



ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

<<ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ (PELLETS ) ΓΗΡΑΣΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΠΡΟΠΥΛΕΝΙΟΥ ΣΕ  
ΜΙΚΡΟΚΟΣΜΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ>>

ΚΑΡΑΚΟΥΛΑΚ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καλογεράκης Νικόλαος , Καθηγητής (Επιβλέπων)

Βενιέρη Δανάη , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Dr. Συρανίδου Ευδοκία

ΧΑΝΙΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2021

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Νικόλαο Καλογεράκη που μου εμπιστεύτηκε την ανάθεση και διεκπεραίωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τη Dr. Συρανίδου Ευδοκία για τη καθοδήγηση, συνεργασία και ευελιξία που παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της υλοποίησης διπλωματικής, στο πειραματικό καθώς και το θεωρητικό κομμάτι όπου οι εμπειρίες και οι γνώσεις της ήταν εξαιρετικά πολύτιμες.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τη κα. Δανάη Βενιέρη και κ. Νικολαΐδη Νικόλαο για την άποψη συνεργασία της καθώς και τη παραχώρηση εξοπλισμού του εργαστηρίου της για τη διεξαγωγή μετρήσεων.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτωρ κα. Καρκανοραχάκη Αικατερίνη και Πετρούλα Σερίδου για τη βοήθεια και καθοδήγηση τους στις πειραματικές διαδικασίες και τις εκτελέσεις μετρήσεων.

Κλείνοντας, λόγο της άριστης συνεργασίας που υπήρχε με τους προαναφερθέντες έγινε εφικτό να γίνει διεκπεραίωση της διπλωματικής μου και τους είμαι ευγνώμον.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρήση πλαστικών προϊόντων έχει καταλάβει τα τελευταία χρόνια μεγάλο κομμάτι των αγαθών της καθημερινότητας μας, με αποτέλεσμα τα απόβλητα που δημιουργούνται από τη χρήση αυτών, επί το πλείστον, να καταλήγουν σε υδάτινους αποδέκτες και κυρίως τον ωκεανό. Με αποτέλεσμα να υποβαθμίζονται αισθητικά και λειτουργικά τα οικοσυστήματα που είναι αποδεκτές τους, θέτοντας τα έτσι σε κίνδυνο. Μία από τις συνηθέστερες μορφές πλαστικών που συναντά κάποιος στις ακτογραμμές και τους ωκεανούς είναι τα μικροσφαιρίδια (pellets), αυτό εξαιτίας του μεγάλου ρόλου τους στη βιομηχανία πλαστικών. Τα pellets κατά τη διάρκεια έκθεσης τους στο περιβάλλον υπόκεινται αλλαγές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους και στις μηχανικές τους ιδιότητες, γνωστό και ως φαινόμενο γήρανσης (weathering), γεγονός που τα καθιστά ευάλωτα στη δράση των μικροοργανισμών.

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης των μικροβιακών κοινοτήτων της θαλάσσιας περιοχής του κόλπου της Σούδας είτε ξεχωριστά είτε σε συνεργασία με τον μύκητα *Acremonium tubakii* στα γηρασμένα μικροσφαιρίδια (pellets) πολυπροπυλενίου, σε προσομοιωμένο θαλάσσιο περιβάλλον μορφής batch reactor, όπου πηγή υδατάνθρακα αποτελούν η γλυκόζη και τα γηρασμένα μικροσφαιρίδια.

Τα γηρασμένα κατά 4 μήνες από UV ακτινοβολία μικροσφαιρίδια τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες, στη συνέχεια προστέθηκε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, χαλκός και γλυκόζη, και τέλος έγινε εμβολιασμός με τη μικροβιακή κοινότητα. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν σε συσκευή ανάδευσης στις 100 στροφές το λεπτό για 2 μήνες. Σε διαστήματα των 15 ημερών πραγματοποιούνταν δειγματοληψία για την εκτίμηση της απώλειας βάρους των μικροσφαιριδίων, την ανίχνευση του ενζύμου της λακκάσης, του ανάγλυφου των μικροσφαιριδίων, των ολικών πρωτεϊνών του βιοφίλμ, του ολικού διαλυμένου άνθρακα καθώς και του βιοφίλμ που είχε προσκολληθεί στα pellets. Από τις παραπάνω μετρήσεις συμπεράναμε ότι υπήρξε αισθητή μείωση του βάρους στα pellet που οφείλεται στη ενεργητικότητα των μικροοργανισμών στους αντιδραστήρες των 100ml που εξετάστηκαν και είχαν ως πηγή άνθρακα τα μικροσφαιρίδια και ποσότητα γλυκόζης 0,1gr που προστέθηκε τη πρώτη μέρα και τη 30<sup>η</sup> ημέρα.

## Abstract

The usage of plastic products has overtaken the last years a big portion of goods we use in our daily life, as a result waste is produced from their usage, in many cases those wastes end up in aqueous recipient and mostly the ocean. This results in the aesthetic and functional downgrading of the recipient ecosystem thus endangering it. One of the most common types of plastic that someone can encounter in the coastlines and the ocean is microbeads (pellets), due to their important role in the industry of plastics. During their exposure to the environment pellets undergo alteration of their physicochemical and mechanical characteristics, also known as weathering/aging, which makes the vulnerable against microorganism attack.

The purpose of this research is the study of the effects of microbial communities from the coastal area of gulf of Souda either combined with the fungi *Acremonium tubakii* on pellets of polypropylene, in simulated marine environment in a batch reactor, where glucose and weathered microbeads are the carbon sources.

The microbeads were previously exposed for 4 months to UV radiation, then they were placed in sterilized flasks. Sterile seawater was added to the flasks as well as Copper (Cu) and Glucose, and the microbial community. Then we placed the flasks on stirring devices at 100rpm for 2 months. We had sampling at intervals of 15 days for the estimation of the weight loss of the pellets, measuring the activity of laccase enzyme, monitoring the surface of the microbeads, the total proteins within the biofilm, the total dissolved carbon as well as the biofilm attached to the microbeads. From the above results we came into a conclusion that there was a significance change in the reduction of weight of the pellets, that the microorganisms in the bioreactors of 100ml that was monitored are responsible and that the source of carbon they had access to was the microplastic pellet and 0,1gr of Glucose that was injected in the first and the 30<sup>th</sup> day.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	iii
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1 ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΠΛΑΣΤΙΚΑ .....	1
1.1.1 Τα προβλήματα των πλαστικών .....	1
1.1.2 Ρύπανση από πλαστικά σε ωκεανούς και γη .....	3
1.1.3 Ρύπανση από πλαστικά πρόσθετα .....	7
1.2 ΠΛΑΣΤΙΚΑ .....	8
1.2.1 Η σύνθεση , δομή και οι ιδιότητες των πλαστικών .....	9
1.2.2 Μικροπλαστικά .....	11
1.2.2.1 Ιδιότητες .....	11
1.2.2.2 Πρωτογενή και δευτερογενή μικροπλαστικά .....	11
1.2.2.3 Περιβαλλοντικές και υγειονομικές επιδράσεις .....	11
1.2.2.4 Μειώνοντας τη ρύπανση από μικροπλαστικά .....	12
1.2.2.5 Κοινότητες μικροοργανισμών .....	12
1.2.3 Νανοπλαστικά .....	13
1.3 ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΠΟΡΩΝ .....	15
1.3.1 Ταυτοποίηση , διαχωρισμός και διαλογή .....	16
1.3.2 Αξία οικονομικής ανάκτησης .....	17
1.3.3 Διασπόμενα πλαστικά .....	18
2 ΣΚΟΠΟΣ .....	18
3 ΜΕΘΟΔΟΙ, ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ .....	19
3.1 ΥΛΙΚΑ .....	19
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ .....	20
3.2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ .....	20
3.2.1.1 Προετοιμασία Αντιδραστήρων .....	20
3.2.1.2 Ανάπτυξη κοινοτήτων μικροοργανισμών .....	22
3.2.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ .....	25

3.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΡΟΥΣ .....	26
3.2.4 ΧΡΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟ ΙΩΔΕΣ .....	27
3.2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ .....	27
3.2.5.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ .....	27
3.2.5.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ .....	28
3.2.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ .....	29
3.2.7 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ PELLET .....	32
3.2.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΑΚΚΑΣΗΣ .....	32
3.2.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΥΜΕΝΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ .....	32
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
4.1 ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ PP.....	34
4.2 ΕΞΕΤΑΣΗ ΒΑΡΟΥΣ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ .....	35
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΡΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟ ΙΩΔΕΣ .....	40
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ .....	42
4.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ .....	43
4.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ PELLET .....	48
4.7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΑΚΚΑΣΗΣ.....	50
4.8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΔΙΑΛΥΜΕΝΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ.....	52
5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	55
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	57

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 : Κατανομή παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών (Source : <a href="http://www.plasticeurope.org">www.plasticeurope.org</a> ) ....	2
Εικόνα 2 : Η ροή που τα πλαστικά εισέρχονται στη θάλασσα ( Source : Janbeck et al. (2015) , Eriksen et al. (2014) , <a href="http://www.OurWorldInData.org">www.OurWorldInData.org</a> ) .....	2
Εικόνα 3 : Οι πέντε κύριοι στρόβιλοι (μεγάλα συστήματα από ωκεάνια ρεύματα ) . ( Source : COMET® Website at <a href="http://meted.ucar.edu/">http://meted.ucar.edu/</a> of the University Corporation for Atmospheric Research (UCAR) ) .....	4
Εικόνα 4 : Κύκλος ζωής των πλαστικών (Source: <a href="http://www.britannica.com">www.britannica.com</a> ) .....	5
Εικόνα 5 : Κατανάλωση και εγκλωβισμός θαλάσσιας χελώνας από πλαστικά δίχτυα (Source : <a href="https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2590332220305509-gr1.jpg">https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2590332220305509-gr1.jpg</a> ) .....	6
Εικόνα 6 : Εγκλωβισμός πτηνού από πλαστική σακούλα . (Source: <a href="http://www.nationalgeographic.com">www.nationalgeographic.com</a> ) .....	6
Εικόνα 7 : Εύρεση μικροπλαστικών στο βουνό Έβερεστ (Source: <a href="https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2590332220305509-fx1.jpg">https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2590332220305509-fx1.jpg</a> ) .....	7
Εικόνα 8 : Μικροπλαστικά στα Ιμαλάια (Source: <a href="https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2590332220305509-gr1.jpg">https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2590332220305509-gr1.jpg</a> ) .....	7
Εικόνα 9 : Χρήση των πλαστικών στη καθημερινότητα (Source : <a href="http://www.plasticeurope.org">www.plasticeurope.org</a> ) .....	9
Εικόνα 10 : Είδος των πλαστικών και οι χρήσεις τους (Source : <a href="http://www.plasticeurope.org">www.plasticeurope.org</a> ) .....	10
Εικόνα 11 : Δομή πολυπροπυλενίου (Source : <a href="http://article.sapub.org/10.5923.j.ajps.20160601.01.html">http://article.sapub.org/10.5923.j.ajps.20160601.01.html</a> ) .....	10
Εικόνα 12 : Μετάδοση από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (α) περιβαλλοντικά σχετικά νανοπλαστικά από πολυεθυλένιο διασπασμένα από UV από γηρασμένα μικροπλαστικά που συλλέχθηκαν στο Βόρειο Ατλαντικό Ωκεανό (b) ένα μίγμα πολυστυρενίου συμβατικού latex (80, 100, 200 and 400 nm, αγοράστηκαν από Thermo-Fischer). Οι γκρίζες σχηματισμοί είναι χαρακτηριστικά οργανικών ατόμων που γενικά χρησιμοποιούνται για να σταθεροποιήσουν συμβατικό latex πολυστυρενίου .....	14
Εικόνα 13 : Zero waste Europe (Source : <a href="http://www.zerowasteeurope.eu">www.zerowasteeurope.eu</a> ) .....	15
Εικόνα 14 : Κάδοι απορριμμάτων ανά είδος (Source: <a href="https://www.britannica.com/explore/savingearth/recycling">https://www.britannica.com/explore/savingearth/recycling</a> Credit : Eva Blanda/Fotolia) .....	16
Εικόνα 15 : Θάλαμος ακτινοβολήσης UV-A .....	19
Εικόνα 16 : Αντιδραστήρες ( κωνικές φιάλες) .....	21

Εικόνα 17 : Τυπική μορφή καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών (Maier 2009) .....	23
Εικόνα 18 : UV-VIS Φασματοφωτόμετρο .....	24
Εικόνα 19 : Ζυγαριά ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων .....	26
Εικόνα 20 : Σχηματισμός βιοφίλμ (Source: Centre of Microbial Innovation ,UoA,NZ) .....	28
Εικόνα 21 : Κυψελίδες με εμφανή τον σχηματισμό του έγχρωμου συμπλόκου χρωστικής-πρωτεΐνης .....	29
Εικόνα 22 : Σύστημα υπολογισμού διασποράς μεγέθους μικροπλαστικών ( Πηγή : <a href="https://www.shimadzu.eu.com">https://www.shimadzu.eu.com</a> ) .....	30
Εικόνα 23 : Σχέση μεταξύ της διαμέτρου των σωματιδίων και του μοτίβου κατανομής του φωτός ( Πηγή : <a href="https://www.shimadzu.eu.com">https://www.shimadzu.eu.com</a> ) .....	31
Εικόνα 24 : Σκέδαση / Περίθαλψη φωτός από το σωματίδιο ο( Πηγή : <a href="https://www.shimadzu.eu.com">https://www.shimadzu.eu.com</a> ) .....	31
Εικόνα 25 : Τρόποι υπολογισμού του ολικού οργανικού άνθρακα.....	33
Εικόνα 26 : "Multi N/C 2100S" Analytik Jena (Source: <a href="https://www.analytik-jena.com">https://www.analytik-jena.com</a> ) .....	33
Εικόνα 27 : Αλλαγή χρώματος στα σφαιρίδια πολυπροπυλενίου εξαιτίας της UV-A ακτινοβολίας .....	34
Εικόνα 28 : Μικροσφαιρίδια (pellets) PS, (Kowalski et al. 2016).....	34

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1 : Ακτινοβολία έκθεσης ανά ημέρα στο θάλαμο ακτινοβολήσης UV .....	20
Διάγραμμα 2 : Διαφορά βάρους ανά δειγματοληψία στη κοινότητα των βακτηρίων .....	35
Διάγραμμα 3 : Μείωση βάρους pellets στη κοινότητα βακτηρίων .....	36
Διάγραμμα 4: Ποσοστιαία μείωση βάρους pellets στη κοινότητα βακτηρίων .....	36
Διάγραμμα 5 : Διαφορά βάρους ανά δειγματοληψία στη κοινότητα των μυκήτων.....	37
Διάγραμμα 6 : Μείωση βάρους pellets στη κοινότητα μυκήτων .....	37
Διάγραμμα 7 : Ποσοστιαία μείωση βάρους pellets στη κοινότητα μυκήτων.....	38
Διάγραμμα 8: Διαφορά βάρους αβιοτικών δειγμάτων .....	38
Διάγραμμα 9: Ποσοστιαία μείωση βάρους αβιοτικών δειγμάτων.....	39



Διάγραμμα 10 : Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων στα δείγματα που επωάστηκαν με την πελαγική κοινότητα και το μύκητα.....	40
Διάγραμμα 11 : Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων στα δείγματα που επωάστηκαν με την πελαγική κοινότητα .....	41
Διάγραμμα 12 : Συγκέντρωση Πρωτεϊνών στα δείγματα που επωάστηκαν με την πελαγική κοινότητα και το μύκητα .....	42
Διάγραμμα 13 : Συγκέντρωση Πρωτεϊνών στα δείγματα που επωάστηκαν με την πελαγική κοινότητα.....	43
Διάγραμμα 14 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τη συγκέντρωσή τους (Number) για τη δειγματοληψία της ημέρας 15 της κοινότητας των βακτηρίων .....	44
Διάγραμμα 15 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τη συγκέντρωσή τους (Number) για τη δειγματοληψία της ημέρας 30 της κοινότητας των βακτηρίων .....	44
Διάγραμμα 16 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τη συγκέντρωσή τους (Number) για τη δειγματοληψία της ημέρας 45 της κοινότητας των βακτηρίων .....	45
Διάγραμμα 17 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τη συγκέντρωσή τους (Number) για τη δειγματοληψία της ημέρας 60 της κοινότητας των βακτηρίων .....	45
Διάγραμμα 18 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση την συγκέντρωσή τους στους αντιδραστήρες με τη κοινότητα των βακτηρίων (Number).....	46
Διάγραμμα 19 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τον όγκο τους (Number) της κοινότητας των βακτηρίων .....	46
Διάγραμμα 20 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τον όγκο στους αντιδραστήρες με τη κοινότητα των βακτηρίων (Volume).....	47
Διάγραμμα 21 : Εκτίμηση κατανομής της επιφάνειας των μικροσφαιριδίων που εκτέθηκαν στην πελαγική κοινότητα βακτηρίων ανά ημέρα δειγματοληψίας με βάση το ποσοστό weathering τους .....	48
Διάγραμμα 22 : Κατανομή pellet με βάση το ποσοστό weathering στη πελαγική κοινότητα βακτηρίων .....	49
Διάγραμμα 23 : Εκτίμηση κατανομής της επιφάνειας των μικροσφαιριδίων από τους αντιδραστήρες της κοινότητας των μυκήτων ανά ημέρα δειγματοληψίας με βάση το ποσοστό weathering τους .....	49
Διάγραμμα 24 : Κατανομή pellet με βάση το ποσοστό weathering στη πελαγική κοινότητα μυκήτων.....	50
Διάγραμμα 25 : Μετρήσεις ενζύμου λακκάσης στην πελαγική κοινότητα .....	51
Διάγραμμα 26 : Μετρήσεις ενζύμου λακκάσης στην πελαγική κοινότητα με το μύκητα .....	51

Διάγραμμα 27 : Μέτρηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα στις φιάσκες της πελαγικής κοινότητας.....	52
Διάγραμμα 28 : Συνολικός διαλυμένος οργανικός άνθρακας στις φιάσκες της πελαγικής κοινότητας.....	53
Διάγραμμα 29 : Μέτρηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα στις φιάσκες στη κοινότητα με το μύκητα.....	53
Διάγραμμα 30 : Συνολικός διαλυμένος οργανικός άνθρακας στη κοινότητα με το μύκητα.....	54

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

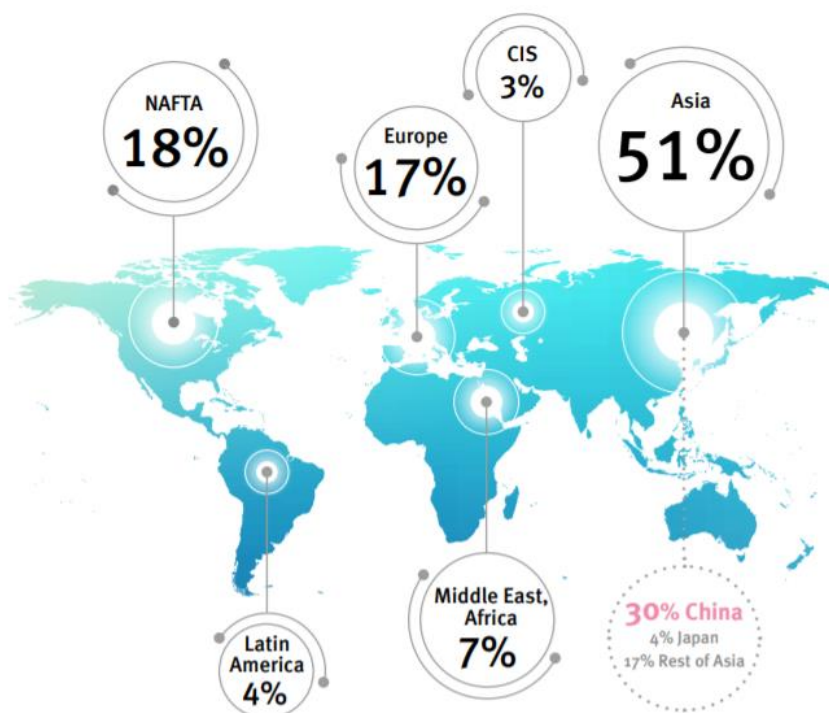
## 1.1 ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΠΛΑΣΤΙΚΑ

Ως ρύπανση από πλαστικά (Plastic Pollution) ορίζεται η συσσώρευση των συνθετικών προϊόντων πλαστικού, όταν αυτά φτάσουν σε σημείο να δημιουργούν πρόβλημα στην πανίδα και το οικοσύστημα της, καθώς και στον ανθρώπινο πληθυσμό. Το 1907 η εύρεση του βακελίτη (Bakelite) έφερε επανάσταση στα υλικά εισάγοντας πραγματικά συνθετικές πλαστικές ρητίνες στο κόσμο του εμπορίου. Στο τέλος του 20<sup>ου</sup> αιώνα, ωστόσο, τα πλαστικά βρέθηκε πως ήταν ανθεκτικοί ρύποι σε ποικίλα σημεία του πλανήτη, από το βουνό Έβερεστ ως τον πυθμένα της θάλασσας. Είτε τα ζώα το θεωρούσαν λανθασμένα ως φαγητό, είτε πλημμύριζαν περιοχές που βρίσκονταν σε χαμηλό υψόμετρο φράζοντας τα συστήματα αποχέτευσης, είτε απλά δημιουργούσαν σημαντική αισθητική και οπτική ρύπανση. Συνέπεια όλων αυτών είναι τα πλαστικά να έρθουν στο επίκεντρο της προσοχής ως ρύπος (Moore, 2020).

### 1.1.1 Τα προβλήματα των πλαστικών

Το πλαστικό είναι ένα πολυμερές υλικό, δηλαδή υλικό που σχηματίζονται από χημική συνένωση (πολυμερισμό) πολλών μικρών δομικών μονάδων (μονομερή), συχνά μοιάζει με μεγάλες αλυσίδες φτιαγμένες από φαινομενικά ατελείωτες σειρές από διασυνδεδεμένους συνδέσμους. Τα πολυμερή όπως το καουτσούκ και το μετάξι υπάρχουν σε αφθονία στη φύση, αλλά αυτά δε θεωρούνται ότι συμβάλουν στην περιβαλλοντική ρύπανση, διότι δεν διατηρούνται στο περιβάλλον. Σήμερα ο μέσος καταναλωτής έρχεται καθημερινά σε επαφή με όλων των ειδών πλαστικών υλικών όπου έχουν αναπτυχθεί συγκεκριμένα ώστε να είναι ανθεκτικά κατά των φυσικών διαδικασιών της φθοράς, υλικά που προέρχονται κυρίως από το πετρέλαιο, που μπορούν να διαμορφωθούν, να στρεβλωθούν ή να εφαρμοστούν ως περιτύλιγμα. Εφόσον τα συνθετικά πλαστικά είναι επί το πλείστον μη βιοδιασπώμενα, τείνουν να είναι ανθεκτικά στα φυσικά περιβάλλοντα. Επιπροσθέτως, πολλά ελαφριά μίας χρήσεως πλαστικά προϊόντα και συσκευασίες που αποτελούν το 50% όλων των παραγόμενων πλαστικών, δεν τοποθετούνται σε δεξαμενές για μεταγενέστερη αφαίρεση στους χώρους υγειονομικής ταφής (ΧΥΤΑ), κέντρα ανακύκλωσης ή κλίβανους (Moore, 2020).

Αντί αυτού, απορρίπτονται ακαταλλήλως κοντά σε περιοχές όπου δεν έχουν άμεση χρήση, όπως παράνομες χωματερές. Εγκαταλείπονται στο έδαφος γύρω από γεμάτο κάδο, πετιούνται από το παράθυρο του αυτοκινήτου και έτσι έχουμε ως αποτέλεσμα την έναρξη διαδικασίας ρύπανσης του περιβάλλοντος. Τοπία ανά όλο το κόσμο καλυμμένα από σκουπίδια είναι πλέον κοινό φαινόμενο. Ωστόσο και η παράνομη εκφόρτωση πλαστικού καθώς και το ξεχείλισμα των δομών συγκέντρωσης παίζουν σημαντικό ρόλο. Μελέτες από όλο τον κόσμο δεν έχουν δείξει κάποια συγκεκριμένη χώρα ή δημογραφικό γκρουπ να είναι με διαφορά το πιο υπεύθυνο, όμως κέντρα με μεγάλη συγκέντρωση πληθυσμού δημιουργούν τα περισσότερα απορρίμματα. Οι λόγοι και τα αποτελέσματα της ρύπανσης από πλαστικά είναι πραγματικά παγκόσμια (Moore, 2020).



Εικόνα 1 : Κατανομή παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών (Source : [www.plasticeurope.org](http://www.plasticeurope.org) )

Σύμφωνα με την Εμπορική Ένωση PlasticsEurope, η παγκόσμια ρύπανση από πλαστικά αυξήθηκε από περίπου 1.5 εκατομμύρια τόνους το χρόνο το 1950 στους 275 εκ. τόνους το 2010 και σε 360 εκ. τόνους το 2018. Μεταξύ 4.8 εκ και 12.7 εκ. τόνους απορρίπτονται στους ωκεανούς ετησίως από χώρες με ακτογραμμές.



