



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

### Διπλωματική Εργασία

**Θέμα: «Βιοαποδόμηση γηρασμένων μικροπλαστικών πολυστυρενίου (PS) και πολυπροπυλενίου (PP) μετά από έκθεσή τους σε θαλάσσιους μικροοργανισμούς»**

**Λαζαρίδη Παρασκευούλα**



ΧΑΝΙΑ, 2019

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

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Καλογεράκης Νικόλαος, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Βενιέρη Δανάη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Dr. Συρανίδου Ευδοκία

## Ευχαριστίες

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

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

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Dr. Συρανίδου Ευδοκία, για την καθοδήγηση της και την άψογη συνεργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, χρωστάω στην υποψήφια Διδάκτωρ, Καρκανοραχάκη Κατερίνα, για την πολύτιμη βοήθεια της και την απεριόριστη υπομονή.

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

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υποστήριξή τους και την αγάπη τους και τους ευγνωμονώ που είναι πάντα δίπλα μου.

## Περίληψη

Ένα μεγάλο μέρος των πλαστικών απορριμμάτων καταλήγουν σε θαλάσσιο και παράκτιο περιβάλλον, με ρυθμό που αυξάνεται δραματικά. Αν και η θαλάσσια ρύπανση από πλαστικά αποτέλεσε το αντικείμενο πολλών μελετών, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά κενά στην κατανόηση των συγκεντρώσεων, των χαρακτηριστικών και των επιπτώσεων των πλαστικών στα θαλάσσια οικοσυστήματα. Στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα βυθισμένα πλαστικά καθώς και τα πλαστικά που επιπλέουν στην επιφάνεια της θάλασσας, αποικίζονται από διάφορα μικροβιακά είδη. Η ικανότητα των θαλάσσιων μικροοργανισμών να βιοαποδομήσουν πολυμερή χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα τα ίδια τα πλαστικά, είναι ένα σχετικά καινούριο ερευνητικό πεδίο. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα πλαστικά δεν απομακρύνονται ποτέ πλήρως, αλλά θρυμματίζονται σε μικροπλαστικά εξαιτίας της έκθεσης σε υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, ακραίες θερμοκρασίες, μηχανική καταπόνηση από τα κύματα, τον αέρα και την άμμο καθώς και τη βιολογική δράση. Τα πλαστικά μικροσφαιρίδια αποτελούν ένα από τα συνηθέστερα πλαστικά απορρίμματα που συναντώνται στις θάλασσες και στις ακτές παγκοσμίως.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι η μελέτη της επίδρασης των μικροβιακών κοινοτήτων της πελαγικής κοινότητας της Σούδας, στα μικροσφαιρίδια (pellets) πολυστυρενίου και πολυπροπυλενίου, σε προσομοιωμένο θαλάσσιο περιβάλλον, όπου τα μικροπλαστικά είναι η μόνη πηγή άνθρακα. Τα μικροσφαιρίδια αρχικά, ακτινοβολήθηκαν (UV) ώστε να επιτευχθεί γήρανση των πλαστικών. Μετέπειτα τα γηρασμένα πλαστικά τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες κωνικές φλάσκες με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και εμβολιάστηκαν με τις θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες. Τοποθετήθηκαν σε τράπεζα ανάδευσης για 5 μήνες. Στη συνέχεια, ακολούθησε μία σειρά μετρήσεων του βάρους των μικροπλαστικών, της μικροβιακής ανάπτυξης, της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών και υδατανθράκων στο βιοφίλμ, της ταχύτητας καθίζησης και της κατανομής του μεγέθους μικροπλαστικών πραγματοποιούνταν κάθε μήνα, για την εκτίμηση της επίδρασης των θαλάσσιων μικροοργανισμών στα μικροσφαιρίδια.

Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί κατάφεραν να αναπτυχθούν και να ευδοκιμήσουν επιτυχώς στο προσομοιωμένο θαλάσσιο μικρόκοσμο. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του βάρους κατά τον 5<sup>ο</sup> μήνα που έφτανε για το πολυστυρένιο 1,99% και για το πολυπροπυλένιο 9,65%. Ακόμη, παρατηρήθηκε αύξηση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων. Τέλος, σημειώθηκε μεγάλο ποσοστό νανοσωματιδίων, τον 5<sup>ο</sup> μήνα και για τα δύο είδη μικροπλαστικών και όλα τα παραπάνω υποδηλώνουν την επιτυχή βιοαποδόμηση των μικροσφαιριδίων από τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς.

## **Abstract**

Plastic waste ends up in marine and coastal environment, with increased rate. Although marine pollution from plastics has been the target of many studies, there are still many gaps in understanding the concentrations, characteristics and impacts of plastics on marine ecosystems. In the marine environment, plastics as well as plastic floating on the surface of the sea are colonized by various microbial species. The ability of marine microorganisms to biodegrade polymers using the plastic as the sole carbon source is a relatively new research area. The most commonly used plastics are never completely removed but are dispersed in microplastics due to exposure to ultraviolet (UV) radiation, extreme temperatures, mechanical stress, waves, air and sand as well as biological activity. Plastic microspheres are one of the most common plastic debris found in the world's seas and shores.

The aim of this diploma thesis is to study the impact of the microbial communities of the pelagic community of Souda on microspheres of polypropylene and polystyrene in a simulated marine environment, where microplastics are the only carbon source. The microspheres were initially irradiated (UV) to achieve aging of the plastics. Immediately the pellets were placed in sterile conical flasks with sterile sea water and were inoculated with the marine microbial community. They were placed on a shaker for 5 months. Next, a series of microbial weight, microbial growth, protein and carbohydrates content in biofilm, velocity speed, and microplastic size measurements were performed monthly to assess the effect of marine microorganisms on microspheres.

Marine microorganisms have successfully developed and thrived in the simulated marine microcosm. A significant weight reduction was observed during the 5th month for polystyrene 1.99% and for polypropylene 9.65%. Additionally, increases in protein and carbohydrate concentrations were observed. Finally, a large percentage of nanoparticles were observed, at the 5th month for both microplastics species, and all of this indicates the successful biodegradation of microspheres by marine microorganisms.

## Περιεχόμενα

1.	Εισαγωγή .....	10
1.1.	Πλαστικά στη σύγχρονη ζωή .....	10
1.2.	Επίδραση πλαστικών στους θαλάσσιους βιότοπους.....	12
1.3.	Αποδόμηση πλαστικών .....	13
1.3.1.	Φωτο-Αποδόμηση .....	13
1.3.2.	Χημική Υποβάθμιση .....	15
1.3.3.	Βιοαποδόμηση από μικροοργανισμούς .....	16
1.4.	Μικροπλαστικά.....	17
1.5.	Νανοπλαστικά.....	20
1.6.	Πολυστυρένιο.....	21
1.7.	Πολυπροπυλένιο.....	22
2.	Σκοπός εργασίας.....	24
3.	Υλικά και Μέθοδοι.....	25
3.1.	Υλικά.....	25
3.2.	Μέθοδοι.....	25
3.2.1.	Δειγματοληψία.....	30
3.2.2.	Προσδιορισμός βάρους.....	30
3.2.3.	Εκτίμηση πληθυσμού των μικροβιακών κοινοτήτων.....	31
3.2.4.	Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυμέσων ουσιών.....	33
3.2.4.1.	Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών.....	34
3.2.4.2.	Προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων.....	34
3.2.5.	Εκτίμηση ταχύτητας καθίζησης.....	35
3.2.6.	Εκτίμηση κατανομής μεγέθους μικροπλαστικών.....	36
4.	Αποτελέσματα .....	37
4.1.	Προσδιορισμός βάρους .....	38
4.2.	Μικροβιακή πληθυσμοί .....	39
4.3.	Ολικές πρωτεΐνες .....	42
4.4.	Ολικοί υδατάνθρακες .....	45
4.5.	Ταχύτητα Καθίζησης .....	49
4.6.	Κατανομή μεγέθους μικροπλαστικών .....	50
5.	Συμπεράσματα .....	58
6.	Βιβλιογραφία .....	61

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Ο κύκλος ζωής του πλαστικού. (Πηγή: <a href="http://wwf.org.au">wwf.org.au</a> ) .....	10
Εικόνα 2: Ποσοστό πλαστικών παγκοσμίως. (Πηγή: <a href="http://www.plasticseurope.org">www.plasticseurope.org</a> ) .....	11
Εικόνα 3: Ποσοστιαία παραγωγή πλαστικών στην Ευρώπη. (Πηγή: <a href="http://www.plasticseurope.org">www.plasticseurope.org</a> ) .....	11
Εικόνα 4: Θαλάσσια ρύπανση από πλαστικά. (Πηγή: <a href="http://phys.org">http://phys.org</a> ) .....	12
Εικόνα 5: Επιπτώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς. (Πηγή: <a href="http://blog.nus.edu.sg">http://blog.nus.edu.sg</a> ) ...	12
Εικόνα 6: UVΑκτινοβολία – Ηλεκτρομαγνητικό Φάσμα (Πηγή: <a href="http://users.uoi.gr">http://users.uoi.gr</a> ). ....	15
Εικόνα 7: Στάδια της βιοαποδόμησης του πλαστικού. (Πηγή: <a href="http://oceans.taraexpeditions.org">oceans.taraexpeditions.org</a> ) .....	17
Εικόνα 8: Το μέγεθος των πλαστικών. (Πηγή: <a href="http://www.vox.com">www.vox.com</a> ) .....	18
Εικόνα 9: Πρωτογενή μικροπλαστικά (Πηγή: <a href="http://www.kanali6.com">www.kanali6.com</a> ) .....	19
Εικόνα 10: Δευτερογενή μικροπλαστικά(Πηγή : <a href="https://www.flickr.com">https://www.flickr.com</a> ) .....	19
Εικόνα 11: Ποσοστό απελευθέρωσης πρωτογενών μικροπλαστικών στους ωκεανούς (Πηγή: <a href="http://storyofstuff.org">storyofstuff.org</a> ) .....	20
Εικόνα 12: Απεικόνιση ναυοπλαστικών σε μικροσκόπιο. (Πηγή: <a href="http://en.wikipedia.org">en.wikipedia.org</a> ).....	21
Εικόνα 13: Παγκόσμιος χάρτης που αναφέρει την παρουσία ναυοπλαστικών σε γλυκά ύδατα, εκβολές ποταμών ή θαλάσσια περιβάλλοντα. ( Πηγή: Gray, 2018 ) .....	21
Εικόνα 14: Χημικός μοριακός τύπος πολυστυρενίου. (Πηγή: <a href="http://en.wikipedia.org">en.wikipedia.org</a> ) .....	22
Εικόνα 15: : Χημικός μοριακός τύπος πολυπροπυλενίου. (Πηγή: <a href="http://en.wikipedia.org">en.wikipedia.org</a> ) .....	23
Εικόνα 16: Μικροπλαστικά πολυστυρενίου και προπυλενίου κατά τη ζύγιση.....	26
Εικόνα 17: Αυτόκαυστος κλίβανος αποστείρωσης.....	27
Εικόνα 18: Τυπική μορφή καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών. (Πηγή: <a href="https://eclass.teiath.gr">https://eclass.teiath.gr</a> ) .....	28
Εικόνα 19: UV-Vis φασματοφωτόμετρο.....	29
Εικόνα 20: Κωνικές φλάσκες σε τράπεζα ανάδευσης με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και pellets.....	31
Εικόνα 21: Ζύγιση πολυπροπυλενίου και πολυστυρενίου. ....	32
Εικόνα 22: Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων. (Πηγή: <a href="http://biologylab.eap.gr">http://biologylab.eap.gr</a> ) .....	33
Εικόνα 23: Μέτρηση αποικιών με τρυβλία Petri.....	33
Εικόνα 24: Φιαλίδια με τον σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης της ανθρόνης με τα προϊόντα πέψης των υδατανθράκων. ....	36
Εικόνα 25: Ογκομετρικός κύλινδρος για τη μέτρηση της ταχύτητας καθίζησης .....	37
Εικόνα 26: Σύστημα υπολογισμού διασποράς μεγέθους πλαστικών (Πηγή: <a href="http://www.ssi.shimadzu.com">www.ssi.shimadzu.com</a> ).....	37
Εικόνα 27: Τρυβλία PP και PS με αραιώση $10^{-4}$ .....	40

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Μείωση βάρους PP ανά μήνα. ....	38
Διάγραμμα 2: Μείωση βάρους PS ανά μήνα. ....	39
Διάγραμμα 3: Αριθμός αποικιών στο "Βιοφίλμ" σε μονάδες CFU ανά $\text{cm}^2$ .....	41
Διάγραμμα 4: Αριθμός αποικιών στο "Νερό" σε μονάδες CFU ανά ml.....	42
Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση πρωτεϊνών του PP στο "Βιοφίλμ" .....	43
Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση πρωτεϊνών του PP στο "Νερό" .....	43



Διάγραμμα 7: Συγκέντρωση πρωτεϊνών του PS στο "Βιοφίλμ"	44
Διάγραμμα 8: Συγκέντρωση πρωτεϊνών του PS στο "Νερό"	44
Διάγραμμα 9: Ενεργότητα ενζύμου στο διάστημα του 4 <sup>ου</sup> και 5 <sup>ου</sup> μήνα για το PP και το PS.	45
Διάγραμμα 11: Συγκέντρωση υδατανθράκων του PP στο "Βιοφίλμ"	47
Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση υδατανθράκων του PP στο "Νερό"	47
Διάγραμμα 13: Συγκέντρωση υδατανθράκων του PS στο "Βιοφίλμ"	48
Διάγραμμα 14: Συγκέντρωση υδατανθράκων του PS στο "Νερό"	48
Διάγραμμα 15: Διάγραμμα Ταχύτητας Καθίζησης PS ανά μήνα.	50
Διάγραμμα 16: Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PP αβιοτικών δειγμάτων βάση του αριθμού τους (Number).	51
Διάγραμμα 17: Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PP αβιοτικών δειγμάτων βάση τον όγκο τους (Volume).	52
Διάγραμμα 18: Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PS αβιοτικών δειγμάτων βάση του αριθμού τους (Number).	53
Διάγραμμα 19: Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PS αβιοτικών δειγμάτων βάση τον όγκο τους (Volume).	54
Διάγραμμα 20: Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PP βάση του αριθμού τους ανά μήνα (Number).	55
Διάγραμμα 21: Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PP βάση τον όγκο τους ανά μήνα (Volume).	56
Διάγραμμα 22: Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PS βάση του αριθμού τους ανά μήνα (Number).	57
Διάγραμμα 23: Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PS βάση τον όγκο τους ανά μήνα (Volume).	58

## 1. Εισαγωγή

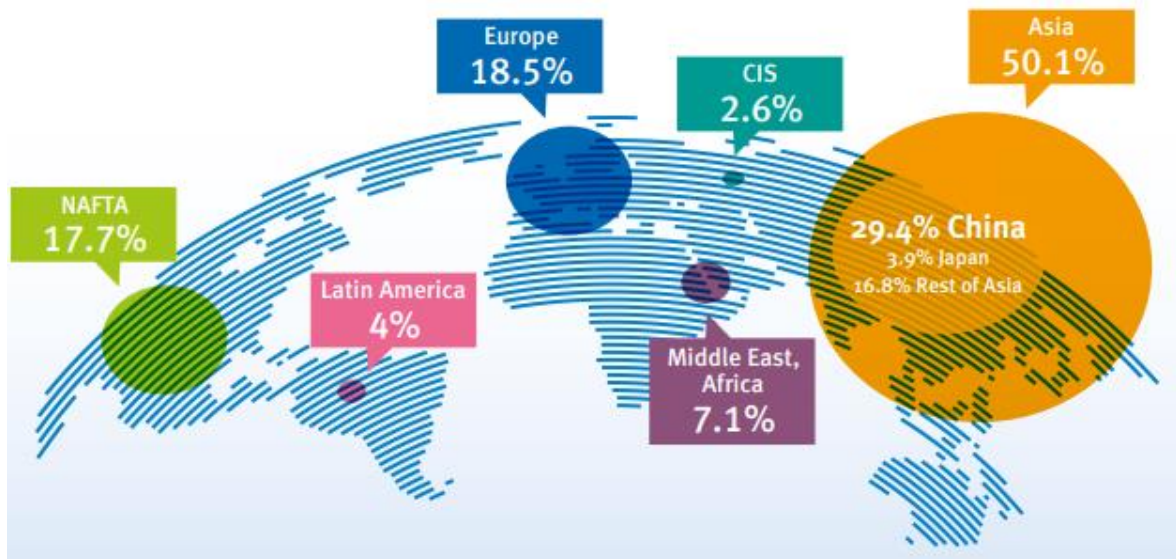
### 1.1. Πλαστικά στη σύγχρονη ζωή

Τα πλαστικά είναι ο όρος που χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει ένα ευρύ φάσμα συνθετικών ή ημισυνθετικών υλικών που χρησιμοποιούνται σε ένα τεράστιο και αυξανόμενο εύρος εφαρμογών. Τα πλαστικά είναι οργανικά υλικά, όπως το ξύλο, το χαρτί ή το μαλλί (PlasticsEurope, 2018). Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πλαστικών είναι φυσικά προϊόντα όπως η κυτταρίνη, ο άνθρακας, το φυσικό αέριο, το αλάτι και, φυσικά, το αργό πετρέλαιο. Τα πλαστικά έχουν γίνει το σύγχρονο υλικό επιλογής, διότι καθιστούν δυνατή την εξισορρόπηση των σημερινών αναγκών με τις περιβαλλοντικές ανησυχίες (PlasticsEurope, 2018). Το πλαστικό είναι ένα υλικό-απόλυτα αποδεκτό σε όλες του τις μορφές, τόσο από τους καταναλωτές, όσο και από τη βιομηχανία. Αυτό οφείλεται στα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει το υλικό αυτό έναντι των άλλων (M. Bergmann, 2015). Τα πλεονεκτήματα αυτά είναι το χαμηλό βάρος του λόγω της σχετικά χαμηλής πυκνότητας των περισσότερων πλαστικών, η μεγάλη αντοχή του, οι εξαιρετικές θερμικές και ηλεκτρικές ιδιότητες μόνωσης (Shaoqing Cui, 2019). Είναι ανθεκτικά στη διάβρωση πολλών ουσιών που προσβάλλουν άλλα υλικά, καθιστώντας τα ανθεκτικά και κατάλληλα για χρήση σε αντίξοες συνθήκες. Το κυριότερο όλων είναι το κόστος τους, είναι το φθηνότερο από όλα τα υλικά, γεγονός που το κάνει δημοφιλή στους καταναλωτές. Από την άλλη το χαμηλό κόστος παραγωγής, οι εξίσου μικρές απαιτήσεις σε πρώτες ύλες και ενέργεια, η απλή παραγωγική διαδικασία, αλλά και η μεγάλη ποικιλία των μορφών και των ειδών του πλαστικού, έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ακμάζουσας βιομηχανίας παραγωγής πλαστικών ειδών, η οποία με τη βοήθεια της συνεχώς αναπτυσσόμενης τεχνολογίας, εμπλουτίζει την παραγωγή νέων πλαστικών ειδών, για την ικανοποίηση των ολοένα και αυξανόμενων αναγκών.

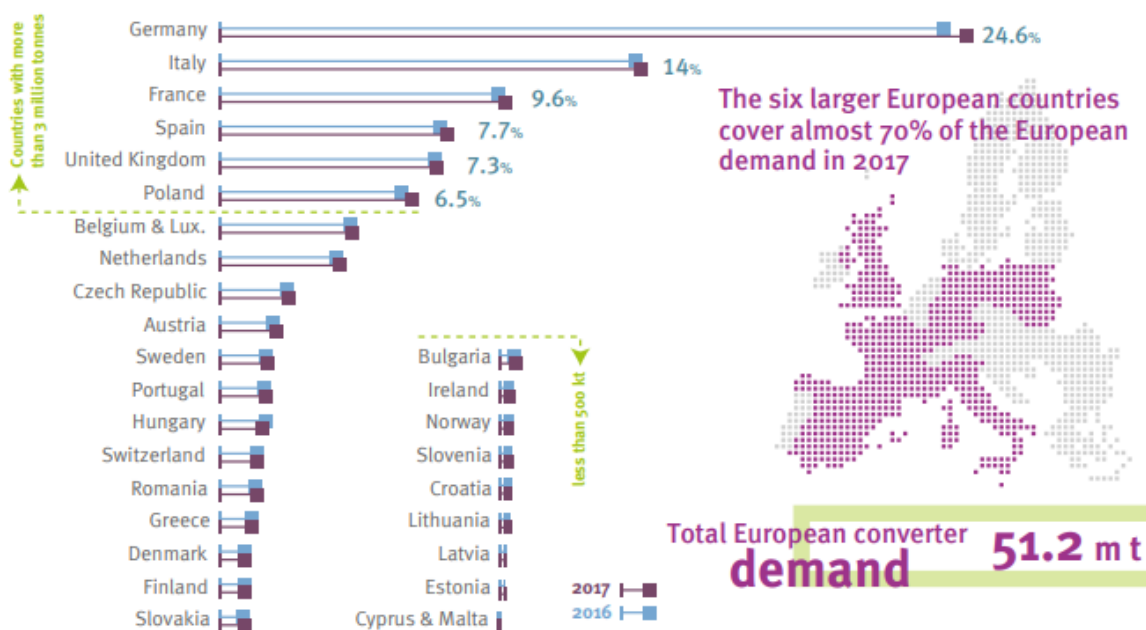


Εικόνα 1: Ο κύκλος ζωής του πλαστικού. (Πηγή: [wwf.org.au](http://wwf.org.au))

Από το 1960 μέχρι το 2017, η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών έχει φτάσει περίπου τα 348 εκατομμύρια τόνους και αναμένεται να διπλασιαστεί την ερχόμενη 20ετία (M. Oliveira, 2019). Η ραγδαία αύξηση της παραγωγής πλαστικών προϊόντων σε συνδυασμό με την πολύ αργή αποδόμησή τους, οδηγεί σε τεράστιες ποσότητες πλαστικών στο φυσικό περιβάλλον (LawK. L., 2017).



Εικόνα 2: Ποσοστό πλαστικών παγκοσμίως. (Πηγή: [www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org))



Εικόνα 3: Ποσοστιαία παραγωγή πλαστικών στην Ευρώπη. (Πηγή: [www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org))

Η Ασία είναι η ήπειρος με τη μεγαλύτερη παραγωγή πλαστικού παγκοσμίως που φτάνει το 50,1%. Συγκεκριμένα, η Κίνα παρασκευάζει το ¼ του πλαστικού σε όλο τον πλανήτη με ποσοστό 29,4%. Δεύτερη σε σειρά έρχεται η Ευρώπη, με ποσοστό 18,5% και ανάμεσα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης κυριαρχεί η Γερμανία με ποσοστό 24,6% λόγω της τεράστιας βιομηχανικής ανάπτυξης της (PlasticsEurope, 2017).

## 1.2. Επίδραση πλαστικών στους θαλάσσιους βιότοπους

Τα πλαστικά αποτελούν πλέον παγκόσμια απειλή για το θαλάσσιο περιβάλλον. Η συσσώρευσή τους στους ωκεανούς σε ολόκληρο τον κόσμο είναι εμφανής και είναι πλέον αποδεδειγμένοι οι κίνδυνοι που μπορούν να προκαλέσουν στην υγεία και στην ποιότητα ζωής τόσο των ανθρώπων όσο και του φυσικού οικοσυστήματος (Ostle Claire, 2019). Εκτιμάται πως το 80-90% των απορριμμάτων στις θάλασσες αποτελείται από πλαστικά υλικά και υπάρχουν μεταξύ 15-51 τρισεκατομμυρίων πλαστικών σωματιδίων που επιπλέουν στην επιφάνεια των ωκεανών.



Εικόνα 4: Θαλάσσια ρύπανση από πλαστικά. (Πηγή: <http://phys.org>)



Εικόνα 5: Επιπτώσεις στους θαλάσσιους οργανισμούς. (Πηγή: <http://blog.nus.edu.sg>)



Κάποιες από τις επιπτώσεις που προκαλούν τα πλαστικά στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι η υποβάθμιση των οικοσυστημάτων, η ρύπανση του περιβάλλοντος καθώς και ότι θέτουν σε κίνδυνο τους θαλάσσιους οργανισμούς μέσω της κατάποσης, της ασφυξίας και της παγίδευσής τους (Lacerda, 2019). Οι επιπτώσεις ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο και το μέγεθος των αντικειμένων των θαλάσσιων απορριμμάτων και των οργανισμών (Dias and Lovejoy, 2012). Τα πλαστικά απορρίμματα που βρίσκονται είτε στην ακτή είτε στο βυθό ή στην επιφάνεια της θάλασσας παγιδεύουν τα ζώα ενώ μπορεί να προκαλέσουν και την ακινητοποίηση τους. Με αυτό τον τρόπο τα ζώα δεν έχουν τη δυνατότητα διαφυγής από τους θηρευτές τους ή δεν μπορούν να κολυμπήσουν για να αναζητήσουν τροφή, με αποτέλεσμα να πεθαίνουν από αστία (Werner et al., 2016). Επίσης, στο θαλάσσιο περιβάλλον συναντώνται πλαστικά που χρησιμοποιούνται ως τεχνητό υπόστρωμα για τη σταθεροποίηση των οργανισμών. Η υδρόφοβη φύση των πλαστικών διεγείρει τον σχηματισμό βιοφίλμ και επιτρέπει την εποίκησή τους από πολυάριθμους οργανισμούς που αποτελούν ένα νέο θαλάσσιο οικοσύστημα που ονομάζεται "Plastisphere" και απαρτίζεται από διαφορετικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ιών, των μυκήτων, των μακροφυκών, των μαλακίων, των καρκινοειδών και των ψαριών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών που μπορεί να προκαλέσουν ασθένεια στα ζώα και κατ' επέκταση στους ανθρώπους (Lacerda, 2019).

