



Πολυτεχνείο Κρήτης
Σχολή Χημικών Μηχανικών και
Μηχανικών Περιβάλλοντος

Μελέτη βιοδιάσπασης βιοπλαστικών με χρήση ενεργού ιλύος

Αθανάσιος Φουντουλάκης

Διπλωματική εργασία

Χανιά, 2022



Πολυτεχνείο Κρήτης
Σχολή Χημικών Μηχανικών και
Μηχανικών Περιβάλλοντος

Μελέτη βιοδιάσπασης βιοπλαστικών με χρήση ενεργού ιλύος

Αθανάσιος Φουντουλάκης

Διπλωματική εργασία

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δ. Βενιέρη (Αναπλ. Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα)

Α. Βλυσίδης (ΕΜΠ, Σχολή Χημικών Μηχανικών)

Ε. Συρανίδου (Μεταδιδάκτωρ του Εργαστηρίου ΒΕΕΒ)

Αναπληρωματικός: Α. Στεφανάκης (Επικ. Καθηγητής)

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

Πρόλογος και ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την την Dr. Συρανίδου Ευδοκία, μέλος της τριμελούς επιτροπής, με την οποία συνεργάστηκα άφογα καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και ήταν πάντα εκεί για να με βοηθήσει, να με κατευθύνει και να μου μεταδώσει σημαντικές γνώσεις. Η βοήθειά της ήταν πολύτιμη καθώς με βοήθησε στη κατανόηση και στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Βλυσίδη Ανέστη, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τη βοήθειά που πρόσφερε για την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής και για το χρόνο που αφιέρωσε για την ανάγνωση και αξιολόγηση της.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω κ. Βενιέρη Δανάη, επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για το χρόνο που αφιέρωσε για την ανάγνωση και αξιολόγηση της.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ, χρωστώ στην υποψήφια Διδάκτωρ, Καριανοραχάκη Αικατερίνη η οποία με καθοδήγησε πολλές φορές στο εργαστήριο και στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων μου. Ήταν πάντα διαθέσιμη για όποια βοήθεια και αν χρειάστηκα, για κάθε μου απορία πάντα με αμέριστη υπομονή και με χαμόγελο.

Ευχαριστώ ακόμα, όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης, και ιδιαίτερα τη Πετρούλα Σερίδου για την πολύτιμη βοήθειά της όσον αφορά το εργαστήριο και τις διάφορες απορίες μου πάνω σε αυτό.

Ένα ακόμα τεράστιο και εγκάρδιο ευχαριστώ σε όλους τους φίλους μου στο εργαστήριο, και πιο συγκεκριμένα στη υποψήφια μεταπτυχιακό Giorgia Barale και στις συμφοιτήτριές μου Βαμβακιά Μαίρη και Μονογυιού Σοφία για τη βοήθεια και τη υπέροχη παρέα που κάναμε.

Τέλος ένα τεράστιο τελευταίο ευχαριστώ στους γονείς, τις αδελφές μου και τους φίλους μου για την συμπαράσταση, την αμέριστη υπομονή και την αγάπη τους σε όλες τις επιτυχίες και τις αποτυχίες μου καθ' όλη την διάρκεια όχι μόνο της διπλωματικής μου, αλλά και των φοιτητικών μου χρόνων.

Περίληψη

Το πλαστικό έχει ενσωματωθεί πλήρως στην καθημερινότητα του ανθρώπου και αποτελεί πλέον αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης ζωής. Ωστόσο, παρόλα τα πλεονεκτήματά του, ευθύνεται για έναν μεγάλο αριθμό περιβαλλοντικών προβλημάτων όπως η θαλάσσια και χερσαία ρύπανση που επηρεάζουν αρνητικά τους ζωντανούς οργανισμούς και την ανθρώπινη υγεία ενώ ταυτόχρονα προκαλούν μια πληθώρα αμέσων και έμμεσων οικολογικών, κοινωνικών και οικονομικών προβλημάτων. Για την αποφυγή αυτών των προβλημάτων η παγκόσμια κοινότητα έχει κατευθυνθεί προς τη χρήση βιοπλαστικών, όρος που αναφέρεται σε βιοαποδομήσιμα πλαστικά, ή μπορεί να μην είναι αποικοδομήσιμα, αλλά παράγονται από βιολογικά υλικά ή ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως άμυλο, κυτταρίνη, φυτικά έλαια και φυτικά λίπη. Η αλόγιστη όμως χρήση και απορριφή τους έχει οδηγήσει σε εκ νέου προβλήματα, παρόμοια με αυτά των πλαστικών.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της ικανότητας των μικροοργανισμών της ενεργού ιλύος από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων του Δήμου Πλατανιά, να βιοαποδομήσουν τα βιοπλαστικά PLA (πολυγαλακτικό οξύ) και PHB (πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα). Πιο συγκεκριμένα, το πείραμα διήρκεσε περίπου 3 μήνες (95 ημέρες) σε εργαστηριακή κλίμακα όπου τα δείγματα τέθηκαν σε συνεχή ανάδευση. Οι μετρήσεις που ακολούθησαν αφορούν κυρίως τα pellets του κάθε είδους και τη δημιουργία βιοφίλμ στην επιφάνεια τους και τη καταμέτρηση μικροπλαστικών στην ενεργό ιλύ. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις βάρους, φασματοσκοπία υπέρυθρου με την τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης, χρήση μικροσκοπίου και μετρήσεις κυττάρων και πρωτεϊνών που αφορούσαν το βιοφίλμ.