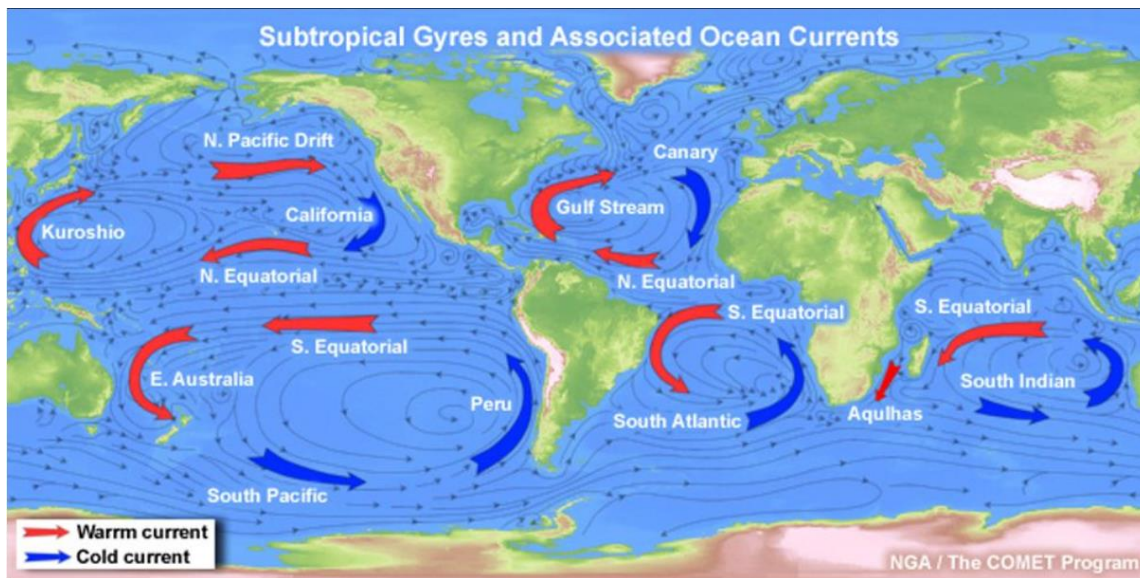
Εικόνα 2 : Η ροή που τα πλαστικά εισέρχονται στη θάλασσα ( Source : Janbeck et al. (2015) , Eriksen et al. (2014) , [www.OurWorldInData.org](http://www.OurWorldInData.org) )

Συγκρινόμενα με υλικά που χρησιμοποιούνταν συχνά το πρώτο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα, όπως το γυαλί, το χαρτί, το σίδηρο και το αλουμίνιο, τα πλαστικά έχουν χαμηλό ποσοστό ανάκτησης. Αυτό διότι είναι σχετικά μη αποδοτικό στο να χρησιμοποιηθούν ως ανακυκλώσιμο απόρριμμα στη διαδικασία παραγωγής, που οφείλεται στις σημαντικές δυσκολίες επεξεργασίας όπως το χαμηλό σημείο τήξης, που αποτρέπει τους ρυπαντές να απομακρυνθούν κατά τη διάρκεια της θέρμανσης και της επανεπεξεργασίας. Τα περισσότερα ανακυκλώσιμα πλαστικά επιδοτούνται κάτω του κόστους των αρχικών υλικών ή απλά η ανακύκλωση τους είναι υποχρεωτική από κυβερνητικούς νόμους. Οι επιδόσεις της ανακύκλωσης διαφέρουν δραματικά από χώρα σε χώρα, μόνο οι βόρειες Ευρωπαϊκές χώρες έχουν επιδόσεις μεγαλύτερες του 50%. Σε κάθε περίπτωση, η ανακύκλωση συμβάλει στη μείωση της ρύπανσης από πλαστικά όταν το ανακυκλωμένο πλαστικό απορρίπτεται «σωστά», όμως η ρύπανση προέρχεται κυρίως από τη «λάθος» απόρριψη (Moore, 2020).

### **1.1.2 Ρύπανση από πλαστικά σε ωκεανούς και γη**

Εφόσον ο ωκεανός είναι κατάντη σχεδόν κάθε χερσαίας περιοχής, είναι και δέκτης πολλών πλαστικών απορριμμάτων που προέρχονται από τη γη. Μερικά εκατομμύρια τόνοι μπάζα καταλήγουν στους ωκεανούς του κόσμου κάθε χρόνο. Η πρώτη ωκεανογραφική μελέτη για να μετρηθούν οι ποσότητες πλαστικών στην επιφάνεια των ωκεανών δημοσιεύθηκε το 2014. Εκτιμάται ότι τουλάχιστον 5.25 τρισεκατομμύρια πλαστικά κομμάτια που ζυγίζουν περίπου 244000 τόνους επέπλεαν στην επιφάνεια. Η ρύπανση από πλαστικό παρατηρήθηκε πρώτη φορά στον ωκεανό από επιστήμονες που έκαναν έρευνα πάνω στο πλακτόν το 1960-1970, περισσότερο ενδιαφέρον λαμβάνουν οι ωκεανοί και οι παραλίες από εκείνους που μελετούν και εργάζονται ώστε να ελαττώσουν τη ρύπανση από πλαστικά σε σύγκριση με το χερσαίο οικοσύστημα (Moore, 2020).

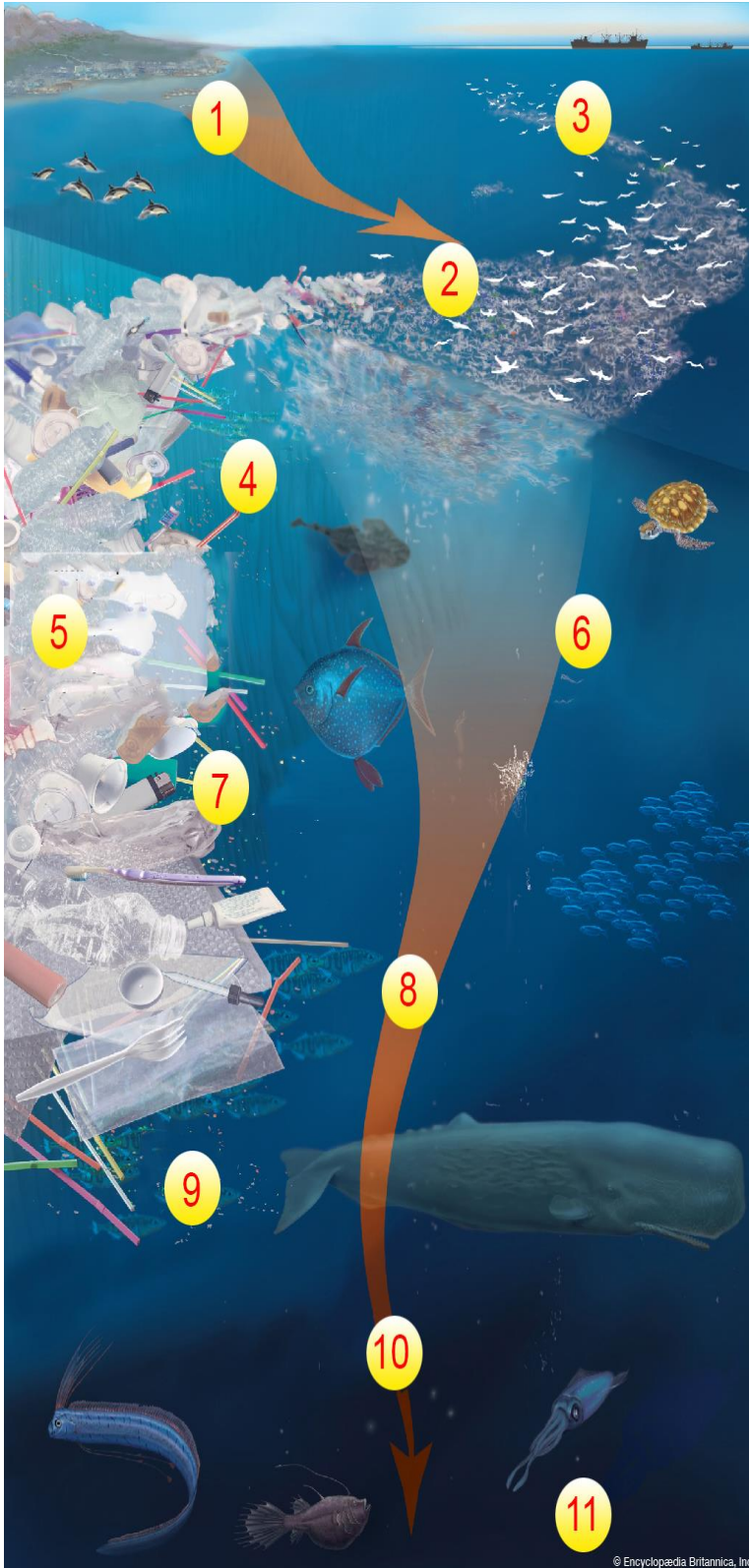
Τα επιπλέοντα πλαστικά απορρίμματα δείχνουν να συσσωρεύονται σε πέντε υποτροπικούς στρόβιλους που καλύπτουν το 40% των παγκόσμιων ωκεανών. Βρίσκονται σε μεσαία γεωγραφικά πλάτη, αυτοί οι στρόβιλοι συμπεριλαμβάνουν το βόρειο και νότιο ειρηνικό υποτροπικό γύρισμα, όπου υπάρχουν ζώνες με μεγάλες συγκεντρώσεις από πλαστικά απορρίμματα που γυρίζουν κοντά στην επιφάνεια του ωκεανού. Αυτά τα φαινόμενα τράβηξαν την προσοχή των επιστημόνων καθώς και των μέσων πληροφόρησης. Οι άλλοι υποτροπικοί στρόβιλοι είναι αυτά του βόρειου και νότιου ατλαντικού και του ινδικού ωκεανού (Moore, 2020).



Εικόνα 3 : Οι πέντε κύριοι στρόβιλοι (μεγάλα συστήματα από ωκεάνια ρεύματα) . ( Source : COMET® Website at <http://meted.ucar.edu/> of the University Corporation for Atmospheric Research (UCAR) )

Στον ωκεανό, η ρύπανση από πλαστικά μπορεί να σκοτώσει θαλάσσια θηλαστικά άμεσα μέσω περιπλοκής τους σε αντικείμενα, όπως εξοπλισμός ψαρέματος, αλλά μπορεί επίσης να σκοτώσει και μέσω της κατανάλωσής τους διότι μοιάζουν με τροφή. Μελέτες βρήκαν πως όλα τα είδη, συμπεριλαμβανομένου μικρά ζωοπλακτόν, μεγάλα κητοειδή, πολλά θαλασσοπούλια και όλες οι θαλάσσιες χελώνες, καταναλώνουν πλαστικά κομμάτια και απορρίμματα (π.χ. αναπτήρες, πλαστικές σακούλες, καπάκια από μπουκάλια). Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες προκαλούν γήρανση στο πλαστικό με συνέπεια το θρυμματισμό του σε μικροπλαστικά που το κάνουν διαθέσιμο προς κατανάλωση σε μικρότερα ζώα και ζωοπλακτόν.





Εικόνα 4 : Κύκλος ζωής των πλαστικών  
(Source: [www.britannica.com](http://www.britannica.com))

1. Ρύπανση από πλαστικά (περίπου 4-12 εκατομμύρια μετρικοί τόνοι εισέρχονται στον ωκεανό ετησίως)
2. Μπάζα στην επιφάνεια και κοντά σε αυτή
3. Σκουπίδια που επιπλέουν
4. Τα πλαστικά διασπώνται από UV ακτίνες στο φως του ηλίου και λόγω των κυμάτων
5. Συστατικά της ρύπανσης από πλαστικά (μικροΐνες, πλαστικές συσκευασίες, σελοφάν, πλαστικές σακούλες, αποσιγάρα, δίχτυα ψαρέματος, πλαστικά εργαλεία γραφείου)
6. Μικροπλαστικά που βυθίζονται και μεγάλα μπάζα
7. Τα μικροπλαστικά αποτελούν περίπου το 85% της ρύπανσης στην ακτογραμμή και τις παραλίες
8. Μπάζα που βυθίζονται
9. Τοξίνες(PCBs) προσκολλάνε στα πλαστικά, δημιουργώντας εστίες μόλυνσης
10. Μικροσωματίδια, πλαστικά μπάζα έχει βρεθεί ότι έχουν καταναλωθεί από ζώα ακόμη και στα πιο βαθιά νερά
11. Τάφρος βυθού



**Εικόνα 5 : Κατανάλωση και εγκλωβισμός θαλάσσιας χελώνας από πλαστικά δίκτυα (Source : <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2590332220305509-gr1.jpg>)**



**Εικόνα 6 : Εγκλωβισμός πτηνού από πλαστική σακούλα . (Source: [www.nationalgeographic.com](http://www.nationalgeographic.com))**

Τέτοια μικρά κομμάτια πλαστικού, με μέγεθος μικρότερο από 5 χιλιοστά σε μήκος, αποτελούν ένα σημαντικό μέρος των πλαστικών απορριμμάτων στον ωκεανό. Έως το 2018, μικροπλαστικά έχουν βρεθεί σε όργανα από περισσότερα των 114 θαλάσσιων ειδών, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων ειδών που βρίσκονταν στο βαθύτερο σημείο των ωκεανών. Έως το 2020, οι επιστήμονες έκαναν εκτίμηση ότι τουλάχιστον 14 εκατομμύρια μετρικοί τόνοι από μικροπλαστικά σωματίδια κείτονταν στα βάθη των ωκεανών, άλλη έρευνα είχε δείξει ότι η κίνηση των υποθαλάσσιων ρευμάτων δημιουργούσε σημεία συγκέντρωσης μικροπλαστικών στους ωκεανούς, όπως αυτό που βρίσκεται στην Τυρρηνική θάλασσα που περιέχει σχεδόν 2 εκατομμύρια μικροπλαστικά κομμάτια ανά τετραγωνικό μέτρο (Moore, 2020).

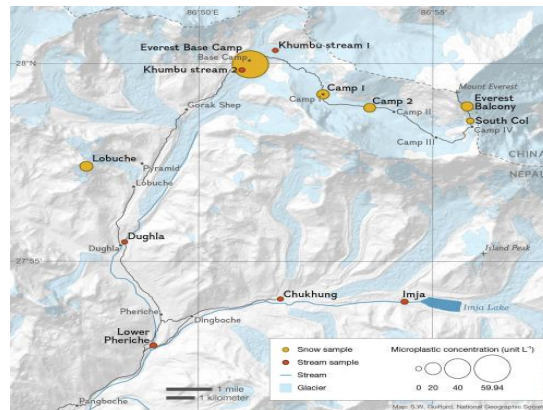
Επιπρόσθετα, τα πλαστικά έχουν δείξει να προσροφούν ρύπους έως και μία εκατομμύρια φορές του επιπέδου τους στην τριγύρω θαλάσσια περιοχή. Σε μία έρευνα (Uematsu, 2014), τα επίπεδα του PCB (polychlorinated biphenyl), ένα λιπαντικό και μονωτικό υλικό που είναι πλέον ευρέως απαγορευμένο, έδειξαν να έχουν αυξάνει σημαντικά τον αδένω ελαίου των ραβδωτών ψαλιδιών, είδος θαλασσοπούλιου, (*Calonectris leucomelas*) ύστερα από την κατανάλωση πλαστικών σφαιριδίων (plastic pellets) που βρέθηκαν στον κόλπο του Τόκιο για μία εβδομάδα.



Η ρύπανση από πλαστικά έχει εμφανιστεί και σε χερσαίες περιοχές. Τα σημερινά συστήματα αποχέτευσης φράζονται με απορρίμματα όπως πλαστικές σακούλες, συσκευασίες τροφίμων και άλλα αντικείμενα μίας χρήσης κυρίως πλαστικά, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει η προβλεπόμενη ροή των υγρών αποβλήτων με συνέπεια τη συσσώρευση τους και δημιουργία πλημμύρας. Τα πουλιά, όπως ο κόνδορας της Καλιφόρνια, έχουν βρεθεί με πλαστικές σακούλες στα στομάχια τους, αλλά και ζώα που τρέφονται από κάδους απορριμμάτων, όπως τα κοράκια, είχε φράξει το έντερο τους. Η μάζα του πλαστικού δεν είναι μεγαλύτερη από αυτή των υπόλοιπων περιεχομένων των απορριμμάτων, αλλά λαμβάνουν δυσανάλογο χώρο (Moore, 2020).



Εικόνα 7 : Εύρεση μικροπλαστικών στο βουνό Έβερεστ (Source: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2590332220305509-fx1.jpg>)



Εικόνα 8 : Μικροπλαστικά στα Ιμαλάια (Source: <https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2590332220305509-gr1.jpg>)

### 1.1.3 Ρύπανση από πλαστικά πρόσθετα

Το πλαστικό παράγει ρύπους κατά την παραγωγή του συγκεκριμένα από την απελευθέρωση ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν. Η ρύπανση του περιβάλλοντος από χημικά που απελευθερώνονται από τα πλαστικά στον αέρα και στο νερό είναι μία ανερχόμενη περιοχή για προβληματισμό.

Κάποιες ουσίες που χρησιμοποιούνται στα πλαστικά, όπως οι φθαλικές ενώσεις, διφαινόλη Α (BPA) και πολυβρωμιωμένος διφαινυλαιθέρας (PBDE) είναι υπό λεπτομερή έλεγχο και περιορισμούς. Οι φθαλικές ενώσεις είναι πλαστικοποιητές – μαλακτικά που χρησιμοποιούνται ώστε να κάνουν τα πλαστικά προϊόντα λιγότερο εύθραυστα (Moore, 2020).

Βρίσκονται σε ιατρικές συσκευές, πακέτα φαγητών, ταπετσαρίες αυτοκινήτων, υλικά πατώματος, υπολογιστές αλλά και σε φαρμακευτικά, αρώματα και κοσμητικά. Η ουσία BPA χρησιμοποιείται στην κατασκευή καθαρών, σκληρών πολυανθρακικών πλαστικών και σκληρού έποξυ επικαλύμματος και κολλών, είναι παρόν σε πακέτα, μπουκάλια, συμπαγείς δίσκους, ιατρικές συσκευές και ως επενδύση σε κουτιά τροφίμων. Το PBDE προστίθεται σε πλαστικά ως επιβραδυντικό φωτιάς. Όλα αυτά είναι ουσίες που έχουν εντοπισθεί σε ανθρώπους και είναι γνωστό ότι διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα. Οι φθαλικές ενώσεις δρουν κατά των ανδρικών ορμονών και επομένως είναι γνωστές ως anti-androgens, η BPA μιμείται τη φυσική θηλυκή ορμόνη οιστρογόνο και το PBDE έχει δείξει ότι διαταράσσει τις ορμόνες του θυροειδούς καθώς είναι και anti-androgen. Οι ευπαθής ομάδες σε αυτά τα ορμονοδιαταράσσον προϊόντα είναι τα παιδιά και οι γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία (Moore, 2020)

Αυτές οι ουσίες έχουν δείξει σημάδια ίδιας συμπεριφοράς σε ζώα. Αποτελέσματα υπάρχουν σε ζώα εργαστηρίου σε επίπεδα αίματος χαμηλότερα αυτών που βρίσκονται σε ένα μέσο κάτοικο αναπτυγμένης χώρας. Αμφίβια, μαλάκια, σκουλήκια, έντομα, οστρακοειδή και ψάρια δείχνουν παρενέργειες στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη μετά από την έκθεσή τους σε αυτές τις ουσίες (Basak, S., Das, M. and Duttaroy, A., 2020).

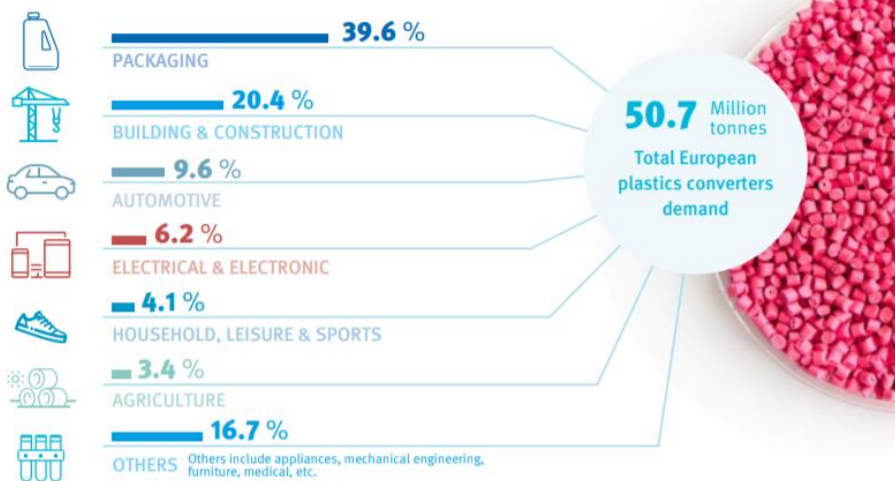
## 1.2 ΠΛΑΣΤΙΚΑ

Τα πλαστικά, είναι πολυμερή υλικά που έχουν την ικανότητα να λιώσουν ή να διαμορφωθούν, συνήθως από την εφαρμογή θερμότητας και πίεσης. Αυτή η ιδιότητα της πλαστικότητας, συνήθως βρίσκεται σε συνδυασμό με άλλες ειδικές ιδιότητες όπως η χαμηλή πυκνότητα, χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, διαφάνεια και σκληρότητα επιτρέπουν στα πλαστικά να χρησιμοποιούνται σε μεγάλη ποικιλία προϊόντων. Αυτά περιλαμβάνουν σκληρά και ελαφριά μπουκάλια αναψυκτικών από PET (polyethylene terephthalate), ευέλικτα λάστιχα κήπου από PVC (polyvinyl chloride), μονωτικά κουτιά φαγητού από αφρό πολυστυρενίου (polystyrene) και άθραυστα παράθυρα από polymethylmethacrylate (Rodriguez, 2020).

## PLASTICS DEMAND BY SEGMENT 2019

Distribution of European (EU28+NO/CH) plastics converters demand by segment in 2019. Packaging and building & construction by far represent the largest end-use markets. The third biggest end-use market is the automotive industry.

SOURCE: PlasticsEurope Market Research Group (PEMRG) and Conversio Market & Strategy GmbH



Εικόνα 9 : Χρήση των πλαστικών στη καθημερινότητα (Source : [www.plasticeurope.org](http://www.plasticeurope.org) )

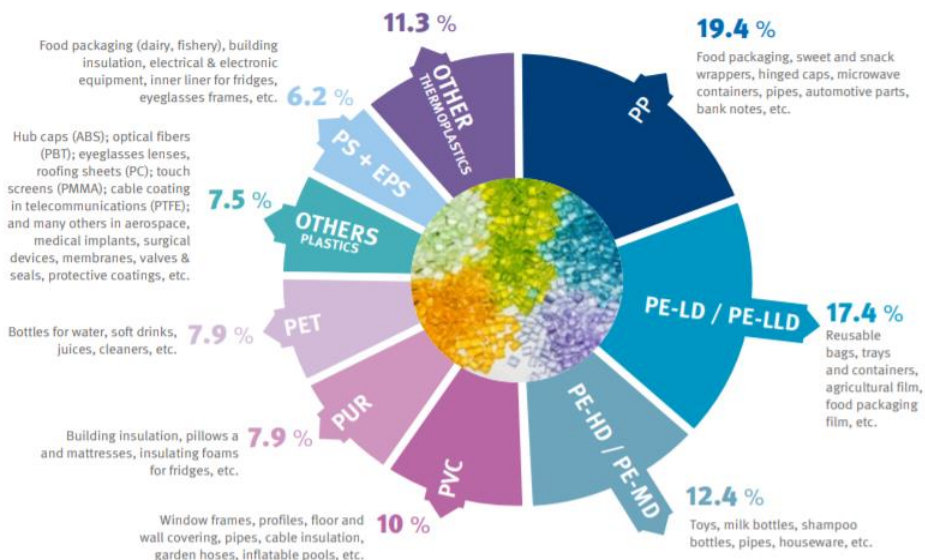
### 1.2.1 Η σύνθεση , δομή και οι ιδιότητες των πλαστικών

Πολλά από τα χημικά ονόματα των πολυμερών έχουν γίνει γνωστά στο καταναλωτή, ωστόσο μερικά είναι γνωστότερα από τις συντομογραφίες τους ή την επωνυμία τους. Στη βιομηχανία τα πλαστικά προϊόντα θεωρούνται «εμπορική» ρητίνη ή «ειδική» ρητίνη. Οι εμπορικές ρητίνες είναι πλαστικά που παράγονται σε μεγάλη ποσότητα και χαμηλό κόστος για τα πιο αναλώσιμα αντικείμενα και ανθεκτικά αγαθά. Αποτελούνται από πολυαιθυλένιο (polyethylene), πολυπροπυλένιο (**polypropylene**), χλώριο του πολυβινυλίου (polyvinyl chloride) και πολυστυρένιο (**polystyrene**).

Οι ειδικές ρητίνες είναι πλαστικά των οποίων οι ιδιότητες τους έχουν σχεδιαστεί για συγκεκριμένες εφαρμογές και παράγονται σε μικρές ποσότητες με μεγάλο κόστος. Ανάμεσα σε αυτή την ομάδα είναι τα αποκαλούμενα μηχανικά πλαστικά ή μηχανικές ρητίνες, που είναι πλαστικά που ανταγωνίζονται με χυτά μέταλλα στα υδραυλικά, hardware και αυτοκινητιστικές εφαρμογές. Σημαντικά μηχανικά πλαστικά, λιγότερο γνωστά στο καταναλωτή είναι τα polyacetal, polyamide (nylon), polytetrafluoroethylene (Teflon), polycarbonate, polyphenylene, sulfide, epoxy και polyetheretherketone. Ακόμα ένα μέλος των ειδικών ρητινών είναι thermoplastic elastomers, πολυμερή που έχουν ελαστικές ιδιότητες όπως του λάστιχου αλλά μπορούν να αναπλάσσει το σχήμα τους επανειλημμένα μέσω της εφαρμογής της θερμότητας (Rodriguez , 2020).

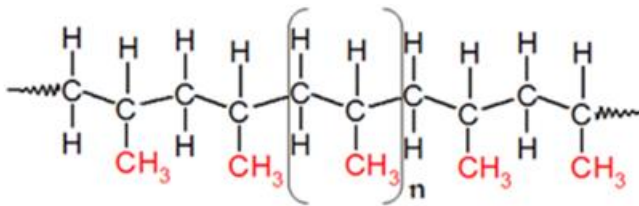
Data for EU28+NO/CH.

SOURCE: PlasticsEurope  
Market Research Group  
(PEMRG) and Conversio Market  
& Strategy GmbH



**Εικόνα 10 : Είδος των πλαστικών και οι χρήσεις τους (Source : [www.plasticeurope.org](http://www.plasticeurope.org))**

Τα πλαστικά μπορούν επίσης να διαχωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες, ανάλογα με τον τρόπο δημιουργίας των δεσμών των δομικών τους μονάδων. Μία είναι αυτά που αποτελούνται από πολυμερή που έχουν μόνο γραμμική αλυσίδα ατόμων άνθρακα. Όλα τα εμπορικά πλαστικά που αναφέρθηκαν ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία. Η δομή του πολυπροπυλενίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράδειγμα, εδώ υπάρχει δεσμός  $\text{CH}_3$  σε κάθε δεύτερο άτομο άνθρακα. Η άλλη κατηγορία από πλαστικά αποτελείται από ετεροαλυσιδοτά πολυμερή. Αυτά περιέχουν άτομα όπως το οξυγόνο, άζωτο ή θείο στις αλυσίδες μαζί με τον άνθρακα. Τα περισσότερα από τα μηχανικά πλαστικά που αναφέρθηκαν ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία. Ένα παράδειγμα είναι το polycarbonate, όπου τα άτομα του περιέχουν δύο «αρωματικούς» δακτύλιους.