### **1.3. Αποδόμηση πλαστικών**

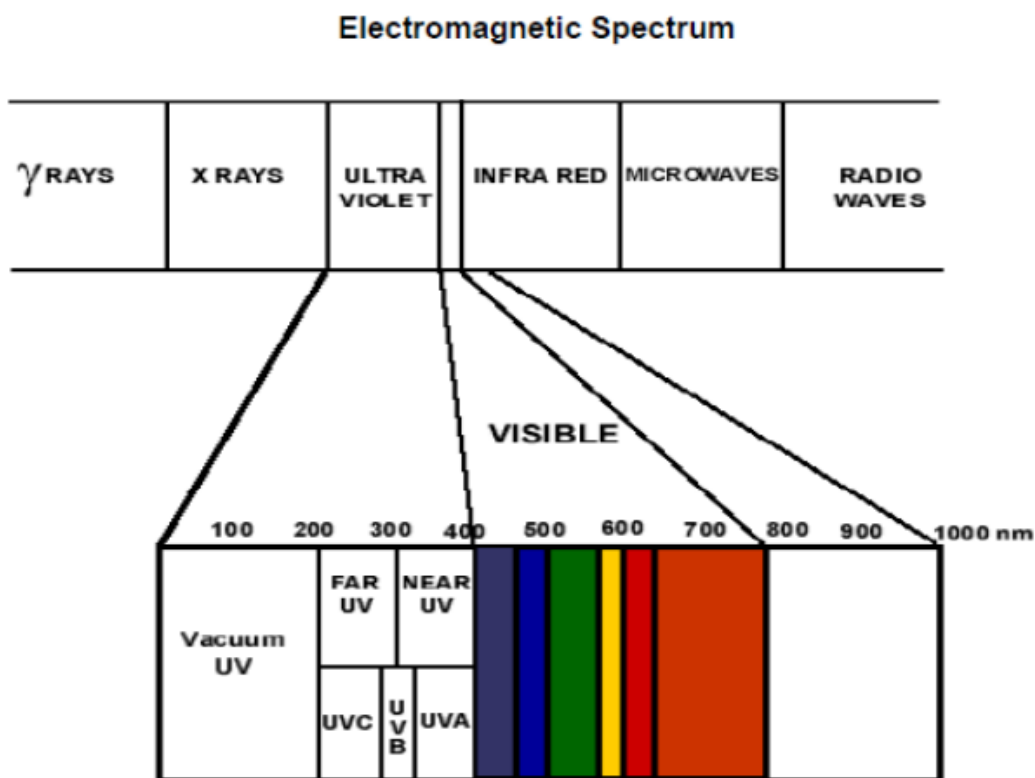
Υπάρχουν πλέον ανησυχίες για τη ρύπανση από τα πλαστικά. Είναι απαραίτητο να γίνουν κατανοητές οι δυνατότητες υποβάθμισης των πλαστικών στο περιβάλλον και συγκεκριμένα στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η πλαστική αποδόμηση ορίζεται ως οποιαδήποτε φυσική ή χημική μεταβολή στο πολυμερές που προκύπτει από το φως, τη θερμότητα, την υγρασία, τη χημική δράση ή τη βιολογική δραστηριότητα που οδηγεί σε μείωση του μέσου μοριακού βάρους των πλαστικών. Η πλαστική αποδόμηση έχει ως αποτέλεσμα τον κατακερματισμό των μεγαλύτερων πλαστικών σωματιδίων σε μικρότερα πλαστικά σωματίδια με συνδυασμό αβιοτικών, όπως ακτινοβολία με υπεριώδη ακτινοβολία και βιοτικών παραγόντων, όπως εξωκυτταρική, ενζυματική δράση (Lucas, 2008). Ένας άλλος παράγοντας που περιπλέκει την έρευνα της αποδόμησης των πλαστικών είναι η πολυπλοκότητα των πλαστικών υλικών όσον αφορά τις πιθανές δομές και συνθέσεις, καθιστώντας τη διαδικασία αυτή αρκετά δύσκολη. Η αβιοτική αποδόμηση και η βιοαποδόμηση συνήθως εξετάζονται χρησιμοποιώντας φυσικές μεθόδους (Palm, G.J., 2019). Οι σημαντικότερες διεργασίες που μπορούν να αναφερθούν για την αποδόμηση των πλαστικών παρουσιάζονται παρακάτω.

#### **1.3.1. Φώτο-Αποδόμηση**

Η ακτινοβολία UV αποτελεί τον σημαντικότερο περιοριστικό παράγοντα του χρόνου ζωής ενός πολυμερούς, ιδιαίτερα όταν αυτό εφαρμόζεται σε εκτεθειμένες στον ήλιο επιφάνειες (όπως συμβαίνει σε διαφανή πάνελ που χρησιμοποιούνται στην οικοδομική). Με την επίδραση της UV ακτινοβολίας, λαμβάνουν χώρα φυσικές και χημικές μεταβολές στη δομή του πολυμερούς, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση των ιδιοτήτων του. Τα εμπορικά πλαστικά υλικά, πέραν των άλλων προσθέτων, συχνά περιέχουν και σταθεροποιητές

έναντι της UV ακτινοβολίας. Ο προσδιορισμός του χρόνου ζωής ενός πλαστικού υλικού που εκτίθεται σε πραγματικές συνθήκες όπως ηλιακής ακτινοβολίας, της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, έχει ιδιαίτερη σημασία, ώστε να ικανοποιούνται τα απαιτούμενα λειτουργικά χαρακτηριστικά του πλαστικού στην πράξη. Από την άλλη μεριά, κυρίως για υλικά που η προοπτική εφαρμογής τους γίνεται με ορίζοντα δεκαετίας, προκειμένου να έχει κανείς έγκαιρα αντίστοιχες πληροφορίες, απαιτούνται κατάλληλοι έλεγχοι επιταχυνόμενης «γήρανσης», προσομοιάζοντας την μακρόχρονη επίδραση του περιβάλλοντος και ειδικότερα της ηλιακής ακτινοβολίας.

Η φωτο-αποδόμηση είναι ο κυρίαρχος τρόπος υποβάθμισης των περισσότερων πλαστικών υπολειμμάτων που βρίσκονται σε θάλασσες και ακτές. Το εύρος της υπεριώδους ακτινοβολίας (10-400 nm) του ηλιακού φωτός παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των πλαστικών μέσω της φωτοοξειδωτικής αποδόμηση κοινών πολυμερών, όπως το LDPE, το HDPE, το πολυπροπυλένιο και τα νάυλον που εκτίθενται στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η αρχική φωτοχρωστική αποδόμηση των θαλάσσιων πλαστικών θραυσμάτων αρχίζει συνήθως στην εξωτερική επιφάνεια του πλαστικού. Αυτή η τοπική υποβάθμιση οφείλεται στον υψηλό συντελεστή απόσβεσης της ακτινοβολίας UV-B στα πλαστικά, στην ελεγχόμενη από διάχυση φύση της αντίδρασης οξειδωτικής και στην παρουσία υλικών πληρώσεως που εμποδίζουν τη διάχυση οξυγόνου στο πλαστικό. Η υποβάθμιση της επιφάνειας λαμβάνει τη μορφή αποχρωματισμού, τριβής ή ρωγμών, διάβρωσης ή θραυσμάτων. Αυτή η υποβαθμισμένη επιφάνεια είναι επιρρεπής σε θραύση λόγω της υγρασίας και των μεταβολών της θερμοκρασίας καθώς και λόγω της τριβής με την άμμο, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε θρυμματισμό πλαστικών σε μικρότερα τεμάχια (Andrady, 1994). Η ένταση της φωτοαποδόμησης εξαρτάται κυρίως από την παρουσία εντός του πολυμερούς δομών απορρόφησης φωτός. Τα πολυμερή που περιέχουν αρωματικές ή καρβονυλικές ομάδες είναι πιθανό να απορροφήσουν το ηλιακό φως (μήκος κύματος  $\lambda > 290$  nm) και συνήθως γίνονται φωτοευαίσθητα υλικά. Ωστόσο, τα πολυμερή που δεν διαθέτουν ομάδα χρωμοφόρου που απορροφά πάνω από 250 nm, όπως τα πολυαιθυλένια, εξακολουθούν να υποβαθμίζονται από το ηλιακό φως κατά τη διάρκεια της εξωτερικής έκθεσης. Αυτή η συμπεριφορά αποδίδεται στην παρουσία ομάδων χρωμοφόρου που απορροφούν την ηλιακή ακτινοβολία είτε ως προσμίξεις (κατάλοιπα καταλύτη, οργανικές ουσίες και προϊόντα θερμικής οξειδωτικής, όπως υδροϋπεροξειδία) είτε ως λειτουργικές ομάδες ενσωματωμένες στο πολυμερές. Στην πραγματικότητα, πολλά αλειφατικά πολυμερή είναι πιο ευαίσθητα στην υπεριώδη ακτινοβολία από ότι τα περισσότερα αρωματικά πολυμερή, παρά το γεγονός ότι είναι ικανά να απορροφούν πολύ περισσότερη ακτινοβολία (Oliviero, 2019).



Εικόνα 6: Ακτινοβολία UV – Ηλεκτρομαγνητικό Φάσμα (Πηγή: <http://users.uoi.gr>).

### 1.3.2. Χημική Υποβάθμιση

Η χημική υποβάθμιση υπεισέρχεται ως αλλαγή της μοριακής δομής λόγω των υψηλών θερμοκρασιών. Όσο πιο υψηλή η θερμοκρασία τόσο πιο μεγάλο το ποσοστό γήρανσης. Σε υψηλές θερμοκρασίες τα μέρη της μεγάλης αλυσίδας των πολυμερών μπορεί να αποχωριστούν (διάρρηξη δεσμών) και να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, αλλάζοντας τις ιδιότητες του πολυμερούς. Είναι μία μη αναστρέψιμη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει:

- Απόσχιση των αλυσίδων
- Επιπλέον σταυροειδείς δεσμούς
- Υδρόλυση
- Αποπολυμερισμός
- Πλαστικοποίηση
- Οξειδωση

Η υδρόλυση και η οξειδωση είναι οι δύο πιο πιθανοί μηχανισμοί χημικής υποβάθμισης των πολυμερών. Η οξειδωση οδηγεί σε διάρρηξη των χημικών δεσμών, δηλαδή μείωση του μοριακού βάρους, αλλαγές στις μηχανικές ιδιότητες, και μείωση της μάζας λόγω εξάτμισης των παραπροϊόντων οξειδωσης. Η θερμο-οξειδωση είναι πολύ σημαντική όταν αυξάνεται η θερμοκρασία και ο χρόνος έκθεσης. Η υδρόλυση είναι ένας μηχανισμός που επιτυγχάνεται με πιο αργούς ρυθμούς στο θαλάσσιο περιβάλλον και δε συμβάλλει σημαντικά στην αποδόμηση των πλαστικών. Κατά τη διαδικασία της υδρόλυσης, προστίθεται μόρια νερού ( $H_2O$ ) στο μακρομόριο κυρίως των εστερικών ομάδων της

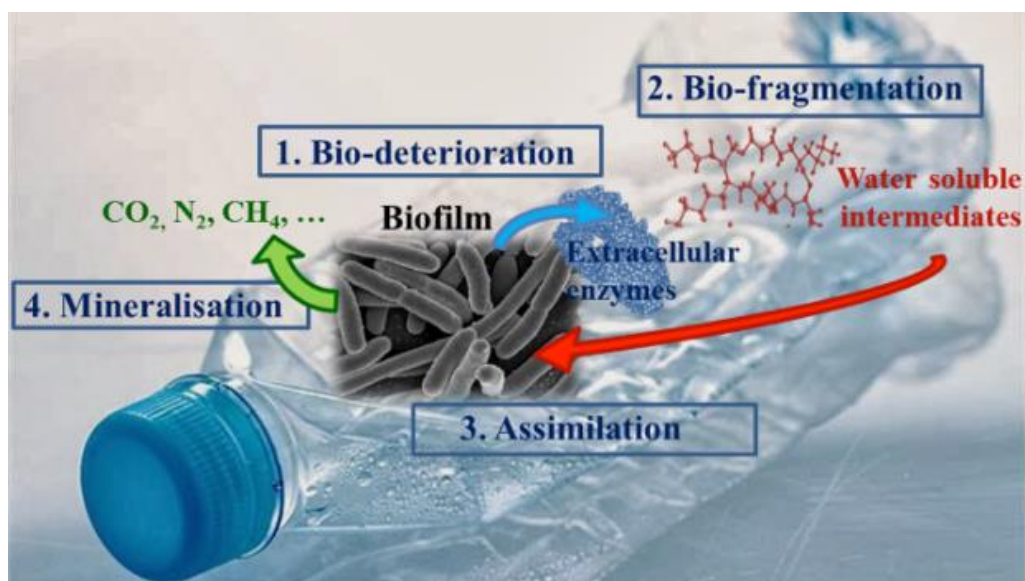
άμορφης περιοχής του πολυμερούς με αποτέλεσμα να διασπάται η αλυσίδα του και να δημιουργούνται δύο ή περισσότερες αλυσίδες (Ioakeimidis et al. 2016)

### 1.3.3. Βιοαποδόμηση από μικροοργανισμούς

Η βιοαποδόμηση ή βιοτική αποδόμηση είναι χημική αποδόμηση που γίνεται από τη δράση μικροοργανισμών όπως βακτήρια, μύκητες ή άλγη. Ο ρυθμός με τον οποίο γίνεται η βιοαποδόμηση στο έδαφος εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, τα επίπεδα της υγρασίας, η ατμοσφαιρική πίεση, το οξυγόνου, η συγκέντρωση οξέων και μετάλλων και ο βαθμός έκθεσης στο φως. Παράγοντες που σχετίζονται με τους μικροοργανισμούς περιλαμβάνουν την συγκέντρωσή τους, αν αυτοί έχουν ή όχι ένζυμα τα οποία χρησιμοποιούν το πολυμερές ως υπόστρωμα, τη συγκέντρωση των ενζύμων, την παρουσία θρεπτικών υλικών και την παρουσία παρεμποδιστών ή ανταγωνιστών. Ακόμη, ο ρυθμός βιοαποδόμησης εξαρτάται ιδιαίτερα από τη σύσταση του πολυμερούς μιας και αυτό αποτελεί υπόστρωμα για τα ένζυμα. Η φύση των διακλαδώσεων στην ανθρακική αλυσίδα και η στερεοδιάταξη ενδιαφέρει ιδιαίτερα τους μηχανισμούς βιοαποδόμησης, επειδή τα ένζυμα είναι εκλεκτικά σε κάποιο ιδιαίτερο τύπο διακλαδισμένης αλυσίδας και στερεοδιάταξης. Κάτω από εξαιρετικά δυσμενείς συνθήκες ο ρυθμός της βιοαποδόμησης μπορεί να μειωθεί και να φτάσει στο μηδέν. Χαμηλές ή πολύ υψηλές θερμοκρασίες παρεμποδίζουν την αποικοδόμηση. Η υγρασία είναι, επίσης, μία σημαντική παράμετρος και βοηθά την υδρολυτική αποδόμηση. Ο αερισμός συμβάλλει στην οξειδωτική αποικοδόμηση και ο βαθμός αερισμού καθορίζει αν η αποδόμηση θα γίνει αερόβια ή αναερόβια ή και τα δύο. Η αποδόμηση επίσης απαιτεί το έδαφος να είναι μικροβιακά ενεργό, ο ρυθμός της αποδόμησης μειώνεται σε ένα στείρο περιβάλλον, όταν η συγκέντρωση των μικροοργανισμών είναι πολύ χαμηλή (Lucas, 2008).

Οι μικροοργανισμοί βοηθούν την αποσύνθεση της οργανικής ύλης και σε θαλάσσιο περιβάλλον. Μέσω της φυσικής αποσύνθεσης τα άτομα του άνθρακα επιστρέφουν στο οικοσύστημα και γίνονται πάλι διαθέσιμα για τα φυτά ώστε να επαναπροσληφθούν με τη διαδικασία της αποσύνθεσης. Τα ζώα με την πρόσληψη τροφής μέσω της αναπνοής, των απεκκρίσεων και της τελικής αποσύνθεσης τους είναι μέρος της ισορροπημένης ανταλλαγής άνθρακα. Αυτές οι διαδικασίες αποτελούν τον κύκλο του άνθρακα (**Franziska Klaeger**, 2019). Η βιοαποδόμηση γενικά θεωρείται ότι περιλαμβάνει ενζυματικές και μη ενζυματικές υδρολύσεις. Η ενζυματική αποδόμηση γίνεται είτε με την παρουσία εξωκυτταρικών ενζύμων στο περιβάλλον των μικροοργανισμών ή με ενδοκυτταρικά ένζυμα. Και στις δύο περιπτώσεις η πολυμερική αλυσίδα διασπάται σε μικρότερα τμήματα. Τα ένζυμα μπορεί να είναι είτε ενδοένζυμα, που σπάζουν εσωτερικούς δεσμούς μέσα στην αλυσίδα, είτε εξωένζυμα που διασπούν τις τελικές μονάδες των μονομερών διαδοχικά. Τα ενδοένζυμα σπάζουν τους δεσμούς της αλυσίδας σε τυχαίες θέσεις και αυτό συνεπάγεται την ταχεία μείωση του μοριακού βάρους (M. Karimi & D.Biria, 2019). Η συνεχής διάσπαση των παραγόμενων θραυσμάτων οδηγεί σε λιγότερες αλλαγές στο μοριακό βάρος. Όταν η αρχική θραυσματοποίηση είναι εξωκυτταρική, τα θραύσματα του πολυμερούς μπορεί σε κάποιο σημείο να είναι τόσο μικρά, ώστε να μεταφερθούν στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου η αποδόμηση συνεχίζεται ως την πλήρη ανοργανοποίηση. Αυτό μπορεί να γίνει από τον ίδιο οργανισμό που παρέχει τα εξωκυτταρικά ένζυμα για την αρχική θραυσματοποίηση ή από άλλους οργανισμούς ([chemtube.gr](http://chemtube.gr)).





Εικόνα 7: Στάδια της βιοαποδόμησης του πλαστικού. (Πηγή: oceans.taraexpeditions.org)

#### 1.4. Μικροπλαστικά

Η παρουσία μικροπλαστικών σωματιδίων στο περιβάλλον αναφέρθηκε για πρώτη φορά στη δεκαετία του 1970, αλλά αναγνωρίστηκε πρόσφατα ως παγκόσμιο ζήτημα. (M. Oliveira, 2019) Τα μικροπλαστικά πλέον βρίσκονται σε θαλάσσια οικοσυστήματα σε όλο τον κόσμο, συμπεριλαμβανομένων απομακρυσμένων και δυσπρόσιτων περιοχών, όπως η Αρκτική (Lusher et al, 2015). Τα μικροπλαστικά ορίζονται ως πλαστικά με διάμετρο μικρότερη από 5 mm που δεν είναι ορατά με γυμνό μάτι. Πρόσφατες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι, σε πολλές περιπτώσεις, οι πλαστικές ίνες είναι το κυρίαρχο είδος που βρίσκεται στο θαλασσινό περιβάλλον (GESAMP, 2016). Τα μικροπλαστικά που εντοπίζονται συχνότερα είναι το πολυστυρένιο (PS), το πολυπροπυλένιο (PP), το πολυαιθυλένιο (PE), η πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), το πολυαμίδιο (PA), το πολύβινυλοχλωρίδιο (PVC) και το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) (Courtene-Jones et, 2017).



Εικόνα 8: Το μέγεθος των πλαστικών. (Πηγή: [www.vox.com](http://www.vox.com))

Τα μικροπλαστικά διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες στα πρωτογενή και στα δευτερογενή μικροπλαστικά.

- Πρωτογενή μικροπλαστικά θεωρούνται τα πλαστικά που απελευθερώνονται στο περιβάλλον απευθείας με τη μορφή μικρών σωματιδίων. Περιέχονται σε προϊόντα καθημερινής περιποίησης και καλλυντικά (π.χ. οδοντόκρεμα, αφρός ξυρίσματος, κρέμες απολέπισης, αντηλιακά, σαμπουάν, αποσμητικά κ.λπ.), καθώς επίσης εμπεριέχονται σαν συνθετικές μικροΐνες στα συνθετικά υφάσματα και απελευθερώνονται κατά την πλύση (Zitko and Hanlon 1991). Η διάμετρός τους είναι περίπου ίση με 5,0 mm και περιλαμβάνουν τις μικροΐνες από ρούχα, μικροσφαιρίδια και πλαστικά σφαιρίδια.



Εικόνα 9: Πρωτογενή μικροπλαστικά (Πηγή: [www.kanali6.com](http://www.kanali6.com))

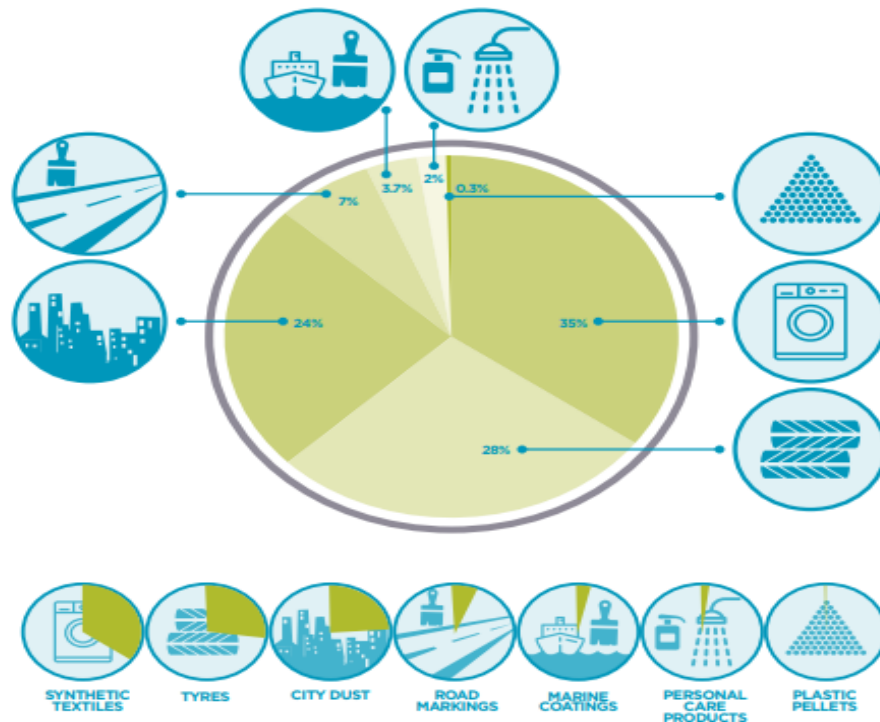
- Δευτερογενή μικροπλαστικά είναι εκείνα που δημιουργούνται από την αποδόμηση των μεγαλύτερων πλαστικών προϊόντων, όπως πλαστικά μπουκάλια νερού και σόδας, δίχτυα αλιείας και πλαστικές σακούλες. Και οι δύο κατηγορίες μικροπλαστικών παραμένουν στο φυσικό περιβάλλον σε υψηλά επίπεδα και κυρίως στις θάλασσες.



Εικόνα 10: Δευτερογενή μικροπλαστικά(Πηγή : <https://www.flickr.com>)

Άλλες πηγές μικροπλαστικών είναι τα :

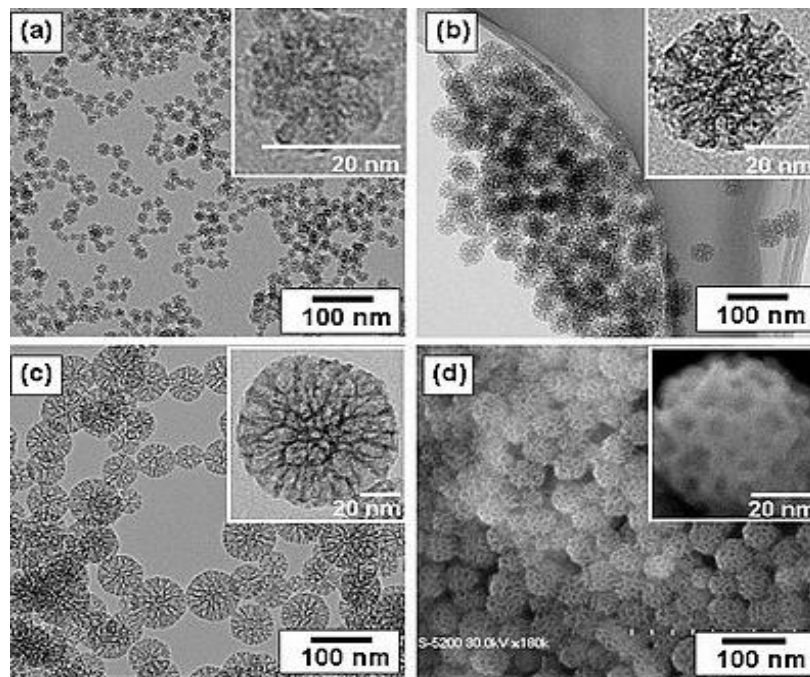
- Βιομηχανικά προϊόντα: καταλήγουν άμεσα ή έμμεσα στους θαλάσσιους υγροβιότοπους από αμέτρητες πηγές.
- Συνθετικά ενδύματα: Τα συνθετικά ενδύματα είναι κατασκευασμένα από συνθετικές ίνες από πλαστικό. Εκτιμάται ότι ένα μόνο συνθετικό ρούχο απελευθερώνει σε κάθε πλύση περίπου 1900 μικροπλαστικές ίνες στο περιβάλλον, οι οποίες συνήθως καταλήγουν στη θάλασσα.