**Εικόνα 11 : Δομή πολυπροπυλενίου (Source : <http://article.sapub.org/10.5923.j.ajps.20160601.01.html>)**

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως για κάθε πολυμερή που περιέχεται στο πίνακα μπορούν να υπάρξουν πολλοί άλλοι υποσηματισμοί που σημαίνει πως οι ιδιότητες που παρουσιάζονται είναι μία εκτίμηση (Rodriguez , 2020).

### **1.2.2 Μικροπλαστικά**

Τα μικροπλαστικά είναι μικρά κομμάτια πλαστικού με μέγεθος μικρότερο των 5 χιλιοστών σε μήκος. Βρίσκονται σε μία ποικιλία προϊόντων, από κοσμητικά μέχρι συνθετικά ρούχα καθώς προέρχονται επίσης και από την αποδόμηση πλαστικών σκευών όπως πλαστικές σακούλες και μπουκάλια. Πολλά από αυτά τα προϊόντα εισέρχονται πολύ εύκολα στο περιβάλλον ως απορρίμματα (Rogers, 2020 ).

#### **1.2.2.1 Ιδιότητες**

Η σύνθεση των μικροπλαστικών αποτελείται από άτομα άνθρακα και υδρογόνου που σχηματίζουν αλυσίδες πολυμερών. Άλλα χημικά, όπως phthalates, polybrominated diphenyl ethers (PBDES) και tetrabromobisphenol A (TBBPA), είναι παρόντα στα μικροπλαστικά και πολλά από αυτά τα χημικά πρόσθετα διαχέονται στο περιβάλλον από τα εκτεθειμένα στις καιρικές συνθήκες πλαστικά λόγω της διάβρωσης και αποδόμησης τους (Rogers, 2020).

#### **1.2.2.2 Πρωτογενή και δευτερογενή μικροπλαστικά**

Τα μικροπλαστικά διαχωρίζονται σε δύο τύπους, τα πρωτογενή και τα δευτερογενή. Παραδείγματα πρωτογενών μικροπλαστικών είναι οι μικρόκοκκοι που βρίσκονται σε προϊόντα υγιεινής, πλαστικά pellets (σφαιρίδια) που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανική παραγωγή, πλαστικές ίνες από συνθετικά ρούχα. Τα πρωτογενή μικροπλαστικά εισέρχονται στο περιβάλλον άμεσα, όπως εξαιτίας της χρήσης προϊόντων προσωπικής φροντίδας, μέσω του συστήματος αποχέτευσης, της ανεπιθύμητης απώλεια από χάπια κατά την παρασκευή ή τη μεταφορά, ή την τριβή κατά το πλύσιμο. Τα δευτερογενή μικροπλαστικά δημιουργούνται από τη διάσπαση μεγαλύτερων πλαστικών. Αυτό συνήθως συμβαίνει όταν τα μεγάλα πλαστικά εκτίθενται στις καιρικές συνθήκες, όπως τριβή του αέρα, κυματική δράση και υπεριώδης ακτινοβολία (Rogers, 2020).

#### **1.2.2.3 Περιβαλλοντικές και υγειονομικές επιδράσεις**

Τα μικροπλαστικά δεν είναι βιοδιασπώμενα. Επομένως, από τη στιγμή που εισχωρήσουν στο περιβάλλον, παραμένουν εκεί και συσσωρεύονται. Έχουν βρεθεί σε πληθώρα οικοσυστημάτων, συμπεριλαμβανομένου αυτών των γλυκών νερών αλλά και των ωκεανών. Είναι επίσης πηγή αέριας ρύπανσης, αφού βρίσκονται στη σκόνη και σε ιπτάμενα ινώδες σωματίδια. Οι επιπτώσεις στην υγεία από τα μικροπλαστικά είναι άγνωστες. Το 2018, στα υδάτινα οικοσυστήματα βρέθηκαν μικροπλαστικά σε περισσότερα από 114 είδη ζωντανών οργανισμών. Βρέθηκαν κατατεθειμένα στις πεπτικές οδούς και ιστούς διαφόρων ασπόνδυλων θαλάσσιων ζώων, συμπεριλαμβανομένων καρκινοειδών όπως τα καβούρια. Τα ψάρια και τα πουλιά είναι πιθανό να καταναλώσουν μικροπλαστικά που επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού μπερδεύοντας τα με τροφή. Η κατανάλωση μικροπλαστικών μπορεί να προκαλέσει στα υδάτινα είδη μείωση στη ποσότητα του φαγητού που θα καταλάωναν υπό κανονικές συνθήκες με συνέπεια να έχουν λιγότερη ενέργεια ώστε να εκτελέσουν ζωτικής σημασίας λειτουργίες με αποτέλεσμα να έχουν νευρολογικά και αναπαραγωγικά προβλήματα. Εικάζεται πως έχουν εισβάλει σε όλη την τροφική αλυσίδα των υδάτινων οργανισμών από το ζωοπλαγκτόν στα μικρά ψάρια και κατά συνέπεια στα μεγαλύτερα (Rogers, 2020).

Τα μικροπλαστικά έχουν ανιχνευθεί στο πόσιμο νερό, τη μπίρα, τα τρόφιμα, τα θαλασσινά φαγητά αλλά και στο επιτραπέζιο αλάτι. Σε μία έρευνα που εξέταζε οκτώ άτομα από οκτώ διαφορετικές χώρες, μικροπλαστικά βρέθηκαν στο δείγμα περιττωμάτων του καθενός τους. Επίσης έχουν βρεθεί σε ιστό και όργανα ανθρώπων, οι επιπλοκές αυτών των ευρημάτων για την ανθρώπινη υγεία είναι αβέβαιη (Rogers, 2020).

#### **1.2.2.4 Μειώνοντας τη ρύπανση από μικροπλαστικά**

Οργανισμοί όπως η Ομάδα Εμπειρογνομόνων των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Expert Panel) του Περιβαλλοντικού Προγράμματος των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Environmental Programme) έκαναν ενέργειες σε περισσότερες από 100 χώρες με εκπαιδευτικές καμπάνιες με σκοπό την αύξηση της επίγνωσης για τα ρύπανση από πλαστικά και την ενθάρρυνση της επαναχρησιμοποίησης και ανακύκλωσης των πλαστικών. Άλλα διεθνή συνεργατικά προγράμματα εδραιώθηκαν για να υπάρξει έμφαση στο πρόβλημα των θαλάσσιων απορριμμάτων, συμπεριλαμβανομένου της ρύπανσης από μικροπλαστικά. Το 2015 οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής ψήφισαν το νόμο για νερά χωρίς μικροσφαιρίδια (Microbead-Free Waters Act) όπου απαγορεύει την παρασκευή και τη διακίνηση καλλυντικών και υγιεινονομικών προϊόντων που περιέχουν πλαστικά μικροσφαιρίδια, και ακολούθησαν και άλλες χώρες (Rogers, 2020).

Η αποκατάσταση των μικροπλαστικών που βρίσκονται στο περιβάλλον είναι ένα ακόμη στοιχείο κλειδί για τη μείωση της ρύπανσης από πλαστικά. Έτσι διεξάγεται έρευνα για την εύρεση στρατηγικής, συμπεριλαμβανομένου και αυτής της χρήσης μικροοργανισμών που είναι ικανοί να διασπάζουν τα συνθετικά μικροπλαστικά πολυμερή. Ένας αριθμός από είδη βακτηρίων και μυκήτων έχουν την ιδιότητα να βιοδιασπάζουν πολυμερή, όπως πολυστερένιο, πολυουρεθάνη πολυεστέρα, πολυαιθυλένιο και πολυπροπυλένιο. Τέτοιοι μικροοργανισμοί ενδεχομένως να μπορούν να εφαρμοστούν σε διαδικασίες όπως αυτές που λαμβάνουν χώρα στο αποχετευτικό σύστημα είτε σε άλλα ρυπασμένα περιβάλλοντα (Rogers, 2020). Ακολουθεί η παρουσίαση των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διπλωματική ώστε να προσδιορισθεί η απόδοση τους στη παραπάνω διαδικασία.

#### **Μύκητας *Acremonium tubakii***

Έως σήμερα οι λακκάσες έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί ευρέως σε ποικιλία μικροοργανισμών, βακτήρια και μύκητες. Αυτά τα ένζυμα οξειδώνουν αρωματικές και μη-αρωματικές οργανικές ενώσεις μειώνοντας το οξυγόνο που βρίσκεται στο νερό. Έχουν έλλειψη ειδικότητας υποστρώματος και επομένως έχουν προοπτική να χρησιμοποιηθούν σε ποικιλία εφαρμογών συμπεριλαμβανομένου της αποτοξίνωσης περιβαλλοντικών ρύπων και εξυγίανση βιομηχανικών αποβλήτων. Η παραγωγή των ενζύμων αυτών από νέες πηγές σε χαμηλό κόστος είναι σημαντική από βιομηχανικής πλευράς. Οι θαλάσσιοι μύκητες έχουν πολλά πλεονεκτήματα, έχουν προσαρμοστεί στο να αναπτύσσονται σε αντίξοα περιβάλλοντα και επομένως οι λακκάσες που παράγονται από αυτούς τους μικροοργανισμούς ίσως έχουν μία υψηλότερη απόδοση στη διάσπαση και κατά συνέπεια έχουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία.

Στη εργασία αυτή χρησιμοποιείται ο μύκητας *Acremonium tubakii* που έχει βρεθεί ότι παράγει λακκάσες. Έχει παρατηρηθεί ότι ο συγκεκριμένος μύκητας αναπτύσσεται ραγδαία. Η χρήση υψηλά αλμυρού διαλύματος δείχνει ένα αυξανόμενο ρυθμό ανάπτυξης και η προσθήκη χαλκού διατηρεί τα επίπεδα δραστηριότητας της λακκάσης. Ο μύκητας έχει μεγαλύτερη απόδοση σε pH της τάξεως του 6 (Charalampous G., Seridou P. and Kalogerakis N. 2017).

### **Κοινότητα βακτηρίων**

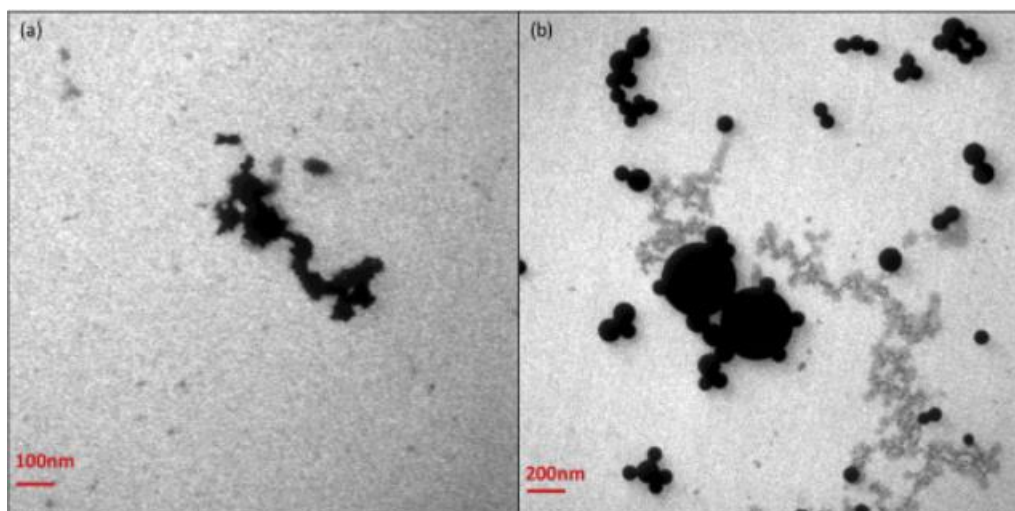
Η κοινότητα μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκε έχει συλλεχθεί από την παράλια περιοχή του κόλπου της Σούδας του νομού Χανίων. Η κοινότητα αυτή είχε εγκλιματιστεί για 5 μήνες με γηρασμένα σφαιρίδια πολυπροπυλενίου όπου τα σφαιρίδια αυτά αποτελούσαν τη μοναδική πηγή άνθρακα. Το βιοφιλμ που είχε αναπτυχθεί στα σφαιρίδια είχε συλλεχθεί τον τελευταίο μήνα της δειγματοληψίας και χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα.

### **1.2.3 Νανοπλαστικά**

Ο όρος νανοπλαστικά είναι ακόμα υπό συζήτηση και ορισμένοι ερευνητές έχουν θέσει το ανώτερο όριο μεγέθους στα 1000 nm ενώ άλλοι στα 100 nm (Cole et al., 2015, Cole and Galloway, 2015, Crawford and Quinn, 2017, da Costa et al., 2016, Koelmans et al., 2015, Ter Halle et al., 2017). Από αυτά που γνωρίζουμε, δεν υπάρχει σύγχρονος ορισμός στη βιβλιογραφία να εξηγήει τη σχετικότητα της λέξης νανοπλαστικά. Τα νανοπλαστικά είναι σωματίδια με μέγεθος του εύρους 1 έως 1000nm που προέρχονται από την διάσπαση πλαστικών αντικειμένων και μπορούν να έχουν κολλοειδή συμπεριφορά. Συγκεκριμένα τα νανοπλαστικά μπορούν να σχηματιστούν από τη διάσπαση γηρασμένων μικροπλαστικών, την κατασκευαστική διαδικασία ή ακόμα και από τη χρήση ενός αντικειμένου, λόγω φθοράς (Gigault et al. , 2018).

Μία από τις μεγαλύτερες κριτικές από τους ερευνητές που χρησιμοποιούν το πρόθεμα “nano” αφορά το γεγονός ότι ίσως είναι δελεαστικό για να τραβήξει τη προσοχή της κοινωνίας, των πολιτικών και των χρηματοδοτικών οργανισμών. Τα τελευταία 20 χρόνια υπάρχει αύξηση της συνειδητοποίησης των περιβαλλοντικών ρίσκων στην κατασκευή νανοϋλικών και αρκετά πρότζεκτ έχουν χρηματοδοτηθεί διεθνικά πάνω στο αντικείμενο παρόλο που είναι λιγοστές οι πηγές που εξετάζουν τις επιπλοκές των νανοϋλικών. Για τα νανοπλαστικά δεν ορίζουμε το μέγεθος του πλαστικού σύμφωνα με τους περιορισμούς στην τεχνική δειγματοληψίας ή την απεικόνιση και χαρακτηρισμό των αναλυτών αλλά στο πραγματικό τους μέγεθος (Bouwmeester et al., 2015).





**Εικόνα 12 :** Μετάδοση από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (a) περιβαλλοντικά σχετικά νανοπλαστικά από πολυεθυλένιο διασπασμένα από UV από γηρασμένα μικροπλαστικά που συλλέχθηκαν στο Βόρειο Ατλαντικό Ωκεανό (b) ένα μίγμα πολυστυρενίου συμβατικού latex (80, 100, 200 and 400 nm, αγοράστηκαν από Thermo-Fischer). Οι γκρίζες σχηματισμοί είναι χαρακτηριστικά οργανικών ατόμων που γενικά χρησιμοποιούνται για να σταθεροποιήσουν συμβατικό latex πολυστυρενίου .

**Πίνακας 1.2.3 Οι κύριες προδιαγραφές που ορίζουν τα νανοπλαστικά (Gigault,2018)**

Σύσταση	Μίγμα από διάφορα πολυμερή που έχουν εκτεθεί σε καιρικές συνθήκες
Σχηματισμός	Αθέλτος
Μέγεθος	1nm – 1μm
Κατανομή Μεγέθους	Πολυδιάσπορα
Σχήμα	Ασύμμετρο σχήμα : Ετερογενής
Επιφανειακή φόρτιση	Ανομοιογενής στην επιφάνεια του σωματιδίου
Σταθερότητα	Ετεροσυσσωμάτωση με άλλα σωματίδια κατά το σχηματισμό
Συσσωματώματα	Δυνητικά, fractal συσσωματώματα
Πορώδες	Ανοιχτή δομή : εξαρτάται από το κύριο υλικό και τη διαδικασία σχηματισμού

Σε αναλύσεις δειγμάτων από το βόρειο Ατλαντικό ωκεανό βρέθηκε πως το κολλοειδές διάλυμα περιέχει νανοπλαστικά που αποτελούνται από διάφορους τύπους. Σύμφωνα με το σχηματισμό τους και τις διαδρομές μεταμόρφωσης, είναι πιθανό ότι τα νανοπλαστικά είναι ετεροσυσσωματώματα από πλαστικά σωματίδια με άλλα φυσικά είδη (οργανική ύλη, ίχνη μετάλλου, μεταλλικά οξείδια). Σε σύγκριση με τα μικροπλαστικά, είναι ακόμη πιο αδιανόητο να αναπτύξουμε μία στρατηγική αφαίρεσης των νανοπλαστικών. Λόγο του μεγέθους τους και των υψηλών ιδιοτήτων διάχυσης, δεν είναι εφικτό να πάρουμε υπόψη αυτή την επιλογή, που αναδύονται νέες ερωτήσεις στο γενικό πλαίσιο των «Πλανητικών Ορίων». Μία επιλογή θα ήταν να συμπεριλάβουμε τα νανοπλαστικά στα «πλανητικά όρια» της χημικής ρύπανσης.

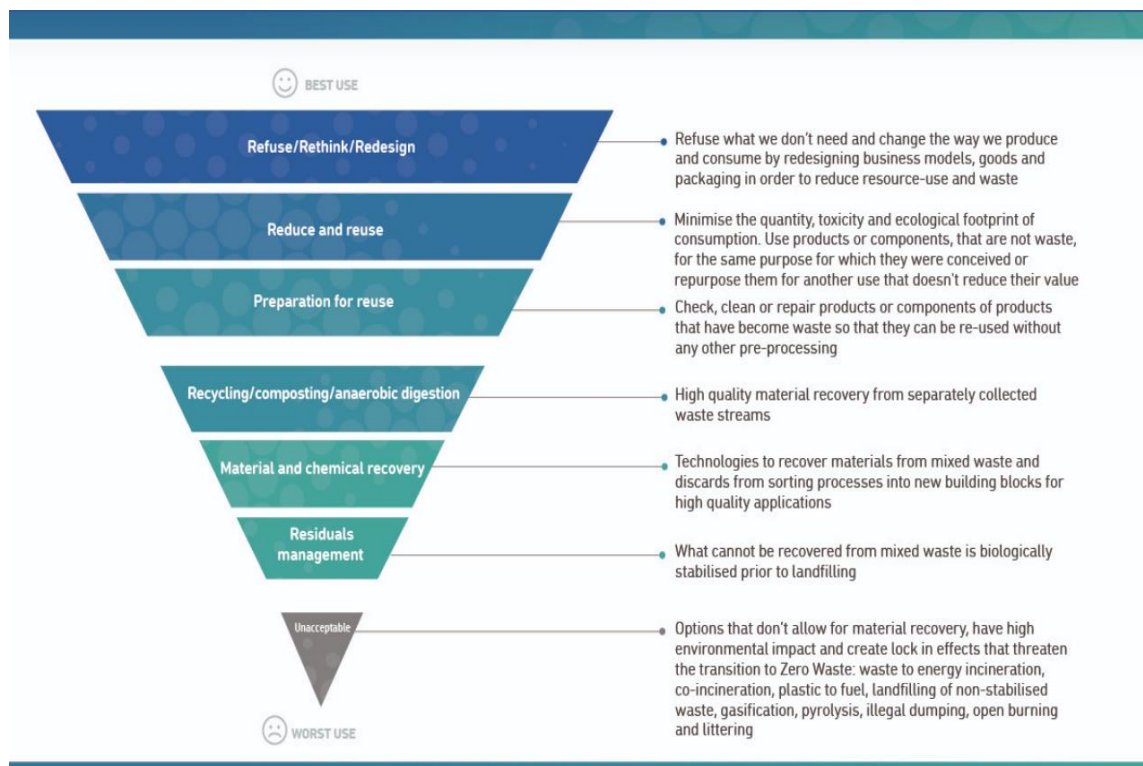


Αλλά σύμφωνα με τις επιπτώσεις που έχουν τα νανοπλαστικά σε όλη τη διάρκεια ζωής μας και η κατάσταση με τα πλαστικά απόβλητα, πιστεύουμε ότι επιβάλλεται να τεθούν νέα πλανητικά όρια για τα πλαστικά απόβλητα. (Jahnke et al., 2017)

### 1.3 ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΠΟΡΩΝ

Δεδομένου της παγκόσμιας κλίμακας της ρύπανσης από πλαστικά, το κόστος της αφαίρεσης από το περιβάλλον είναι αποτρεπτικό. Οι περισσότερες λύσεις στο πρόβλημα της ρύπανσης από πλαστικά επικεντρώνονται στην αποτροπή της ακατάλληλης απόρριψής τους ή στον περιορισμό της χρήσης ορισμένων αντικειμένων. Πρόστιμα για απόρριψη σκουπιδιών αποδείχθηκαν δύσκολα στην εφαρμογή, αλλά απαγορεύσεις ή τιμολόγηση ορισμένων συσκευασιών ή σακούλων είναι πλέον κοινό φαινόμενο. Επιπλέον υπάρχει δυνατότητα επιστροφής ορισμένων πλαστικών με αντί κάποιου ποσού (Charles Moore, 2020).

Η λεγόμενη πολιτική της ευθύνης του καταναλωτή κάνει τους παραγωγούς να χρειάζεται να έχουν υποδομές για να πάρουν πίσω και να ανακυκλώσουν τα προϊόντα που παράγουν. Η έμφαση για τις σοβαρές επιπτώσεις του ρύπανσης από πλαστικά αυξάνεται με αποτέλεσμα νέες λύσεις αναδύονται, όπως η χρήση βιοδιασπώμενων πλαστικά και η φιλοσοφία των «μηδενικών απορριμμάτων» (Moore, 2020).



Εικόνα 13 : Zero waste Europe (Source : [www.zerowasteurope.eu](http://www.zerowasteurope.eu) )

Σε πολλές περιοχές η επικρατούσα μέθοδος απόρριψης στερεών αποβλήτων είναι τα ΧΥΤΑ, στα οποία στρώσεις απορριμμάτων εναλλάσσονται με στρώσεις χώματος. Ωστόσο, ανησυχίες για το πόσο σοφό είναι τέτοια χρήση της γης ενθαρρύνουν προσπάθειες για την απόρριψη διάφορων υλικών σε εγκαταστάσεις ανακύκλωσης για την επαναχρησιμοποίηση τους.

Το χαρτί, όπως και το γυαλί αλλά και το αλουμίνιο που χρησιμοποιούνται σε συσκευασίες ανακυκλώνονται σε ένα βαθμό για αρκετά χρόνια τώρα με διάφορους τρόπους, πιο πρόσφατα αυτές του πλαστικού άρχισαν να χρησιμοποιούνται καθώς και να δημιουργηθεί η ανάγκη του για ανακύκλωση. Αυτά είναι μερικά τεχνικά και οικονομικά προβλήματα: 1) ταυτοποίηση, διαχωρισμός και διαλογή σε κεντρικούς σταθμούς και 2) η οικονομική αξία της ανάκτησης (Rodriguez, 2020).

### 1.3.1 Ταυτοποίηση , διαχωρισμός και διαλογή

Εφόσον τα πλαστικά χρησιμοποιούνται σε συσκευασίες και είναι πολύ εμφανές κομμάτι του ρεύματος απορριμμάτων, οι περισσότερες προσπάθειες ανακύκλωσης εστίασαν εκεί. Τα περισσότερα εμπορικά πλαστικά έχουν τριγωνικές ετικέτες με κάποια συντομογραφία για το προαναφερθεί λόγο. Επιπρόσθετα στη σήμανση, σε πολλές περιοχές οι καταναλωτές ανταμείβονται για την επιστροφή πλαστικών. Αυτό το σύστημα λύνει δύο κύρια προβλήματα που συσχετίζονται με το κόστος εφόσον ο καταναλωτής επιστρέφει το απόρριμμα αλλά και αυτό του διαχωρισμού. Επιπλέον προσφέρει και στην αισθητική της περιοχής διότι υπάρχουν λιγότερα απορρίμματα στους δρόμους (Rodriguez, 2020).



Εικόνα 14 : Κάδοι απορριμμάτων ανά είδος (Source: <https://www.britannica.com/explore/savingearth/recycling> Credit : Eva Blanda/Fotolia)

### 1.3.2 Αξία οικονομικής ανάκτησης

Γενικά, τα θερμοπλαστικά (thermoplastic) υλικά είναι δυνατό να ανακυκλωθούν πιο εύκολα από ότι τα θερμοσκληρυνόμενα (thermosets). Παρόλα αυτά είναι δύσκολη η ανακύκλωση τους. Αρχικά, ένα ανακυκλώσιμο πλαστικό μπορεί να έχει ρυπανθεί από μη-πλαστικά ή από διαφορετικά πολυμερή. Ακόμη και σε ένα είδος πολυμερούς υπάρχουν διαφορετικά μοριακά βάρη. Για παράδειγμα, ένας προμηθευτής πολυστυρενίου μπορεί να παράγει ένα υλικό με υψηλό μοριακό βάρος για ένα προϊόν και χαμηλό για ένα άλλο. Εάν τα πολυμερή από τα δύο αυτά προϊόντα αναμειχθούν σε ένα κάδο ανακύκλωσης το ανακυκλωμένο μείγμα αυτών δε θα είναι χρήσιμο για κάποια από τις χρήσεις των προκατόχων του (Rodriguez, 2020).

Μία ακόμη επιπλοκή στην ανακύκλωση πλαστικών είναι η ανάμιξη τους με βαφές διάφορων χρωμάτων και ένα ακόμη είναι ο έλεγχος ποιότητας. Σχεδόν όλα τα πλαστικά αλλάζουν είτε ελαφρά είτε σε μεγάλο βαθμό ως αποτέλεσμα της αρχικής κατασκευής και χρήσης. Ορισμένα για παράδειγμα οξειδώνονται άρα και αλλάζουν οι ιδιότητες τους (Rodriguez, 2020).

Επομένως για όλους τους προηγούμενους λόγους, τα ανακυκλώσιμα πλαστικά σχεδόν πάντα έχουν θα έχουν ορισμένα μειονεκτήματα σε σχέση με τα μη-ανακυκλώσιμα πλαστικά, ωστόσο τα πλεονεκτήματα υπερτερούν. Τα περισσότερα θερμοπλαστικά ανακυκλώνονται σε λιγότερο απαιτητικές εφαρμογές για παράδειγμα HDPE από λεπτές σακούλες καταστημάτων μετατρέπεται σε χοντρού τοιχώματος δοχείο για λουλούδια, PVC από μπουκάλια μετατρέπεται σε κώνους σήμανσης οδικής κυκλοφορίας και PET από μπουκάλια αναψυκτικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για γεμίσματα ρούχων και μαξιλαριών (Rodriguez, 2020).