Εικόνα 11: Ποσοστό απελευθέρωσης πρωτογενών μικροπλαστικών στους ωκεανούς (Πηγή: storyofstuff.org)

### 1.5. Νανοπλαστικά

Τα νανοπλαστικά είναι τα σωματίδια με μέγεθος που κυμαίνεται από 1-100 nm (Gigault et al., 2018). Ο σχηματισμός νανοσωματιδίων αλλάζει τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά του σωματιδίου και κατά συνέπεια τη διαθεσιμότητα και τη βιολογική επίδρασή του στους υδρόβιους οργανισμούς (Mattsson et al., 2015). Τα νανοπλαστικά έχουν αρκετά μεγαλύτερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο από τα μεγαλύτερα σωματίδια (Chemosphere, 2019). Ανιχνεύονται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και συλλέγονται με τη χρήση νανοφίλτρων. Η ποσότητα των νανοπλαστικών που βρίσκονται στο θαλάσσιο περιβάλλον παραμένει άγνωστη, διότι η συλλογή τους είναι μια εξαιρετικά δύσκολη διαδικασία. Τα νανοπλαστικά μπορούν να γίνουν τροφή για τα μονοκύτταρα πρωτόζωα και έτσι σιγά σιγά να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα φτάνοντας και στον τελικό αποδέκτη που είναι άνθρωπος (Worm et al., 2017).



Εικόνα 12: Απεικόνιση νανοπλαστικών σε μικροσκόπιο. (Πηγή: en.wikipedia.org)



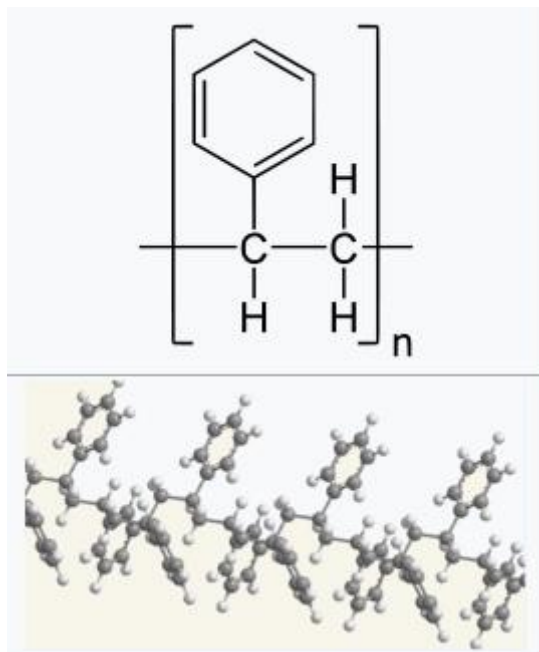
Εικόνα 13: Παγκόσμιος χάρτης που αναφέρει την παρουσία νανοπλαστικών σε γλυκά ύδατα, εκβολές ποταμών ή θαλάσσια περιβάλλοντα. ( Πηγή: Gray, 2018 )

## 1.6. Πολυστυρένιο

Το πολυστυρένιο ανακαλύφθηκε το 1839 από τον Eduard Simon, φαρμακοποιό από το Βερολίνο και θεωρείται ένα από τα παλαιότερα θερμοπλαστικά. Είναι ένας συνθετικός, αρωματικός υδρογονάνθρακας, ο οποίος παράγεται από το μονομερές στυρένιο. Είναι ένα άμορφο, διαυγές και μη πολικό θερμοπλαστικό. Μπορεί να είναι σε στερεή ή αφρώδης μορφή και έχει σχετικά χαμηλό σημείο τήξης. Σε θερμοκρασία δωματίου παραμένει στερεό, αλλά λιώνει σε θερμοκρασίες πάνω από 100°C και επανέρχεται στην



αρχική του μορφή όταν κρυώσει. Το πολυστυρένιο είναι χημικά αδρανές, ανθεκτικό σε οξέα και βάσεις, αλλά διαλύεται εύκολα από πολλούς χλωριωμένους διαλύτες και πολλούς διαλύτες αρωματικών υδρογονανθράκων (Wikipedia).



Εικόνα 14: Χημικός μοριακός τύπος πολυστυρενίου. (Πηγή: en.wikipedia.org)

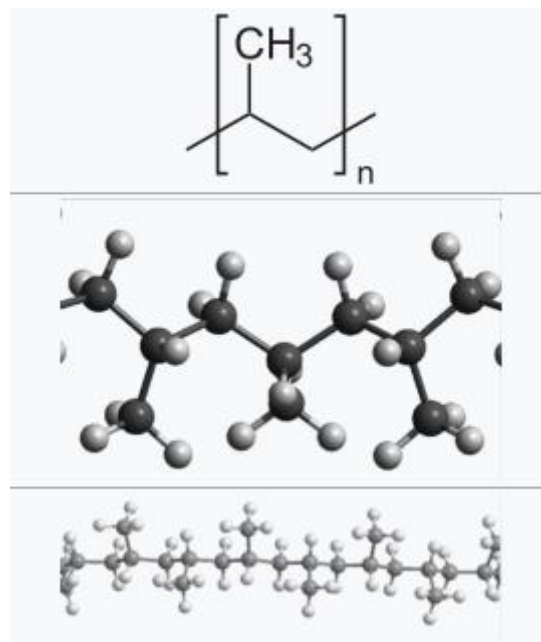
Οι τρεις πιο σημαντικές κατηγορίες πολυστυρενίου είναι:

- **GPPS:** Πολυστυρένιο γενικής χρήσης, γνωστό και ως κρυσταλλικό πολυστυρένιο, είναι ένα πλήρως διαφανές, άκαμπτο και μάλλον εύθραυστο θερμοπλαστικό χαμηλού κόστους κατασκευασμένο από μονομερές στυρενίου. Το GPPS είναι ένα στερεό προϊόν που κατασκευάζεται με τη μορφή σφαιριδίων 2-5 mm.
- **HIPS:** Το πολυστυρένιο υψηλής αντοχής περιέχει συνήθως καουτσούκ 5 έως 10% (βουταδιένιο) και χρησιμοποιείται για εξαρτήματα που απαιτούν υψηλή αντοχή στην κρούση.
- **EPS:** Το διογκούμενο πολυστυρένιο αποτελείται από μικροσφαιρίδια ή σφαιρίδια που περιέχουν έναν παράγοντα εμφύσησης (συνήθως πεντάνιο). Το διογκωμένο ή αφρώδες πολυστυρένιο είναι θερμομονωτικό, έχει υψηλή αντοχή στην κρούση και είναι εύκολο στην επεξεργασία.

Το πολυστυρένιο είναι ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα πλαστικά, ενώ η κλίμακα της παραγωγής του φτάνει μερικά εκατομμύρια τόνους ετησίως. Οι χρήσεις του περιλαμβάνουν κυρίως προστατευτικές συσκευασίες (όπως πλαστικά μπολ, συσκευασίες τροφίμων, θήκες CD και DVD), δοχεία, καπάκια, μπουκάλια, δίσκους, ποτήρια, αναλώσιμα μαχαιροπέρουνα και πιάτα, παιχνίδια.

## 1.7. Πολυπροπυλένιο

Το πολυπροπυλένιο (άμορφο) ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα το 1950 από τον Fontana, ενώ η σύνθεση του ισοστατικού πολυπροπυλενίου το οποίο έχει βιομηχανικές εφαρμογές, έγινε το 1954 από τον Giulio Natta. Το πολυπροπυλένιο ανήκει στην ομάδα των πολυολεφινών και είναι κρυσταλλικό και μη πολικό. Οι ιδιότητές του είναι παρόμοιες με το πολυαιθυλένιο, αλλά είναι ελαφρώς πιο σκληρές και ανθεκτικές στη θερμότητα. Είναι λευκό, ανθεκτικό υλικό και έχει υψηλή χημική αντοχή. Το εμπορικό ισοτακτικό PP έχει σημείο τήξης που κυμαίνεται από 160 έως 166 ° C που είναι ανάλογο με το υλικό και την κρυσταλλικότητα ([Wikipedia](#)).



Εικόνα 15: : Χημικός μοριακός τύπος πολυπροπυλενίου. (Πηγή: [en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org))

Παρατηρούνται πολλά διαφορετικά είδη πολυπροπυλενίου. Κάποια από αυτά είναι:

- **Ισοτακτικό πολυπροπυλένιο (iPP):** Το ισοτακτικό πολυπροπυλένιο μπορεί να υπάρχει σε διάφορες κρυσταλλικές τροποποιήσεις οι οποίες διαφέρουν από τη μοριακή διάταξη των πολυμερών αλυσίδων.
- **Σύνθετο πολυπροπυλένιο (sPP):** Το σύνθετο πολυπροπυλένιο ανακαλύφθηκε πολύ αργότερα από το ισοτακτικό PP και μπορούσε να παρασκευαστεί μόνο με τη χρήση καταλυτών μεταλλοκενίου.
- **Ατακτικό πολυπροπυλένιο (aPP):** Το ατακτικό πολυπροπυλένιο είναι άμορφο και δεν έχει κρυσταλλική δομή γι' αυτό είναι εύκολος διαλύτης ακόμη και σε μέτριες θερμοκρασίες. Έχει χαμηλή πυκνότητα, σημείο τήξης και θερμοκρασία σε σχέση με τους κρυσταλλικούς τύπους και είναι κολλώδες σε θερμοκρασία δωματίου (καούτσουκ).

Το πολυπροπυλένιο χρησιμοποιείται στα συστήματα κατασκευής σωληνώσεων λόγω της αντοχής και ακαμψίας του (χρήση σε υδραυλικά συστήματα, υδραυλική θέρμανση και ψύξη και ανακυκλώσιμο νερό). Πολλά πλαστικά αντικείμενα για ιατρική ή εργαστηριακή χρήση μπορούν να κατασκευαστούν από πολυπροπυλένιο λόγω της

αντοχής του στη θερμότητα. Επίσης, κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα (π.χ., σχοινιά, χαλιά κλπ) είναι κατασκευασμένα από πολυπροπυλένιο, καθώς και χαρτικά, πλαστικά μέρη και επαναχρησιμοποιούμενα δοχεία διάφορων τύπων και εξαρτήματα αυτοκινήτων (**Wikipedia**).



## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της ικανότητας θαλάσσιων μικροοργανισμών που έχουν συλλεχθεί από την πελαγική ζώνη του κόλπου της Σούδας στα Χανιά, να βιοαποδομήσουν pellets πολυστυρενίου (PS) και πολυπροπυλενίου (PP), σε προσομοιωμένο θαλάσσιο μικρόκοσμο.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### Πειραματική Διαδικασία

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος.

##### 3.1. Υλικά

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη μικροπλαστικών, το πολυστυρένιο και το πολυπροπυλένιο, σε μορφή σφαιριδίων (pellets). Η διάμετρος των pellets είναι κατά μέσο όρο ίση με 0,3cm και το σχήμα τους είναι σφαιρικό. Τα πλαστικά αρχικά ακτινοβολήθηκαν σε UV-A ακτινοβολία για διάστημα 4 μηνών. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε από τη φοιτήτρια Μαρία Λώλη στα πλαίσια της διπλωματικής της εργασίας.



Εικόνα 16: Μικροπλαστικά πολυστυρενίου και προπυλενίου κατά τη ζύγιση.

##### 3.2. Μέθοδοι

###### Προετοιμασία Δειγμάτων

Για την προετοιμασία του πειράματος έγινε χρήση 28 κωνικών φλασκών των 250ml, 12 για το πολυστυρένιο και 12 για το πολυπροπυλένιο, καθώς και 2 φλάσκες για το κάθε είδος πλαστικού ως αβιοτικά δείγματα ελέγχου. Σε κάθε φλάσκα τοποθετήθηκαν 100ml φιλτραρισμένο, αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και 0,5gr μικροπλαστικών του αντίστοιχου είδους.

Το θαλασσινό νερό καθώς και οι φλάσκες είχαν αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο κλίβανο πριν τη χρήση. Επίσης, τα πλαστικά πριν τοποθετηθούν στις φλάσκες αποστειρώθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 70%. Τέλος, τα πλαστικά τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης στους 37°C για 3 ημέρες.

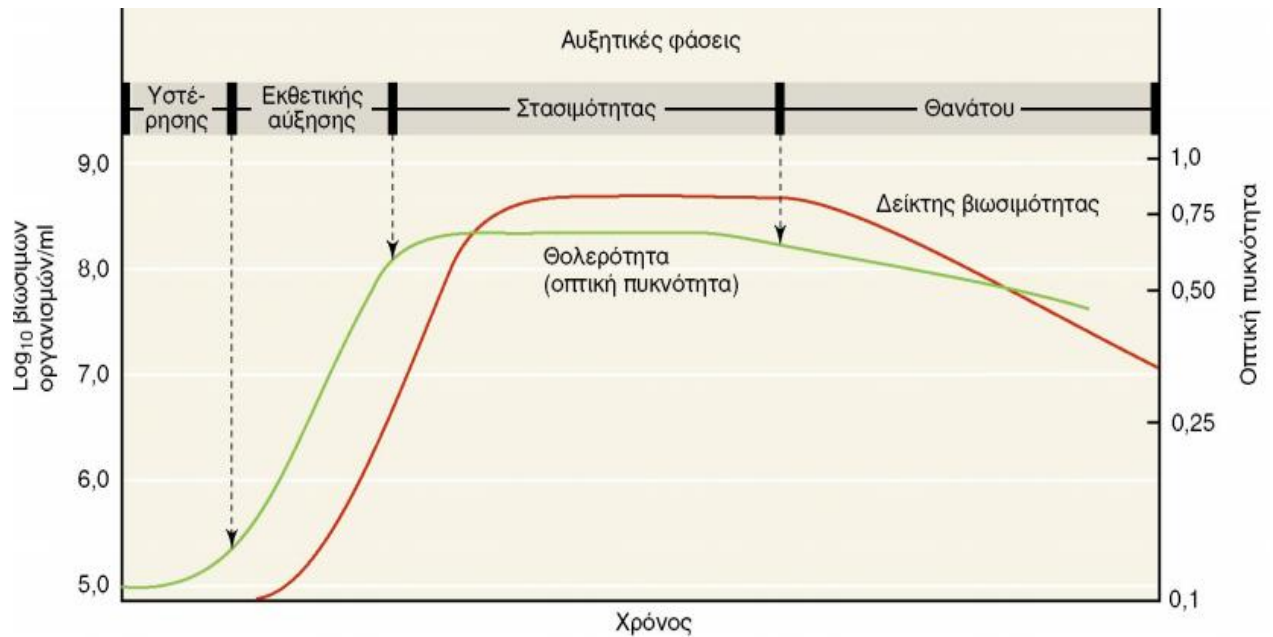


**Εικόνα 17: Αυτόκαυστος κλίβανος αποστείρωσης.**

#### Ανάπτυξη μικροοργανισμών

Η πελαγική μικροβιακή κοινότητα συλλέχθηκε από την περιοχή του κόλπου της Σούδας στα Χανιά, εγκλιματίστηκε για 6 μήνες σε περιβάλλον με μοναδική πηγή άνθρακα κομμάτια πολυαιθυλενίου και πολυστυρένιου και απομονώθηκε στα πλαίσια του FP-7 Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος BIOCLEAR (New BIOTEchnological approaches for biodegrading and promoting the environmental biotransformation of synthetic and polymeric materials) που εκπονήθηκε από το Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης. Η θαλάσσια κοινότητα ονομάστηκε “SOYDA” και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους -80°C.

Ο προσδιορισμό της αύξησης των μικροοργανισμών γίνεται μέσω της καμπύλης ανάπτυξης της μικροβιακής καλλιέργειας που παρουσιάζεται παρακάτω. Η μικροβιακή καμπύλη ανάπτυξης εκφράζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια επώασης σε μία ασυνεχή καλλιέργεια.



**Εικόνα 18: Τυπική μορφή καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών. (Πηγή: <https://eclass.teiath.gr>)**

Η μορφή της καμπύλης ανάπτυξης χωρίζεται σε 4 φάσεις:

- Φάση υστέρησης (LagPhase): Όταν οι μικροοργανισμοί προστεθούν σε ένα νέο θρεπτικό μέσο δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους για κάποιο χρονικό διάστημα. Τα κύτταρα στη φάση αυτή δε διαιρούνται και δεν υπάρχει καθαρή αύξηση τους. Παρόλο αυτά το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο για την προσαρμογή των μικροοργανισμών στο θρεπτικό μέσο.
- Φάση εκθετικής ανάπτυξης (LogPhase): Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με μέγιστο σταθερό ρυθμό ανάπτυξης. Επειδή κάθε κύτταρο διαιρείται σε διαφορετική χρονική στιγμή η μορφή της καμπύλης είναι ομαλή.
- Φάση στασιμότητας (Stationary Phase): Σε αυτή τη φάση η ανάπτυξη των κυττάρων σταματά και η καμπύλη γίνεται οριζόντια. Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών παραμένει σταθερός με εξισορρόπηση των ρυθμών ανάπτυξης και θανάτου. Η φάση στασιμότητας παρατηρείται όταν ο πληθυσμός των κυττάρων ισούται περίπου  $10^9$  αποικίες  $\text{ml}^{-1}$ .
- Φάση θανάτου (DeathPhase): Αυτή η φάση μπορεί να προκληθεί λόγω της έλλειψης θρεπτικών παραγόντων καθώς και της συσσώρευσης τοξικών μεταβολικών προϊόντων στο μέσο της ανάπτυξης.

Ο προσδιορισμός της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών στηρίχθηκε στην εκτίμηση της θολερότητας των αιωρημάτων και προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου UV-VIS στα 600nm για τον υπολογισμό της οπτικής απορρόφησης τους.



**Εικόνα 19: UV-Vis φασματοφωτόμετρο.**

Πιο αναλυτικά, κάθε 30 min πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης της πελαγικής κοινότητας έως ότου η τιμή της απορρόφησης φτάσει την επιθυμητή ( $\approx 0,7$ ). Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Μέχρι την επίτευξη αυτής της τιμής η καλλιέργεια παρέμενε σε τράπεζα ανάδευσης στις 120 rpm και σε θερμοκρασία 25°C. Από την καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 0,5 ml μαζί με 150 ml θρεπτικό υλικό DSMZ 453.

Η σύσταση του θρεπτικού υλικού DSMZ 453 είναι η εξής:

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

Για τιμή απορρόφησης  $S_{ouda} \approx 0,7$  υπολογίσθηκε ο αριθμός των αποικιών (CFU) σε τρυβλία Petri με αραιώσεις  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  και με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης, εμβολιάστηκαν τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό. Επώαστηκαν για περίπου 7 ημέρες ,και στη συνέχεια καταμετρήθηκαν οι αποικίες. Επομένως, για τις παραπάνω τιμές απορρόφησης που αντιστοιχούν στην εκθετική φάση των μικροοργανισμών, ο αριθμός των αποικιών μετρήθηκε σε  $10^8$  CFU/ml.

Από την καλλιέργεια λήφθηκε ποσότητα ίση με 35ml, τοποθετήθηκε σε falcon και οδηγήθηκε για φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 20 min. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό προσεκτικά χωρίς να αποκολληθεί η πελέτα και προστέθηκαν 35ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε ξανά, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό και προστέθηκαν 3,5ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, η πελέτα διαλύθηκε και προστέθηκε σε κάθε φιάσκα 0,1 ml.

Η ποσότητα εμβολιασμού υπολογίστηκε με τον νόμο της αραίωσης:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2} = \frac{10^8 \frac{CFU}{ml} \cdot 35ml}{3,5ml} = 10^9 \frac{CFU}{ml} \quad (1)$$

Όπου,

$C_1$ : αριθμός αποικιών στην εκθετική φάση ανάπτυξης

$C_2$ : τελικός αριθμός αποικιών

$V_1$ : αρχικός όγκος πριν τη φυγοκέντρηση

$V_2$ : τελικός όγκος = 3,5 ml

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

Όπου,

$C_1$ : αριθμός αποικιών από τη σχέση (1)

$C_2$ : επιθυμητός αριθμός αποικιών

$V_1$ : ζητούμενος όγκος εμβολιασμού

$V_2$ : όγκος κάθε φλάσκας

Οι 24 φλάσκες εμβολιάστηκαν με 100 μl από την κοινότητα "Souda". Οι κωνικές φλάσκες τοποθετήθηκαν σε τράπεζα ανάδευσης στις 120 rpm και θερμοκρασία 25°C. Επίσης, στις 4 φλάσκες που χρησιμοποιήθηκαν ως αβιοτικά δείγματα ελέγχου δεν έγινε εμβολιασμός. Οι δύο από αυτές τοποθετήθηκαν μαζί με τις υπόλοιπες σε τράπεζα ανάδευσης ενώ, οι άλλες δυο παρέμειναν σε ηρεμία στο χώρο του εργαστηρίου.



**Εικόνα 20: Κωνικές φιάσκες σε τράπεζα ανάδευσης με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και pellets.**

### **3.2.1. Δειγματοληψία**

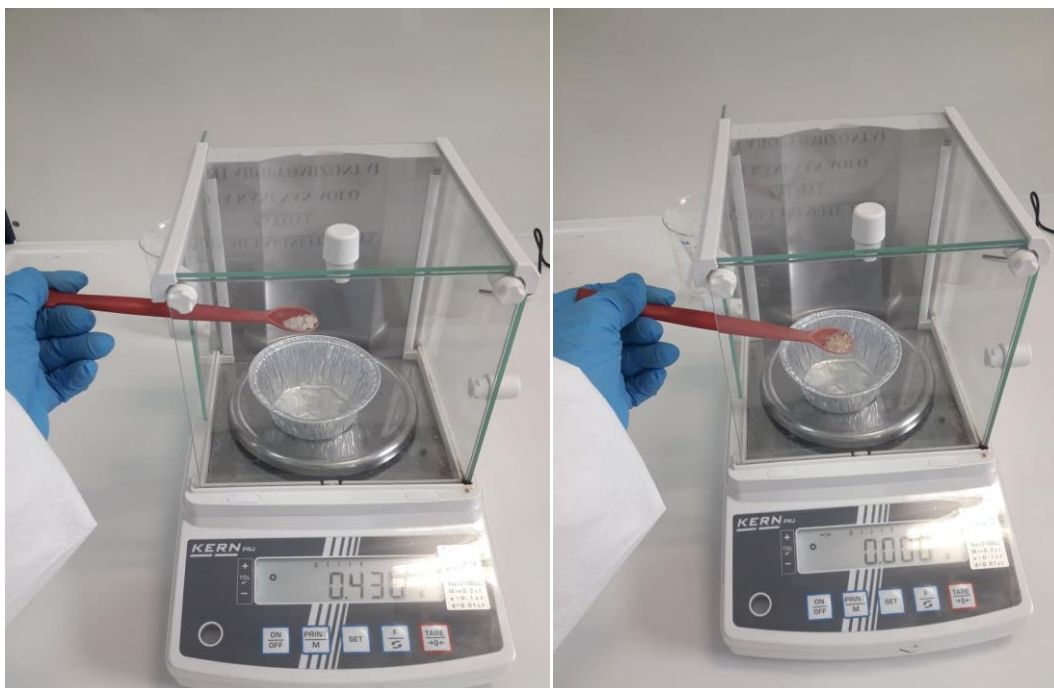
Κάθε μήνα απομακρύνονταν από την τράπεζα ανάδευσης 3 φιάσκες του πολυπροπυλενίου και 3 του πολυστυρενίου. Στη συνέχεια, διαχωριζόταν το νερό από τα πλαστικά και τοποθετούνταν σε δύο falkons των 50 ml τα οποία ονομάζονταν “Νερό” και αποθηκευόταν στην κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Τα pellets τοποθετούνταν σε falkon των 15ml μαζί με 10 ml αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και 2-3 σταγόνες Tween 80 και αναδεύονταν για μία ημέρα σε τράπεζα ανάδευσης. Αυτή η διαδικασία γινόταν για να ξεπλυθούν τα πλαστικά και να απομακρυνθεί το βιοφίλμ που ήταν προσκολλημένο στην επιφάνειά τους. Την επόμενη μέρα, διαχωρίζονταν τα πλαστικά από το υγρό, το οποίο ονομαζόταν “Βιοφίλμ” και αποθηκευόταν στην κατάψυξη στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Έπειτα, ακολουθεί μια σειρά μετρήσεων που περιγράφονται παρακάτω.

### **3.2.2. Προσδιορισμός βάρους**

Αρχικά, τα pellets αφού αφαιρέθηκαν από το υγρό “Βιοφίλμ” πλύθηκαν με απιονισμένο νερό για να απομακρυνθεί τελείως το βιοφίλμ και το Tween 80 και τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης στους  $37^{\circ}\text{C}$  για περίπου μία εβδομάδα. Αφού απομακρύνθηκε όλη η υγρασία από τα πλαστικά μετρήθηκε το ξηρό τους βάρος για κάθε πλαστικό που περιείχε κάθε φιάσκα. Το βάρος των πλαστικών κάθε φιάσκας συγκρίθηκε με το αρχικό το οποίο ισούταν με 0,5 gr (πριν την είσοδο των μικροπλαστικών στις φιάσκες). Η διαφορά βάρους που προκύπτει δείχνει τη βιοαποδόμηση των pellets.