Πλαστικά τα οποία δε μπορούν να διαχωριστούν με βάση τον τύπο του πολυμερούς τους μπορούν να μετατραπούν σε πλαστική «ξυλεία», εξωθημένες πλάκες που είναι χρήσιμες για εφαρμογές όπως παγκάκια πάρκων ή βιομηχανικά πατώματα. Άλλες διαδικασίες ανακύκλωσης που χρησιμοποιούν ανάμεικτα πλαστικά είναι η πυρόλυση, που μετατρέπει τα στερεά σε πετρελαιοειδή ουσίες, και η άμεση αποτέφρωση, που παρέχει ενέργεια σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις (Rodriguez, 2020).

Παρά τις δυσκολίες στο να γίνει η ανακύκλωση των πλαστικών οικονομικά ελκυστική σε μεγάλη κλίμακα, πολλές επιτυχείς διαδικασίες έχουν αναπτυχθεί για πιο μικρές εφαρμογές. Οι θήκες πολυπροπυλενίου από τις μπαταρίες αυτοκινήτων μπορούν να ανακτηθούν φθηνά και να χρησιμοποιηθούν ύστερα από λιώσιμο για τον ίδιο σκοπό. Στις περισσότερες διαδικασίες ανακύκλωσης, το πρώτο βήμα είναι να κοπεί σε μικρά κομμάτια το πλαστικό με σκοπό τον ευκολότερο χειρισμό και καθαρισμό του στα επερχόμενα βήματα. Τα κομμάτια πλένονται με σκοπό την αφαίρεση στοιχείων πέραν του πλαστικού, εάν το υλικό έχει γνωστή δομή τότε γίνεται το στάδιο της ξήρανσης και του λιωσίματος σε νέα μορφή. Για πλαστικά με μικτή δομή γίνεται αυτόματος διαχωρισμός ανάλογα με τη πυκνότητα ή τη διαλυτότητα σε κάποιο βαθμό (Rodriguez, 2020).

### 1.3.3 Διασπόμενα πλαστικά

Κανένα από τα εμπορικά πλαστικά δε διασπάτε με ταχύ ρυθμό στο περιβάλλον. Ωστόσο, ορισμένοι επιστήμονες βλέπουν τα βιοδιασπώμενα και τα φωτοδιασπόμενα πλαστικά ως μία λύση για το πρόβλημα των απορριμμάτων. Ορισμένα βιοπλαστικά έχουν αναπτυχθεί, όχι όμως σε μεγάλη κλίμακα κυρίως λόγω του μεγάλου κόστους καθώς και των προβλημάτων κατά την επεξεργασία και χρήση τους. Από την άλλη το φωτοδιασπόμενο πλαστικό, όμοιο με του LDPE (low density polyethylene), αποσυντίθεται σε σκόνη μερικούς μήνες ύστερα από την έκθεση του σε περιοχή με μεγάλη ηλιοφάνεια (Rodriguez, 2020).

## 2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της υφιστάμενης διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος του ρυθμού ανάπτυξης και η αποτελεσματικότητα στην βιοαποδόμηση σφαιριδίων πολυπροπυλενίου (PP) των θαλάσσιων μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε πελαγική κοινότητα η οποία συλλέχθηκε από τη θαλάσσια περιοχή της βορείου Κρήτης, συγκεκριμένα από τον κόλπο της Σούδας στο νομό Χανίων μόνη της είτε προστέθηκε και ο μύκητας *Acremonium tubakii* καθώς γνωρίζουμε ότι ο συγκεκριμένος παράγει λακκάσες. Τα μικροσφαρίδια (pellet), έχουν υποστεί έκθεση σε ακτινοβολία UV-A για χρονική περίοδο 4 μηνών με σκοπό τη προσομοίωση της διαδικασίας φυσικής γήρανσης λόγω φωτοαποδόμησης που τους υποβάλλεται στο περιβάλλον, διότι έχει αποδειχθεί πως η γήρανση ευνοεί τη βιοαποδόμηση των πλαστικών.

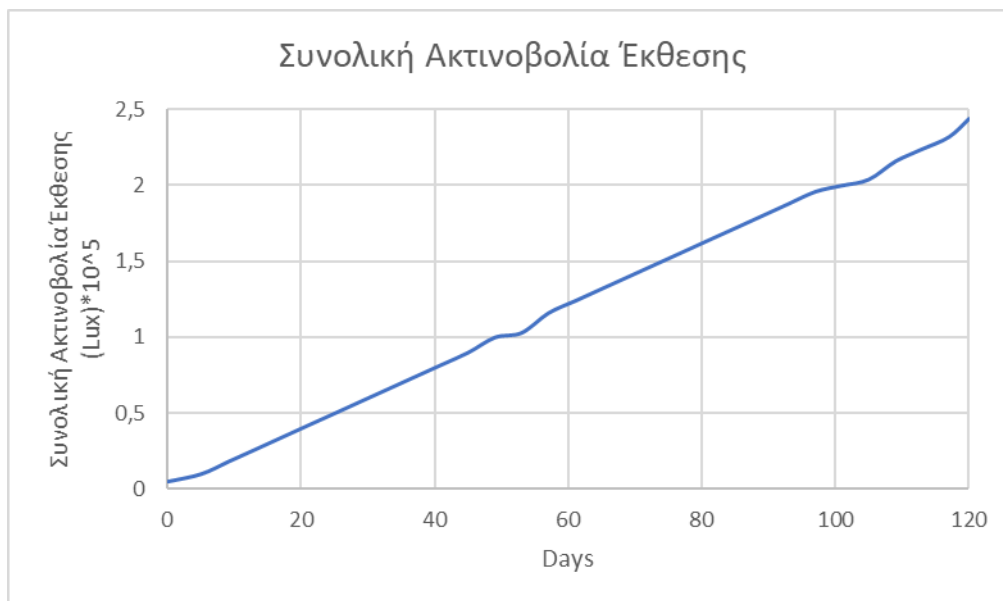
### 3 ΜΕΘΟΔΟΙ, ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

#### 3.1 ΥΛΙΚΑ

Για τη διεκπεραίωση του πειράματος χρησιμοποιήσαμε πλαστικά Pellets (σφαιρίδια) τύπου PP (polypropylene) διαμέτρου 0.3 cm κατά μέσο όρο τα οποία είχαν εκτεθεί σε ακτινοβολία UV-A για διάστημα 120 ημερών. Στο διάστημα αυτό έγιναν μετρήσεις στη θερμοκρασία και ένταση της ακτινοβολίας στο θάλαμο με το όργανο μέτρησης HOBO Temperature Light 3500 DP Logger. Το εύρος τιμών που μπορεί να καταγράψει το παραπάνω όργανο είναι 20°C έως 70°C για τη θερμοκρασία και 0 έως 320,000 Lux για την ακτινοβολία. Η καταγραφή των μετρήσεων έγινε καθ' όλη τη διάρκεια της γήρανσης και αναδεικνύεται στο παρακάτω γράφημα.



Εικόνα 15 : Θάλαμος ακτινοβολίας UV-A



**Διάγραμμα 1 : Ακτινοβολία έκθεσης ανά ημέρα στο θάλαμο ακτινοβολήσης UV**

## 3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Το πείραμα εξετάζει δύο περιπτώσεις κοινοτήτων μικροοργανισμών, η πρώτη είναι η πελαγική κοινότητα βακτηρίων και η δεύτερη κοινότητα είναι η πελαγική κοινότητα με την προσθήκη του μύκητα. Η ανάπτυξη τους έγινε με την προσθήκη θρεπτικών ουσιών, μικρής ποσότητας χαλκού 0,1ml και από διάλυμα συγκέντρωσης 20μM καθώς και γλυκόζης 1ml και από διάλυμα συγκέντρωσης 2g/20ml έτσι οι τελικές συγκεντρώσεις στους αντιδραστήρες είναι 0,02μM Cu ανά αντιδραστήρα και 1mg Glucose ανά αντιδραστήρα. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι στα εναπομείναντα δείγματα ύστερα από τη δειγματοληψία της 30<sup>ης</sup> ημέρας έγινε προσθήκη γλυκόζης ποσότητας 1ml και συγκέντρωσης 2g/20ml.

#### 3.2.1.1 Προετοιμασία Αντιδραστήρων

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε θαλασσινό νερό που συλλέχθηκε από την περιοχή της Σούδας. Η συλλογή και αποθήκευση του νερού γίνεται σε ένα μεγάλο μπιτόνι. Με την χρήση ενός χωνιού, μιας γυάλινης φιάλης 2 λίτρων και δύο φίλτρων (το φίλτρο μπαίνει διπλό) φιλτράρουμε το νερό και το αποθηκεύουμε σε μια γυάλινη φιάλη. Με την ίδια διαδικασία φιλτράρουμε εκ νέου 2 λίτρα νερού και τα αποστειρώνουμε στον αυτόκαυστο κλίβανο για χρήση σε επόμενα στάδια του πειράματος.

Αρχικά αποστειρώθηκαν 12 κωνικές φλάσκες των 250 ml για την πελαγική κοινότητα και 12 κωνικές φλάσκες των 250 ml για την πελαγική κοινότητα με την προσθήκη του μύκητα. Επιπλέον αποστειρώθηκαν 3 φλάσκες που χρησιμοποιήθηκαν ως αβιοτικά δείγματα ελέγχου. Η αποστείρωση πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο κλίβανο.



Σε κάθε φιάσκα τοποθετήθηκε 100 mL θαλασσινό νερό και 0,500 gr πλαστικά. Το θαλασσινό νερό προμηθεύτηκε από τη θαλάσσια περιοχή της Σούδας και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο κλίβανο.

Τα πλαστικά αντίστοιχα, πριν τοποθετηθούν σε κάθε φιάσκα, αποστειρώθηκαν με διάλυμα 70% αιθανόλης για να απομακρυνθούν οι μικροοργανισμοί που είχαν τυχόν προσκολληθεί και τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης στους 37°C για 3 ημέρες.

Τα αβιοτικά δείγματα ελέγχου περιέχουν 0,500 gr PP pellets και 100 ml φιλτραρισμένου και αποστειρωμένου θαλασσινού νερού με pH 6,5. Δεν περιέχουν μικροβιακές κοινότητες. Η παραγωγή τους πραγματοποιήθηκε σε 3 αποστειρωμένα μπουκαλάκια με ονομασίες A1, A2 και A3 αντίστοιχα.



Εικόνα 16 : Αντιδραστήρες ( κωνικές φιάλες)

### **3.2.1.2 Ανάπτυξη κοινοτήτων μικροοργανισμών**

#### Θρεπτικό Υλικό DSMZ

Θα χρησιμοποιήσουμε το θρεπτικό υλικό standard I medium. Η σύσταση του για παραγωγή 1000 ml 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

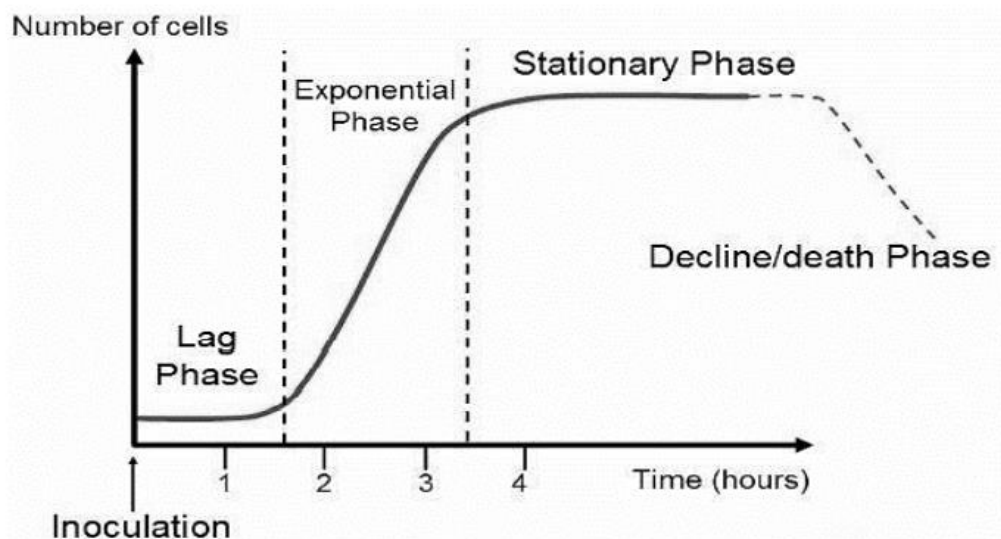
#### Θρεπτικό υλικό για το μύκητα ώστε να παράξει τη λακκάση

Η σύσταση του για παραγωγή 1000ml είναι η εξής :

- D (+)-Glucose 20.0 g
- NaCl 30.0 g
- Yeast extract 5.0 g
- Peptone from caseine 10.0 g
- Peptone from meat 20.0 g
- Distilled water 1000.0 ml

Για την παρακολούθηση της αύξησης του πληθυσμού των μικροοργανισμών χρησιμοποιείται η καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών (Εικόνα 17)





Εικόνα 17 : Τυπική μορφή καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών (Maier 2009)

Α) Φάση προσαρμογής (Lag phase):

Σε αυτήν την φάση οι μικροοργανισμοί έχουν μόλις εμβολιαστεί στο θρεπτικό υλικό. Δεν αναπαράγονται απευθείας, αλλά προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες ανάπτυξης. Τα κύτταρα στη φάση αυτή δε διαιρούνται και δεν παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των μικροοργανισμών. Η διάρκεια αυτής της φάσης εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού και τις συνθήκες που επικρατούν (Maier, 2009).

Β) Φάση εκθετικής ανάπτυξης (Exponential/Log phase):

Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης οι μικροοργανισμοί αρχίζουν να διαιρούνται με σταθερό ρυθμό και παρατηρείται διπλασιασμός των κυττάρων σε σχέση με το χρόνο. Ο ρυθμός ανάπτυξης παραμένει σταθερός σε αυτή τη φάση (Maier, 2009).

Γ) Στατική φάση (Stationary phase):

Κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μειώνεται μέχρι να σταματήσει. Αυτό συμβαίνει λόγω της εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών και της συσσώρευσης τοξικών προϊόντων. Παρατηρείται εξισορρόπηση μεταξύ του ρυθμού ανάπτυξης και θανάτου των μικροοργανισμών (Maier 2009).

Δ) Φάση θανάτου (Death phase):

Κατά τη διάρκεια της φάσης θανάτου παρατηρείται η μείωση των θρεπτικών παραγόντων και η αύξηση των τοξικών προϊόντων μεταβολισμού των μικροοργανισμών. Αυτοί οι παράγοντες οδηγούν τελικά στον θάνατο των μικροοργανισμών (Maier, 2009).

Οι καλλιέργειες των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκαν σε τράπεζα ανάδευσης η οποία λειτουργούσε στις 120 rpm και σε θερμοκρασία 20°C. Για τις καλλιέργειες χρησιμοποιούνταν το κατάλληλο θρεπτικό υλικό είτε για την ανάπτυξη των βακτηρίων είτε του μύκητα όπως παρουσιάστηκε παραπάνω. Για τον προσδιορισμό της καμπύλης ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπολογίστηκε η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου UV-VIS στα 600 nm. Συγκεκριμένα, κάθε 30-40 min πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης της καλλιέργειας και των δυο διαφορετικών κοινοτήτων έως ότου να ληφθεί η επιθυμητή τιμή απορρόφησης (0,700 - 0,800). Η προαναφερθείσα τιμή αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης.



**Εικόνα 18 : UV-VIS Φασματοφωτόμετρο**

Η συγκέντρωση των μικροοργανισμών σε αυτές τις τιμές απορρόφησης είναι  $10^8$  CFU/ml. Έπειτα, συλλέχθηκε ποσότητα 30 ml σε ένα falcon το οποίο φυγοκεντρήθηκε στις 3.500 rpm σε διάρκεια 15 min. Έπειτα έγινε η απομάκρυνση του υπερκείμενου θρεπτικού με τέτοιο τρόπο ώστε να μην αποκολληθεί η πελέτα που δημιουργήθηκε στον πάτο του falcon. Προστέθηκαν 30 ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και σε αυτά διαλύθηκε η πελέτα μέσω του αναδευτήρα στροβιλισμού (vortex). Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε 2 ακόμα φορές έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού. Τέλος, έγινε προσθήκη 1 ml αυτού σε κάθε φλάσκα ώστε η αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών στο πείραμα να είναι  $10^6$  CFU/ml. Αυτό υπολογίστηκε με τον νόμο της αραιώσης ως εξής:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \Rightarrow V_2 = \frac{C_1 * V_1}{C_2} = \frac{10^6 \text{ CFU/ml} * 100 \text{ ml}}{10^8 \text{ CFU/ml}} = \frac{10^8}{10^8} = 1 \text{ ml}$$

Όπου

- $C_1$ : αριθμός αποικιών που μετρήθηκε στην εκθετική φάση ανάπτυξης
- $V_1$ : αρχική ποσότητα πριν την φυγοκέντρηση
- $C_2$ : τελικός αριθμός αποικιών που αντιστοιχεί σε όγκο  $V_2$

Επίσης, σε κάθε φλάσκα προστίθενται 10 μl διαλύματος αζώτου φωσφόρου ώστε η αναλογία C:N:P να είναι 100:10:1. Η τιμή υπολογίστηκε ως εξής:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \Rightarrow V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1} = \frac{1 M * 100 ml}{10.000 M} = 0,01 ml \text{ ή } 10 \mu l$$

Όπου

- C1: συγκέντρωση N βάση αναλογίας 100:10:1
- C2: συγκέντρωση N στο διάλυμα NP
- V2: όγκος κάθε φλάσκας

Στη συνέχεια οι φλάσκες καλύπτονται με διπλό αποστειρωμένο αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στην τράπεζα ανάδευσης. Σε κάθε φλάσκα έγινε προσθήκη χαλκού 0.1ml συγκέντρωσης 20 μM Cu με αποτέλεσμα να έχουμε συγκέντρωση 0,02μM στο βιοαντιδραστήρα. Επίσης, σε κάθε φλάσκα έγινε προσθήκη αποστειρωμένης γλυκόζης διαλύματος 1ml με συγκέντρωση 100mg/ml στην αρχή του πειράματος καθώς και μία ακόμη φορά στη μέση αυτού.

### 3.2.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν κάθε 15 ημέρες ως εξής:

1. Απομακρύνονταν κάθε φορά από την τράπεζα ανάδευσης οι 3 κωνικές φλάσκες που είχαν τη κοινότητα του βακτηρίου και 3 που είχαν τη κοινότητα του μύκητα.
2. Σε αποστειρωμένο περιβάλλον έγινε αφαίρεση των PP pellets που επέπλεαν στις κωνικές φλάσκες, ύστερα σε 2 falcon των 50ml αποθηκεύονταν το υγρό με τους μικροοργανισμούς στην κατάψυξη που λειτουργεί στους -20 °C για περαιτέρω ανάλυση και ονομάστηκε «Δείγμα».
3. Από τα πλαστικά σφαιρίδια αφαιρέθηκαν 3 για περαιτέρω ανάλυση και τα υπόλοιπα τοποθετήθηκαν σε falcon των 10ml όπου και πλύθηκαν με διάλυμα που περιείχε 10 ml απιονισμένο νερό και 2 σταγόνες Tween 80. Η διαδικασία επαναλήφθηκε δυο φορές, ώστε να απομακρυνθεί το βιοφίλμ που είχε προσκολληθεί στην επιφάνεια των πλαστικών και να μετρηθεί η καθαρή διαφορά βάρους των pellets ύστερα από την προσθήκη και εκείνων που αφαιρέθηκαν. Το νερό της πλύσης αποθηκεύονταν για περαιτέρω αναλύσεις και ονομάζονταν 'Βιοφίλμ'.

Μετέπειτα ακολούθησε μια σειρά μετρήσεων που αναλύονται παρακάτω.

### 3.2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΑΡΟΥΣ

Τα σφαιρίδια πολυπροπυλενίου ύστερα από τη πλύση τους, έγινε ψεκασμός τους με αιθανόλη και στη συνέχεια εκ νέου πλύση τους με σκοπό την απομάκρυνση του βιοφίλμ που ενδέχεται να υπάρχει. Ακολούθησε η τοποθέτηση τους σε φούρνο ξήρανσης που λειτουργεί στους 37 °C για χρονικό διάστημα 4 ημερών ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Στη συνέχεια έγινε μέτρηση του ξηρού βάρους των πλαστικών σφαιριδίων που βρίσκονταν σε κάθε κωνική φιάλη. Τοποθετήσαμε το βοηθητικό σκεύος στη ζυγαριά, κάναμε μηδενισμό της μέτρησης και στη συνέχεια προσθέσαμε τα σφαιρίδια. Έγινε σύγκριση της μέτρησης του βάρους κάθε κωνικής φιάσκας με αυτό που τους είχε τοποθετηθεί στη καθεμία τους. Θεωρήσαμε ότι η διαφορά αυτή στη μέτρηση του βάρους οφείλεται στη βιοαποδόμηση των μικροπλαστικών.



Εικόνα 19 : Ζυγαριά ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων

Για τον υπολογισμό της μείωσης του βάρους των σφαιριδίων πολυπροπυλενίου χρησιμοποιήθηκε ο τύπος :

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

Όπου

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

### 3.2.4 ΧΡΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟ ΙΩΔΕΣ

Για την χρώση των δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδες (sample staining with crystal violet) ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- I. Αερισμός των δειγμάτων στον θάλαμο για 45 λεπτά
- II. Χρωματισμός με 1% κρυσταλλικού ιώδους (1 σταγόνα)
- III. Αερισμός των βαμμένων δειγμάτων στον θάλαμο για 45 λεπτά
- IV. Πλύση των δειγμάτων με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό
- V. Αερισμός των δειγμάτων στον θάλαμο για 45 λεπτά
- VI. Τοποθέτηση σε erpendorf χωρητικότητας 2 ml με 1 ml 95% αιθανόλης για 10 λεπτά
- VII. Μέτρηση τιμής οπτικής απορρόφησης στα 595 nm

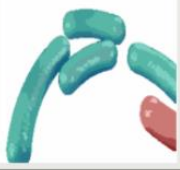

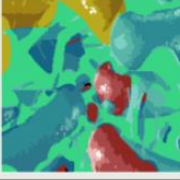
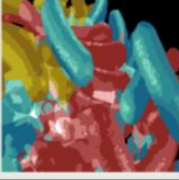
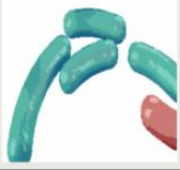
Η μέτρηση γίνεται στο φασματοφωτόμετρο στα 595 nm. Δεκτές τιμές απορρόφησης είναι οι τιμές μικρότερες του 1. Κατά μέσο όρο γίνονται 4 αραιώσεις σε κάθε δείγμα για να επιτευχθούν αποδεκτές τιμές.

### 3.2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

#### 3.2.5.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Στο φυσικό περιβάλλον οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και ζουν ελεύθερα. Σε υγρές συνθήκες μπορούν να αναπτύσσονται και να συμβιώνουν σε κάποια επιφάνεια. Έτσι αναπτύσσονται κοινότητες βακτηρίων που περιβάλλονται από ένα εξωκυτταρικό πολυμερές υλικό που παράγουν τα ίδια τα βακτήρια, τις βιομεμβράνες (Biofilms)(Z. MELABIANAKI et al. 2007).

Μέρος του βιοφίλμ είναι και οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες EPS(Extracellular polymeric substances), μικροοργανισμοί και άλλα σωματίδια. Τα κύρια υπεύθυνα για τη δομική και λειτουργική ενότητα των βιοφίλμ καθώς και για τις βιολογικές, φυσικοχημικές ιδιότητες, είναι τα EPS. Όπου αποτελούνται από **πρωτεΐνες**, πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια (Adav et al. 2008). Με ποσοστό που ανήκει σε 50-90% της συνολικής οργανικής ύλης (Nielsen et al. 1997). Έχουν σημαντικό ρόλο στην βιοαποδόμηση των πλαστικών. Ο σχηματισμός μικροβιακών βιοφίλμ γίνεται με στόχο να προστατέψουν τις κοινότητες των μικροοργανισμών σε αντίξοες συνθήκες περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα μεγαλύτερη απόδοση στη διαδικασία της βιοαποδόμησης (Kulonen and Hallman 1956).

ATTACHMENT	GROWTH	MATURATION	DETACHMENT	RE-DEVELOPMENT
				
Bacteria attach to a variety of surfaces, from metal, to plastic, to skin tissue, using specialized tail-like structures.	The cells grow and divide, forming a dense matrixed structure, many layers thick. At this stage the biofilm is too thin to be seen.	When there are enough bacteria in the developing biofilm the bacteria secrete a slimy extracellular matrix of proteins and polysaccharides.	The slime protects the bacteria from the harsh environments, shielding them from many chemicals, antibiotics and immune systems.	As the colonies mature, the structures created weaken and cast off bacteria that look for new places to grow and prosper.

Εικόνα 20 : Σχηματισμός βιοφίλμ (Source: Centre of Microbial Innovation ,UoA,NZ)

### 3.2.5.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

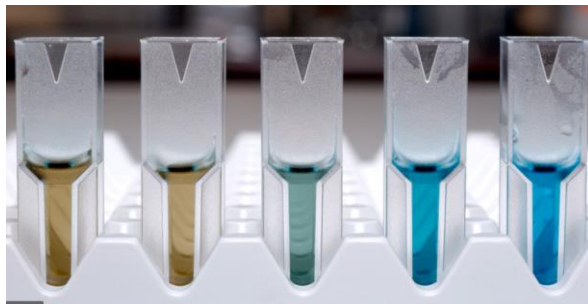
Για τον υπολογισμό των πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος Bradford είναι η πλέον διαδεδομένη για τον προσδιορισμό της απόλυτης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο δείγμα και στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G 250 αλλάζει χρώμα όταν συνδέεται με πρωτεΐνες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

Η διαδικασία εύρεσης των ολικών πρωτεϊνών έγινε στα δείγματα 'Δείγμα' και 'Βιοφίλμ' που απομονώθηκαν κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας για την κάθε κοινότητα μικροοργανισμών. Από κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε ποσότητα 1,8 ml στις 12,000rpm για 20 min και στη συνέχεια αραιώθηκε σε 0,9 ml απιονισμένο νερό.

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

- Διάλυμα Β (500  $\mu\text{g/ml}$ ): 10 ml  $H_2O$  + 5 mg albumin
- Διάλυμα C (250  $\mu\text{g/ml}$ ): 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml B
- Διάλυμα D (200  $\mu\text{g/ml}$ ): 3 ml  $H_2O$  + 2ml B
- Διάλυμα E (150  $\mu\text{g/ml}$ ): 3,5 ml  $H_2O$  + 1,5 ml B
- Διάλυμα F (125  $\mu\text{g/ml}$ ): 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml C
- Διάλυμα G(100  $\mu\text{g/ml}$ ): 4 ml  $H_2O$  + 1ml B
- Διάλυμα H (75  $\mu\text{g/ml}$ ) : 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml E
- Διάλυμα I (50  $\mu\text{g/ml}$ ) : 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml G
- Διάλυμα J (25  $\mu\text{g/ml}$ ) : 2,5 ml  $H_2O$  + 2,5 ml I

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



Εικόνα 21 : Κυψελίδες με εμφανή τον σχηματισμό του έγχρωμου συμπλόκου χρωστικής-πρωτεΐνης

### 3.2.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ

Στη διάρκεια του πειράματος τα μικροπλαστικά σφαιρίδια διασπάστηκαν λόγω βιοαποδόμησης και ανάδευσης σε μικρότερα σωματίδια. Έγινε μέτρηση για κάθε δειγματοληψία με το μηχάνημα SALD-7500 nano όπου υπολογίζει τη διασπορά του μεγέθους των μικροπλαστικών και παρέχει υψηλής ευαισθησίας και ακριβές μετρήσεις των νανο και μικρο σωματιδίων χαμηλής συγκέντρωσης. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα μέτρησης δειγμάτων με συγκέντρωση χαμηλότερη από 1ppm.



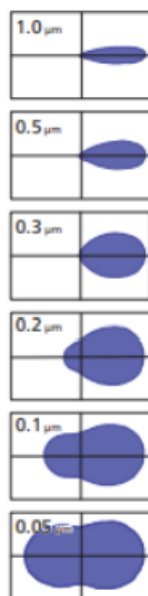
**Εικόνα 22 : Σύστημα υπολογισμού διασποράς μεγέθους μικροπλαστικών ( Πηγή : <https://www.shimadzu.eu.com> )**

Έγινε εισαγωγή 5ml δείγματος ύστερα από το μηδενισμό του οργάνου με 5ml αποστειρωμένο θαλασσινό νερό για κάθε μέτρηση. Τα αποτελέσματα αναφέρονται σε κατανομή μεγέθους των μικροπλαστικών κατά ποσότητα και όγκο.

#### **Αρχή Λειτουργίας Μηχανήματος**

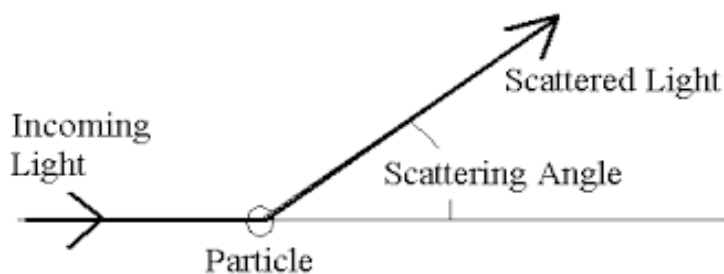
Όταν ένα σωματίδιο ακτινοβολείται με τη δέσμη λέιζερ του μηχανήματος, εκπέμπεται φως από το σωματίδιο προς όλες τις κατευθύνσεις. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται σκεδαζόμενο φως (scattered light). Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός ποικίλει με τη γωνία σκέδασης και περιγράφει ένα χωρικό μοτίβο κατανομής της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





Εικόνα 23 : Σχέση μεταξύ της διαμέτρου των σωματιδίων και του μοτίβου κατανομής του φωτός ( Πηγή : <https://www.shimadzu.eu.com> )

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



Εικόνα 24 : Σκέδαση / Περίθλαση φωτός από το σωματίδιο ο( Πηγή : <https://www.shimadzu.eu.com> )

### 3.2.7 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ PELLEΤ

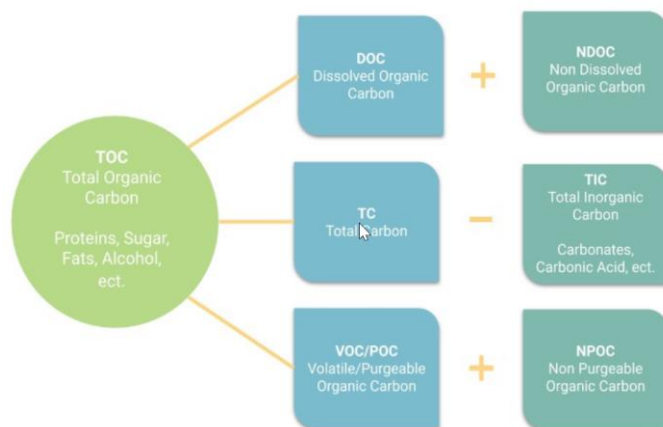
1. Έγινε τοποθέτηση των Pellets κάθε αντιδραστήρα σε κυκλικό δισκίο
2. Το δισκίο τοποθετήθηκε σε μικροσκόπιο που προσαρμόστηκε για σωστή χρήση από το παρατηρητή, ο οποίος ήταν το ίδιο άτομο για όλες της μετρήσεις
3. Με μία λαβίδα έγινε ανάλυση κάθε Pellet για 4 νοητές πλευρές ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια του
4. Έγινε κατανομή της επιφάνειας για κάθε pellet ποσοστιαία από 0% (Clean) με βήμα 25% έως 100% (Weathered)
5. Στη συνέχεια πήραμε το μέσο όρο από τις 4 νοητές πλευρές για τη συνολική επιφάνεια του pellet
6. Τέλος πήραμε το μέσο όρο κάθε αντιδραστήρα της ίδιας χρονικής περιόδου δειγματοληψίας

### 3.2.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΑΚΚΑΣΗΣ

Ο Προσδιορισμός της λακκάσης έγινε με τη μέθοδο εκτίμησης οξείδωσης του ABTS. Η μη-φαινολική βαφή ABTS οξειδώνεται από τη λακκάση σε μια πιο σταθερή και πιο προτιμητέα κατάσταση κατιόντων. Η συγκέντρωση των κατιόντων που ευθύνονται για την έντονη τιγκουάζ απόχρωση μπορούν να συσχετιστούν με την δραστηριότητα του ενζύμου και μετριέται στα 420nm. Το μίγμα αποτελείται στη περίπτωση μας από 400 μl δείγματος 500 μl Sodium Acetate (pH 5.0) με 50mM συγκέντρωση και 100 μl ABTS. Το μίγμα αντίδρασης περιείχε 10mM ABTS. Οι αντιδραστήρες έμεναν σε σκοτεινό μέρος για 30' και στη συνέχεια έγινε μέτρηση τους και καταγραφή για τελικό αποτέλεσμα. Έγιναν και μετρήσεις ύστερα από 24 και 48 ώρες στα ίδια δείγματα αλλά δεν ήταν αξιόπιστες για να καταγραφούν. Μία μονάδα ορίστηκε για για ποσότητα λακκάσης που οξειδώθηκε για 1μmol ABTS ανά λεπτό (Sunsil S. More, 2011).

### 3.2.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΥΜΕΝΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ

Η μέτρηση του ολικού οργανικού άνθρακα TOC έγινε με το μηχάνημα "Multi N/C 2100S" της Analytik Jena. Ο οργανικός ολικός άνθρακας είναι ένα μέτρο του ποσού του ολικού άνθρακα σε οργανικές συνθέσεις σε καθαρό νερό και υδάτινα συστήματα. Η μέτρηση του οργανικού άνθρακα είναι μία αξιόλογη και αναλυτική τεχνική που εφαρμόζεται από πολλά εργαστήρια, όπως αυτό του Radboud University, για να καθορίσουν πόσο ιδανικό είναι ένα διάλυμα για τις διεργασίες τους. Είναι μία σημαντική παράμετρος που χρησιμοποιείται για τη παρακολούθηση των ολικών επιπέδων των παρόντων οργανικών στοιχείων.



Εικόνα 25 : Τρόποι υπολογισμού του ολικού οργανικού άνθρακα

### Πειραματική διαδικασία

Έγινε συλλογή γυάλινων φιαλιδίων τα οποία πλύθηκαν 2 φορές με νερό, 2 φορές με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια με υπερ-κάθαρο νερό. Ακολούθησε στέγνωμα σε φούρνο στους 65 °C. Έπειτα φιλτράρονται περίπου 10 ml από κάθε δείγμα με φίλτρο **0,45μm** σε διαφορετικό φιαλίδιο για κάθε δείγμα. Τα φιαλίδια σφραγίζονται για να μετρηθούν από το μηχάνημα.



Εικόνα 26 : "Multi N/C 2100S" Analytik Jena (Source: <https://www.analytik-jena.com> )

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ PP

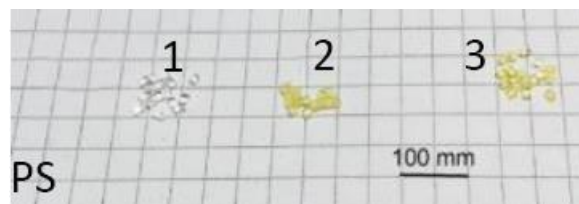
Τα σφαιρίδια πολυπροπυλενίου τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ακτινοβολήσης του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης, για χρονική περίοδο 4 μηνών σε μέση θερμοκρασία 60°C και μέση ένταση ακτινοβολίας 2000 lux .



Εικόνα 27 : Αλλαγή χρώματος στα σφαιρίδια πολυπροπυλενίου εξαιτίας της UV-A ακτινοβολίας

Όπως διαπιστώνεται στη παραπάνω εικόνα η αλλαγή του χρώματος είναι αισθητή με μεγαλύτερη αλλαγή στο διάστημα των 4 μηνών, με το χρώμα τους να τείνει να κιτρινίσει. Έχει αποδειχθεί ότι η φωτογήρανση προκαλεί αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες των πλαστικών, όπως το χρώμα, μοριακό βάρος (Singh and Sharma 2008), ευθραστότητα και μηχανικές ιδιότητες. Η αλλαγή χρώματος οφείλεται στη δημιουργία διπλών διασταυρόμενων δεσμών και στην απουσία οξυγόνου, καθώς ο κύριος μηχανισμός είναι οι διασταυρόμενες συνδέσεις (Gewert et al., 2015). Έχει επίσης γίνει γνωστό ότι η αλλαγή χρώματος στα πλαστικά υποδηλώνει οξείδωση των φαινολικών αντιοξειδωτικών παραγόντων δημιουργώντας παραπροϊόντα (Endo et al., 2005).

Υπάρχουν αρκετές μελέτες καθώς και πειραματικές δοκιμές για τη διεύρυνση των αποτελεσμάτων της φωτόλυσης των πολυμερών, είτε στο περιβάλλον σε κανονικές καιρικές συνθήκες είτε σε προσομοιώσεις των συνθηκών σε εργαστηριακό περιβάλλον. Ένα εκ των αποτελεσμάτων αυτών παρουσιάζεται στη παρακάτω εικόνα .



Εικόνα 28 : Μικροσφαιρίδια (pellets) PS, (Kowalski et al. 2016)

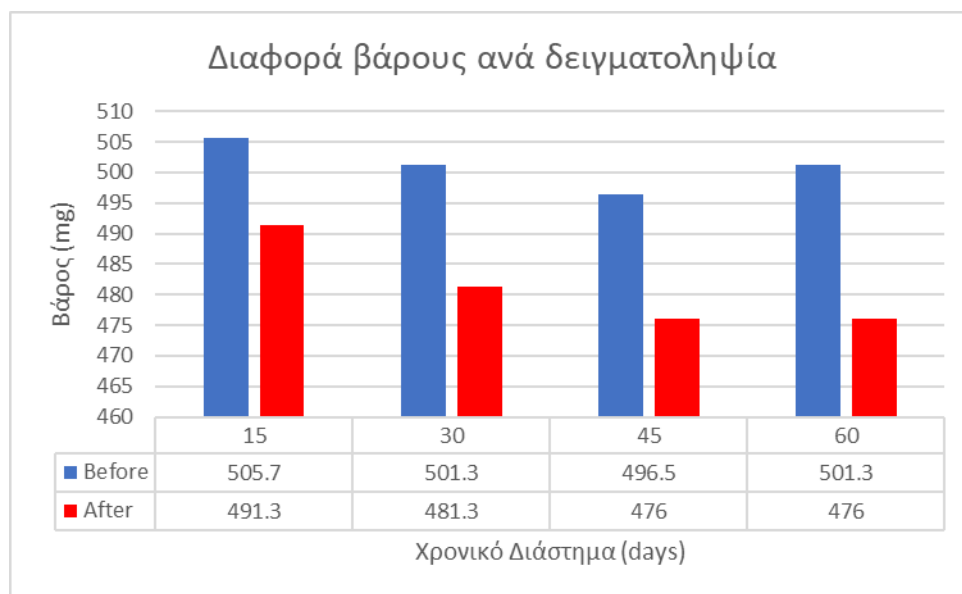
Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα εξής :

1. Σφαιρίδια πλαστικού τα οποία ήταν αποθηκευμένα στο σκοτάδι
2. Σφαιρίδια πλαστικού που αποθηκεύτηκαν σε θαλασσινό νερό στο εργαστήριο και ήταν εκτεθειμένα 12 ώρες ημερησίως στην υπεριώδη ακτινοβολία
3. Σφαιρίδια πλαστικού που αποθηκεύτηκαν σε ξηρό περιβάλλον και ήταν εκτεθειμένα 12 ώρες ημερησίως στην υπεριώδη ακτινοβολία

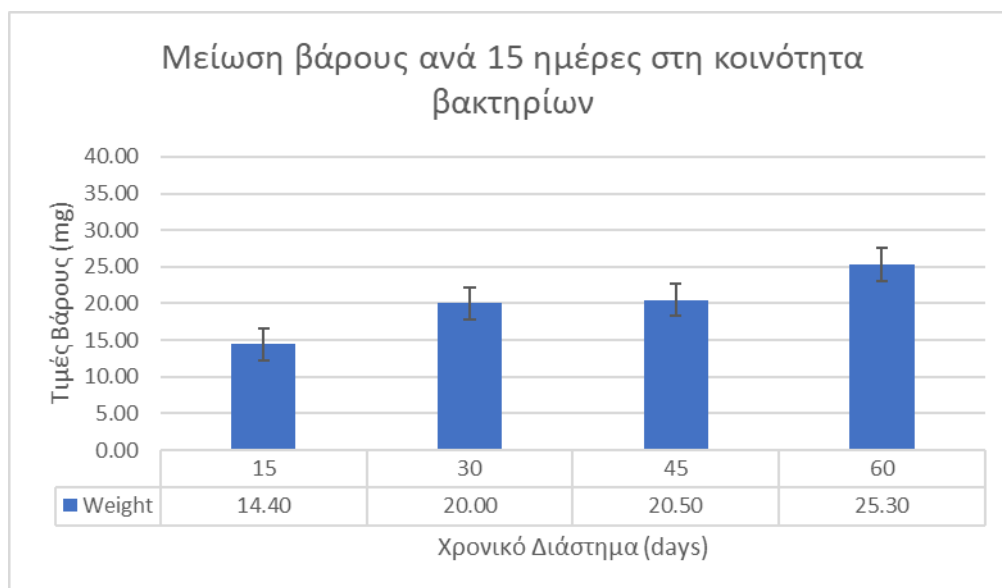
Η ακτινοβολήση έγινε στο εργαστήριο με λάμπα UV-A και η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν ένας χρόνος (Kowalski et al. 2016).

## 4.2 ΕΞΕΤΑΣΗ ΒΑΡΟΥΣ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ

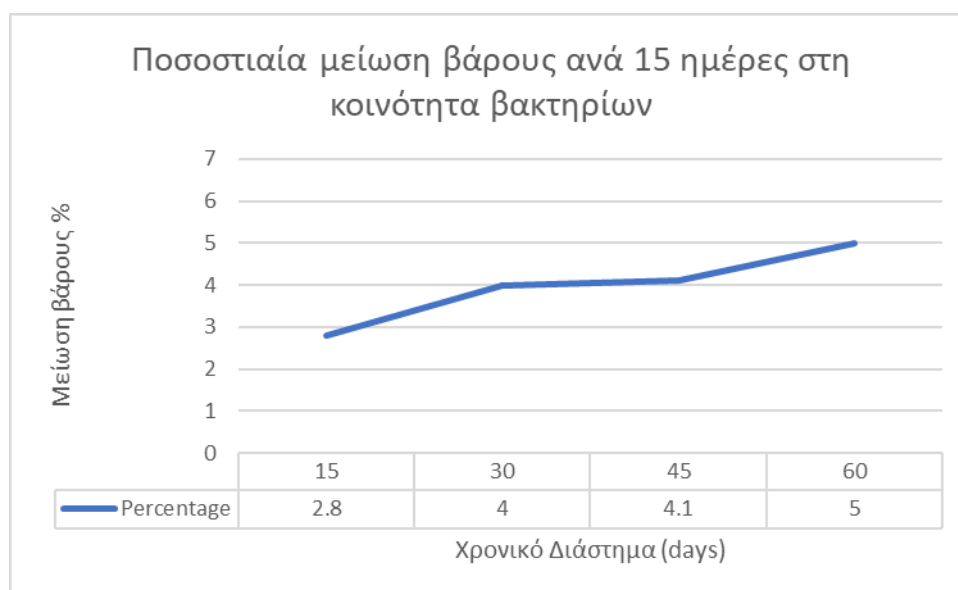
Σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε μέτρηση του βάρους των μικροσφαιριδίων πολυπροπυλενίου πριν και μετά το τέλος του πειράματος. Η απώλεια βάρους αναφέρεται στη διαφορά βάρους μεταξύ του αρχικού και του τελικού βάρους των μικροσφαιριδίων PP η οποία μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο της παραγράφου 3.3.3. Στα διαγράμματα 4.2.1.a και 4.2.1.b παρουσιάζονται οι μεταβολές βάρους των σφαιριδίων που εκτέθηκαν στην πρώτη κοινότητα μικροοργανισμών ενώ στα διαγράμματα 4.2.2.a και 4.2.2.b οι μεταβολές του βάρους των σφαιριδίων που εκτέθηκαν στην πελαγική κοινότητα και το μήκητα. Επιπλέον, μετά το πέρας των δύο μηνών πραγματοποιήθηκε μέτρηση βάρους τριών αβιοτικών δειγμάτων.



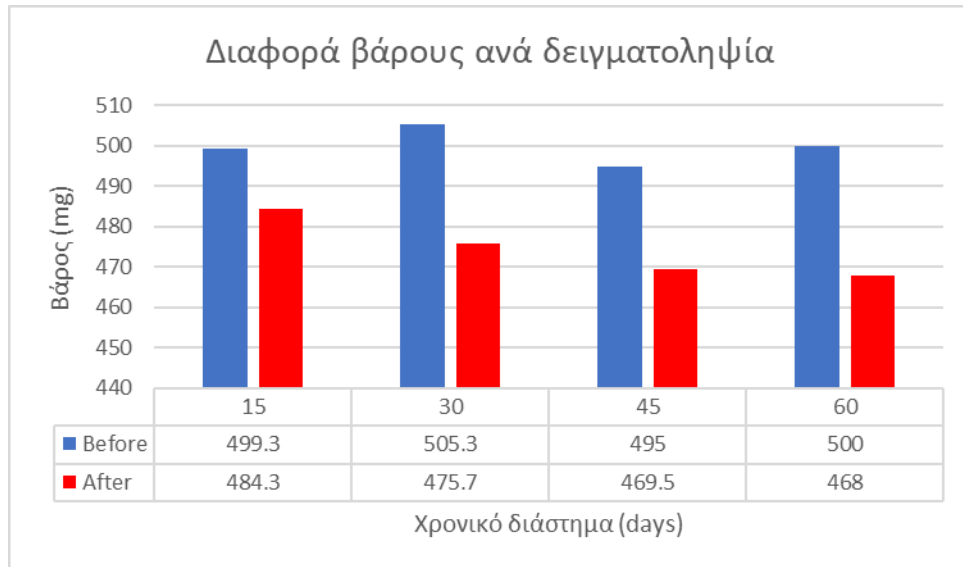
**Διάγραμμα 2 : Διαφορά βάρους ανά δειγματοληψία στη κοινότητα των βακτηρίων**



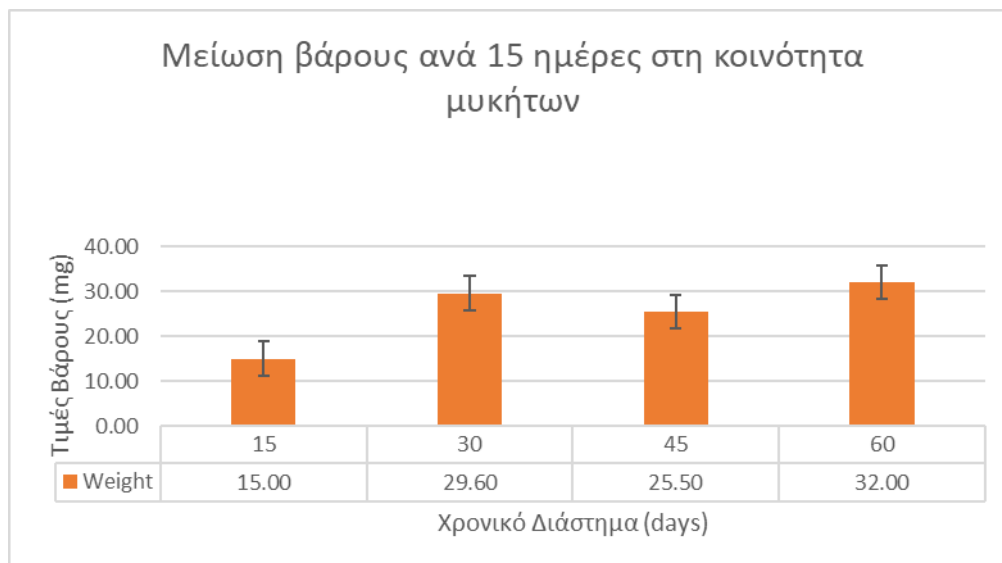
**Διάγραμμα 3 : Μείωση βάρους pellets στη κοινότητα βακτηρίων**



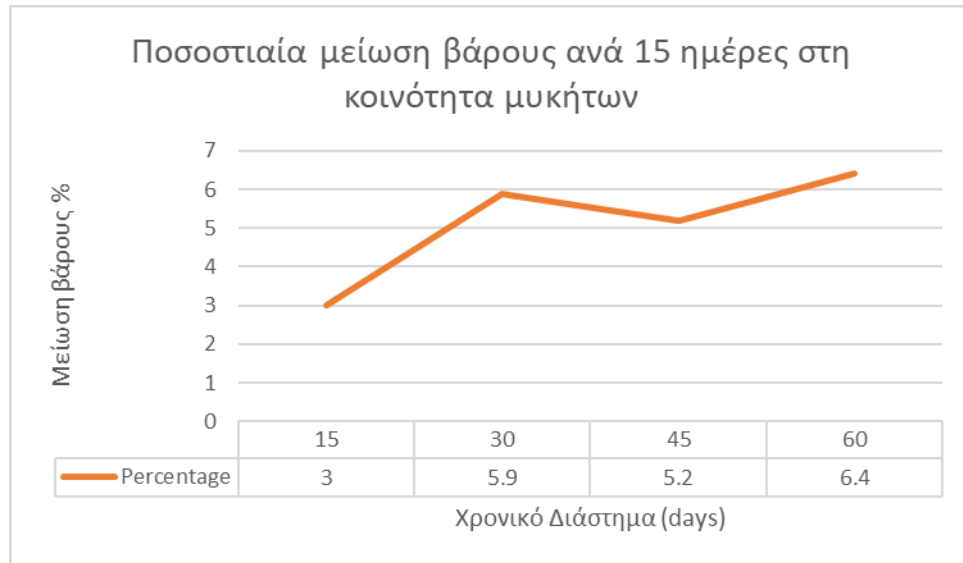
**Διάγραμμα 4: Ποσοστιαία μείωση βάρους pellets στη κοινότητα βακτηρίων**



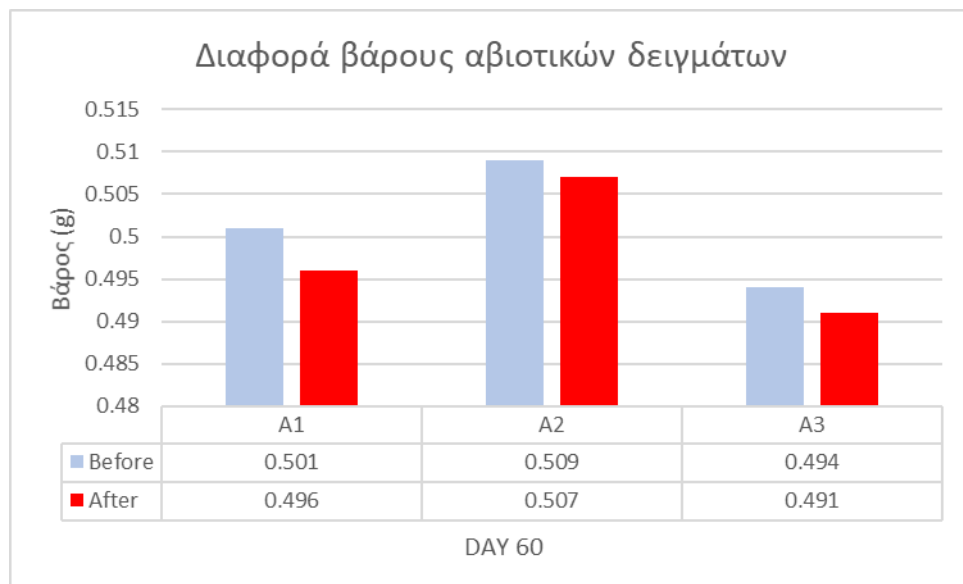
**Διάγραμμα 5 : Διαφορά βάρους ανά δειγματοληψία στη κοινότητα των μυκητών**