**Εικόνα 21: Ζύγιση πολυπροπυλενίου και πολυστυρένιου.**

Για τον υπολογισμό της μείωσης του βάρους των PP και PS χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος:

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

Όπου,

Αρχικό Βάρος: η αρχική ποσότητα pellets

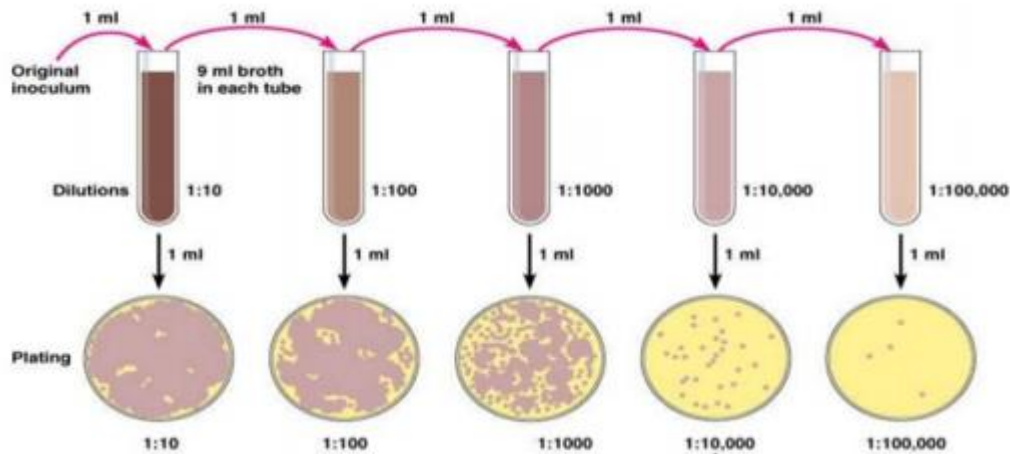
Τελικό Βάρος: το βάρος που υπολογίστηκε μετά την αφαίρεση των pellets από τις φλάσκες

### **3.2.3. Εκτίμηση πληθυσμού των μικροβιακών κοινοτήτων**

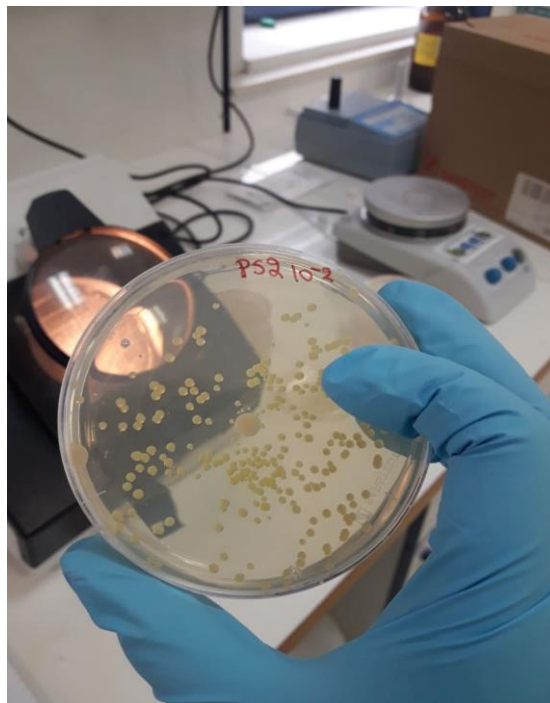
Για την εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού έγινε χρήση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων. Αυτή η μέθοδος προσδιορισμού βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε κύτταρο σε κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης δίνει μια αποικία θυγατρικών κυττάρων, που είναι ορατή με γυμνό μάτι. Για να εφαρμοστεί η μέθοδος αυτή με επιτυχία πρέπει ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσεται σε ένα τρυβλίο να είναι προσίτος σε αρίθμηση. Αυτό επιτυγχάνεται με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού δείγματος πριν την επίστρωση σε τρυβλία με άγαρ. Το στερεό θρεπτικό που χρησιμοποιήθηκε για την επίστρωση των τρυβλίων ήταν DSMZ 453. Κατόπιν μετρήθηκαν οι αποικίες δειγμάτων κάθε μήνα του “Νερό” και το “Βιοφίλμ” κάθε φλάσκας με εμβολιασμό σε τρυβλία Petri και η καταμέτρηση τους έγινε μετά από το



πέρασ 4-5 ημερών. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, μετά από επιτυχή αραίωση, περιέχεται μόνο το ένα δέκατο των κυττάρων σε σχέση με τον αμέσως προηγούμενο. Τα αποτελέσματα της εκτιμήσεως των μικροβιακών πληθυσμών εκφράζονται σε Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών (Colony Forming Units - CFU)/ ml δείγματος.



Εικόνα 22: Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων. (Πηγή: <http://biologylab.eap.gr>)



Εικόνα 23: Μέτρηση αποικιών με τρυβλία Petri.

### 3.2.4. Προσδιορισμός εξωκυτταρικών πολυμέσων ουσιών

#### 3.2.4.1. Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών στα δείγματα έγινε χρήση της μεθόδου Bradford. Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια σύντομη και αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών που περιέχονται σε ένα διάλυμα, η οποία βασίζεται στη χρήση χρωστικής. Η χρωστική που χρησιμοποιεί είναι η BrilliantBlueG-250 η οποία αλλάζει χρώμα όταν έρχεται σε επαφή με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα (Bradford, 1976). Αν και υπάρχουν λίγες παρεμποδιστικές ουσίες, οι οποίες μπορεί να αλλοιώσουν το αποτέλεσμα, η χρωστική αλληλεπιδρά με τις διάφορες πρωτεΐνες σε διάφορα σημεία και έτσι δεν είναι αυστηρά ποσοτική.

Κάθε μήνα γινόταν προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών στα δείγματα του “Νερού” και του “Βιοφίλμ” του κάθε πλαστικού. Από κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε ποσότητα 1,5 ml στις 12000 rpm για 15 min.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη μέθοδο είναι το Coomassie Protein Assay Reagent Kit της εταιρείας BioRad που αποτελείται από την χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, μεθανόλη, φωσφορικό οξύ και διαλυτικούς παράγοντες.

Για την ποσοτική εκτίμηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε άγνωστα δείγματα χρειάζεται μία πρότυπη καμπύλη απορρόφησης δειγμάτων γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Ως πρότυπο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ορός αλβουμίνης βοδιού (BSA) και για την πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα B (500 µg/ml): 10 ml  $H_2O$  + 5 mg albumin

Διάλυμα C (250 µg/ml): 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml B

Διάλυμα D (200 µg/ml): 3 ml  $H_2O$  + 2ml B

Διάλυμα E (150 µg/ml): 3,5 ml  $H_2O$  + 1,5 ml B

Διάλυμα F (125 µg/ml): 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml C

Διάλυμα G(100 µg/ml): 4ml  $H_2O$  + 1ml B

Διάλυμα H (75 µg/ml) : 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml E

Διάλυμα I (50 µg/ml) : 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml G

Διάλυμα J (25 µg/ml) : 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml I

Διάλυμα X (0 µg/ml) : 5 ml  $H_2O$

Σε κάθε κυψελίδα προστέθηκε 1 ml αντιδραστηρίου Bradford και 20 µl από κάθε δείγμα, καθώς και για τη μέτρηση της καμπύλης βαθμονόμησης προστέθηκαν νέες κυψελίδες με 1 ml αντιδραστηρίου Bradford και 20 µl από τα πρότυπα διαλύματα που αναφέρονται παραπάνω. Το διάλυμα αναδεύθηκε και αφέθηκε σε θερμοκρασία 30

°C σε σκοτεινό μέρος για 5 min, ώστε να σχηματιστεί το έγχρωμο σύμπλοκο. Στη συνέχεια, φωτομετρήθηκε το περιεχόμενο κάθε κυψελίδας στα 595nm.

#### Μέτρηση Ενζύμου

Στα δείγματα του “Βιοφίλμ” του 4<sup>ου</sup> και του 5<sup>ου</sup> μήνα πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ενζύμου λακκάση. Χρησιμοποιήθηκε 1 ml δείγματος από κάθε είδος μικροπλαστικού. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου λακκάση τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα 0,1 ml δείγματος και 0,8 ml οξικού νατρίου συγκέντρωσης 50 mM (pH= 5.0). Η εκκίνηση της ενζυμικής αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0,1 ml ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) συγκέντρωσης 10 mM. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 30°C. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στα 420 nm σε φασματοφωτόμετρο για τη μέτρηση της οξείδωσης του υποστρώματος (ABTS). Η μέτρηση αυτή επαναλήφθηκε για 3 συνεχόμενες ημέρες.

#### **3.2.4.2. Προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων**

Ο προσδιορισμός των ολικών υδατανθράκων στα δείγματα του “Νερού” και του “Βιοφίλμ” έγινε με τη μέθοδο Anthron. Η μέθοδος αυτή είναι μια απλή χρωματομετρική μέθοδος με σχετική έλλειψη ευαισθησίας στις παρεμβολές από τα άλλα κυτταρικά συστατικά. Αρχικά, επιτυγχάνεται η υδρόλυση των πολυσακχαριτών και η αφυδάτωση των μονομερών (προσθήκη θειικού οξέος και θερμική επεξεργασία). Τα σάκχαρα 5-άνθρακα (πεντόζης) και 6-άνθρακα (εξόζης) μετατρέπονται σε φουρφουράλη και υδροξυμεθυλοφουρφουράλη, αντίστοιχα. Στη συνέχεια προστίθενται η ανθρόνη (αρωματική ένωση) ή οποία αντιδρά με τα παραπάνω προϊόντα πέψης και δίνει έγχρωμη ένωση (Gerhardt et al. 1994). Ως πρότυπο διάλυμα (stock) για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γλυκόζης με συγκέντρωση 0,05 g γλυκόζη και προσθήκη νερού σε ογκομετρική των 500ml σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

ΔιάλυμαΑ (20 mg/ml): 8 ml H<sub>2</sub>O + 2 ml stock

ΔιάλυμαΒ (15mg/ml): 8,5 ml H<sub>2</sub>O + 1,5 ml stock

ΔιάλυμαC (10 mg/ml): 9 ml H<sub>2</sub>O + 1 ml stock

ΔιάλυμαD (8mg/ml): 9,2 ml H<sub>2</sub>O + 0,8 ml stock

ΔιάλυμαE (5mg/ml): 5 ml H<sub>2</sub>O + 5 ml C

ΔιάλυμαF (1mg/ml): 9 ml H<sub>2</sub>O + 1 ml C

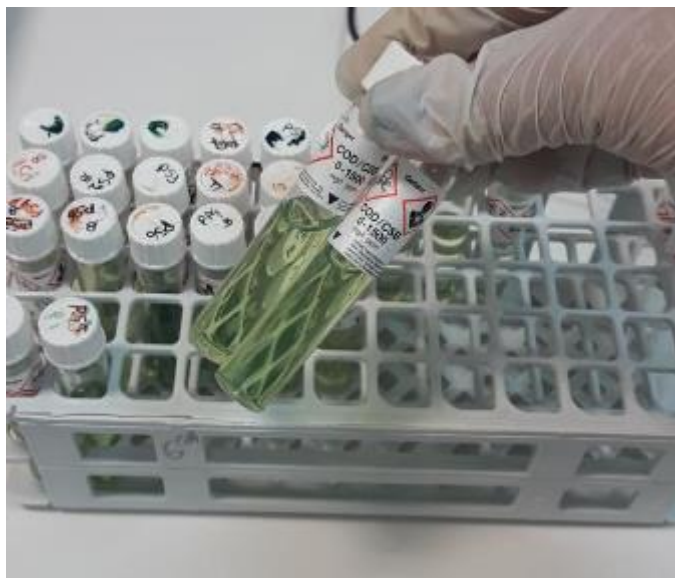
ΔιάλυμαG (0,5mg/ml): 5 ml H<sub>2</sub>O + 5 ml F

ΔιάλυμαH (0,1mg/ml) : 8 ml H<sub>2</sub>O + 2 ml G

ΔιάλυμαX (0 mg/ml) : 5 ml H<sub>2</sub>O

Για την μέτρηση παρασκευάστηκε διάλυμα θειικού οξέος (75%) από την προηγούμενη ημέρα καθώς και διάλυμα ανθρακενόνης το οποίο περιείχε 0,5 gr ανθρακενόνης, με 10 ml καθαρής αιθανόλης τα οποία αναμίχθηκαν με 250 ml διαλύματος θειικού οξέος (75%).

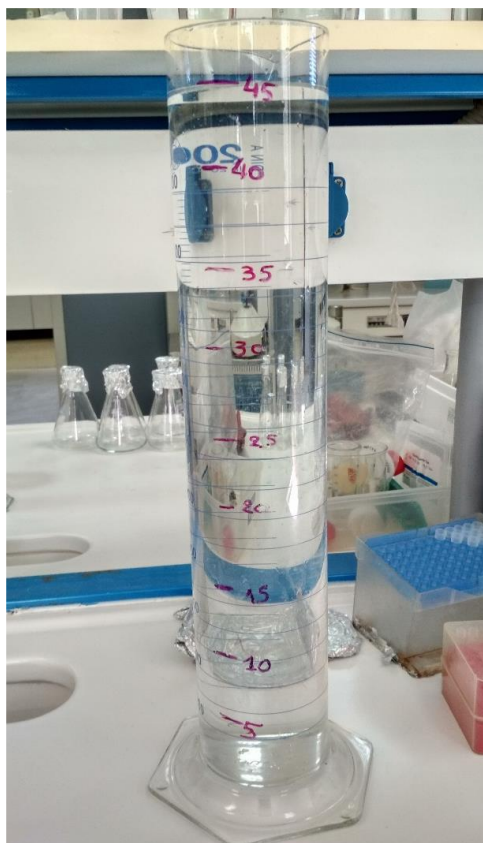
Σε γυάλινα φιαλίδια προστέθηκαν 1 ml δείγματος ή αραιώσεων, 2 ml θειικό οξύ και 4 ml διαλύματος ανθρακενόνης και τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 100°C για 15 min. Κατόπιν αφού κρύωσαν φωτομετρήθηκαν στα 578 nm.



**Εικόνα 24:** Φιαλίδια με τον σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης της ανθρόνης με τα προϊόντα πέψης των υδατανθράκων.

### 3.2.5. Εκτίμηση ταχύτητας καθίζησης

Σε κάθε δειγματοληψία μετά τη ξήρανση των σφαιριδίων του πολυστυρενίου πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της ταχύτητας καθίζησης. Χρησιμοποιήθηκε ένας ογκομετρικός κυλινδρικός σωλήνας όγκου 2 L, στον οποίο προστέθηκε φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό σε φίλτρο με πορώδες 200  $\mu\text{m}$ . Κατά μήκος του ογκομετρικού σωλήνα σχεδιάστηκαν 9 συνολικά σημεία ανά 5 cm που σηματοδοτούν το μήκος του κυλίνδρου και με τη βοήθεια χρονομέτρου υπολογίστηκε ο χρόνος που απαιτείται ώστε το pellet να διελεύσει και τα 9 αριθμημένα σημεία μέχρι να φτάσει στον πυθμένα του. Τέλος, η ταχύτητα καθίζησης υπολογίστηκε εφαρμόζοντας απλή γραμμική παλινδρόμηση της γραμμικής συνάρτησης :  $Y = \alpha X + \beta$  όπου η εξαρτημένη μεταβλητή  $Y$  αποτελεί τα εκατοστά που διέυλεσε το pellet, και η ανεξάρτητη μεταβλητή  $X$  αποτελεί τον χρόνο σε δευτερόλεπτα της διέλευσης. Ο συντελεστής  $\alpha$  οποίος αποτελεί της κλίση της ευθείας παλινδρόμησης, αποτελεί την ταχύτητα καθίζησης σε μονάδες εκατοστά ανά δευτερόλεπτο (cm/ sec).



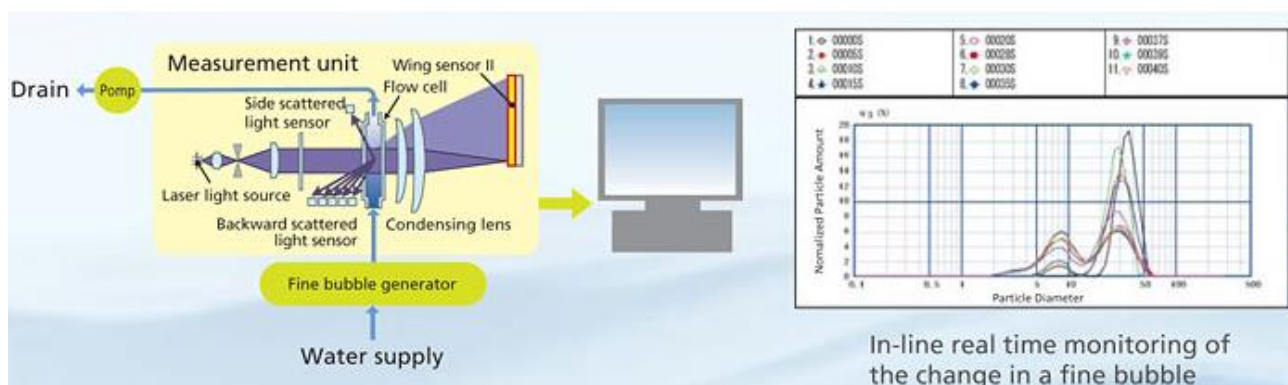
Εικόνα 25: Ογκομετρικός κύλινδρος για τη μέτρηση της ταχύτητας καθίζησης

### 3.2.6. Εκτίμηση κατανομής μεγέθους μικροπλαστικών

Για την αξιολόγηση της διασποράς των μικροπλαστικών στο διάστημα των 5 μηνών ανάδευσης και βιοαποδόμησής τους χρησιμοποιήθηκε το σύστημα SALD-7500nano. Το SALD-7500nano αναπτύχθηκε για να παρέχει ακριβή και υψηλής ευαισθησίας μέτρηση των χαμηλών συγκεντρώσεων και υψηλή απορρόφηση των νανοσωματιδίων καθώς και μέτρηση δειγμάτων με συγκέντρωση κάτω από 1 ppm. Με μία μόνο πηγή φωτός και ένα απλό οπτικό σύστημα μπορούν να μετρηθούν σωματίδια μεγέθους από 7 nm – 800  $\mu$ m.



Εικόνα 26: Σύστημα υπολογισμού διασποράς μεγέθους πλαστικών (Πηγή: [www.ssi.shimadzu.com](http://www.ssi.shimadzu.com))



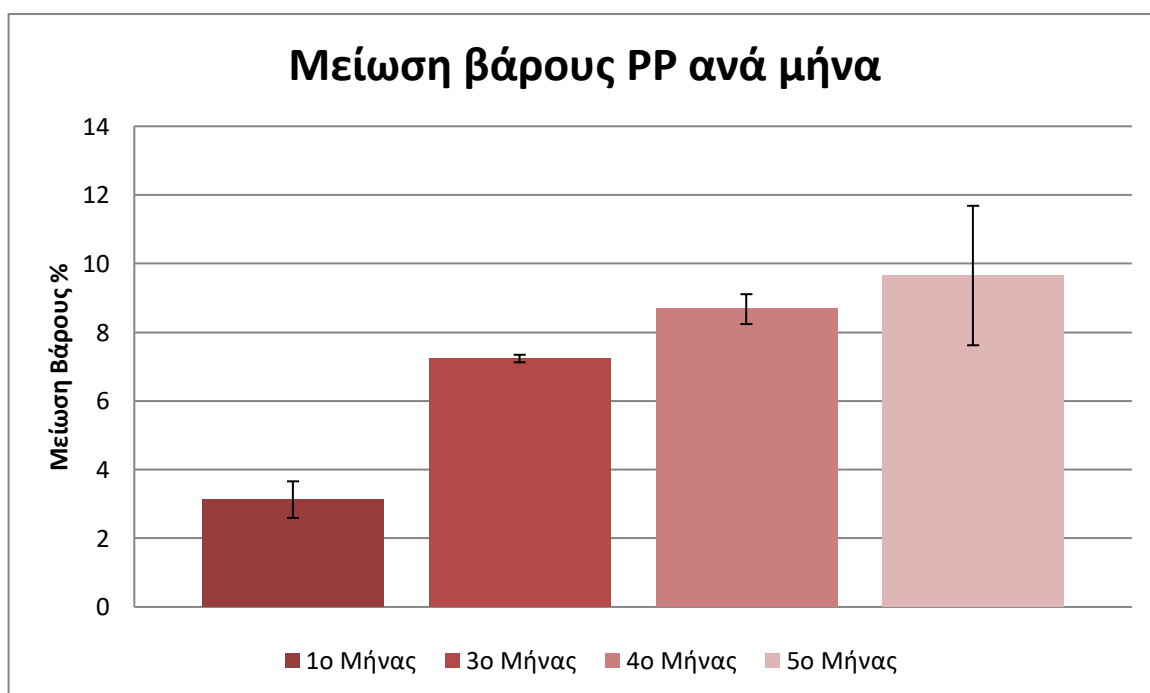
Εικόνα 27: Τρόπος λειτουργίας του SALD-7500nano (Πηγή: [www.ssi.shimadzu.com](http://www.ssi.shimadzu.com))

Στο σύστημα εισήχθησαν 5ml δείγματος από κάθε μήνα, αφού πρώτα μηδενιζόταν το όργανο με 5 ml φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό. Η κατανομή μεγέθους των pellets που παρουσιάζεται είναι κατά αριθμό σωματιδίων και όγκο.

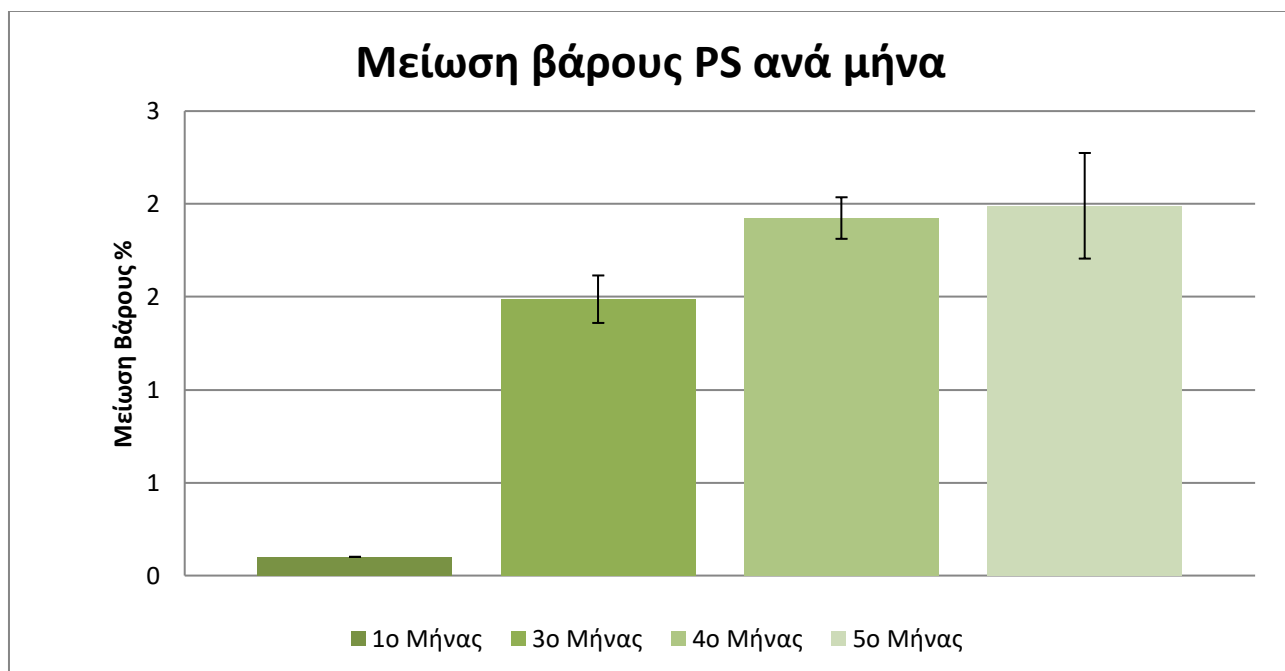
## 4. Αποτελέσματα – Συζήτηση

### 4.1. Προσδιορισμός βάρους

Σύμφωνα με τις μετρήσεις της μεταβολής του βάρους των μικροπλαστικών στο διάστημα των 5 μηνών προκύπτουν τα παρακάτω διαγράμματα για το PP και το PS αντίστοιχα.



Διάγραμμα 1: Μείωση βάρους PP ανά μήνα.



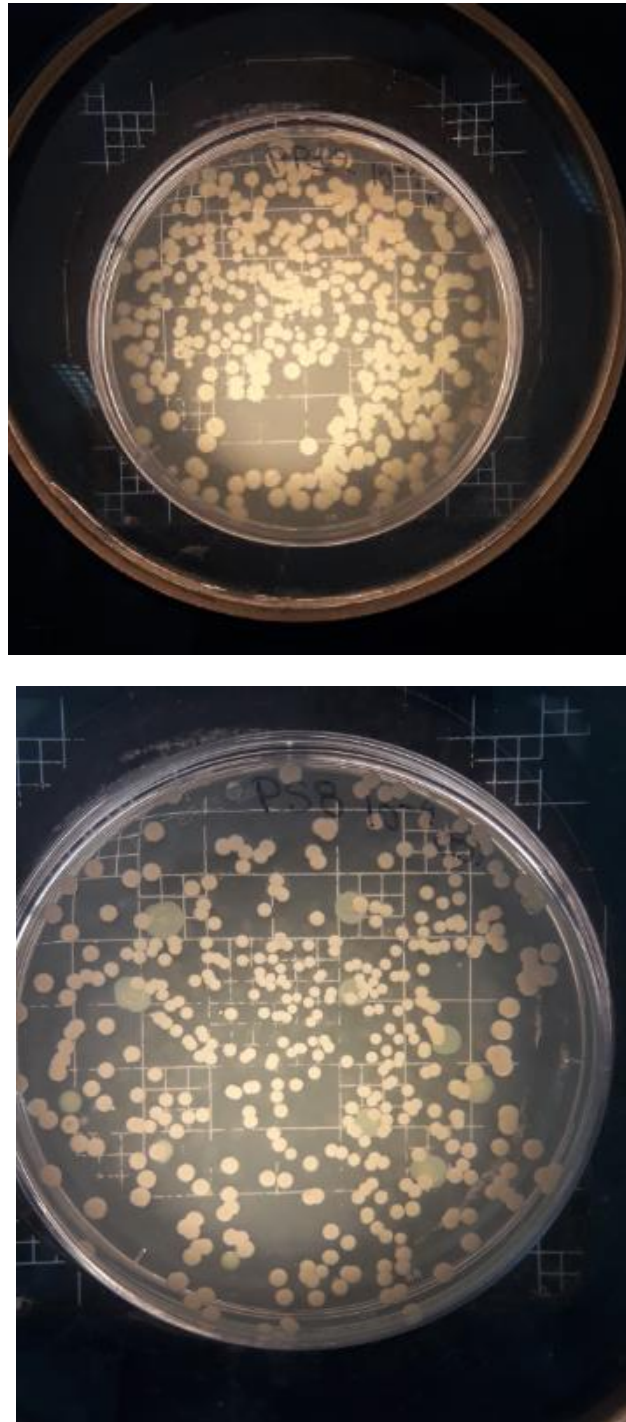
**Διάγραμμα 2: Μείωση βάρους PS ανά μήνα.**

Σύμφωνα με τα δύο παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται και στα δύο πλαστικά μείωση του βάρους για το πολυπροπυλένιο PP και για το πολυστυρένιο κατά διάρκεια των 5 μηνών. Παρόλο αυτά, το PP παρουσιάζει μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης βάρους σε σχέση με το PS. Πιο συγκεκριμένα, για το PP το ποσοστό μείωσης βάρους που υπολογίστηκε τον 1ο μήνα ισούται με 3,13% και τον 5ο μήνα έφτασε το 9,65%, ενώ, στο PS το ποσοστό μείωσης βάρους μειώθηκε σε πολύ χαμηλότερη τιμή 0,1% για τον 1ο μήνα και 1,99% για τον 5ο μήνα. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που παρουσιάζουν αποτελέσματα μείωσης βάρους λόγω βιοαποδόμησης από θαλάσσιους και χερσαίους μικροοργανισμούς. Πειραματική μελέτη που διερευνήθηκε η βιοαποδόμηση πολυβινυλοχλωριδίου (PVC) από τα βακτήρια *Pseudomonas citronellolis* και *Bacillus flexus* έδειξε στατιστικά σημαντικές απώλειες βάρους με ποσοστό 18,58% για μεμβράνες PVC μετά από επώαση 30 ημερών σε σύγκριση με αβιοτικούς παράγοντες που είχαν ποσοστό 8,39% (Lucia Giacomucci, 2019). Επίσης, η πειραματική μελέτη για τη βιοαποδόμηση μικροπλαστικών πολυαιθυλενίου με τη βοήθεια βακτηρίων που είχαν συλλεχθεί από χώρο υγειονομικής ταφής έδειξε μείωση ξηρού βάρους 14,7% σε διάστημα 60 ημερών επώασης. Η διαφορά στην απώλεια βάρους μπορεί να οφείλεται στο μεταβολισμό των μικροβίων. Πρόσφατες μελέτες ανέφεραν ότι ο ρυθμός αποδόμησης πολυμερών υλικών πολυαιθυλενίου κυμαινόταν από 1,5% έως 13% σύμφωνα με διάφορες πειραματικές συνθήκες και διάφορους μικροοργανισμούς (Seon Yeong Park, Chang Gyun Kim, 2019). Για το πολυπροπυλένιο (PP) σύμφωνα με τη πειραματική μελέτη για τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των συμπολυμερών του PP βρέθηκε μείωση βάρους 13,6 – 22,1% με τη χρήση μικροοργανισμών μετά από επώαση 90 ημερών (Gokhan Acik, 2018). Η μείωση του βάρους μπορεί να αποτελέσει ένα δείκτη βιοαποδόμησης των pellets, ωστόσο δεν μπορεί να δώσει σαφή εικόνα της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών, και για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αναλύσεις.



#### 4.2. Μικροβιακοί Πληθυσμοί

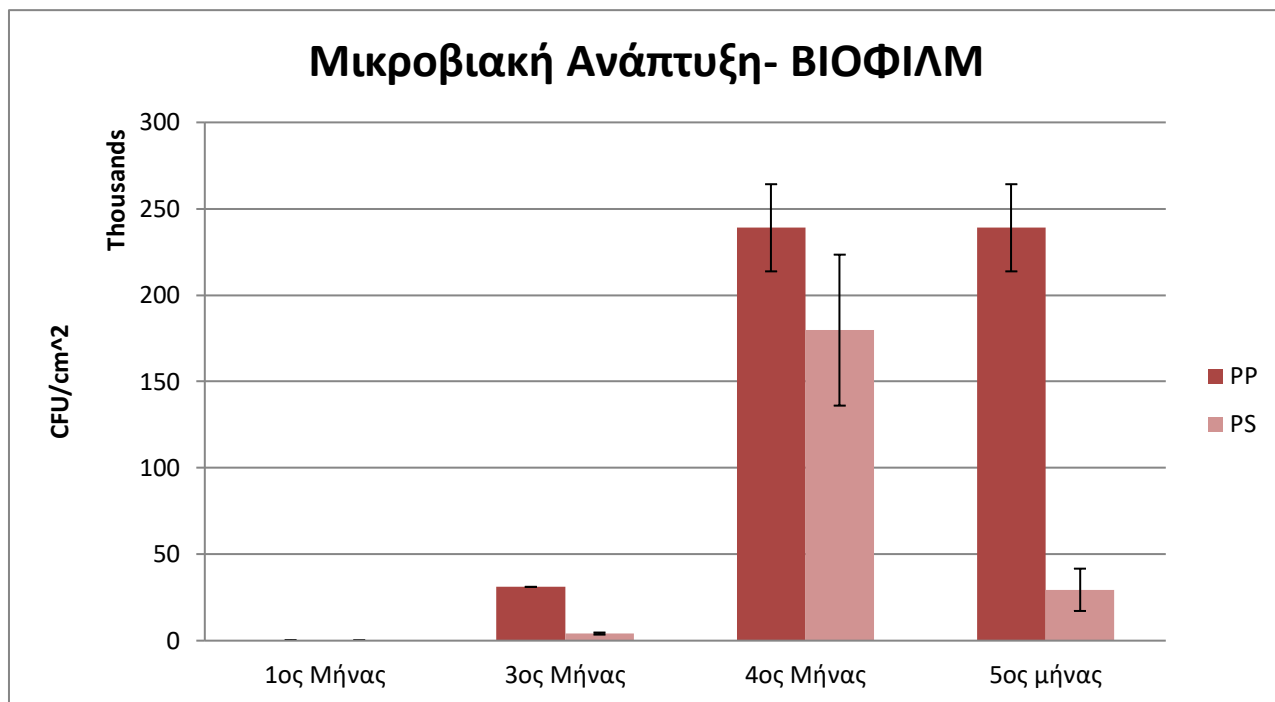
Ακολουθούν τα αποτελέσματα της εκτίμησης του μικροβιακού πληθυσμού που έγινε χρήση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων.



**Εικόνα 28: Τρυβλία PP και PS με αραιώση  $10^{-4}$ .**

Κάθε μήνα για το διάστημα των 5 μηνών πραγματοποιούνταν η μέτρηση των αποικιών στα δείγματα του Βιοφίλμ και του Νερού, για το PP και το PS αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

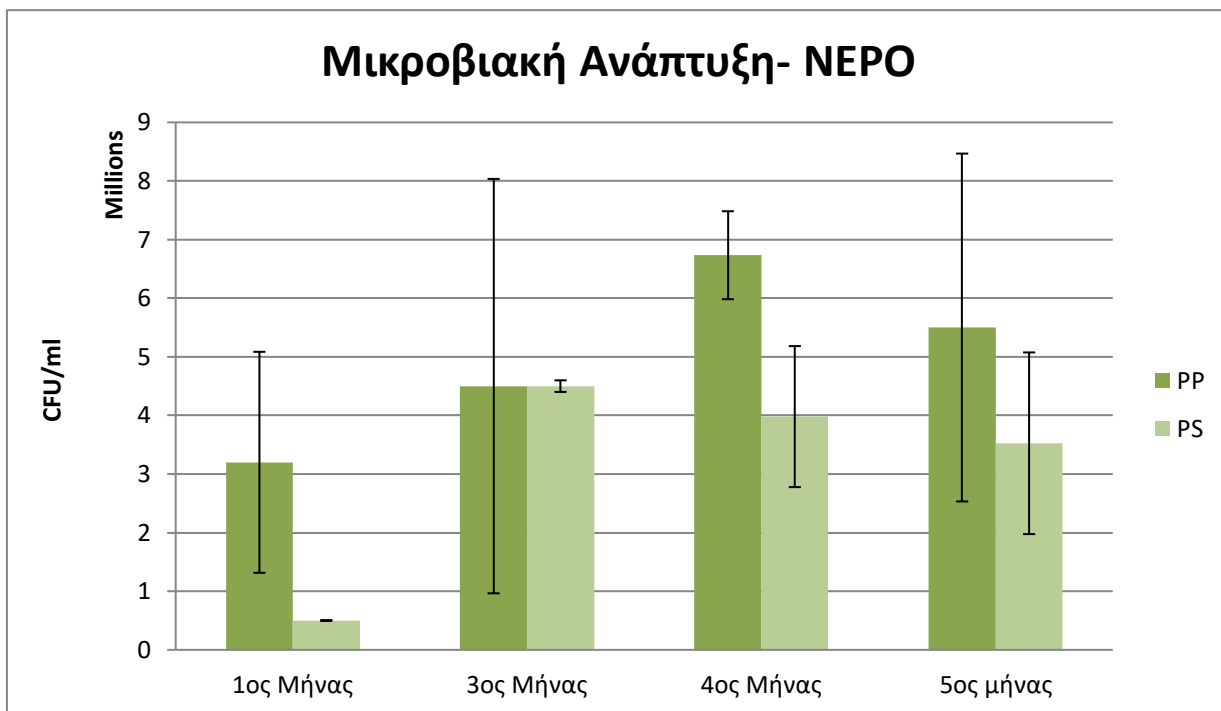




**Διάγραμμα 3: Αριθμός αποικιών στο “Βιοφίλμ” σε μονάδες CFU/cm<sup>2</sup>.**

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι τον 1<sup>ο</sup> μήνα η συγκέντρωση των κυττάρων για το πολυπροπυλένιο και για το πολυστυρένιο είναι πολύ χαμηλή με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αποδοθεί στο διάγραμμα αυτό. Τον 3<sup>ο</sup> μήνα για το PP η συγκέντρωση των κυττάρων ισούται με  $3 \cdot 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup>, ενώ για το PS ισούται με  $4 \cdot 10^3$  CFU/cm<sup>2</sup>. Ο πληθυσμός της κοινότητας που προστέθηκε στις φλάσκες στην αντίστοιχη επιφάνεια των πλαστικών παρατηρείται ότι τον 1<sup>ο</sup> και τον 3<sup>ο</sup> μήνα μειώνεται σημαντικά σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού. Η μείωση της μικροβιακής ανάπτυξης μεταξύ 1<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> μήνα, πιθανώς να οφείλεται στις oligotrophic συνθήκες που επικρατούσαν. Τον 4<sup>ο</sup> μήνα παρατηρείται μεγάλη αύξηση και στο PP και στο PS που φτάνει τα  $2 \cdot 10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> και  $1 \cdot 10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> αντίστοιχα. Η αύξηση αυτή που παρατηρείται και στο PP και στο PS οφείλεται στη προσθήκη θρεπτικών φωσφόρου και αζώτου που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του 3<sup>ου</sup> μήνα. Τέλος, τον 5<sup>ο</sup> μήνα η συγκέντρωση των κυττάρων στο PP παραμένει σταθερή, ενώ του PS μειώνεται σημαντικά και ισούται με  $2 \cdot 10^4$  CFU/cm<sup>2</sup>.

Το βιοφίλμ είναι ένα λεπτό στρώμα μικροοργανισμών σε μια επιφάνεια που συντίθενται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς. Η οργάνωση των μικροοργανισμών στο βιοφίλμ προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, οι μικροοργανισμοί παραμένουν ενωμένοι σε μια βέλτιστη θέση, υπερασπιζόμενοι από τις περιβαλλοντικές καταστάσεις. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί συνυπάρχουν σε ένα σταθερό σύνολο συνεργασίας μεταξύ διαφορετικών ειδών και, κατά συνέπεια, υποβαθμίζουν τα υποστρώματα που βρίσκονται (Malegori, C., 2016). Η δημιουργία βιοφίλμ εξαρτάται από την επιφάνεια που προσκολλούνται οι μικροοργανισμοί, από την επιφανειακή φόρτιση, από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις καθώς και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος που αναπτύσσονται όπως η θερμοκρασία και το pH (Liao et al. 2015).



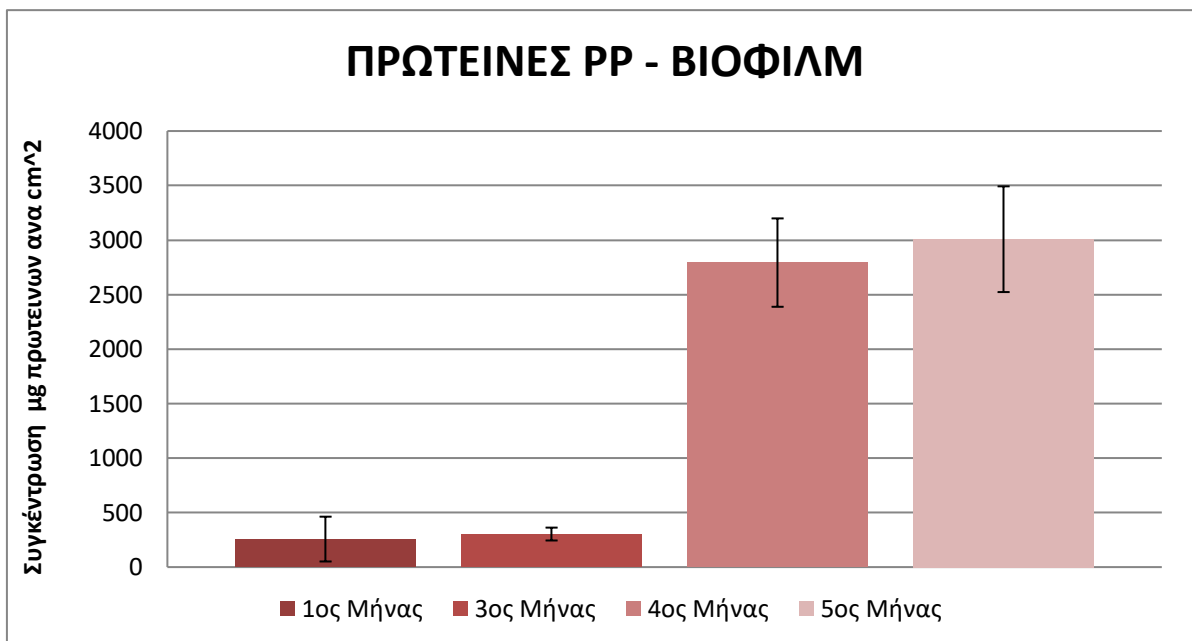
**Διάγραμμα 4: Αριθμός αποικιών στο “Νερό” σε μονάδες CFU/ ml.**

Στο διάγραμμα 4, παρουσιάζεται ο αριθμός των αποικιών στο δείγμα “Νερό” στο διάστημα των 5 μηνών. Αρχικά, για το PP τον 1<sup>ο</sup> μήνα ο πληθυσμός των κυττάρων είναι ίσος με  $32 \cdot 10^5$  CFU/ml, μία σημαντική μείωση σε σχέση με την συγκέντρωση εμβολιασμού και αυξάνεται σταδιακά μέχρι και τον 4<sup>ο</sup> μήνα που φτάνει τα  $67 \cdot 10^5$  CFU/ml. Από τον 1<sup>ο</sup> μήνα και έπειτα παρατηρείται μία συνεχής αύξηση μέχρι και τον 4<sup>ο</sup> μήνα. Τον 5<sup>ο</sup> μήνα παρατηρείται μία μικρή μείωση και ο πληθυσμός των κυττάρων για το PP ισούται με  $55 \cdot 10^5$  CFU/ml. Για το PS τον 1<sup>ο</sup> μήνα ο πληθυσμός των κυττάρων ισούται με  $5 \cdot 10^5$  CFU/ml (και εδώ παρατηρείται μείωση σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού) και συνεχίζει να αυξάνεται τον 3<sup>ο</sup> μήνα φτάνοντας τα  $45 \cdot 10^5$  CFU ανά ml. Ενώ, τον 4<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> μήνα μειώνεται και φτάνει να ισούται με  $352 \cdot 10^4$  CFU ανά ml.

### 4.3. Ολικές πρωτεΐνες

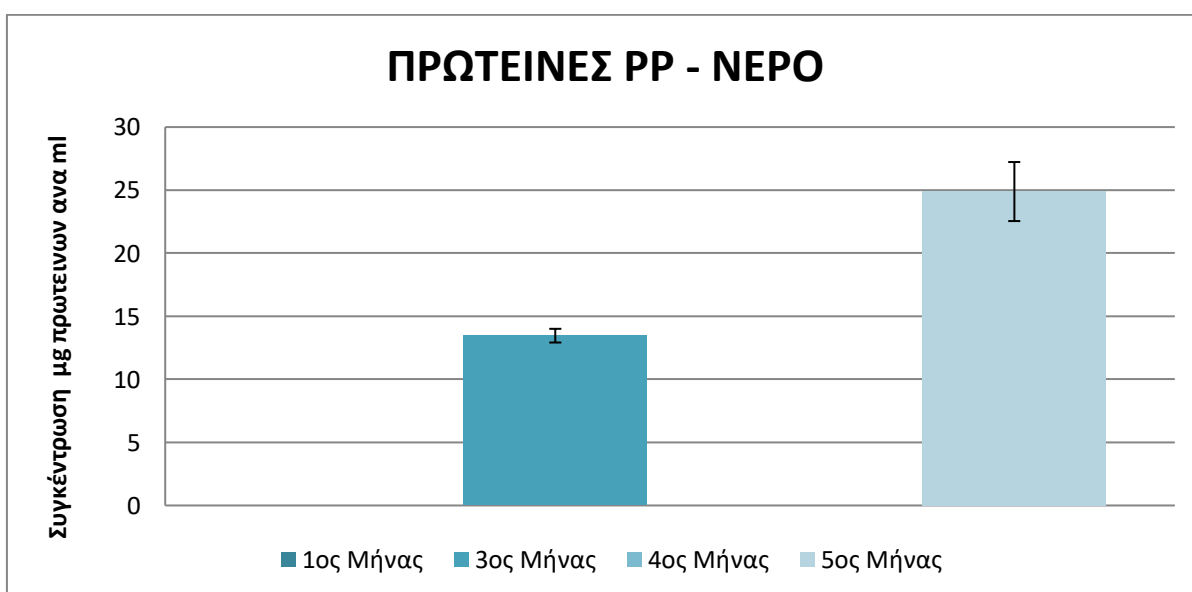
Οι πρωτεΐνες αποτελούν τα πιο διαδεδομένα και πολυδιάστατα, τόσο στη μορφή όσο και στη λειτουργία τους, μακρομόρια. Ακόμη και σε ένα απλό κύτταρο των βακτηριακό κύτταρο εντοπίζονται εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεΐνες με την καθεμία εξ αυτών να έχει ιδιαίτερο ρόλο. Οι πρωτεΐνες αποτελούν είτε δομικά συστατικά των μεμβρανών του κυττάρου, είτε συνεργούν σε κάποια συγκεκριμένη λειτουργία, όπως η δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων (Wikipedia).

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



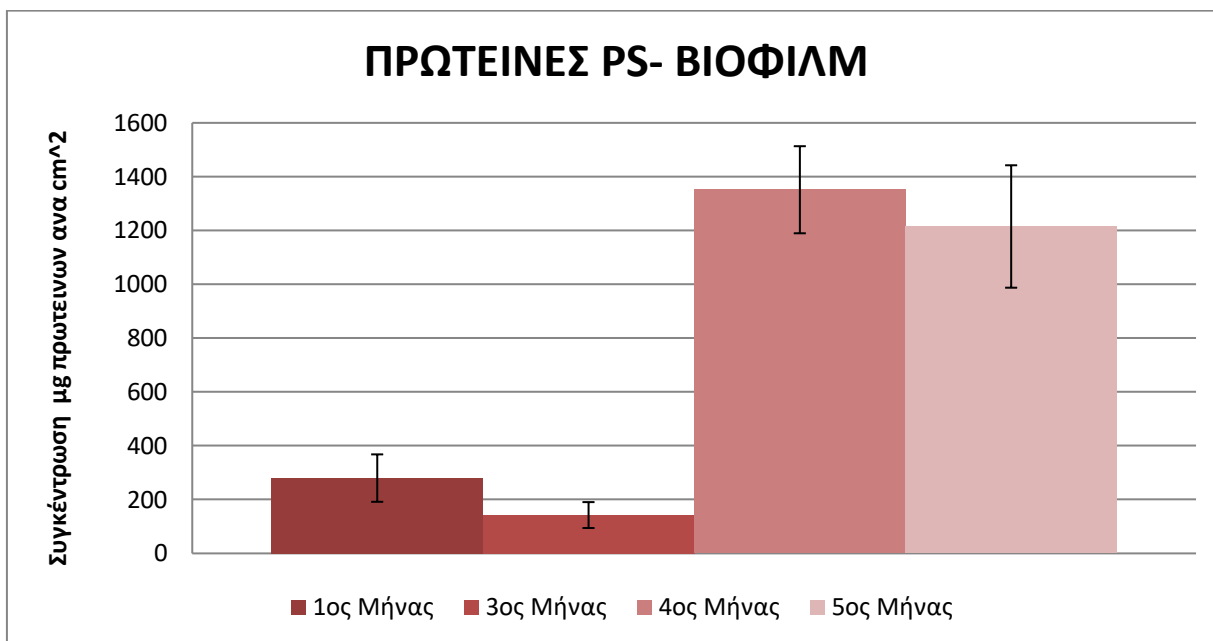
**Διάγραμμα 5: Συγκέντρωση πρωτεϊνών του ΡΡ στο "Βιοφίλμ"**

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο 'Βιοφίλμ' και για τα δυο είδη πλαστικών, υπολογίστηκε ανά μονάδα επιφάνειας. Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα η συγκέντρωση πρωτεϊνών τον 1<sup>ο</sup> και τον 3<sup>ο</sup> μήνα είναι ίση με 257 και 303 μg πρωτεϊνών ανά cm<sup>2</sup> αντίστοιχα, ενώ τον 4<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> μήνα αυξάνεται σημαντικά και ισούται με 2793 και 3008 μg πρωτεϊνών ανά cm<sup>2</sup> αντίστοιχα.



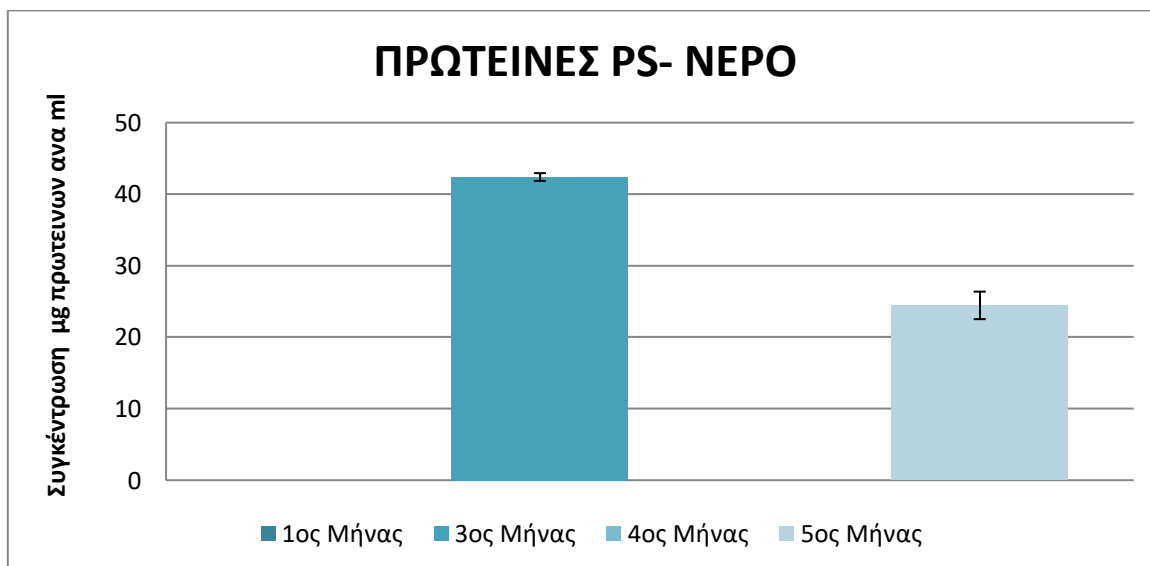
**Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση πρωτεϊνών του ΡΡ στο "Νερό"**

Από το διάγραμμα 6, παρατηρείται ότι τον 1<sup>ο</sup> και τον 4<sup>ο</sup> μήνα η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι αρκετά χαμηλή ώστε να μην μπορεί να ανιχνευθεί, ενώ τον 3<sup>ο</sup> μήνα μετρήθηκε 13 μg πρωτεϊνών ανά ml και τον 5<sup>ο</sup> μήνα έφτασε 25 μg πρωτεϊνών ανά ml.



Διάγραμμα 7: Συγκέντρωση πρωτεϊνών του PS στο "Βιοφίλμ"

Στο παραπάνω διάγραμμα, αρχικά, τον 1<sup>ο</sup> μήνα η συγκέντρωση των πρωτεϊνών ισούται με 280 μg πρωτεϊνών ανά cm<sup>2</sup> και τον 3<sup>ο</sup> μήνα είχε τη χαμηλότερη τιμή, καθώς μετρήθηκε 143 μg πρωτεϊνών ανά cm<sup>2</sup>. Τον 4<sup>ο</sup> μήνα έλαβε τη μέγιστη τιμή 1351 μg πρωτεϊνών ανά cm<sup>2</sup>, ενώ τον 5<sup>ο</sup> υπάρχει μία μικρή μείωση 1214 μg πρωτεϊνών ανά cm<sup>2</sup>.