**Διάγραμμα 6 : Μείωση βάρους pellets στη κοινότητα μυκήτων**

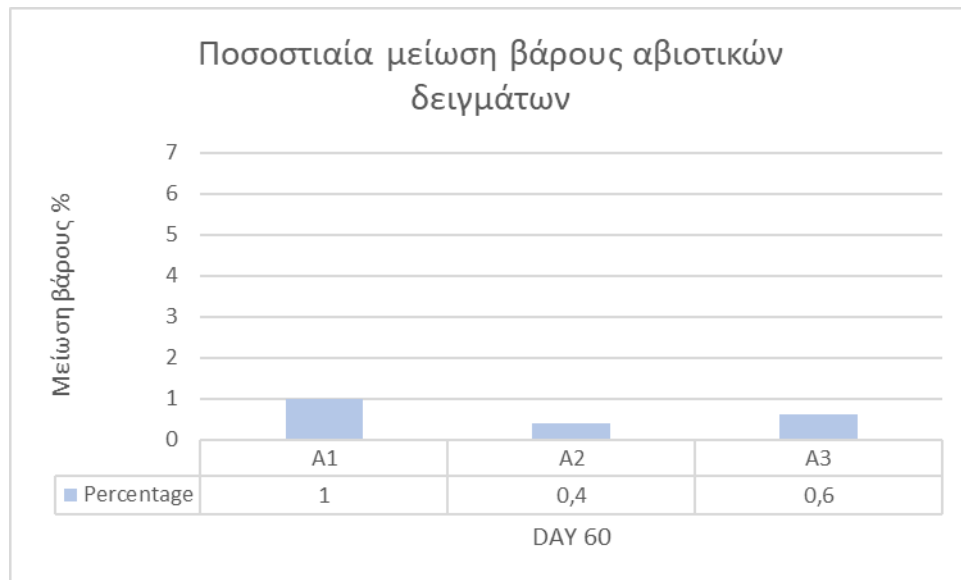


**Διάγραμμα 7 : Ποσοστιαία μείωση βάρους pellets στη κοινότητα μυκήτων**



**Διάγραμμα 8: Διαφορά βάρους αβιοτικών δειγμάτων**





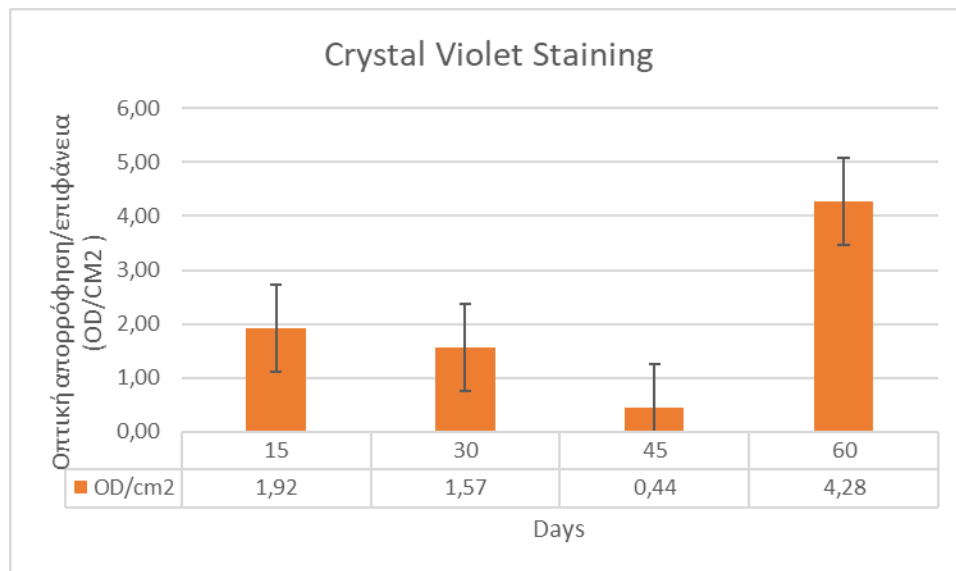
**Διάγραμμα 9: Ποσοστιαία μείωση βάρους αβιοτικών δειγμάτων**

Και στις δύο κοινότητες στα διαγράμματα 3 και 5 παρατηρείται μία ανοδική πορεία στην ποσοστιαία μείωση του βάρους από την πρώτη δειγματοληψία έως και αυτήν των 30 ημερών, στη συνέχεια βλέπουμε ότι υπάρχει διαφορετική συμπεριφορά στις δύο κοινότητες. Αυτή του μύκητα έχει μια φθίνουσα πορεία έως τη δειγματοληψία των 45 ημερών ενώ για το ίδιο διάστημα αυτή με τη πελαγική κοινότητα των βακτηρίων έχει μία σταθερή πορεία. Ακολουθεί μία ανοδική πορεία και για της δύο κοινότητες για το χρονικό διάστημα μεταξύ της 3<sup>ης</sup> δειγματοληψίας και της τελευταίας, παρουσιάζοντας κοινή συμπεριφορά μεταξύ των πελαγικών κοινοτήτων. Υπάρχει πιθανότητα αυτή η ανοδική πορεία στις δύο κοινότητες να οφείλεται στο γεγονός ότι έγινε προσθήκη στα εναπομείναντα δείγματα ύστερα από τη 2<sup>η</sup> δειγματοληψία των 30 ημερών να ευθύνεται στη προσθήκη γλυκόζης ποσότητας 1ml και από διάλυμα συγκέντρωσης 1g/10ml που αντιστοιχεί σε 1mg Glucose ανά αντιδραστήρα.

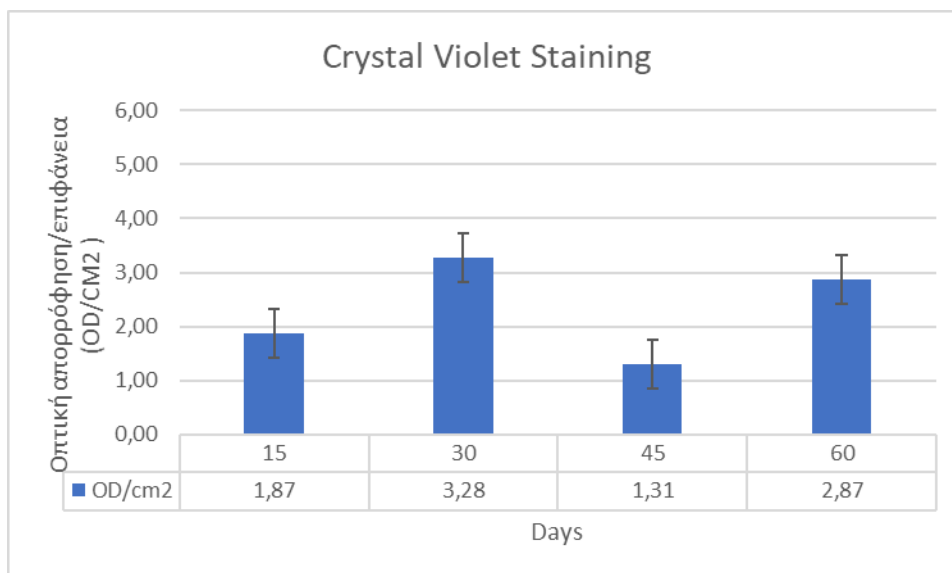
Επιπλέον παρατηρείται ότι η πελαγική κοινότητα που περιέχει το μύκητα έχει παρουσιάσει μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση σε σχέση με αυτή των βακτηρίων. Ωστόσο η συμπεριφορά τους δείχνει να είναι ασταθής στα διαγράμματα, όχι όπως αυτή της κοινότητας των βακτηρίων, που είναι σημάδι ότι χρειάζεται περαιτέρω έρευνα ώστε να υπάρξει εικόνα καθώς και σύγκριση των δυνατοτήτων τους σε σταθερές και για τις δύο περιπτώσεις συνθήκες. Ο ακριβής προσδιορισμός των παραμέτρων που ευνοούν την ενεργητικότητα και τη σταθερότητα στο κύκλο ζωής τους θα επέτρεπε μία τέτοια έρευνα.

### 4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΧΡΩΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΟ ΙΩΔΕΣ

Για τη μέτρηση του βιοφίλμ που αναπτύχθηκε στην επιφάνεια των pellets χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο χρώσης του δείγματος με κρυσταλλικό ιώδες (sample staining with crystal violet) της παραγράφου 3.3.4, μέσω παρακολούθησης της οπτικής του πυκνότητας σε φασματοφωτόμετρο. Το κρυσταλλικό ιώδες είναι μία βαφή τριαρυλομεθανίου. Η διαδικασία έγινε σε δύο pellet για κάθε δείγμα και υπολογίστηκε ανά μονάδα επιφάνειας ( $OD/cm^2$ ). Το crystal violet έχει αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και ανθελμινθικές ιδιότητες, χρησιμοποιείται ως ιστολογική χρώση για την ταξινόμηση μικροοργανισμών. Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται η έκταση του βιοφίλμ στην επιφάνεια των Pellets.



**Διάγραμμα 10 : Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων στα δείγματα που επώαστηκαν με την πελαγική κοινότητα και το μύκητα**



**Διάγραμμα 11 : Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων στα δείγματα που επώαστηκαν με την πελαγική κοινότητα**

#### **Δείγματα με την πελαγική κοινότητα και το μύκητα**

Παρατηρείται μία σταθερή τάση στην έκταση του βιοφίλμ τις πρώτες 30 ημέρες του πειράματος και στη συνέχεια μία απότομη πτώση που την ακολουθεί μία απότομη αύξηση. Αυτό πολύ πιθανό να ευθύνεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί στα δείγματα υπέστησαν ένα διάστημα ατροφίας, εκείνο το διάστημα όπου έγινε αντιληπτό και οπτικά μας οδήγησε στην απόφαση να εισάγουμε 1ml μίγματος γλυκόζης συγκέντρωσης 1g/10ml .

#### **Δείγματα με την πελαγική κοινότητα**

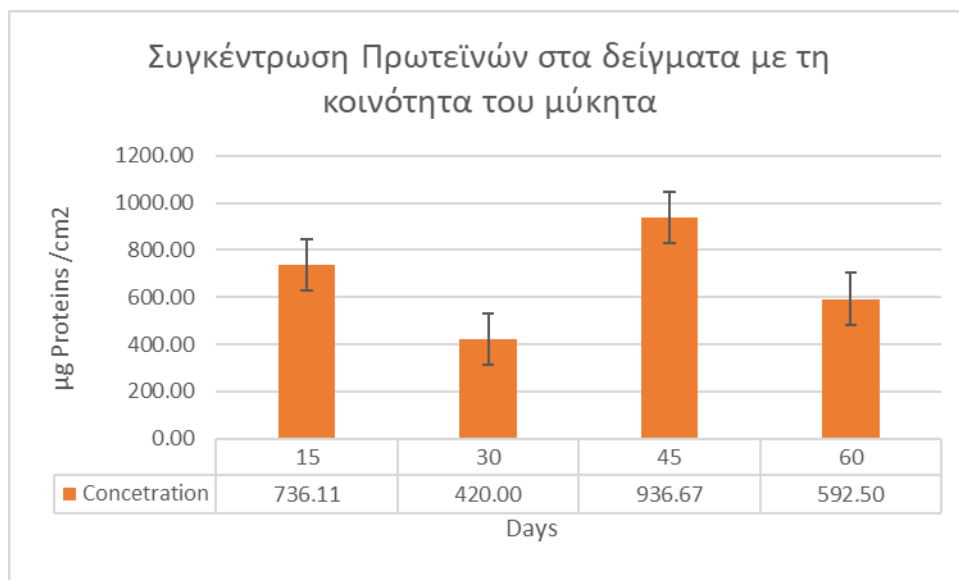
Στο διάγραμμα 11, φαίνεται να υπάρχει μία αύξηση στην οπτική απορρόφηση ανά επιφάνεια τετραγωνικού εκατοστού στο πρώτο μισό του πειράματος, έως και τη 2<sup>η</sup> δειγματοληψία της 30<sup>ης</sup> ημέρας, στη συνέχεια παρατηρείται μία απότομη μείωση στη 45<sup>η</sup> ημέρα και την ακολουθεί μία αύξηση ίδιου βαθμού με αυτή της 30<sup>ης</sup> ημέρας από τη 15<sup>η</sup> ημέρα. Τα δύο μισά του πειράματος δείχνουν να έχουν την ίδια συμπεριφορά.

Οι δύο κοινότητες έδειξαν διαφορετική συμπεριφορά στα παραπάνω διαγράμματα, με τη πελαγική κοινότητα των βακτηρίων να παρουσιάζουν ένα μοτίβο, ενώ αυτό της κοινότητας των μυκήτων να φθίνουσα συμπεριφορά στο βάθος του χρόνου και ξαφνικά μία απότομη αύξηση στη τελευταία δειγματοληψία.

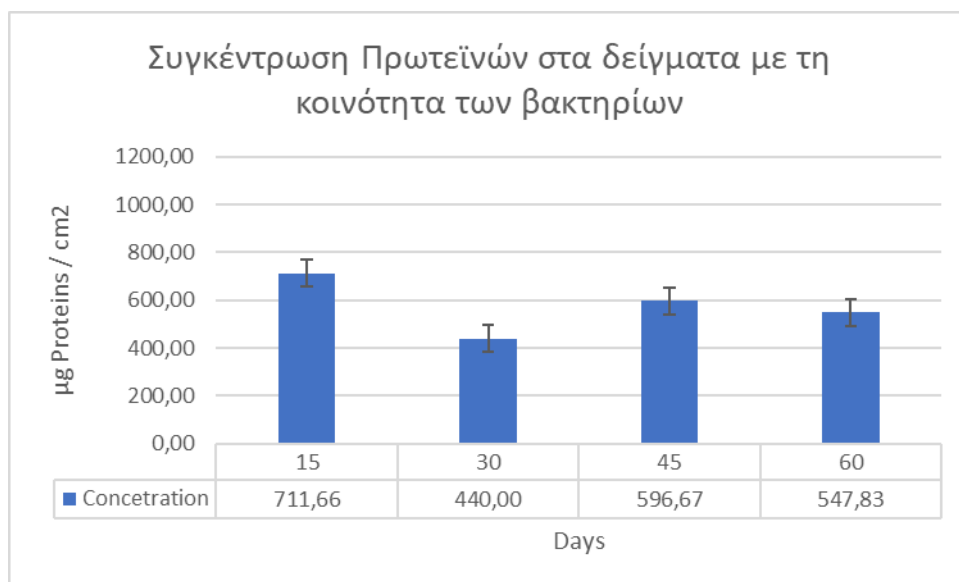
#### 4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Ένα από τα βασικά δομικά στοιχεία των κυττάρων είναι οι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πολύπλοκες, πολυδιάστατες ουσίες που συνεισφέρουν στις διαδικασίες των οργανισμών. Οι πρωτεΐνες είναι οργανικά μακρομόρια που αποτελούνται από αμινοξέα ενωμένα μεταξύ τους με πεπτιδικό δεσμό. Ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται από την ένωση της καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος με την αμινομάδα του επόμενου αμινοξέος με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Πρωτεΐνες παρόμοιας λειτουργίας έχουν παρόμοια σύνθεση αμινοξέων και αλληλουχία (Encyclopedia Britannica). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες περιέχονται στα EPS και διαδραματίζουν μεγάλο ρόλο ως δομικές, ενζυμικές πρωτεΐνες, καθώς και στην αποδόμηση των EPS (Haurowitz and Koshland 2020).

Τα δεδομένα συλλέχθηκαν ύστερα από την εφαρμογή της μεθόδου Bradford και υπολογίσαμε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών ανά μονάδα επιφάνειας και παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



Διάγραμμα 12 : Συγκέντρωση Πρωτεϊνών στα δείγματα που επωάστηκαν με την πελαγική κοινότητα και το μύκητα



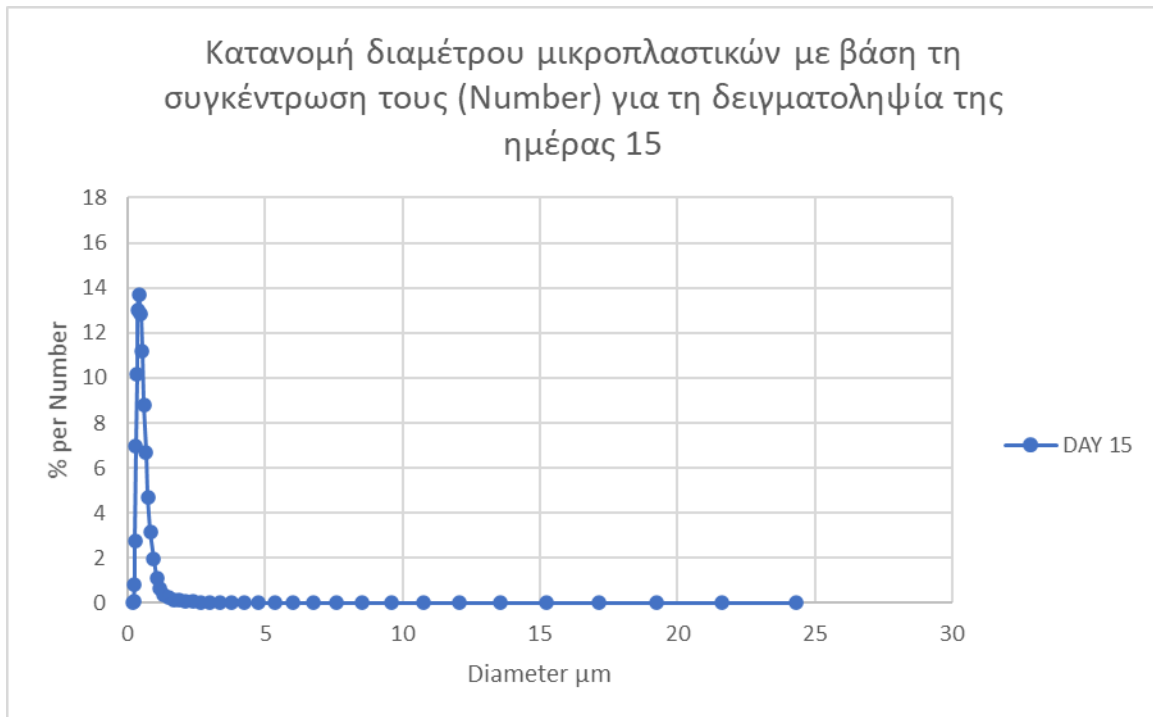
**Διάγραμμα 13 : Συγκέντρωση Πρωτεϊνών στα δείγματα που επώαστηκαν με την πελαγική κοινότητα**

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο βιοφιλμ και για τα δύο είδη κοινοτήτων φαίνεται να ακολουθεί παρόμοιο μοτίβο, έχοντας αύξηση τις πρώτες 15 ημέρες, ακολουθεί πτώση στη συγκέντρωση και στη συνέχεια λόγω της προσθήκης τροφής στις 30 ημέρες, φαίνεται να υπάρχει αύξηση κλείνοντας με πτώση. Αξιοσημείωτο είναι ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο βιοφιλμ της κοινότητας των βακτηρίων ακολουθεί το ανάστροφο μοτίβο με τη συγκέντρωση του βιοφιλμ.

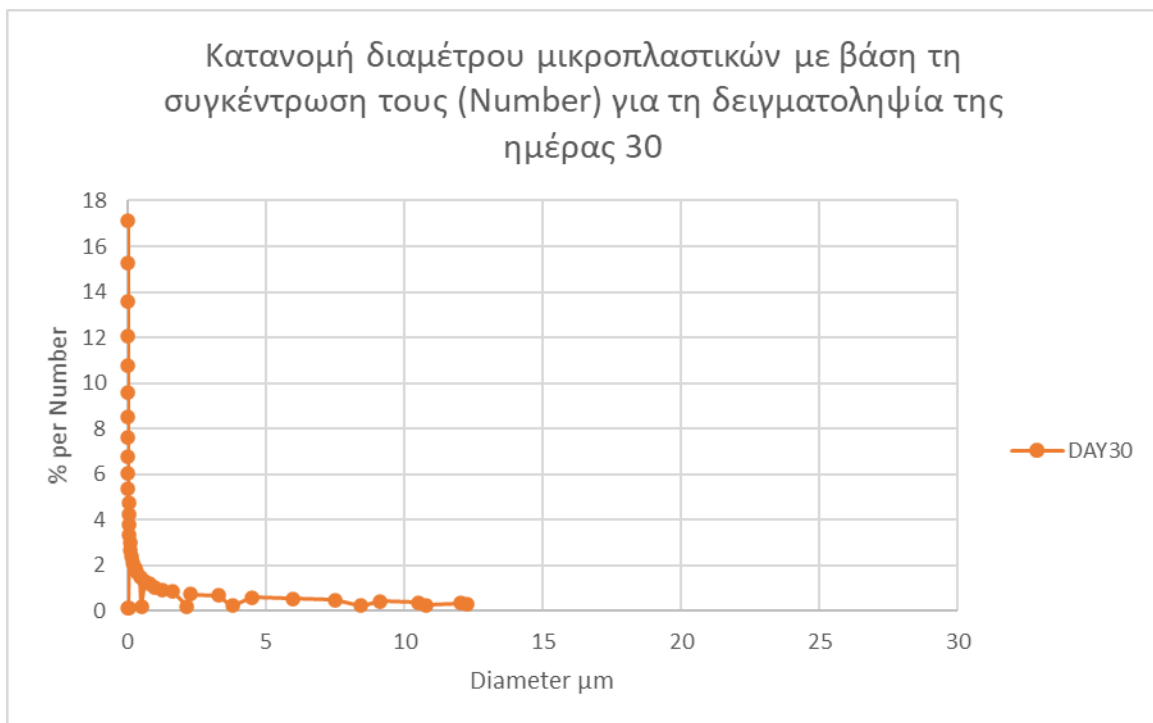
#### **4.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ**

Τα παράγωγα μικροπλαστικά που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος μετρήθηκαν μέσω του μηχανήματος SALD-7500 Nano και υπολογίστηκε η διασπορά τους.

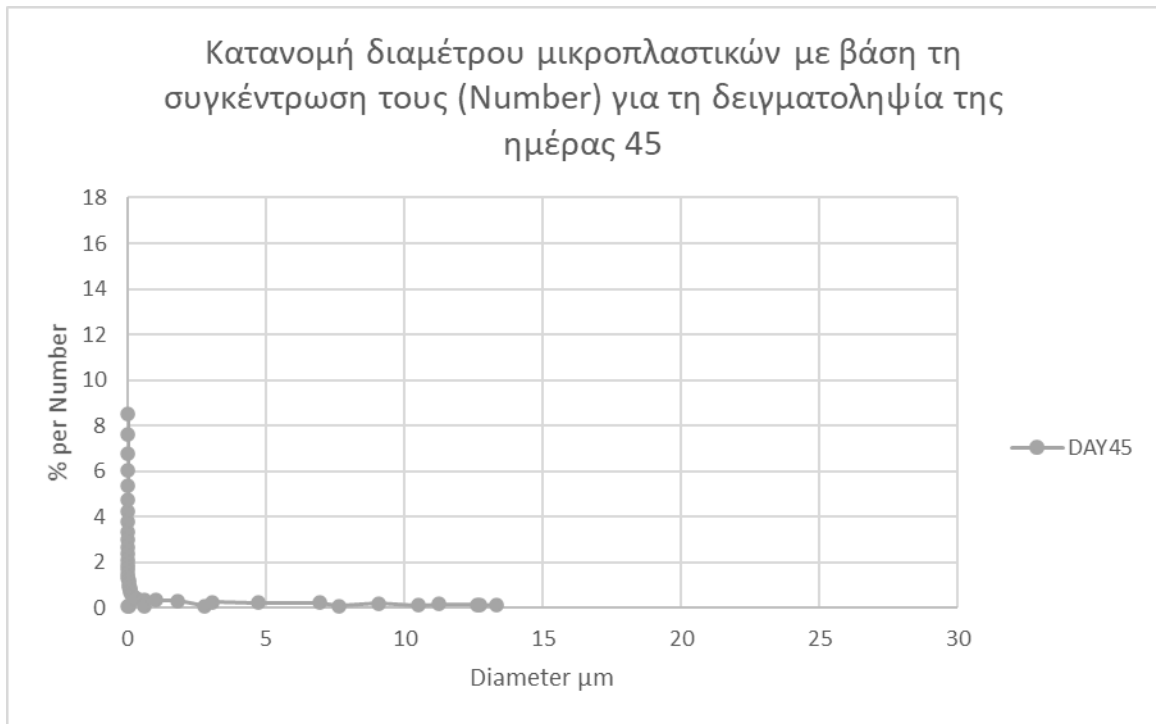
Τα διαγράμματα που παρουσιάζονται είναι αυτό κατά αριθμό που μετράει τον αριθμό των σωματιδίων που υπάρχουν μέσα στο διάλυμα και γίνεται κατανομή βάση του μεγέθους του σε διάγραμμα και γίνεται διάκριση με βάση τον όγκο στο κάθε δείγμα. Το διάγραμμα όγκου διακρίνει τι υπερσχύει ογκομετρικά μέσα στο δείγμα.