Διάγραμμα 8: Συγκέντρωση πρωτεϊνών του PS στο "Νερό"

Από το διάγραμμα 8, παρατηρείται το ίδιο μοτίβο με το PP τον 1<sup>ο</sup> και τον 4<sup>ο</sup> μήνα η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι αρκετά χαμηλή ώστε να μην ανιχνεύεται, ενώ τον 3<sup>ο</sup> μήνα είχαμε 42 μg πρωτεϊνών ανά ml και τον 5<sup>ο</sup> μήνα η συγκέντρωση των πρωτεϊνών

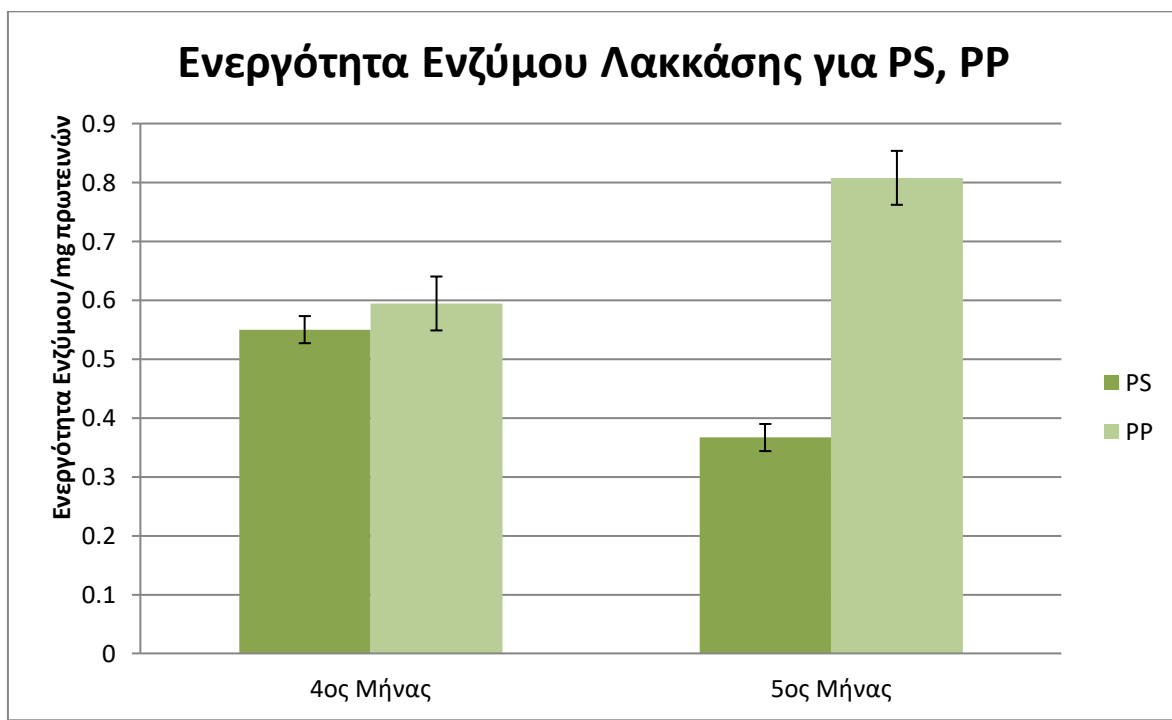
μειώθηκε στα 25 μg πρωτεϊνών ανά ml. Η μέγιστη συγκέντρωση πρωτεϊνών μετρήθηκε τον 4<sup>ο</sup> μήνα.

Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο “Βιοφίλμ” είναι σχετικά υψηλή τους τελευταίους μήνες και για τα δύο υλικά. Αυτό οφείλεται διότι οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και το DNA είναι σημαντικοί παράγοντες σχηματισμού του βιοφίλμ καθώς συμβάλλουν στη λειτουργικότητα και στη σταθερότητάς του βιοφίλμ (Whitchurch et al. 2002). Λόγω της αύξησης του βιοφίλμ τον 4<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> μήνα παρουσιάζεται μεγάλη αύξηση και στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών.

### Μέτρηση ενζύμου

Τα ένζυμα είναι οι καταλληλότεροι καταλύτες, προσφέροντας πολύ πιο ανταγωνιστικές διεργασίες σε σύγκριση με τους χημικούς καταλύτες. Ένας αριθμός διαδικασιών που βασίζονται σε ένζυμα έχουν διατεθεί στο εμπόριο για την παραγωγή πολλών πολύτιμων προϊόντων από τότε που η βιοκατάλυση εισήχθη για πρώτη φορά σχεδόν πριν από έναν αιώνα (Jung-Min Choi, 2015).

Τον 4<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> μήνα πραγματοποιήθηκε στα δείγματα του “Βιοφίλμ” μέτρηση του ενζύμου λακκάση. Η λακκάση (p-διφαινύλο-οξειδοορεδοουκτάση) ανήκει στις πολύ-χαλκούχες πολυφαινολικές οξειδάσες και παράγονται κυρίως από βασιδιομύκητες αλλά και από μερικά στελέχη ασκομυκήτων και εντοπίζεται σε φυτά, μύκητες, βακτήρια και έντομα. Η λακκάση ως ένζυμο παρουσιάζει υψηλή θερμική αντοχή και είναι το κύριο ένζυμο που καταλύει την οξείδωση πολλών οργανικών αρωματικών υποστρωμάτων, κυρίως φαινολικά συστατικά και διαμίνες (Minussi et al. 2002).



**Διάγραμμα 9: Ενεργότητα ενζύμου στο διάστημα του 4<sup>ου</sup> και 5<sup>ου</sup> μήνα για το PP και το PS.**

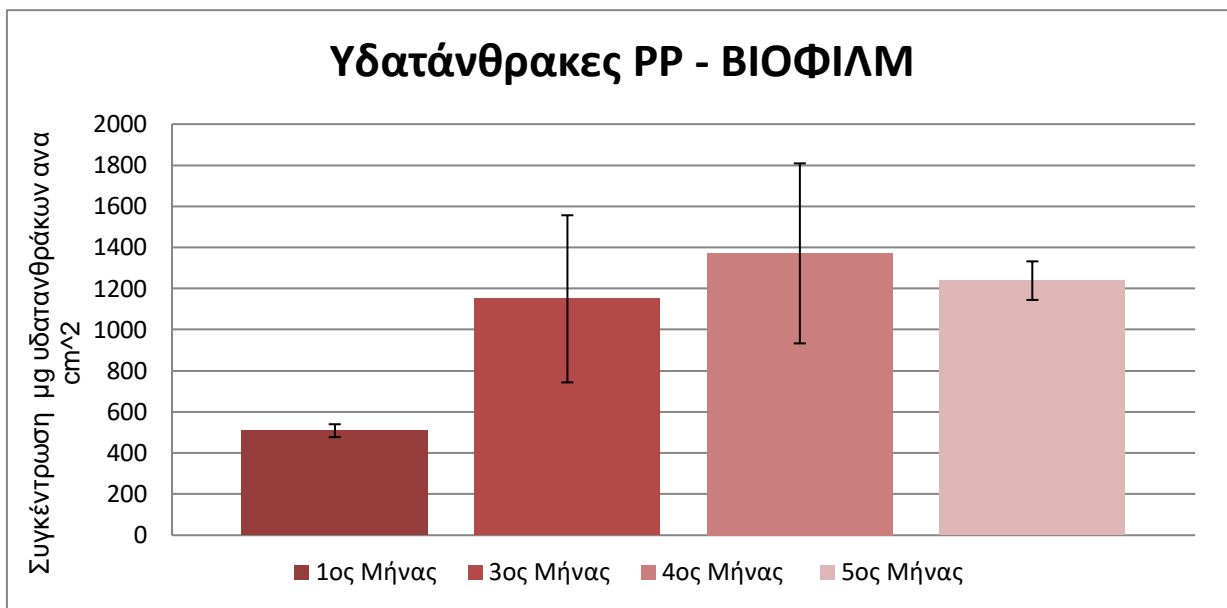
Από το διάγραμμα 9, παρατηρήθηκε ότι για το PS τον 4<sup>ο</sup> μήνα η ενεργότητα του ενζύμου είναι ίση με 0,55 ανά mg πρωτεϊνών, ενώ για το PP είναι ίση με 0,59 ανά mg πρωτεϊνών. Τον 5<sup>ο</sup> μήνα παρατηρήθηκε για το PS μείωση της ενεργότητας του ενζύμου και ήταν ίση με 0,37 ανά mg πρωτεϊνών, ενώ η ενεργότητα του ενζύμου στο PP αυξάνεται σημαντικά και φτάνει 0,81 ανά mg πρωτεϊνών.

Η σύνθεση και η έκκριση του ένζυμου λακκάση επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών (αναλογία C/N), τις συνθήκες καλλιέργειας, την κατάσταση ανάπτυξης μυκήτων, καθώς και την προσθήκη παραγόντων επαγωγής στο μέσο καλλιέργειας. Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν στην παραγωγή της λακκάσης και περιλαμβάνουν ρύθμιση των μεταλλικών ιόντων, λιγνίνη ή παράγωγα που σχετίζονται με αρωματικές ενώσεις, άζωτο και πηγές άνθρακα (Claudia M. Rivera-Hoyos, 2013). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η παραγωγή ενζύμων συμβάλλει στη βιοαποδόμηση πλαστικών, καθώς και στη μείωση του μοριακού βάρους τους (Ren Vei, 2017).

#### **4.4. Ολικοί υδατάνθρακες**

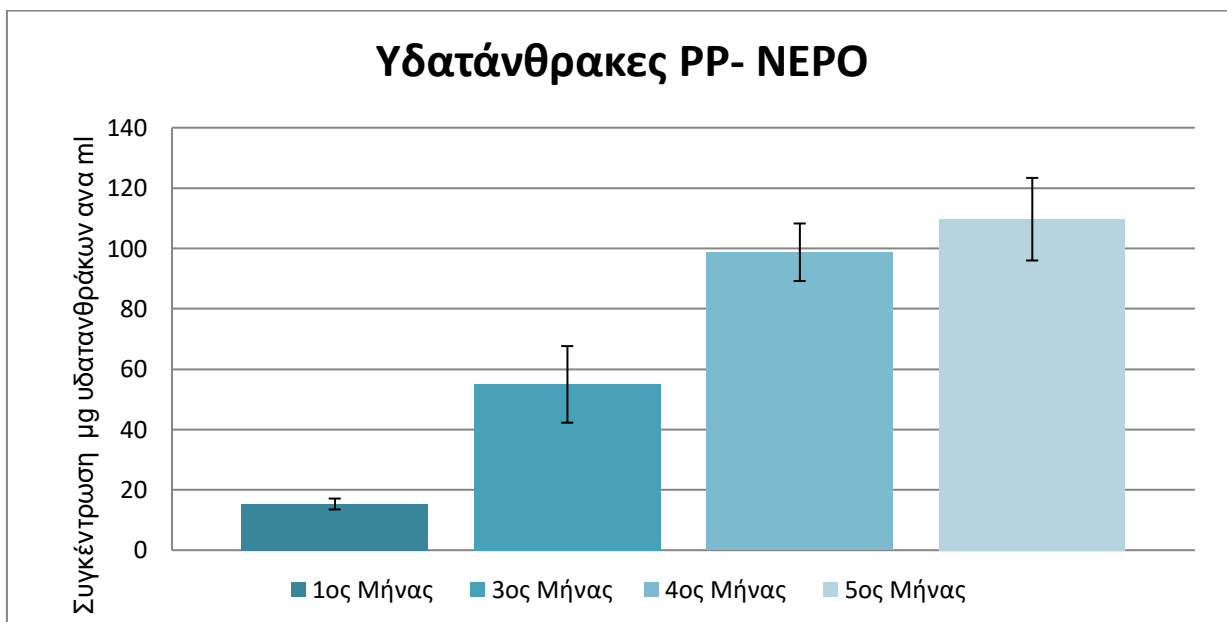
Οι υδατάνθρακες είναι ένα βιομόριο που αποτελείται από άτομα άνθρακα (C), υδρογόνου (H) και οξυγόνου (O) και έχουν εμπειρικό τύπο  $C_m(H_2O)_n$ . Οι βιολογικής σημασίας υδατάνθρακες ονομάζονται και σάκχαρα ή ακόμη και γλυκίδια αρχίζουν από τους μονοσακχαρίτες (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη), και φθάνουν μέχρι και σύνθετα μόρια, που λέγονται πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη. Συνεπώς, όλοι οι σύνθετοι υδατάνθρακες δημιουργούνται από απλές μονάδες που λέγονται μονοσακχαρίτες οι οποίες και δεν μπορούν να υδρολυθούν σε απλούστερη δομή. Οι υδατάνθρακες αποτελούν πηγή ενέργειας και σημαντικές συνιστώσες στη διατροφή όλων των ζωικών οργανισμών, αυτότροφων και ετερότροφων, τροφοδοτώντας τους με την απαιτούμενη ενέργεια για να επιβιώσουν (Wikipedia).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, έγινε μέτρηση των ολικών υδατανθράκων κατά τη διάρκεια των 5 μηνών με τη μέθοδο Anthron. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες υπολογίστηκε ανά μονάδα ml καθώς και ανά μονάδα  $cm^2$  για τα δυο είδη πλαστικών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



**Διάγραμμα 10: Συγκέντρωση υδατανθράκων του PP στο "Βιοφίλμ"**

Η συγκέντρωση των υδατανθράκων στο "Βιοφίλμ" του PP έχει μια αυξητική τάση τους πρώτους μήνες με μέγιστη τιμή των 4<sup>ο</sup> μήνα να ισούται με 1371 μg υδατανθράκων ανά cm<sup>2</sup>, ενώ τον 5<sup>ο</sup> μήνα παρατηρείται μια μικρή μείωση στη συγκέντρωση η οποία είναι ίση με 1238 μg υδατανθράκων ανά cm<sup>2</sup>.

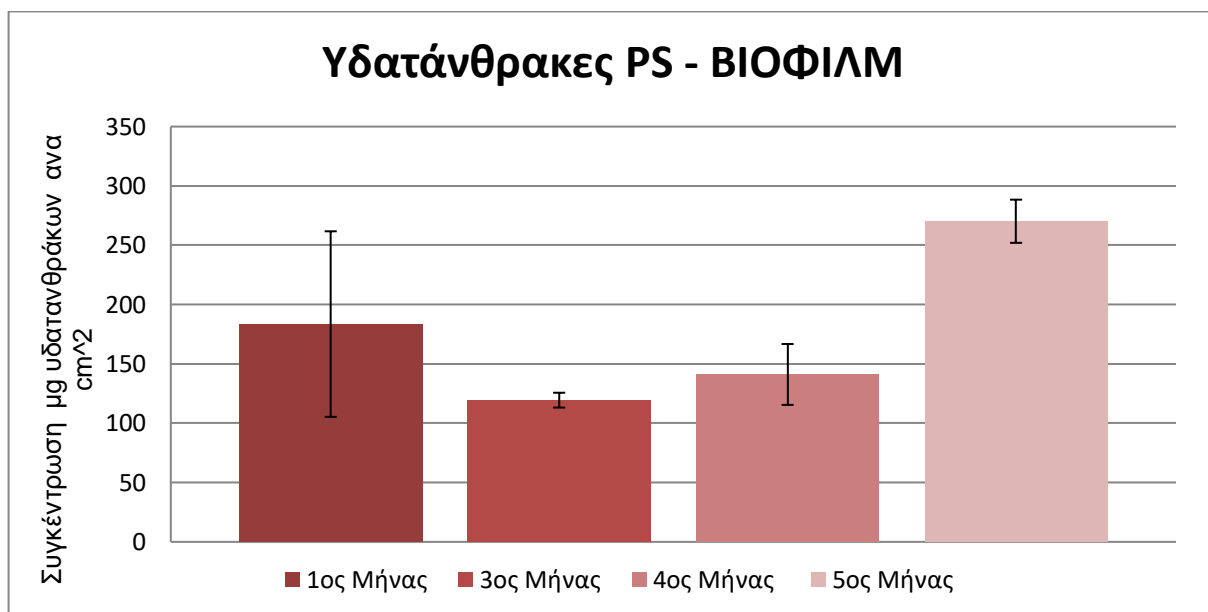


**Διάγραμμα 11: Συγκέντρωση υδατανθράκων του PP στο "Νερό"**

Οι συγκεντρώσεις των υδατανθράκων στην επιφάνεια των πλαστικών παρουσιάζουν διαφορετικό μοτίβο σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στο νερό. Συγκεκριμένα στο παραπάνω διάγραμμα η συγκέντρωση των υδατανθράκων για το PP στο "Νερό" παρουσιάζει μία συνεχής αύξηση. Τον 1<sup>ο</sup> μήνα η συγκέντρωση ισούται με 15

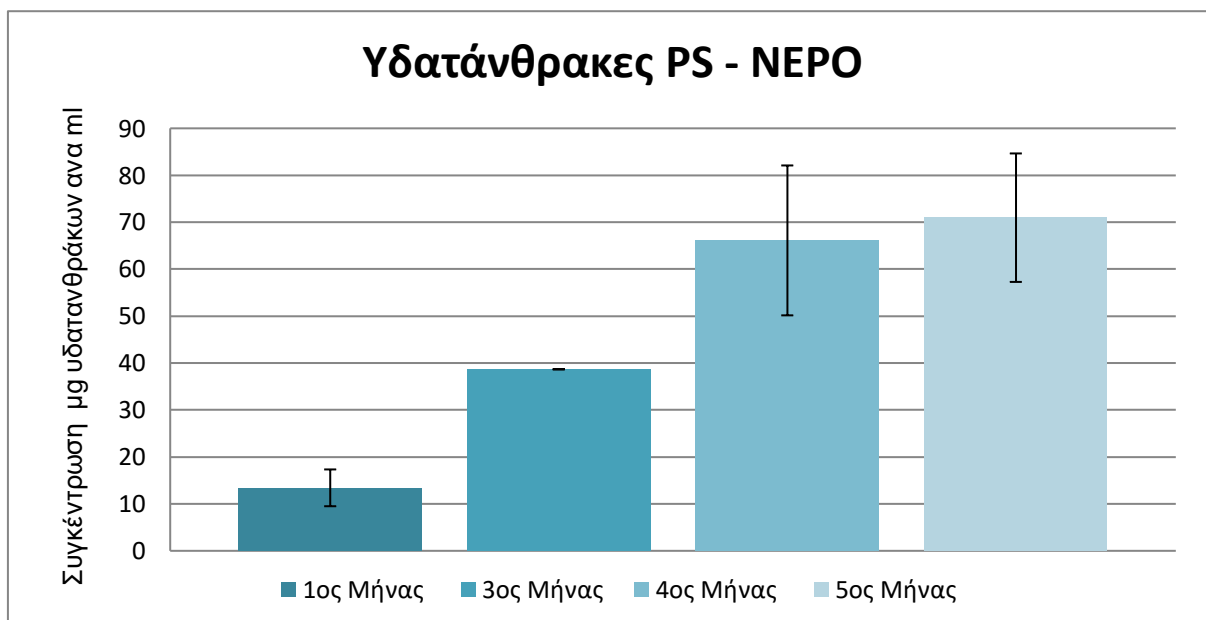


μυδατανθράκων ανά ml και συνεχώς αυξάνεται και τον 5<sup>ο</sup> μήνα φτάνει την τιμή 109,7 μυδατανθράκων ανά ml.



**Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση υδατανθράκων του PS στο "Βιοφίλμ"**

Για το PS στο διάγραμμα 13, παρατηρείται τον 1<sup>ο</sup> μήνα η τιμή να είναι αυξημένη σε σχέση με τον 2<sup>ο</sup> και είναι ίσες με 184 και 119 μγ υδατανθράκων ανά cm<sup>2</sup> αντίστοιχα. Τον 2<sup>ο</sup> μήνα υπάρχει μία μικρή μείωση. Από τον 2<sup>ο</sup> μήνα και μετά ακολουθεί μία αυξητική πορεία και τον 5<sup>ο</sup> μήνα φτάνει τα 270 μγ υδατανθράκων ανά cm<sup>2</sup>.



**Διάγραμμα 13: Συγκέντρωση υδατανθράκων του PS στο "Νερό"**

Το ίδιο μοτίβο που επικρατεί στο διάγραμμα 12 που παρουσιάζει τη συγκέντρωση των υδατανθράκων στο PP επικρατεί και στο διάγραμμα 14. Παρατηρείται μία συνεχής αύξηση

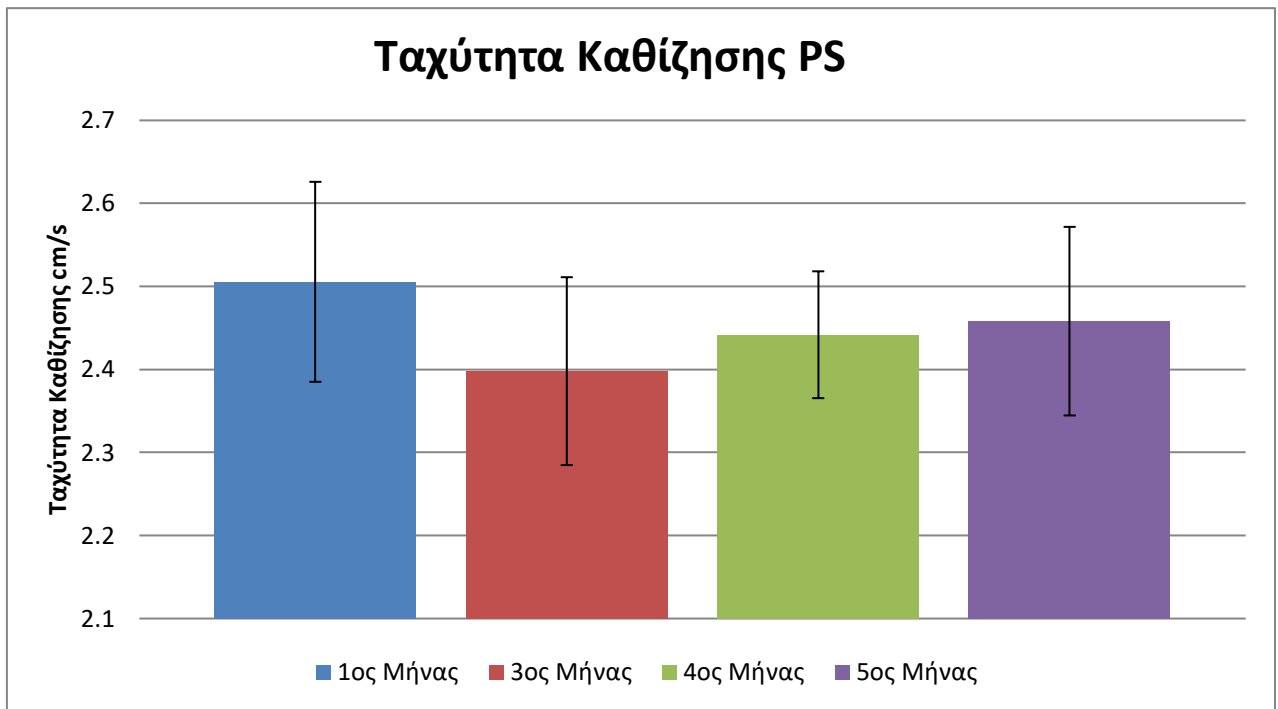
της συγκέντρωσης των υδατανθράκων με τον 1<sup>ο</sup> μήνα να ισούται με 13 μg υδατανθράκων ανά ml και τον 5<sup>ο</sup> μήνα να φτάνει τα 71 μg υδατανθράκων ανά ml.

Ο ρόλος των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων στα εξωκυτταρικά πολυμερή είναι κυρίως η προσκόλληση και η συσσωμάτωση των βακτηριακών κυττάρων καθώς και η προστασία τους από τις περιβαλλοντικές αλλαγές. Βοηθούν στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, δημιουργούν ένα προστατευτικό πλέγμα για την κατακράτηση του νερού και την προσρόφηση οργανικών και ανόργανων ενώσεων, δεσμεύουν ένζυμα, δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων και επιτρέπουν στα κύτταρα να λειτουργούν με τρόπο παρόμοιο με τους πολυκύτταρους οργανισμούς (Eriksen et al., 2014; Shi et al., 2017). Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει διαπιστωθεί πως τα EPS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των μικροοργανισμών στην επιφάνεια των πλαστικών και μετέπειτα στον σχηματισμό του βιοφίλμ. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι συγκεκριμένοι πολυσακχαρίτες των EPS (πολύ-β-1,6 ακετυλο-γλυκοζαμίνη (PGA), κυτταρίνη και κολανικό οξύ), είναι απαραίτητοι για τη βέλτιστη σύνδεση του βακτηρίου *Escherichia coli* με πλαστικές επιφάνειες (Matthysse et al. 2008).

Παρατηρείται, λοιπόν, για το πολυπροπυλένιο ότι οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες ακολουθούν το ίδιο μοτίβο τόσο για το βιοφίλμ όσο και για το νερό. Το μοτίβο που ακολουθείται είναι μία συνεχής αύξηση η οποία ανατρέπεται τον 5<sup>ο</sup> μήνα που παρατηρείται μία μικρή πτώση στις συγκεντρώσεις των υδατανθράκων στο βιοφίλμ. Ακόμα, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι συγκεντρώσεις τόσο των πρωτεϊνών όσο και των υδατανθράκων του PP και στο βιοφίλμ και στο νερό είναι μεγαλύτερες σε σχέση με του PS. Για τα διαγράμματα πρωτεϊνών και υδατανθράκων του πολυστυρένιου δεν παρατηρείται κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο. Συγκεκριμένα όσον αφορά το PS η συγκέντρωση των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων κατά τον 3<sup>ο</sup> μήνα και έπειτα αυξάνεται επί το πλείστον.