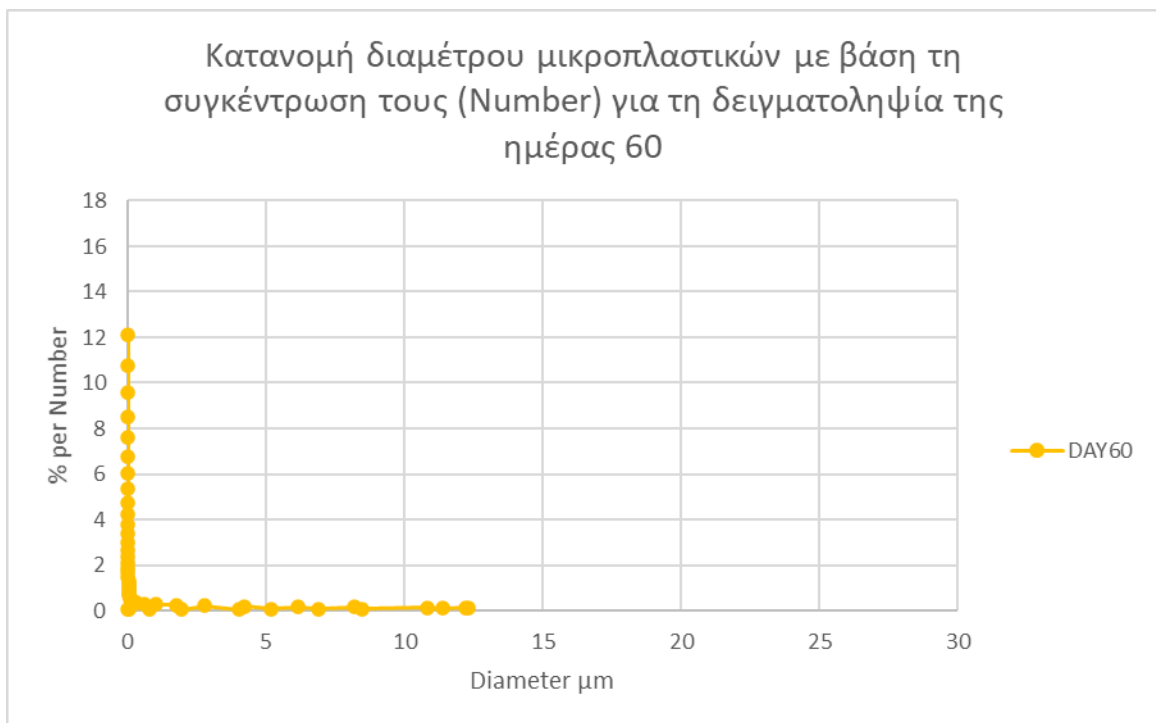
**Διάγραμμα 14 :** Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τη συγκέντρωσή τους (Number) για τη δειγματοληψία της ημέρας 15 της κοινότητας των βακτηρίων



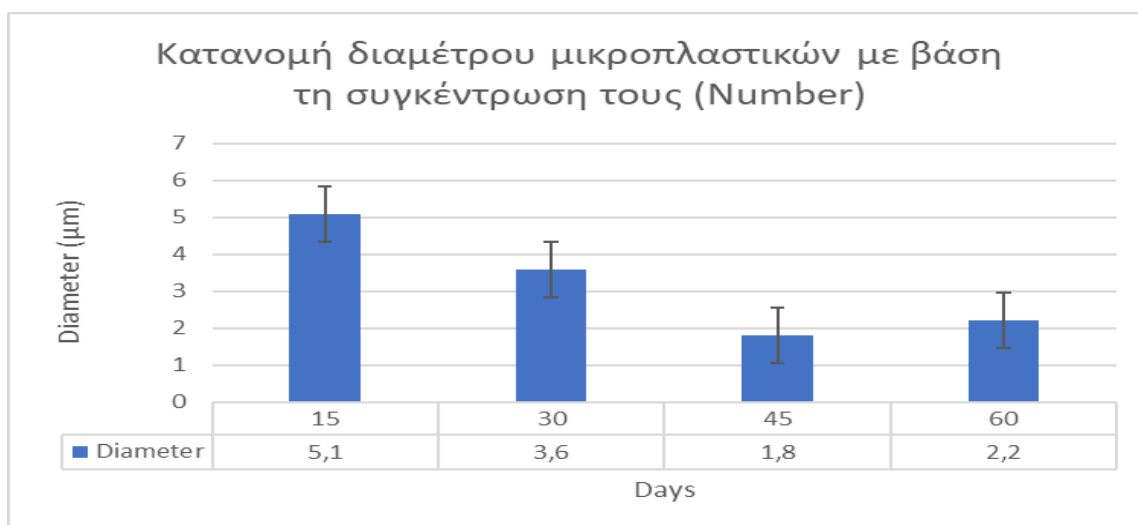
**Διάγραμμα 15 :** Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τη συγκέντρωσή τους (Number) για τη δειγματοληψία της ημέρας 30 της κοινότητας των βακτηρίων



Διάγραμμα 16 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τη συγκέντρωσή τους (Number) για τη δειγματοληψία της ημέρας 45 της κοινότητας των βακτηρίων

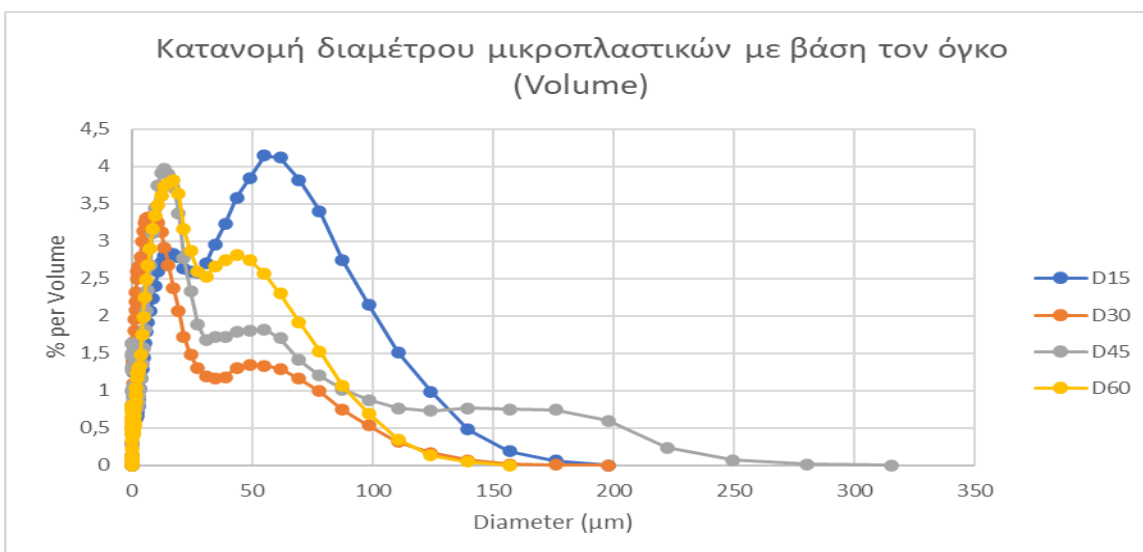


Διάγραμμα 17 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τη συγκέντρωσή τους (Number) για τη δειγματοληψία της ημέρας 60 της κοινότητας των βακτηρίων



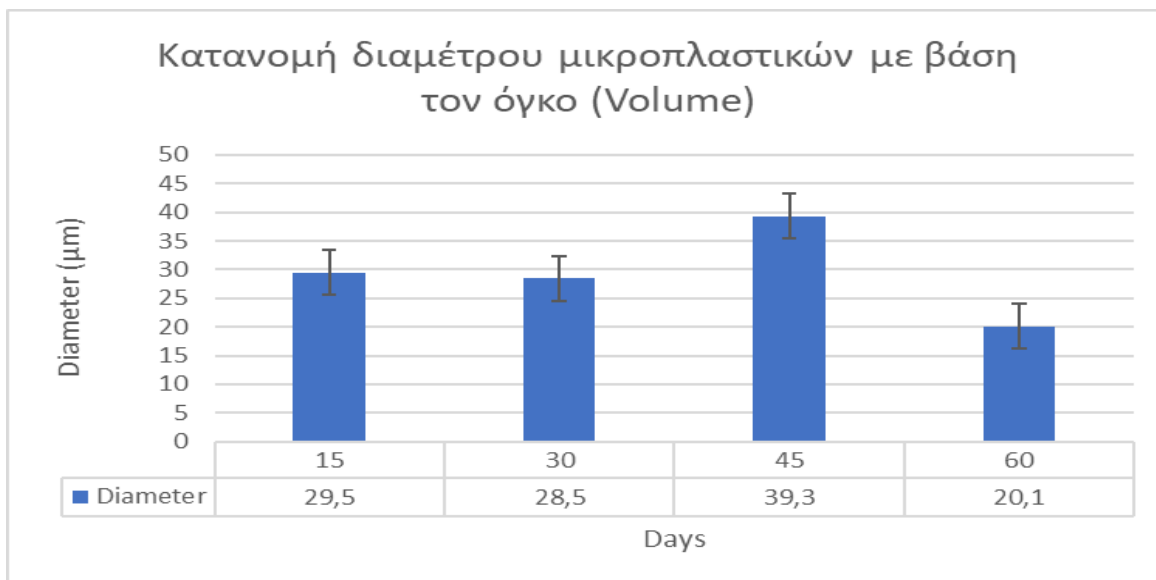
**Διάγραμμα 18 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση την συγκέντρωσή τους στους αντιδραστήρες με τη κοινότητα των βακτηρίων (Number)**

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κατανομή της διαμέτρου των μικροπλαστικών με κριτήριο τον αριθμό των σωματιδίων που βρίσκονται στα δείγματα που επώαστηκαν με την πελαγική κοινότητα. Όπως παρατηρείται τις αρχικές ημέρες είναι μεγαλύτερη η διάμετρος και δείχνει να έχει φθίνουσα πορεία καθώς αυξάνονται οι μέρες που σημαίνει ότι υπάρχει ενδεχόμενο να καταναλώνεται μέρος των σωματιδίων από τους μικροοργανισμούς και έτσι να οφείλεται η μείωση της διαμέτρου.



**Διάγραμμα 19 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τον όγκο τους (Number) της κοινότητας των βακτηρίων**





**Διάγραμμα 20 : Κατανομή διαμέτρου μικροπλαστικών με βάση τον όγκο στους αντιδραστήρες με τη κοινότητα των βακτηρίων (Volume)**

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζεται η κατανομή της διαμέτρου των μικροπλαστικών με κριτήριο τον όγκο των σωματιδίων που βρίσκονται μέσα στα δείγματα της πελαγικής κοινότητας. Όπως παρατηρείται τις αρχικές ημέρες είναι μεγαλύτερη η διάμετρος και δείχνει να έχει φθίνουσα πορεία, με εξαίρεση αυτή τη δειγματοληψία της 45<sup>ης</sup> ημέρας.

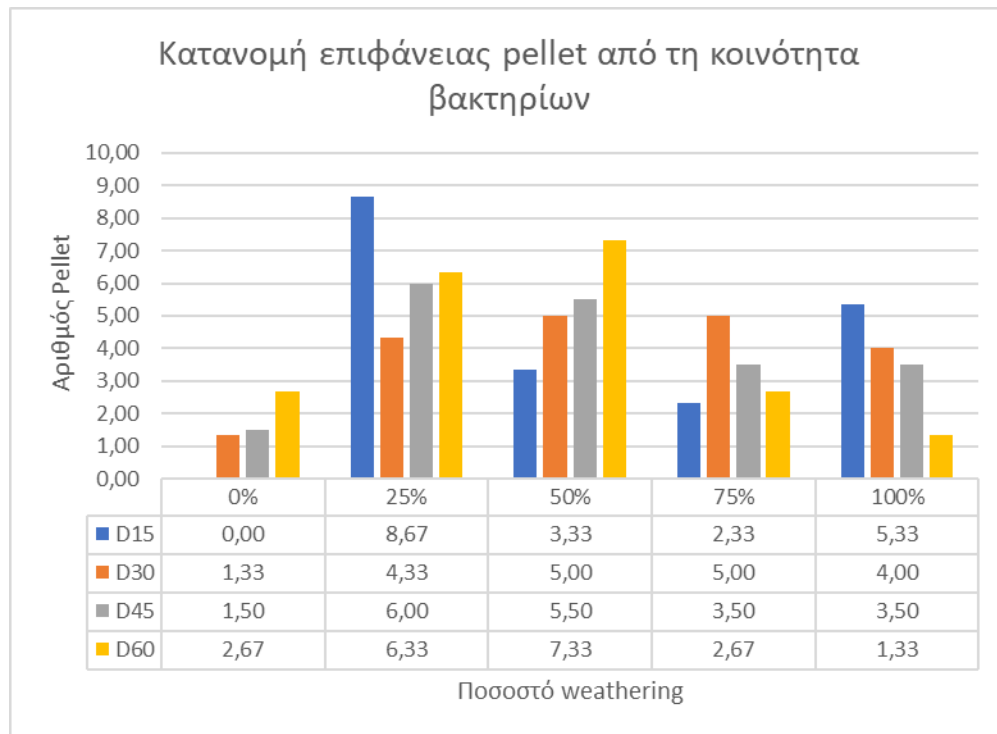
Ωστόσο κρίνοντας από το μοτίβο των υπολοίπων μετρήσεων είναι διακριτή μία μείωση της διαμέτρου που ενδεχομένως οφείλεται στην ύπαρξη μικροοργανισμών της πελαγικής κοινότητας Σούδας, οι οποίοι βοηθούν ενεργά στην βιοαποδόμηση των σύνθετων πολυμερών στο υδατικό διάλυμα.

Όπως φαίνεται στα παραπάνω διαγράμματα υπάρχει μείωση της διαμέτρου ανά δειγματοληψία στις μετρήσεις με βάση τον αριθμό. Έτσι ενδεχόμενος υπάρχει ένα μοτίβο που δηλώνει τη θετική έκβαση των μικροοργανισμών στη βιοαποδόμηση των μικροπλαστικών σωματιδίων στο δείγμα και σε μικρότερη κλίμακα από ότι αυτή των μικροσφαιριδίων. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε ύπαρξη πλαστικών μικρότερης διαμέτρου από αυτής των 1 μm που σημαίνει ότι πιθανόν να μην βρίσκονται νανοπλαστικά στα δείγματα.

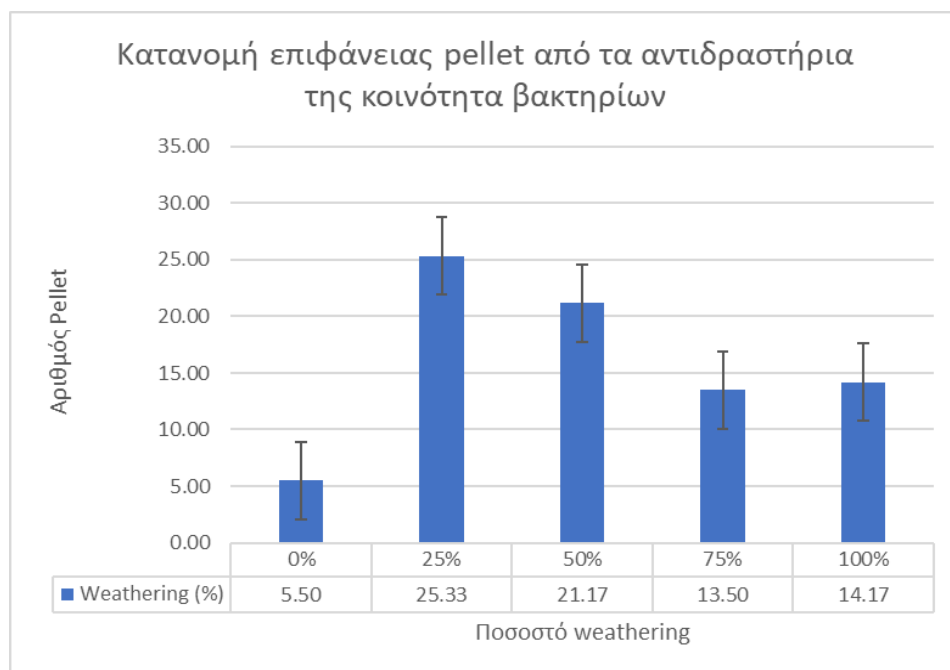
Όσον αφορά τα δείγματα της πελαγικής κοινότητας του μύκητα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν έδειξαν κάποιο αποτέλεσμα με τη συγκεκριμένη μέθοδο στο παρόν μηχάνημα και δεν υπήρχε δυνατότητα ανίχνευσης μικροπλαστικών/ νανοπλαστικών στην υδατική φάση της περίπτωσης μας.

## 4.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ PELLEΤ

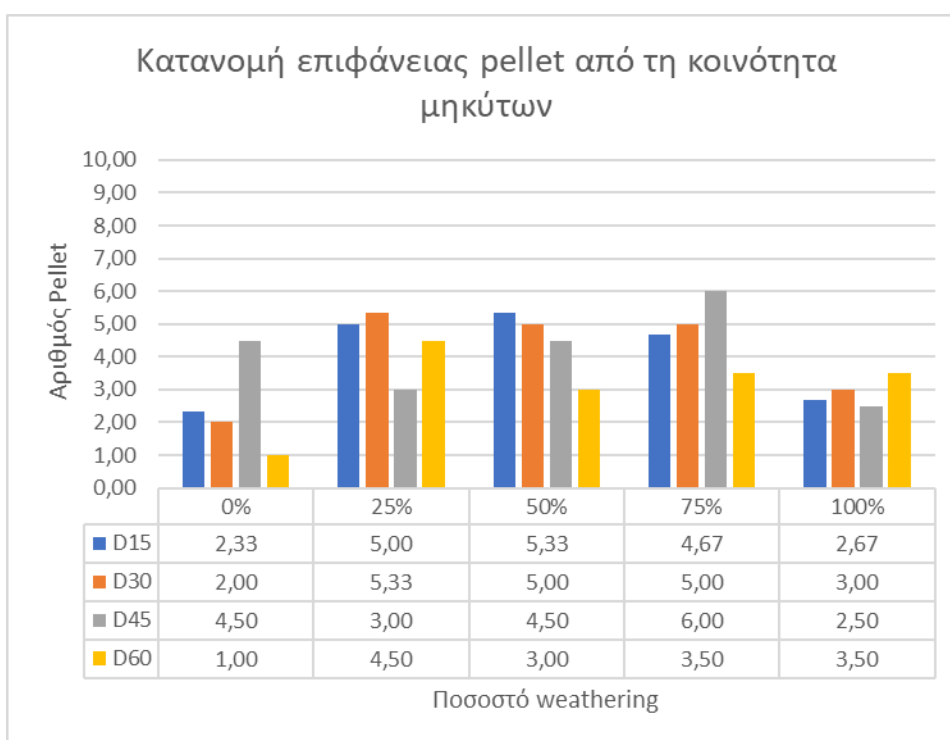
Στα 2 διαγράμματα παρακάτω, παρουσιάζεται ο αριθμός των pellet που αντιχτοιχεί σε κάθε δειγματοληψία που έγινε σε διάστημα 2 μηνών για τις κοινότητες των βακτηρίων και των μυκήτων, ανάλογα με το ποσοστό weathering της ολικής επιφάνειας σε κάθε ένα από αυτά, με τον μέσο όρο του αριθμού των Pellet να παρουσιάζεται στο πίνακα εκατέρωθεν του διαγράμματος. Ύστερα από κάθε αναλυτικό διάγραμμα που δείχνει κάθε ημέρα δειγματοληψίας παρουσιάζεται το συγκεντρωτικό με βάση μόνο τον αριθμό των pellet σε σχέση με το ποσοστό weathering.



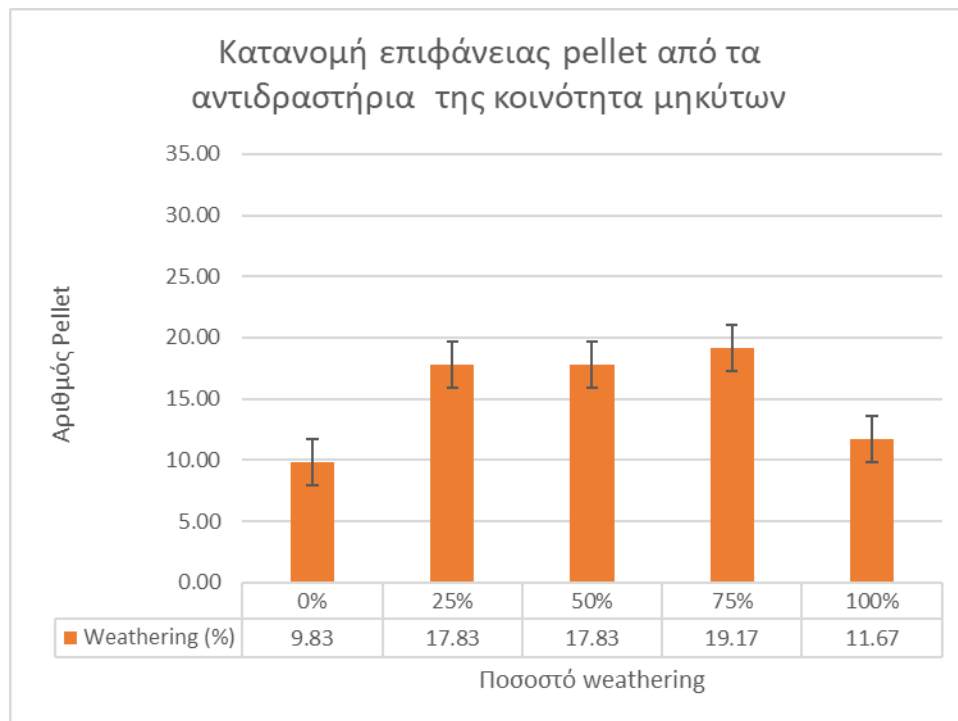
**Διάγραμμα 21 : Εκτίμηση κατανομής της επιφάνειας των μικροσφαιριδίων που εκτέθηκαν στην πελαγική κοινότητα βακτηρίων ανά ημέρα δειγματοληψίας με βάση το ποσοστό weathering τους**



Διάγραμμα 22 : Κατανομή pellet με βάση το ποσοστό weathering στη πελαγική κοινότητα βακτηρίων



Διάγραμμα 23 : Εκτίμηση κατανομής της επιφάνειας των μικροσφαιριδίων από τους αντιδραστήρες της κοινότητας των μυκήτων ανά ημέρα δειγματοληψίας με βάση το ποσοστό weathering τους



**Διάγραμμα 24 : Κατανομή pellet με βάση το ποσοστό weathering στη πελαγική κοινότητα μυκήτων**

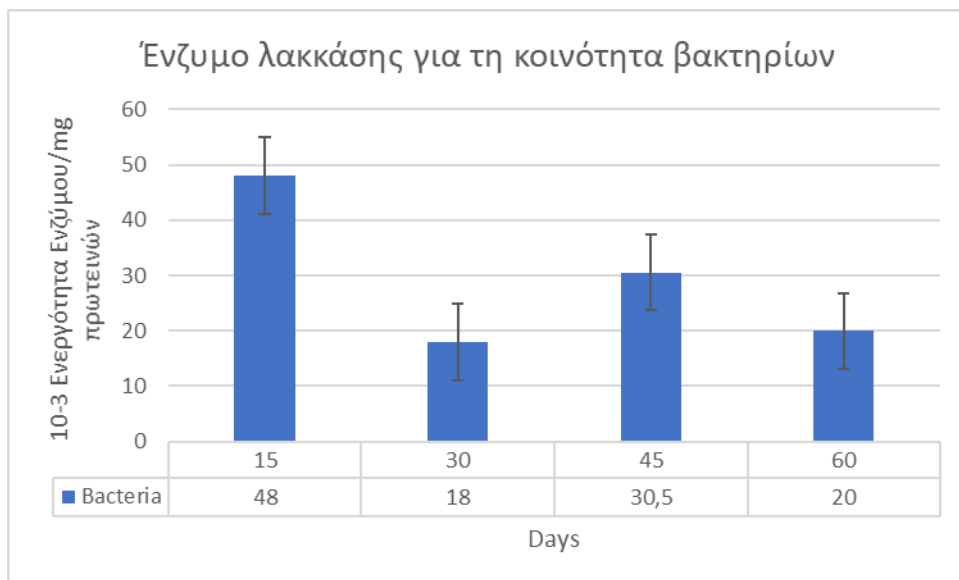
Δε παρατηρείται κάποιο μοτίβο όσον αφορά τη συσχέτιση της διάρκειας που βρίσκονταν τα Pellet με το ποσοστό weathering που υπέστη σε αυτά. Αυτό που παρατηρείται ωστόσο είναι πως στη κοινότητα των βακτηρίων δεν υπάρχει αντιληπτό ποσοστό στο 0% σε αντίθεση με αυτή των μυκήτων όπου είναι μία σχετικά ομοιόμορφη κατανομή του αριθμού των Pellet καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος καθώς και το ποσοστό weathering.

Τέλος παρουσιάζεται η ολική κατανομή της επιφάνειας των pellet όσον αφορά το ποσοστό weathering ανεξαρτήτως της ημέρας δειγματοληψίας για τις δύο κοινότητες.

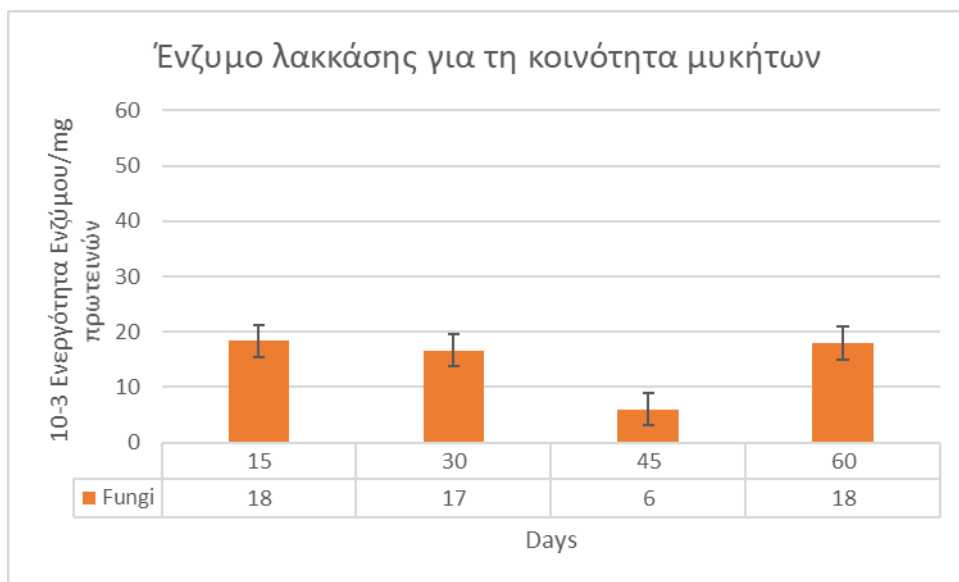
## 4.7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΑΚΚΑΣΗΣ

Οι λακκάσες είναι πολυχαλκινικές οξειδάσες με υψηλή καταλυτική ευελιξία και χαμηλών καταλυτικών απαιτήσεων καθώς απαιτείται μόνο οξυγόνο για την ενεργοποίησή τους (Felipe de Salas, Susana Camarero, 2020). Οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί σε εμπορικό επίπεδο για τη παραγωγή αιθανόλης (Alfred M Mayer , Richard C Staples, 2002). Μύκητες και βακτήρια που έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές δείχνουν υψηλές δυνατότητες βιοαποδόμησης πλαστικών, ένα από τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι οι λακκάσες (Thi Cam Ha Dang et al, 2018). Με προσθήκη βοηθητικών ουσιών όπως ο χαλκός αυξάνεται η δραστηριότητά τους (Leticia Arregui, 2019). Ο αποπολυμερισμός γίνεται από ένζυμα ανάμεσα τους και η λακκάση που έχουν απομονωθεί από σημεία απόθεσης πλαστικών (Thi Cam Ha Dang et al, 2018).

Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι μετρήσεις του ενζύμου της λακκάσης για τις δύο κοινότητες μικροοργανισμών που είναι υπό εξέταση.