#### 4.5. Ταχύτητα Καθίζησης

Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμοι τρόποι για τον υπολογισμό της ταχύτητας καθίζησης ενός πλαστικού και η εφαρμογή τους έχει δοκιμαστεί επανειλημμένα σε σωματίδια με διαφορετικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένων των μικροπλαστικών. Οι ιδιότητες των μικροπλαστικών, όπως η πυκνότητά τους, το σχήμα και το μέγεθός τους επηρεάζουν σημαντικά την ταχύτητα καθίζησης (David Kaiser, 2019). Η ταχύτητα καθίζησης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον χρόνο που χρειάζεται το pellet να διαπεράσει τον ογκομετρικό κυλινδρικό σωλήνα όγκου 2L. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η ταχύτητα καθίζησης κατά τη διάρκεια των 5 μηνών για το πολυστυρένιο. Τα δείγματα πολυπροπυλενίου δεν μπορούσαν να βυθιστούν οπότε δεν μπορούσε να μετρηθεί η ταχύτητα καθίζησής τους.



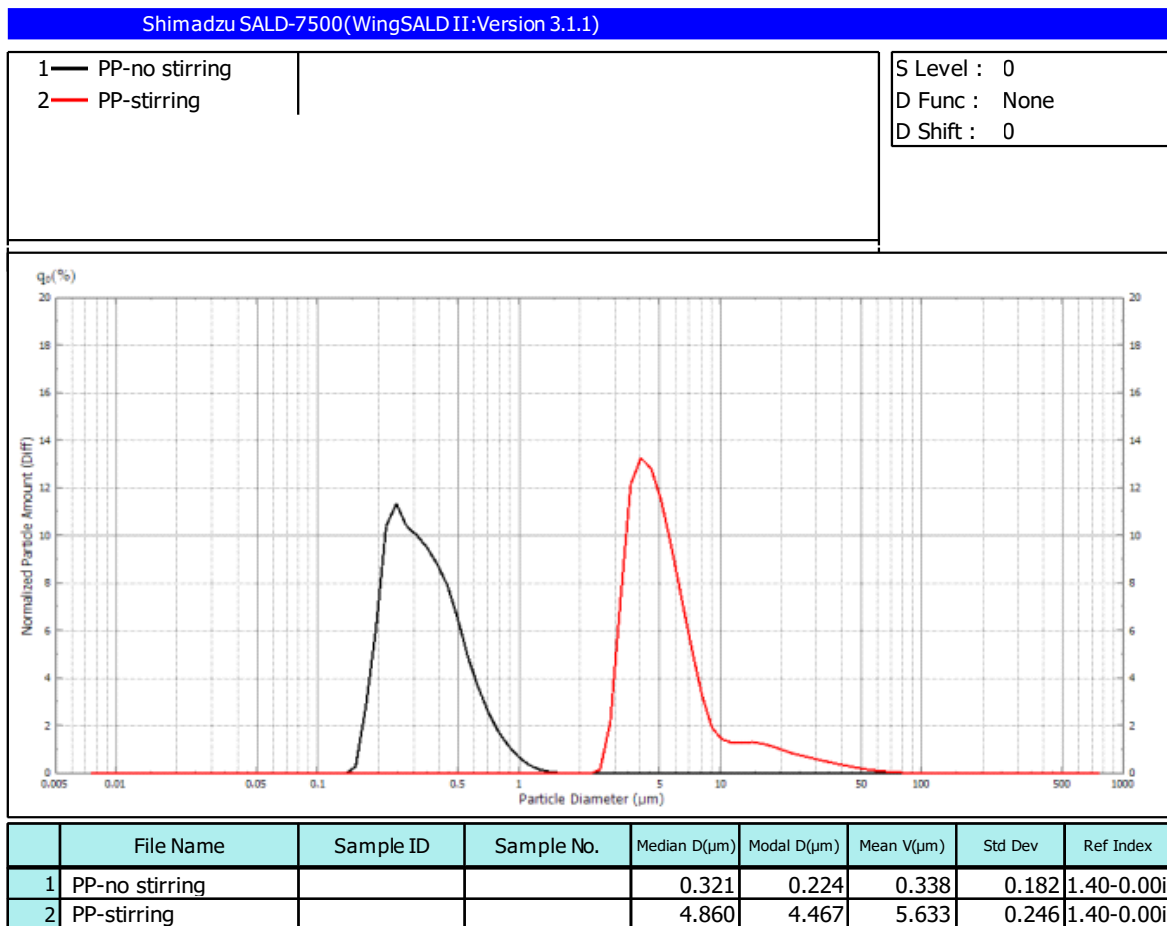
**Διάγραμμα 14: Διάγραμμα Ταχύτητας Καθίζησης PS ανά μήνα.**

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η ταχύτητα καθίζησης από τον 2<sup>ο</sup> μήνα και έπειτα αυξάνεται συνεχώς. Τον 1<sup>ο</sup> μήνα η ταχύτητα καθίζησης είναι ίση με 2,51 cm/s και είναι η μεγαλύτερη τιμή που έχει, ενώ τον 3<sup>ο</sup> μήνα παρατηρείται μία μικρή μείωση, με την ταχύτητα καθίζησης να είναι ίση με 2,39 cm/s και μετά μια μικρή συνεχόμενη αύξηση τον 4<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> μήνα με τιμές 2,44 και 2,45 cm/s αντίστοιχα. Δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά μεταξύ των τιμών με το πέρασ του χρόνου.

Η ταχύτητα καθίζησης επηρεάζεται σημαντικά από την αλατότητα και τη θερμοκρασία του νερού. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι σε μικροσφαιρίδια (pellets) PS η ταχύτητα βύθισης μειώθηκε με την αύξηση της αλατότητας του υγρού (Kowalski et al. 2016). Στα φυσικά θαλάσσια ύδατα η πυκνότητα της θάλασσας αυξάνεται με το βάθος. Επομένως, ορισμένα σωματίδια επιβραδύνονται κατά τη βύθιση τους σε μεγαλύτερα βάθη, και παραμένουν στάσιμα στο σημείο όπου η πυκνότητα του θαλασσινού νερού είναι περίπου ίση με την δική τους (David Kaiser, 2019). Σε χαμηλές θερμοκρασίες η ταχύτητα βύθισης είναι πιο αργή, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες δημιουργείται μια διαστρωμάτωση της στήλη ύδατος όσο αφορά την θερμοκρασία (Paula Möhlenkamp, 2018).

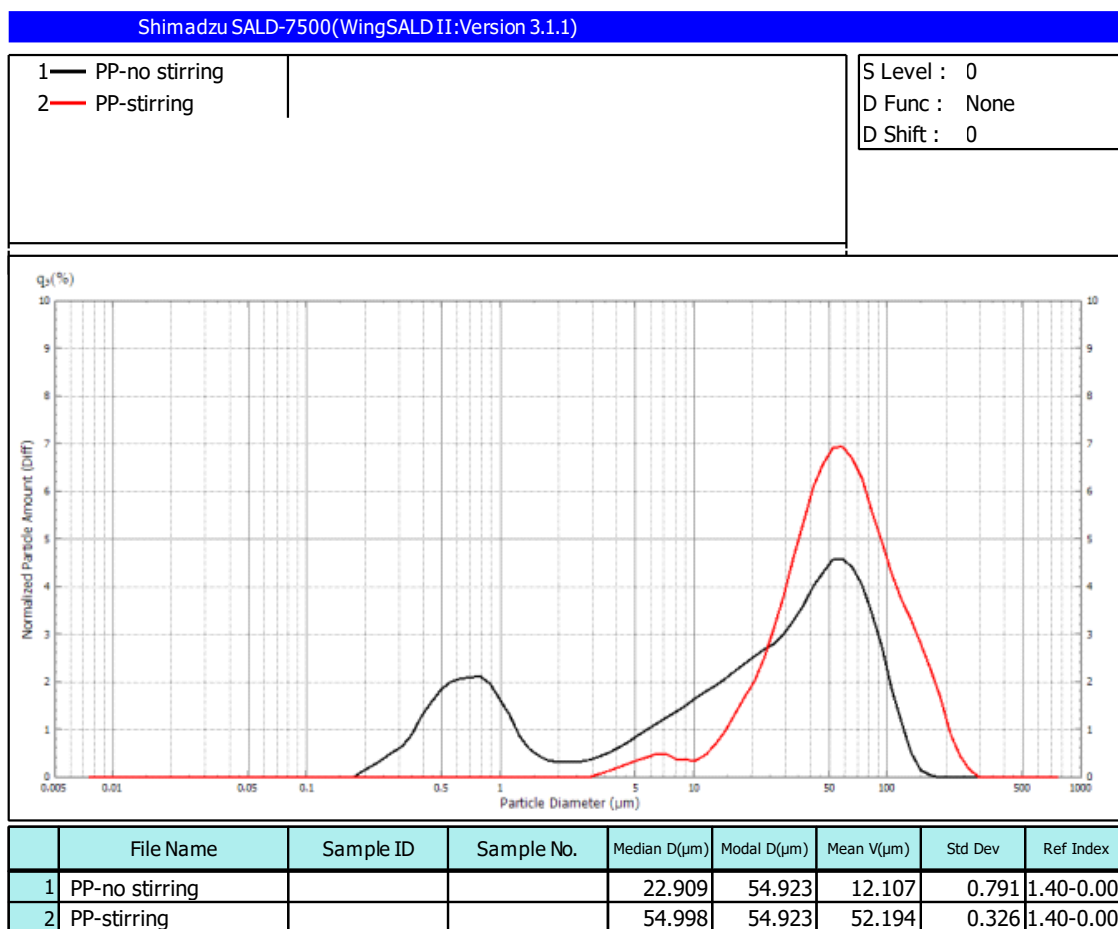
#### 4.6. Κατανομή μεγέθους μικροπλαστικών

Μετά από το διάστημα των 5 μηνών η διασπορά του μεγέθους των μικροπλαστικών που δημιουργήθηκαν μετά την επώαση με τους μικροοργανισμούς υπολογίστηκε με τη βοήθεια του μηχανήματος SALD-7500 Nano σε πραγματικό χρόνο, όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω. Ακολουθούν τα διαγράμματα κατανομής.



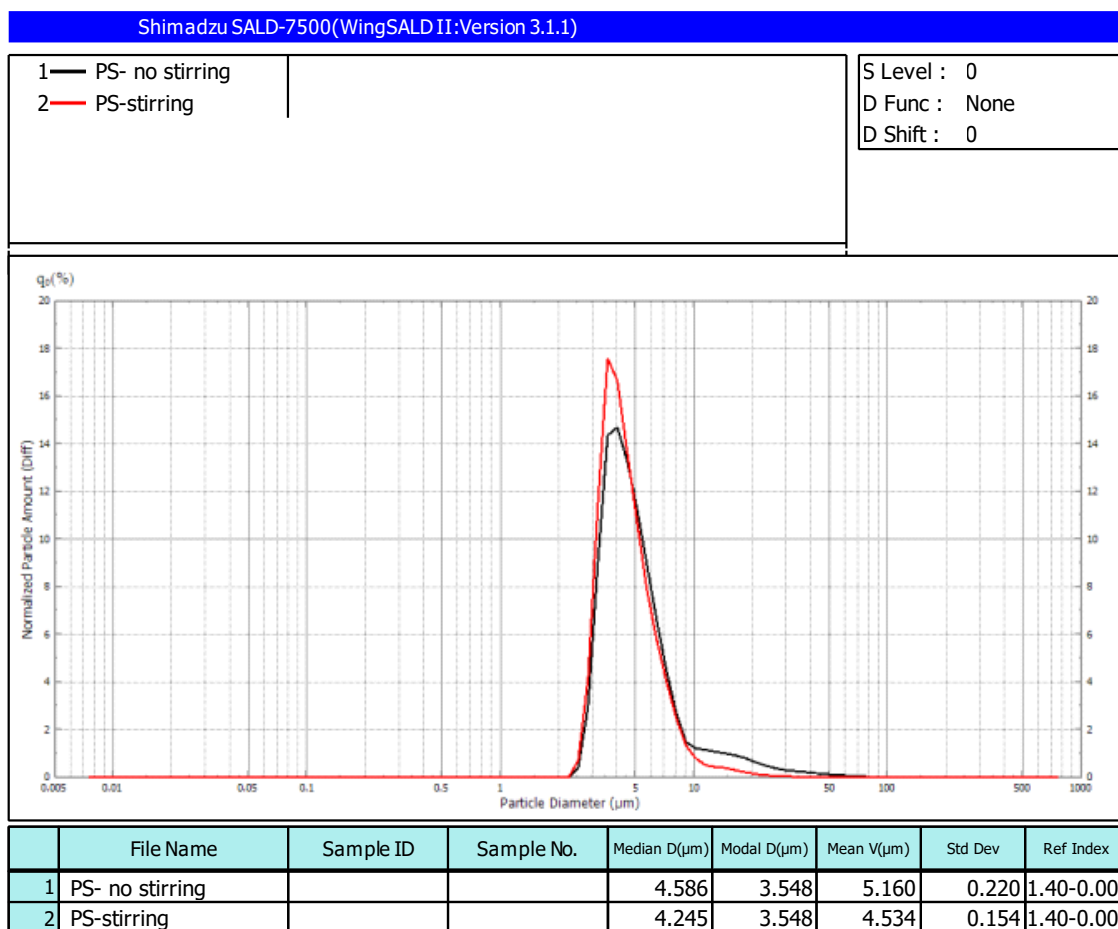
**Διάγραμμα 15:Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PP αβιοτικών δειγμάτων βάση του αριθμού τους (Number).**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω έγινε χρήση 4 επιπλέον κωνικών φλάσκων, 2 για το κάθε είδος πλαστικού ως αβιοτικά δείγματα ελέγχου. Οι φλάσκες αυτές περιείχαν αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και pellets πολυπροπυλενίου και πολυστυρενίου αντίστοιχα και οι 2 από αυτές τοποθετήθηκαν σε τράπεζα ανάδευσης στις 120 στροφές, ώστε να επωαστούν στους 25 °C υπό αερόβιες συνθήκες, ενώ οι άλλες 2 έμειναν σταθερές, χωρίς να αναδεύονται στο χώρο του εργαστηρίου για το διάστημα των 5 μηνών. Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανομή μεγέθους των μικροπλαστικών του πολυπροπυλενίου των αβιοτικών δειγμάτων ελέγχου, με ανάδευση και χωρίς ανάδευση βάση του αριθμού τους. Παρατηρείται ότι η μέση διάμετρος των αβιοτικών δειγμάτων χωρίς ανάδευση είναι ίση 0,338 μm, σε αντίθεση με τη μέση διάμετρο των αβιοτικών δειγμάτων με ανάδευση η οποία ισούται 5,633 μm. Επομένως, η μέση διάμετρος και των δύο αβιοτικών δειγμάτων είναι μεγαλύτερη από 0,1 μm άρα δεν μπορούμε να θεωρήσουμε ότι υπάρχουν νανοπλαστικά στο δείγμα μας.

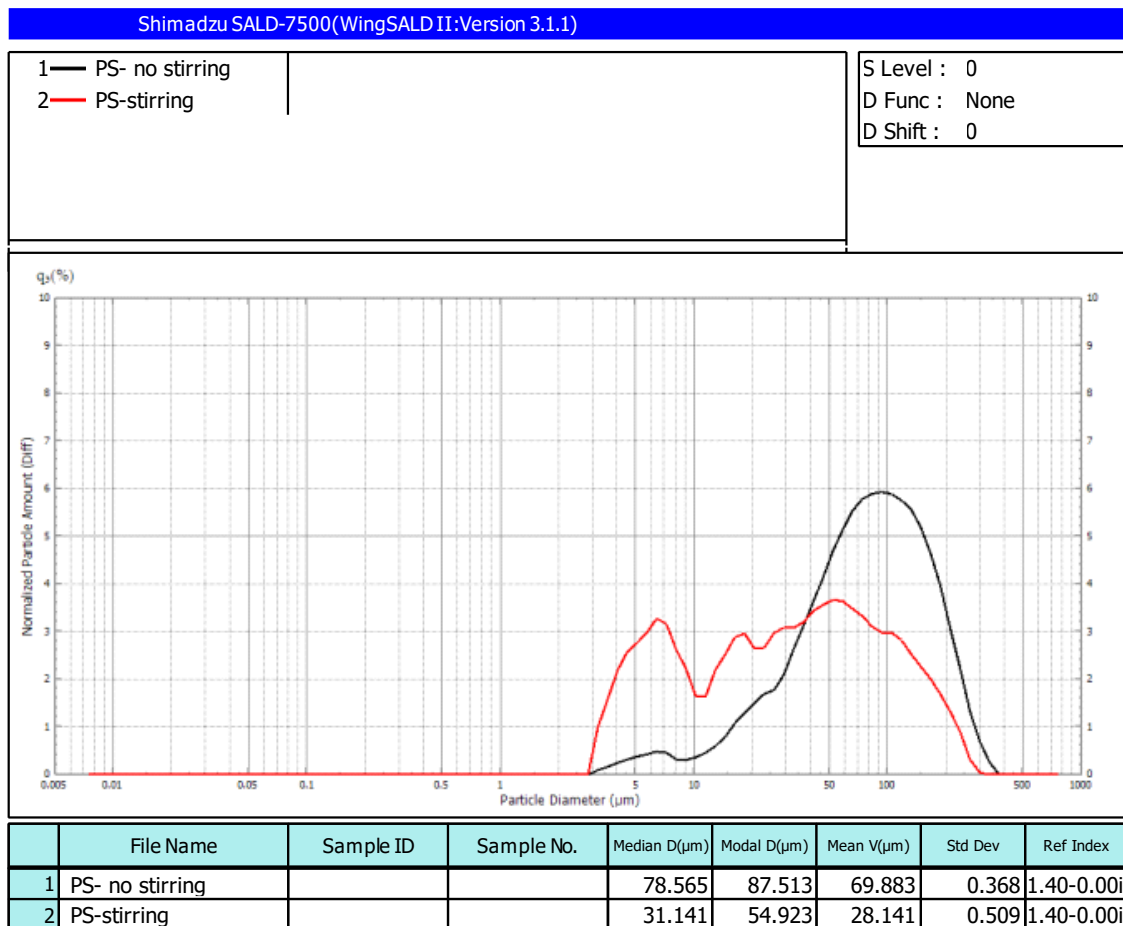


**Διάγραμμα 16:Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PP αβιοτικών δειγμάτων βάση τον όγκο τους (Volume).**

Στο διάγραμμα 17, παρουσιάζεται η κατανομή της διαμέτρου των μικροπλαστικών του PP στα αβιοτικά δείγματα ελέγχου με ανάδευση και χωρίς ανάδευση με βάση τον όγκο τους. Η μέση διάμετρος για το αναδευόμενο αβιοτικό δείγμα ισούται 52,194 μm, ενώ για το αβιοτικό δείγμα χωρίς ανάδευση ισούται 12,107 μm. Και από αυτό το διάγραμμα διαπιστώνεται ότι κανένα σωματίδιο δεν έχει διάμετρο μικρότερη από 0,1 μm, ώστε να θεωρηθεί νανοπλαστικό.



**Διάγραμμα 17:Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PS αβιοτικών δειγμάτων βάση του αριθμού τους (Number).**

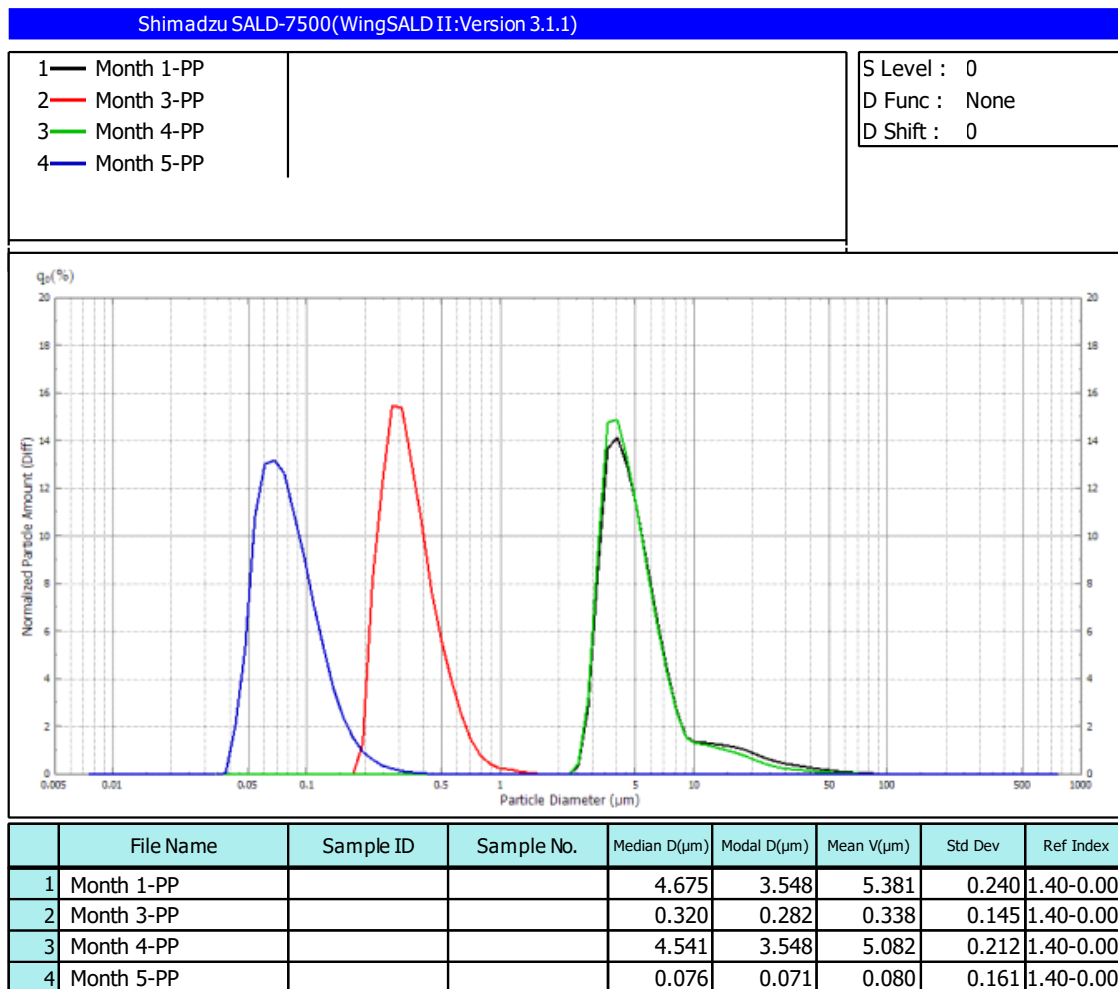


**Διάγραμμα 18:Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PS αβιοτικών δειγμάτων βάση τον όγκο τους (Volume).**

Στα διαγράμματα 18 και 19, παρουσιάζεται η κατανομή μεγέθους των μικροπλαστικών του πολυστυρενίου των αβιοτικών δειγμάτων ελέγχου, με ανάδευση και χωρίς ανάδευση βάση του αριθμού τους (διάγραμμα 18) και του όγκο τους (διάγραμμα 19). Παρατηρείται και στα δύο διαγράμματα ότι κανένα σωματίδιο του PS δεν έχει διάμετρο μικρότερη του 0,1 μm, ώστε να θεωρηθεί νανοπλαστικό.

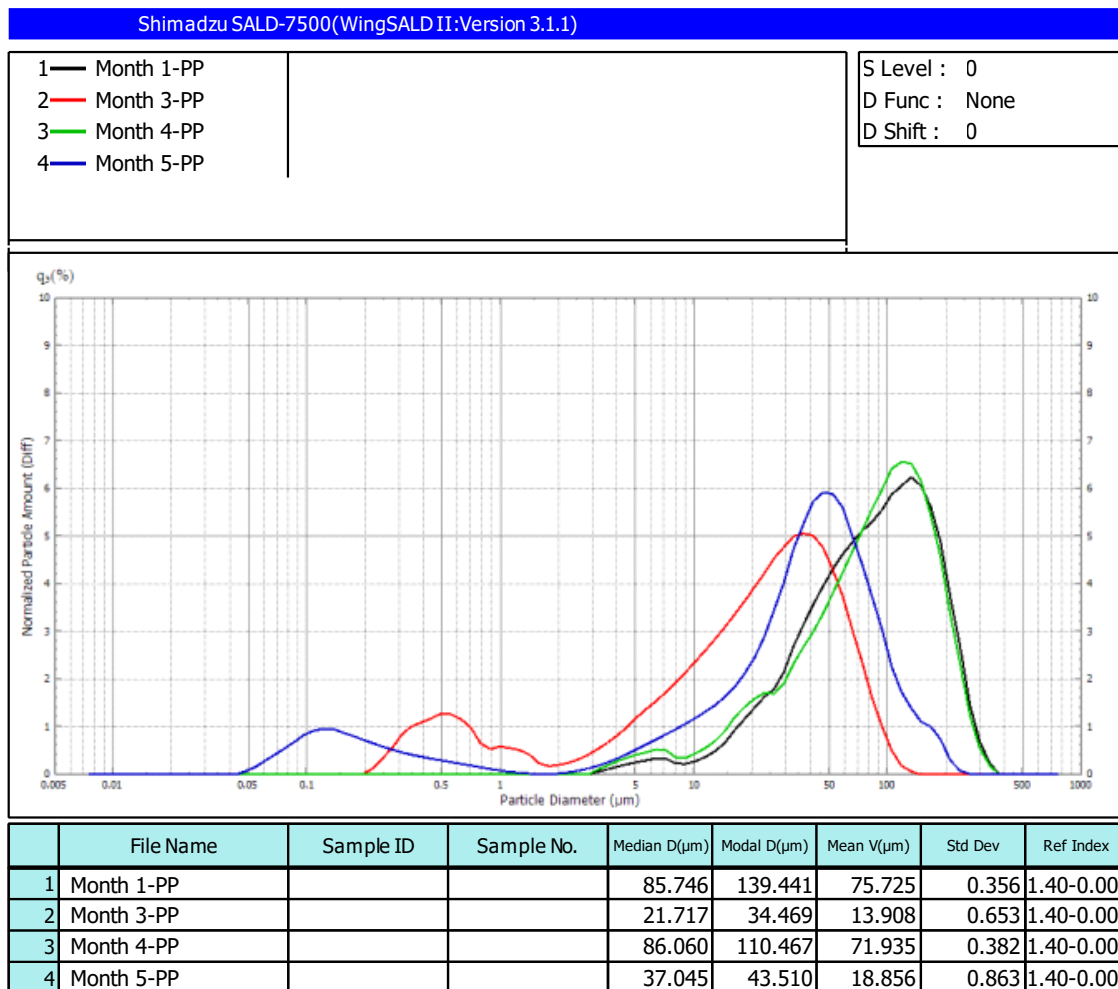
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και των 4 διαγραμμάτων των αβιοτικών δειγμάτων ελέγχου τόσο του PP όσο και του PS στις φλάσκες που αναδεύονταν υπήρχε ένα μικρό ποσοστό κατακερματισμού των σωματιδίων, αλλά η διάμετρος τους παρέμενε μεγάλη. Άρα, δεν μπορούν να σχηματιστούν νανασωματίδια λόγω μηχανικής ανάδευσης ούτε από το PP ούτε από το PS.