**Διάγραμμα 25 : Μετρήσεις ενζύμου λακκάσης στην πελαγική κοινότητα**



**Διάγραμμα 26 : Μετρήσεις ενζύμου λακκάσης στην πελαγική κοινότητα με το μύκητα**

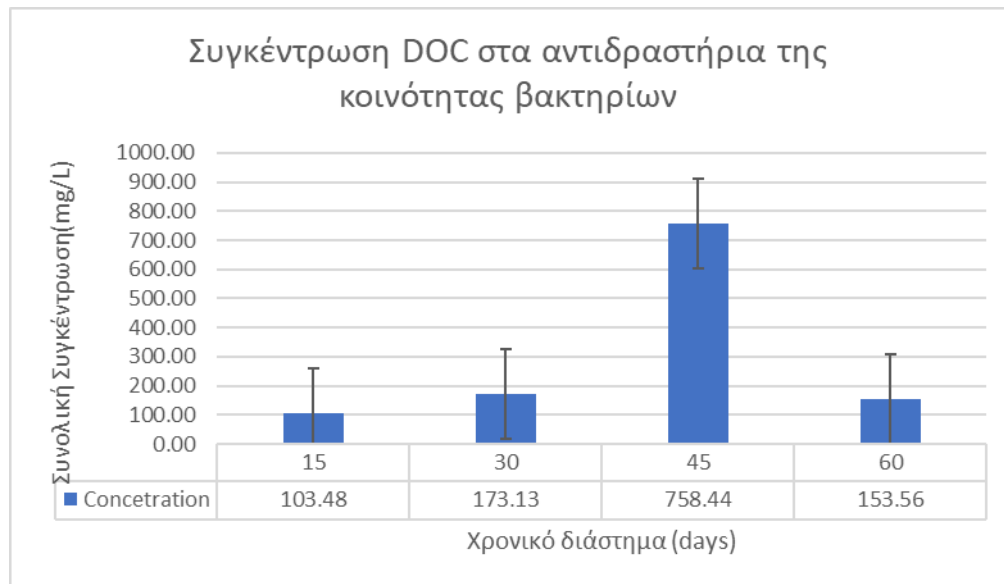
Όσον αφορά τη κοινότητα των βακτηρίων παρατηρείται ένα μοτίβο αύξησης που ακολουθεί πτώση για το πρώτο μισό του πειράματος με επανάληψη του ίδιου φαινομένου στο δεύτερο μισό, ωστόσο η 1<sup>η</sup> δειγματοληψία τη 15<sup>η</sup> ημέρα δείχνει να έχει τη μεγαλύτερη ενεργητικότητα κατά μεγάλο βαθμό σε σχέση με τις υπόλοιπες μετρήσεις.

Γενικότερα, το μοτίβο της ενεργότητας ακολουθεί το μοτίβο της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο βιοφίλμ της πελαγικής κοινότητας βακτηρίων.

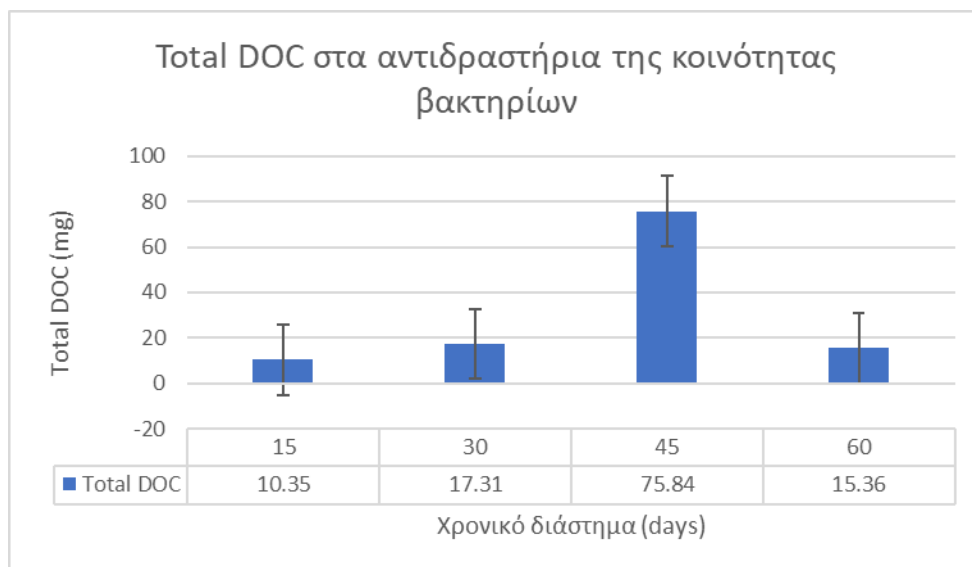
Σε αντίθεση η κοινότητα του μύκητα φαίνεται να έχει σταθερή μέτρηση στο ένζυμο με πτώση στη 45<sup>η</sup> ημέρα για τον ίδιο λόγο που αναφέρθηκε και παραπάνω, ωστόσο υπάρχει πιθανότητα ύπαρξης κάποιου ισοζυγίου στο οποίο ίσως έχει κάποιο ρόλο το ένζυμο της λακκάσης από τη στιγμή που στις ημέρες ευτροφίας των μικροοργανισμών υπάρχει μία σταθερότητα.

#### 4.8 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΔΙΑΛΥΜΕΝΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ

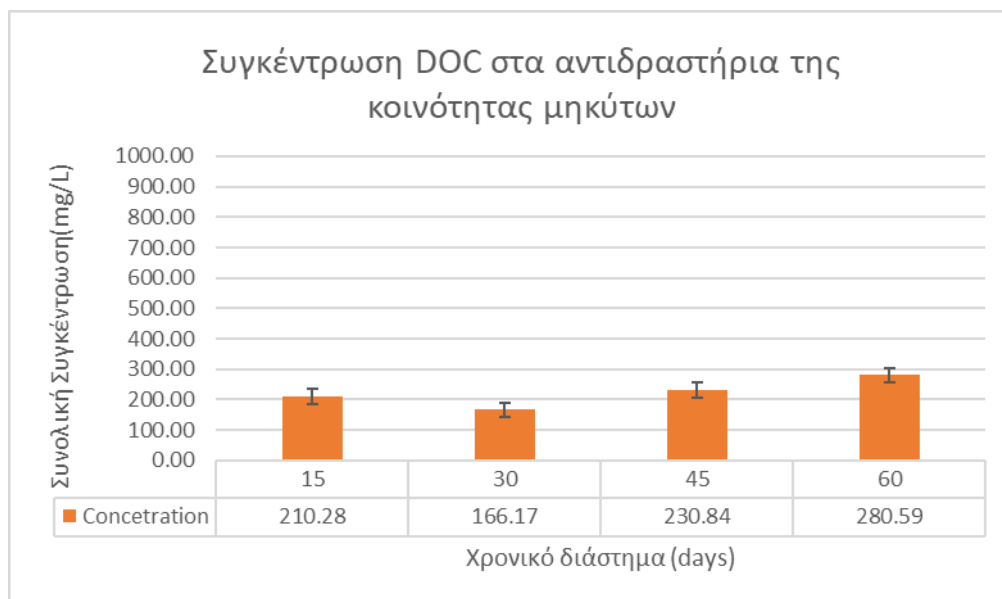
Η περιεκτικότητα DOC στα θαλάσσια οικοσυστήματα ταξινομείται είτε ως αυτόχθονη, δηλαδή έχει προέλευση από το ίδιο το περιβάλλον του συστήματος, είτε ως αλλόχθονη, δηλαδή με προέλευση εκτός του συστήματος. Το DOC στους ωκεανούς προέρχεται από το φυτοπλαγκτόν και σχηματίζει το βασικό υπόστρωμα για τον μικροβιακό ιστό τροφίμων που τροφοδοτεί τη μικρο-ετεροτροφική ανάπτυξη (Romera-Castillo et al. 2018). Τα οικοσυστήματα του γλυκού νερού επί το πλείστον είναι αλλόχθονα (Dafner and Wangersky 2002). Τα μικροπλαστικά από τη στιγμή που εισέρχονται σε υδάτινο οικοσύστημα επηρεάζουν το απόθεμα άνθρακα του με συνέπεια να επηρεάζουν και το παγκόσμιο κύκλο άνθρακα (Shen, Ye, et al. 2020). Αυτό είναι ζωτικής σημασίας, διότι εάν υπάρχει διαταραχή στην ικανότητα των ωκεανών να απομονώνουν διοξείδιο του άνθρακα, θα γίνει δραματική αλλαγή στο κύκλο του άνθρακα με αποτέλεσμα την απειλή των βασικών συνθηκών πολλών οργανισμών (Shen, Ye, et al. 2020). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας είναι σημαντικό υποπροϊόν της φωτοαποδόμησης των πλαστικών και μπορεί να υπολογιστεί με διάφορες μεθόδους (Zhu et al. 2020).



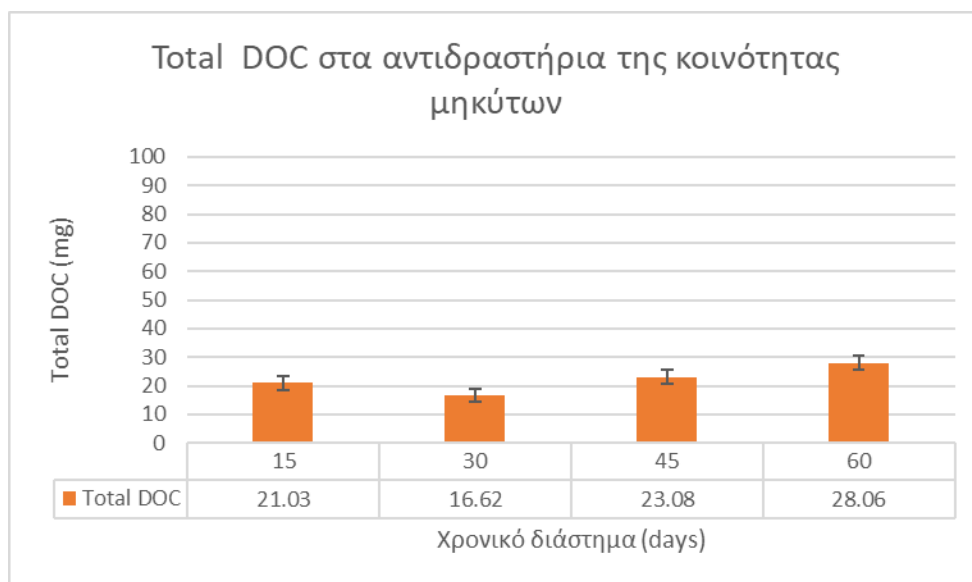
**Διάγραμμα 27 : Μέτρηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα στις φιάσκες της πελαγικής κοινότητας**



**Διάγραμμα 28 : Συνολικός διαλυμένος οργανικός άνθρακας στις φλάσκες της πελαγικής κοινότητας**



**Διάγραμμα 29 : Μέτρηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα στις φλάσκες στη κοινότητα με το μύκητα**



**Διάγραμμα 30 : Συνολικός διαλυμένος οργανικός άνθρακας στη κοινότητα με το μύκητα**

Για τα αποτελέσματα των δειγμάτων της κοινότητας βακτηρίων παρατηρείται μια απότομη διακύμανση στη μέτρηση της 3<sup>ης</sup> δειγματοληψίας τη 45<sup>η</sup> ημέρα που δείχνει πολύ μεγάλη αύξηση σε όλα τα triplets της δειγματοληψίας. Ενώ στο μοτίβο των υπόλοιπων μετρήσεων υπάρχει σχετικά σταθερή συμπεριφορά.

Οι μετρήσεις που απεικονίζονται για τη κοινότητα των μυκήτων φαίνεται να είναι σε μεγαλύτερο εύρος επί το πλείστον από αυτές της κοινότητας των βακτηρίων, σε αυτή τη περίπτωση παρατηρείται το μοτίβο που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μετρήσεις του πειράματός μας, δηλαδή υπάρχει αύξηση μέχρι τη 15<sup>η</sup> μέρα στη συνέχεια μείωση στη 30<sup>η</sup> μέρα και ακολουθεί ανοδική πορεία ύστερα, ωστόσο όλες παραμένουν στο ίδιο εύρος τιμών και παρόμοιο με εκείνο της πελαγικής κοινότητας βακτηρίων με εξαίρεση τη μέτρηση της 45<sup>ης</sup> ημέρας.

Πρέπει να αναφερθεί πως, η γήρανση και η αποδόμηση του πλαστικού στα δείγματά μας μπορεί να προκαλέσει μικρή τοπική θραύση στα pellet, με αποτέλεσμα να είχε σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των μετρήσεων μας αφού μπορούσε ενδεχομένως να αυξήσει την έκπλυση DOC λόγω της αύξησης της επιφάνειας σε σχέση με τον όγκο του.

Επιπλέον στους αντιδραστήρες της 45<sup>ης</sup> και 60<sup>ης</sup> ημέρας και για τις δύο κοινότητες έγινε προσθήκη γλυκόζης ποσότητας 1ml με περιεκτικότητα 0,1gr Glucose που αντιστοιχεί σε 1mg Glucose ανά αντιδραστήρες.



## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα πλαστικά τα οποία εκτίθενται στο περιβάλλον είτε θαλάσσιο είτε χερσαίο αποικίζονται από ποικίλα είδη μικροοργανισμών. Στη περίπτωση μας το ερευνητικό πεδίο της βιοαποδόμησης μικροπλαστικών από θαλάσσιους μικροοργανισμούς είναι πολύ ενδιαφέρον. Στην παρούσα έρευνα στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας έγινε εξέταση και ανάλυση της επίδρασης των βιοτικών παραγόντων σε pellets πολυπροπυλενίου, τα οποία είχαν εκτεθεί σε UV-A ακτινοβολία για τη προσομοίωση των περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν υπό ρεαλιστικές καταστάσεις. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με δύο κοινότητες μικροοργανισμών, μία πελαγική μόνη της και με την προσθήκη του μύκητα *Acremonium tubakii*. Ύστερα από την ανάλυση των μετρήσεων βγήκαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Οι κοινότητες των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος έδειξαν ότι μπορούν να διασπούν τα pellets με την παρουσία επιπλέον πηγής άνθρακα.
- Από την παρατήρηση του ανάγλυφου της επιφάνειας των μικροσφαιριδίων δε παρατηρήθηκε κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο όσον αφορά το χρόνο παραμονής τους σε υδάτινο περιβάλλον με μικροοργανισμούς που βοηθάνε στη βιοαποδόμηση τους.
- Η μείωση του βάρους είναι μία ένδειξη βιοαποδόμησης των μικροσφαιριδίων πολυπροπυλενίου. Τόσο στην κοινότητα των **βακτηρίων όσο και στην κοινότητα βακτηρίων-μυκήτα** παρατηρήθηκε μείωση του βάρους κατά τη διάρκεια των 2 μηνών, όπου ήταν 5% και 6,5% αντίστοιχα για τις δύο κοινότητες.
- Όσον αφορά τις μετρήσεις της ποσότητας του DOC στα διαλύματα παρατηρείται όμοια συμπεριφορά μεταξύ των δύο κοινοτήτων, ωστόσο λόγο του γεγονότος ότι υπάρχει μία υψηλή αύξηση στη κοινότητα των βακτηρίων αυτό δεν είναι βέβαιο.
- Παρατηρώντας τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των σωματιδίων πολυπροπυλενίου στα δείγματα της κοινότητας βακτηρίων είναι φανερή η ύπαρξη πολλών μικροσωματιδίων έως και νανοσωματιδίων.
- Λαμβάνοντας υπόψη τις μετρήσεις στα διαγράμματα προσδιορισμού των ολικών πρωτεϊνών στα δείγματα των δύο κοινοτήτων μικροοργανισμών φαίνεται ότι είχαν όμοια συμπεριφορά και δεν υπήρχαν μεγάλες διακυμάνσεις.
- Τα παραπάνω στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι παραπάνω κοινότητες μικροοργανισμών με ύπαρξη τροφής στο περιβάλλον παρακολούθησης έχουν την ικανότητα να βιοαποδομήσουν μικροσφαιρίδια πολυπροπυλενίου.

### Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Σίγουρα υπάρχουν πολλές έρευνες που αποδεικνύουν τη βιοαποδόμηση πολυμερών από μικροοργανισμούς σε χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα, ωστόσο υπάρχουν ακόμη ερωτήματα και υπάρχουν κενά στην κατανόηση του πλήρη μηχανισμού της βιοαποδόμησης. Στο φυσικό περιβάλλον ιδίως, που συνεισφέρουν πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι δύσκολο να απομονώσουμε την απόδοση του κάθε παράγοντα χωριστά ή σε συνδυασμό για την επίδραση του στη βιοαποδόμηση.

Ωστόσο, καλό θα ήταν να γίνει εξέταση των παραπάνω κοινοτήτων μικροοργανισμών σε ελεγχόμενο περιβάλλον με σταθερές συνθήκες και παραμέτρους σε συνεχή λειτουργία για να υπάρξει έλεγχος τους ως προς τη καταλληλότητά τους για scale-up. Αυτό είναι δυνατό να γίνει σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς ροής ώστε να υπάρχει συνεχής έλεγχος, περισσότερες μετρήσεις και ταυτοχρόνως καλύτερη εικόνα του μηχανισμού τους.

Θα έχουμε καλύτερη εικόνα στη διαδικασία βιοαποδόμησης και της απόδοσης των μικροοργανισμών αν υπάρχει έλεγχος σε μικροπλαστικά όπου είναι ομοιόμορφα γηρασμένα ώστε να προσδιορισθούν οι ευνοϊκότερες συνθήκες. Αυτό διότι στη περίπτωση μας ενδέχεται να ήταν γηρασμένος ο εξωτερικός φλοιός των μικροσφαιριδίων με αποτέλεσμα όταν οι μικροοργανισμοί το είχαν καταναλώσει να υπήρχε μείωση της απόδοσης στη συνέχεια από τη στιγμή που από εκεί και ύστερα δεν ήταν γηρασμένο μικροπλαστικό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί εάν γίνει προσθήκη μικροπλαστικών λεπτότερου πάχους όπως πλακίδια αντί για μικροσφαιρίδια (pellets).

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Z. MELABIANAKI, 1, 2 E. VELONAKIS, 2, and A.VATOPOULOS2. 2007. "Biofilms, Man, Environment." : 411–31.
- Adav, Sunil S., Duu Jong Lee, and Joo Hwa Tay. 2008. "Extracellular Polymeric Substances and Structural Stability of Aerobic Granule." *Water Research* 42(6–7): 1644–50.
- Romera-Castillo, Cristina, Maria Pinto, Teresa M. Langer, Xosé Antón Álvarez\_Salgado, and Gerhard J. Herndl. 2018. "Dissolved Organic Carbon Leaching from Plastics Stimulates Microbial Activity in the Ocean." *Nature Communications* 9(1).
- Nielsen, P, A Jahn, and R Palmgren. 1997. "Conceptual Model for Production and Composition of Exopolymers in Biofilms." *Water Science and Technology*.
- Maier, Raina M. 2009. "Bacterial Growth." *Environmental Microbiology*: 37–54.
- Shen, Maocai, Wei Huang, Ming Chen, Biao Song, Guangming Zeng, and Yaxin Zhang. 2020. "(Micro)Plastic Crisis: Un-Ignorable Contribution to Global Greenhouse Gas Emissions and Climate Change." *Journal of Cleaner Production* 254:120138
- Singh, B. and Sharma, N. (2008) Mechanistic Implications of Plastic Degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93, 561-584.  
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>
- Botterell, Zara L. R., Nicola Beaumont, Tarquin Dorrington, Michael Steinke, Richard C. Thompson, and Penelope K. Lindeque. "Bioavailability and Effects of Microplastics on Marine Zooplankton: A Review." *Environmental Pollution* 245 (February 1, 2019): 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.065>.
- Bouwmeester, Hans, Peter C. H. Hollman, and Ruud J. B. Peters. "Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology." *Environmental Science & Technology* 49, no. 15 (August 4, 2015): 8932–47. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01090>.
- Eriksen, Marcus, Laurent C. M. Lebreton, Henry S. Carson, Martin Thiel, Charles J. Moore, Jose C. Borerro, Francois Galgani, Peter G. Ryan, and Julia Reisser. "Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea." *PLOS ONE* 9, no. 12 (December 10, 2014): e111913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913>.
- Gewert, Berit, Merle M. Plassmann, and Matthew MacLeod. "Pathways for Degradation of Plastic Polymers Floating in the Marine Environment." *Environmental Science: Processes & Impacts* 17, no. 9 (2015): 1513–21. <https://doi.org/10.1039/C5EM00207A>.
- Gigault, Julien, Alexandra ter Halle, Magalie Baudrimont, Pierre-Yves Pascal, Fabienne Gauffre, Thuy-Linh Phi, Hind El Hadri, Bruno Grassl, and Stéphanie Reynaud. "Current Opinion: What Is a Nanoplastic?" *Environmental Pollution* 235 (April 2018): 1030–34. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>.
- Jambeck, Jenna R., Roland Geyer, Chris Wilcox, Theodore R. Siegler, Miriam Perryman, Anthony Andrady, Ramani Narayan, and Kara Lavender Law. "Marine Pollution. Plastic Waste

- Inputs from Land into the Ocean.” *Science (New York, N.Y.)* 347, no. 6223 (February 13, 2015): 768–71. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>.
- Koelmans, Albert A., Ellen Besseling, and Won J. Shim. “Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical Review.” In *Marine Anthropogenic Litter*, edited by Melanie Bergmann, Lars Gutow, and Michael Klages, 325–40. Cham: Springer International Publishing, 2015. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_12).
- Kowalski, Marek L., Ignacio Ansotegui, Werner Aberer, Mona Al-Ahmad, Mubeccel Akdis, Barbara K. Ballmer-Weber, Kirsten Beyer, et al. “Risk and Safety Requirements for Diagnostic and Therapeutic Procedures in Allergology: World Allergy Organization Statement.” *World Allergy Organization Journal* 9 (2016): 33. <https://doi.org/10.1186/s40413-016-0122-3>.
- Encyclopedia Britannica. “Microplastics | Definition, Properties, & Plastic Pollution.” Accessed May 23, 2021. <https://www.britannica.com/technology/microplastic>.
- Encyclopedia Britannica. “Plastic | Composition, Uses, Types, & Facts.” Accessed May 23, 2021. <https://www.britannica.com/science/plastic>.
- Encyclopedia Britannica. “Plastic Pollution | Sources & Effects.” Accessed May 23, 2021. <https://www.britannica.com/science/plastic-pollution>.
- Ter Halle, Alexandra, Laurent Jeanneau, Marion Martignac, Emilie Jardé, Boris Pedrono, Laurent Brach, and Julien Gigault. “Nanoplastic in the North Atlantic Subtropical Gyre.” *Environmental Science & Technology* 51, no. 23 (December 5, 2017): 13689–97. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03667>.
- Zhu, Lixin, Shiye Zhao, Thais B. Bittar, Aron Stubbins, and Daoji Li. 2020. “Photochemical Dissolution of Buoyant Microplastics to Dissolved Organic Carbon: Rates and Microbial Impacts.” *Journal of Hazardous Materials* 383(July 2019):121065.
- Charalampous G., Seridou P. and Kalogerakis N. ,2017 [http://www.mikrobiokosmos.org/sites/default/files/7th\\_mbk\\_abstract\\_book\\_2017.pdf](http://www.mikrobiokosmos.org/sites/default/files/7th_mbk_abstract_book_2017.pdf)
- 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*.
- Berit Gewert, Merle Plassmann M., and Matthew MacLeod. 2015. “Pathways for Degradation of Plastic Polymers Floating in the Marine Environment.” *Environmental Sciences: Processes and Impacts* 17(9): 1513–21. <http://dx.doi.org/10.1039/C5EM00207A>.
- Satoshi Endo, Reiko Takizawa, Keiji Okuda, Hideshige Takada, Kazuhiro Chiba, Haruyuki Kanehiro, Haruo Ogi, Rei Yamashita, Takeshi Date, “Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: Variability among individual particles and regional differences”, 2005, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.04.030>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X05001517>)
- COMET® Website at <http://meted.ucar.edu/> of the University Corporation for Atmospheric Research (UCAR), sponsored in part through cooperative agreement(s) with the National

- Arregui, Leticia, Marcela Ayala, Ximena Gómez-Gil, Guadalupe Gutiérrez-Soto, Carlos Eduardo Hernández-Luna, Mayra Herrera de los Santos, Laura Levin, et al. "Laccases: Structure, Function, and Potential Application in Water Bioremediation." *Microbial Cell Factories* 18, no. 1 (November 14, 2019): 200. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>.
- Dang, Thi Cam Ha, Dang Thang Nguyen, Hoang Thai, Thuy Chinh Nguyen, Thi Thu Hien Tran, Viet Hung Le, Van Huynh Nguyen, et al. "Plastic Degradation by Thermophilic *Bacillus* Sp. BCBT21 Isolated from Composting Agricultural Residual in Vietnam." *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 9, no. 1 (March 2018): 015014. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aaabaf>.
- Gigault, Julien, Alexandra ter Halle, Magalie Baudrimont, Pierre-Yves Pascal, Fabienne Gauffre, Thuy-Linh Phi, Hind El Hadri, Bruno Grassl, and Stéphanie Reynaud. "Current Opinion: What Is a Nanoplastic?" *Environmental Pollution* 235 (April 1, 2018): 1030–34. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>.
- Mayer, Alfred M., and Richard C. Staples. "Laccase: New Functions for an Old Enzyme." *Phytochemistry* 60, no. 6 (July 2002): 551–65. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00171-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00171-1).
- Napper, Imogen E., Bede F. R. Davies, Heather Clifford, Sandra Elvin, Heather J. Koldewey, Paul A. Mayewski, Kimberley R. Miner, et al. "Reaching New Heights in Plastic Pollution—Preliminary Findings of Microplastics on Mount Everest." *One Earth* 3, no. 5 (November 20, 2020): 621–30. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.10.020>.
- Salas, Felipe de, and Susana Camarero. "Fungal Laccases as Biocatalysts for Wide Range Applications." In *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21087-X>.
- More, Sunil S., Renuka P S, Pruthvi K, Swetha M, S. Malini, and Veena S M. "Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* Sp." *Enzyme Research* 2011 (2011): 248735. <https://doi.org/10.4061/2011/248735>.
- Uematsu, Sayaka, Kazuyoshi Uematsu, Jennifer L. Lavers, and Bradley C. Congdon. "Reduced Vitamin A (Retinol) Levels Indicate Radionuclide Exposure in Streaked Shearwaters (*Calonectris Leucomelas*) Following the 2011 Fukushima Nuclear Accident." *Ecological Indicators* 43 (August 1, 2014): 244–51. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.02.025>.
- "Polypropylene as a Promising Plastic: A review." Accessed July 7, 2021. <http://article.sapub.org/10.5923.j.ajps.20160601.01.html>.
- Basak, S., Das, M. and Duttaroy, A., 2020. Plastics derived endocrine-disrupting compounds and their effects on early development. *Birth Defects Research*, 112(17), pp.1308-1325.