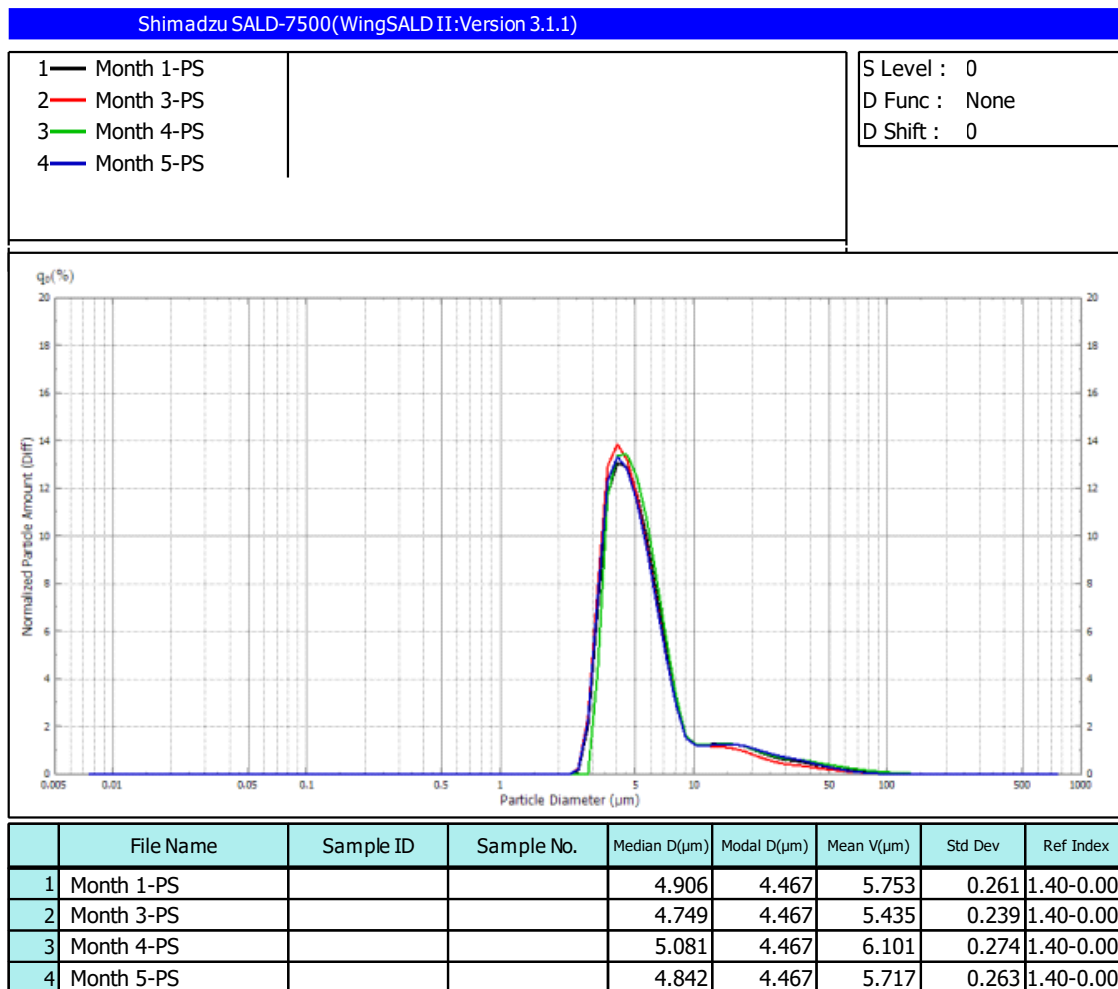
**Διάγραμμα 19:Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PP βάση του αριθμού τους ανά μήνα (Number).**

Στο διάγραμμα 20 παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των μικροπλαστικών PP με βάση τον αριθμό τους για το διάστημα των 5 μηνών. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρείται ότι η μέση διάμετρος μειώνεται σημαντικά εκτός από τον 4<sup>ο</sup> μήνα όπου παρατηρείται μία αύξηση. Πιο συγκεκριμένα, τον 1<sup>ο</sup> μήνα η μέση διάμετρος των PP ισούται 5,381 μm, τον 3<sup>ο</sup> υπολογίστηκε 0,338 μm, τον 4<sup>ο</sup> είναι ίση 5,082 μm, ενώ τον 5<sup>ο</sup> έφτασε τα 0,080 μm.



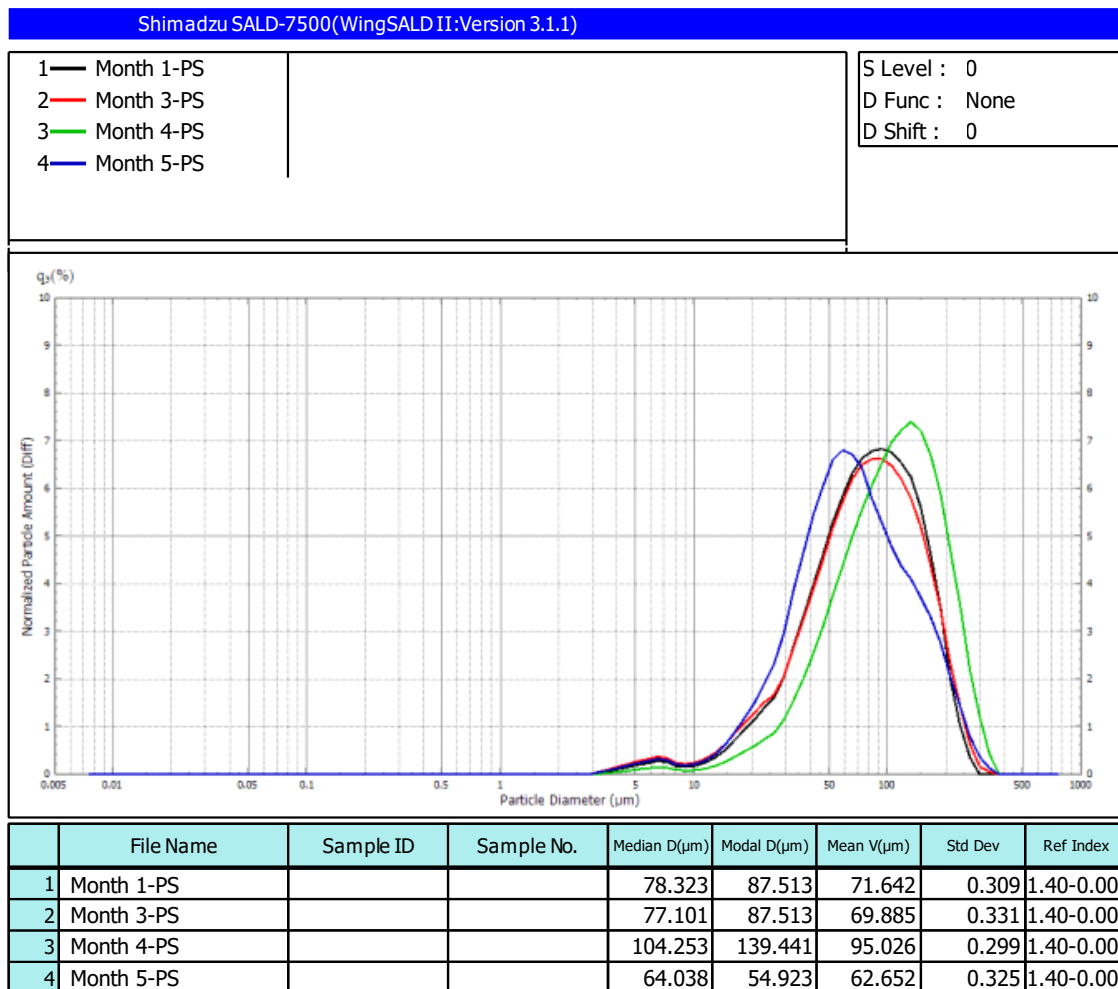
**Διάγραμμα 20:Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PP βάση τον όγκο τους ανά μήνα (Volume).**

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των μικροπλαστικών PP με βάση τον όγκο τους για το διάστημα των 5 μηνών. Παρατηρείται ότι η μέση διάμετρος τον 1<sup>ο</sup> μήνα είναι ίση 75,725 μm, ενώ τον 3<sup>ο</sup> μήνα μειώνεται αρκετά και είναι ίση 13,908 μm. Τον 4<sup>ο</sup> μήνα παρατηρείται αύξηση της διαμέτρου η οποία φτάνει τα 71,935 μm, ενώ τον 5<sup>ο</sup> μήνα μειώνεται ξανά στα 18,856 μm. Το ίδιο μοτίβο μείωσης που ανιχνεύτηκε στο προηγούμενο διάγραμμα με βάση τον αριθμό (διάγραμμα 18) παρατηρείται και εδώ. Η μέγιστη διάμετρος στο διάγραμμα 21 ισούται 139,441 μm, ενώ στο διάγραμμα 18 ισούται 3,541 μm. Σύμφωνα με τα διαγράμματα 20 και 21 η συχνότητα εμφάνισης μικρού σχετικά όγκου των σωματιδίων με διάμετρο μικρότερο του 0,1 μm σε σχέση με τον όγκο των μεγαλύτερων σωματιδίων δείχνει την παρουσία νανοσωματιδίων στο δείγμα μας εξαιτίας της βιοαποδόμησης τους από τους μικροοργανισμούς της πελαγικής κοινότητας Souda.



**Διάγραμμα 21:Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PS βάση του αριθμού τους ανά μήνα (Number).**

Στο διάγραμμα 22 παρουσιάζεται η κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PS βάση του αριθμού τους ανά μήνα για το διάστημα των 5 μηνών. Τον 1<sup>ο</sup> μήνα η μέση διάμετρος ισούτα 5,753 μm, τον 3<sup>ο</sup> μήνα μειώνεται ελάχιστα στα 5,435 μm, τον 4<sup>ο</sup> μήνα αυξάνεται στα 6,101 μm και τέλος, τον 5<sup>ο</sup> μήνα φτάνει περίπου στην αρχική τιμή και συγκεκριμένα στα 5,717 μm.



**Διάγραμμα 22:Κατανομή διαμέτρου σωματιδίων PS βάση τον όγκο τους ανά μήνα (Volume).**

Σύμφωνα με το διάγραμμα 23, παρατηρείται μεγάλη αύξηση της μέσης διαμέτρου σε σχέση με το αντίστοιχο διάγραμμα για το PP. Πιο συγκεκριμένα, τον 1<sup>ο</sup> μήνα η μέση διάμετρος είναι ίση 71,642 μm, τον 3<sup>ο</sup> μήνα μειώνεται ελάχιστα στα 69,885 μm, τον 4<sup>ο</sup> μήνα αυξάνεται σημαντικά και φτάνει τα 95,026 μm, ενώ τον 5<sup>ο</sup> μήνα μειώνεται πάλι και φτάνει τα 62,652 μm. Η μέγιστη διάμετρος ισούται 139,441 μm κατά τον 4<sup>ο</sup> μήνα των μετρήσεών μας.

## 5. Συμπεράσματα

Ένα μεγάλο ποσοστό πλαστικών απορριμμάτων που προέρχεται από ανθρωπογενείς δραστηριότητες καταλήγει στα θαλάσσια και χερσαία οικοσυστήματα. Υπάρχει τεράστια ζήτηση στην εξερεύνηση των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε διαφορετικές συνθήκες και να χρησιμοποιούν τα πλαστικά πολυμερή ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η παρούσα εργασία παρέχει πληροφορίες για την πορεία υποβάθμισης των μικροπλαστικών με την επίδραση βιοτικών παραγόντων σε προσομοιωμένο θαλάσσιο περιβάλλον με προσθήκη σφαιριδίων πολυστυρενίου και πολυπροπυλενίου καθώς και εμβολιασμό από θαλάσσιους μικροοργανισμούς για διάστημα 5 μηνών. Αναλύοντας τα αποτελέσματα των δειγματοληψιών καταλήξαμε στα εξής συμπεράσματα:

- ❖ Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν από τη πελαγική κοινότητα της Σούδας, όχι μόνο μπόρεσαν να αναπτυχθούν αλλά επίσης, ευδοκίμησαν υπό ολιγοτροφικές συνθήκες, όπου τα γηρασμένα μικροπλαστικά πολυπροπυλενίου και πολυστυρενίου ήταν η μόνη διαθέσιμη πηγή άνθρακα.
- ❖ Τα εξωκυτταρικά πολυμερή παρουσίασαν επί το πλείστον μία αυξητική τάση στη συγκέντρωσή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος και ιδιαίτερα τον 4<sup>ο</sup> και τον 5<sup>ο</sup> μήνα, υποδηλώνοντας τον επιτυχή εγκλιματισμό των μικροβιακών κοινοτήτων.
- ❖ Για το πολυπροπυλένιο τον 5<sup>ο</sup> μήνα παρατηρείται η μεγαλύτερη αύξηση των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων, σε συνδυασμό με την μέγιστη μικροβιακή ανάπτυξη και την μέγιστη απώλεια βάρους και υποδηλώνει την επιτυχής βιοαποδόμηση των μικροσφαιριδίων από τους θαλάσσιους μικροοργανισμούς.
- ❖ Για το πολυστυρένιο παρατηρείται σε κάποιες τιμές όπως στη μικροβιακή ανάπτυξη και στις πρωτεΐνες τον 4<sup>ο</sup> μήνα να σημειώνονται οι μεγαλύτερες τιμές.
- ❖ Λαμβάνοντας υπόψη τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των σωματιδίων στα αβιοτικά δείγματα ελέγχου, προτείνεται ότι η μηχανική ανάδευση δεν προκαλεί τον κατακερματισμό των μικροσφαιριδίων σε σωματίδια διαμέτρου  $<0,1 \mu\text{m}$ . Ωστόσο σύμφωνα με τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των σωματιδίων PP καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως ο σχηματισμός νανοσωματιδίων είναι αποτέλεσμα βιοαποδόμησης τους από τους μικροοργανισμούς της πελαγικής κοινότητας.
- ❖ Σύμφωνα με τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των σφαιριδίων πολυστυρενίου διαπιστώθηκε ένα μικρό ποσοστό βιοαποδόμησης τους και σχηματισμός μεγαλύτερων σωματιδίων σε σχέση με το πολυπροπυλένιο.

Όλα τα παραπάνω στοιχεία που καταθέτονται οδηγούν στο συμπέρασμα της αποδόμησης των μικροπλαστικών πολυστυρενίου και πολυπροπυλενίου από θαλάσσιες μικροβιακές κοινότητες σε προσομοιωμένο θαλάσσιο περιβάλλον με μόνη πηγή άνθρακα τα μικροπλαστικά αυτά. Ωστόσο η βιοαποδόμηση των πλαστικών στο φυσικό περιβάλλον είναι μια πολύ αργή διαδικασία και σε συνδυασμό με την ύπαρξη νανοσωματιδίων καθώς και αύξησης των πολυμερών ουσιών και της μικροβιακής ανάπτυξης από τον 4<sup>ο</sup> μήνα και έπειτα, διαπιστώνεται ότι οι 5 μήνες είναι λίγος χρόνος για την πλήρη αποδόμηση των μικροπλαστικών.

### Μελλοντικές Προτάσεις

Η βιοαποδόμηση των πλαστικών είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο. Τα πειράματα που προσομοιάζουν τη φύση είναι δύσκολο να πραγματοποιηθούν στο εργαστήριο λόγω του μεγάλου αριθμού παραμέτρων που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ανακύκλωσης. Στην πραγματικότητα, όλες αυτές οι παράμετροι δεν μπορούν να αναπαραχθούν και να ελεγχθούν πλήρως. Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες από τις γνώσεις σχετικά με τη μικροβιακή ικανότητα αποδόμησης πλαστικών βασίζονται σε συγκεκριμένα βακτήρια ικανά να αναπτυχθούν, που αντιπροσωπεύουν <0,1% των συνολικών βακτηριδίων. Οι χαμηλού κόστους, αποδοτικές τεχνολογίες, φιλικές προς το περιβάλλον που μπορούν να μειώσουν ή και να εξαλείψουν τα πλαστικά, έχουν μεγάλο περιβαλλοντικό ενδιαφέρον. Μεταξύ των βιολογικών παραγόντων, τα μικροβιακά ένζυμα είναι ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία για τη βιοαποικοδόμηση των πλαστικών. Είναι σημαντικό να ληφθούν μέτρα ατομικά και κρατικά όπως η ανακύκλωσή τους, για τον περιορισμό, αφενός της ρύπανσης στην πηγή της, αλλά και της αντιμετώπισής της εκεί που υφίσταται, και στη συνέχεια της εξυγίανσής της, με παραδοσιακές αλλά και καινοτόμες μεθόδους.

## 6. Βιβλιογραφία

- 1) Ana L. d. F. Lacerda, Lucas dos S. Rodrigues, Erik van Sebille, Fábio L. Rodrigues, Lourenço Ribeiro, Eduardo R. Secchi, Felipe Kessler & Maíra C. Proietti, (2019), «Plastics in sea surface waters around the Antarctic Peninsula».
- 2) Andrady, A. L. Assessment of Environmental Biodegradation of Synthetic Polymers. J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev. 34, 25–76 (1994).
- 3) Andrady, A. L. Microplastics in the marine environment. Mar. Pollut. Bull.62, 1596–1605 (2011).
- 4) Campion, E.M., Loughran, S.T., Walls, D. (2017), «Protein quantitation and analysis of purity».
- 5) Cheng, Y., Wei, H., Sun, R., Tian, Z., Zheng, X.,(2016) «Rapid method for protein quantitation by Bradford assay after elimination of the interference of polysorbate 80», Analytical Biochemistry, Volume 494, 1 February 2016, Pages 37-39
- 6) Choi, J.-M., Han, S.-S., Kim, H.-S, (2015), «Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects», Biotechnology Advances, Volume 33, Issue 7, 15 November 2015, Pages 1443-1454
- 7) Claudia M.Rivera-Hoyos, Edwin David Morales-Álvarez, Raúl A. Poutou-Piñales, Aura Marina Pedroza-Rodríguez, Refugio Rodríguez-Vázquez, Julio M. Delgado-Boada, (2013) «Fungal laccases».
- 8) Cozar, A. et al. Plastic debris in the open ocean. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 10239–10244 (2014).
- 9) David Kaiser, Arne Estelmann, Nicole Kowalski, Michael Glockzin, Joanna J. Waniek, (2019) «Sinking velocity of sub-millimeter microplastic», Marine Pollution Bulletin,
- 10) Dias, Bráulio Ferreira De Souza, and Thomas E. Lovejoy. (2012) CBD Technical Series Impacts of Marine Debris on Biodiversity: Current Status and Potential Solutions.
- 11) Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borroero, J. C., et al. (2014). «Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea». PLoS One
- 12) Franziska Klaeger, Alexander S. Tagg, Stefan Otto, Matthias Bienmüller, Ingo Sartorius & Matthias Labrenz, (2019), «Residual Monomer Content Affects the Interpretation of Plastic Degradation».



- 13) Gokhan Acik, Cagatay Altinkok, Mehmet Atilla Tasdelen, (2018), «Synthesis and characterization of polypropylene-graft-poly(l-lactide) copolymers by CuAAC click chemistry».
- 14) Goldring, J.P.D., (2019), «Measuring protein concentration with absorbance, lowry, bradford coomassie blue, or the smith bicinchoninic acid assay before electrophoresis».
- 15) Ioakeimidis, C., K. N. Fotopoulou, H. K. Karapanagioti, M. Geraga, C. Zeri, E. Papathanassiou, F. Galgani, and G. Papatheodorou. 2016. "The Degradation Potential of PET Bottles in the Marine Environment: An ATR-FTIR Based Approach." *Scientific Reports* 6 (October 2015): 1–8.
- 16) Jan F. Rabek, *Polymer Photodegradation: Mechanisms and Experimental Methods*, Springer, 1995, pp.67-92.
- 17) Kowalski, Nicole, Aurelia M. Reichardt, and Joanna J. Waniek. 2016. "Sinking Rates of Microplastics and Potential Implications of Their Alteration by Physical, Biological, and Chemical Factors." *Marine Pollution Bulletin*.
- 18) Law, K. L. (2017), «Plastics in the marine environment».
- 19) Liao, C., X. Liang, Michelle L. Soupir, and L. R. Jarboe. 2015. "Cellular, Particle and Environmental Parameters Influencing Attachment in Surface Waters: A Review." *Journal of Applied Microbiology* 119(2): 315–30.
- 20) Lucas, N. et al. *Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques*. *Chemosphere* 73, 429–442 (2008)
- 21) Lucia Giacomucci, Noura Raddadi, (2019), «Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*», *New Biotechnology*, Volume 52, 25 September 2019, Pages 35-41
- 22) M. Karimi & D. Biria, (2019), «The promiscuous activity of alpha-amylase in biodegradation of low-density polyethylene in a polymer-starch blend».
- 23) Malegori, C. , Franzetti, L. , Guidetti, R. , Casiraghi, E. , Rossi, R., 2016, «GLCM, an image analysis technique for early detection of biofilm», *Journal of Food Engineering*, Volume 185, September 2016, Pages 48-55
- 24) Matthyse, Ann G., Rajendar Deora, Meenu Mishra, and Alfredo G. Torres. 2008. "Polysaccharides Cellulose, Poly-β-1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine, and Colanic Acid

Are Required for Optimal Binding of Escherichia Coli O157:H7 Strains to Alfalfa Sprouts and K-12 Strains to Plastic but Not for Binding to Epithelial Cells.” *Applied and Environmental Microbiology* 74(8): 2384–90.

- 25) Melanie Bergmann, Birgit Lutz, Mine B. Tekman, Lars Gutow, 2017 « Citizen scientists reveal: Marine litter pollutes Arctic beaches and affects wild life», *Marine Pollution Bulletin*, Volume 125, Issues 1–2, 15 December 2017, Pages 535-540
- 26) Minussi R. S. (2002). Purification, characterization and application of laccase.
- 27) Niaounakis, M. Management of Marine Plastic Debris (William Andrew Publishing, 2017).
- 28) Oliviero, M., Stanzione, M., D'Auria, M., Iannace, S., Verdolotti, L., 2019 «Vegetable tannin as a sustainable UV stabilizer for polyurethane foams»
- 29) Paula Möhlenkamp, Autun Purser, Laurenz Thomsen, 2018, «Plastic microbeads from cosmetic products: an experimental study of their hydrodynamic behaviour, vertical transport and resuspension in phytoplankton and sediment aggregates»
- 30) Ren Vei, Wolfgang Zimmermann, 2017, «Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?».
- 31) Seon Yeong Park, Chang Gyun Kim, 2019, «Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site».
- 32) Shaoqing Cui, Joshua Borgemenke, Zhe Liu, Yebo Li, 2019, «Recent advances of “soft” bio-polycarbonate plastics from carbon dioxide and renewable bio-feedstocks via straightforward and innovative routes».
- 33) Shi, Y., Huang, J., Zeng, G., Gu, Y., Chen, Y., Hu, Y., et al. (2017). Exploiting extracellular polymeric substances (EPS) controlling strategies for performance enhancement of biological wastewater treatments: An overview.
- 34) T.S. Galloway, M. Bergmann, L. Gutow, M. Klages (Eds.), 2015 «Micro- and Nano-Plastics and Human Health» Springer International Publishing, Cham Volume 139, February 2019, Pages 214-220
- 35) Werner, Stefanie et al. 2016. JRC Technical Report Harm Caused by Marine Litter - European Commission.
- 36) Whitchurch, Cynthia B., Tim Tolker-Nielsen, Paula C. Ragas, and John S. Mattick. 2002. “Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation.” *Science*

## Διαδύκτιο

- <https://www.wwf.org.au/>
- [www.plasticseurope.org](http://www.plasticseurope.org)
- <http://phys.org>
- <http://chemtube.gr>
- <https://oceans.taraexpeditions.org/>
- [www.vox.com](http://www.vox.com)
- [www.kanali6.com](http://www.kanali6.com)
- <https://www.flickr.com>
- <https://storyofstuff.org/>
- <https://en.wikipedia.org>
- <https://eclass.teiath.gr>
- <http://biologylab.eap.gr>
- [www.ssi.shimadzu.com](http://www.ssi.shimadzu.com)