Συνολικά, τα pellets του πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB) παρουσίασαν μείωση βάρους και ανάπτυξη βιοφίλμ στην επιφάνειά τους σε αντίθεση με το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) που δεν εμφάνισε σημαντικές διαφορές.

Abstract

Plastic has been fully integrated into human daily life and is now an integral part of modern life. However, despite its advantages, it is responsible for a large number of environmental problems such as marine and terrestrial pollution that adversely affect living organisms and human health while at the same time causing a multitude of direct and indirect ecological, social and economic problems. To avoid these problems the world community has turned to the use of bioplastics a term that refers to biodegradable plastics, or they may not be degradable, but produced from organic materials or renewable raw materials, such as starch, cellulose, vegetable oils and vegetable fats. However, their reckless use and disposal has led to new problems, similar to those of plastics.

The purpose of this thesis is to investigate the ability of activated sludge microorganisms from the sewage treatment plant of the Municipality of Platanias to biodegrade the bioplastics PLA (polylactic acid) and PHB (poly-3-hydroxybutanoic ester). More specifically, the experiment lasted about 3 months (95 days) on a laboratory scale where the samples were put in constant agitation. The measurements that followed mainly concern the pellets of each kind and the creation of biofilms on their surface and the counting of microplastics in the activated sludge. Weight measurements, total reflectance infrared spectroscopy, microscopy, and measurements of biofilm-related cells and proteins were performed.

Overall, poly-3-hydroxybutanoate (PHB) pellets showed weight reduction and biofilm development on their surface in contrast to polylactic acid (PLA) which did not show significant differences.

Περιεχόμενα

Πρόλογος και ευχαριστίες	iv
Περίληψη	v
Abstract	vi
Εικόνες	ix
Πίνακες	x
Διαγράμματα	x
1. Εισαγωγή	1
1.1 Πολυμερή	1
1.1.1 Πλαστικά	2
1.1.2 Ιστορικά Στοιχεία	3
1.1.3 Βιοπλαστικά	5
1.2 Στατιστικά Στοιχεία	7
1.3 Κατηγοριοποίηση πλαστικών	10
1.3.1 Μικροπλαστικά	12
1.4 Αποδόμηση πλαστικών	14
1.4.1 Φωτοαποδόμηση	14
1.4.2 Υδρόλυση	16
1.4.3 Θερμο-οξειδωτική αποδόμηση	16
1.4.4 Βιοαποδόμηση	16
1.5 Πολυγαλακτικό οξύ (PLA)	18
1.6 Πολυ (3-υδροξύ βουτυρικός) εστέρας (PHB)	23
1.7 Οικολογικές επιπτώσεις από τη χρήση βιοπλαστικών	25
2. Σκοπός εργασίας	27
3. Υλικά και μέθοδοι	28
3.1 Υλικά	28
3.2 Μέθοδοι	28
3.2.1 Προετοιμασία Δειγμάτων	28
3.2.2 Δειγματοληψία	29
3.2.3 Χρώση δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδες (sample staining with crystal violet)	30
3.2.4 Μέτρηση Κυττάρων	31
3.2.5 Προσδιορισμός Βάρους	31
3.2.6 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών	31
3.2.7 Φασματοσκοπία Υπέρυθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)	33
3.2.8 Κυτταρομετρία ροής (Κυτταρόμετρο CytoFLEX)	35

3.2.9	Μικροσκοπιο.....	37
3.2.10	Μετρήσεις των παραμέτρων της ενεργού ιλύος (COD, TN, TP)	37
3.2.11	Διαχωρισμός πυκνότητας με CaCl ₂ για την ανάκτηση των μικροπλαστικών και καταμέτρηση.....	38
4.	Αποτελέσματα & συζήτηση	39
4.1	Μείωση βάρους μικροπλαστικών PLA και PHB.....	39
4.2	Μικροβιακοί πληθυσμοί (Βιοφίλμ).....	40
4.2.1.	Ποσοτικός προσδιορισμός ανάπτυξης του βιοφίλμ.....	42
4.2.2	Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών	44
4.2.3	Μέτρηση Κυττάρων (Κυτταρόμετρο CytoFLEX)	46
4.3	Φασματοσκοπία Υπέρυθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (FTIR-ATR).....	47
4.3.1	Χαρακτηριστικά φάσματα	48
4.4	Μικροσκοπιο.....	53
4.5	Χημικά χαρακτηριστικά	54
5.	Συμπεράσματα.....	56
6.	Βιβλιογραφία	Error! Bookmark not defined.

Εικόνες

Εικόνα 1.1: Πλαστικά (Πηγή: https://universeplast.com/the-history-and-future-of-plastics/)	2
Εικόνα 1.2: Ιστορία πλαστικού (Πηγή: http://www.chem4us.be/plastics-and-bioplastics-a-200-year-history-of-research-and-development/)	3
Εικόνα 1.3: Κατηγορίες βιοπλαστικών (Πηγή: https://www.tainstruments.com/material-analysis-for-bioplastics-quality-assurance-and-degradation/)	5
Εικόνα 1.4: Παγκόσμια παραγωγή πλαστικού, 2020 (Πηγή: https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/)	7
Εικόνα 1.5: Ευρωπαϊκή ζήτηση πλαστικού ανά είδος, 2020 (Πηγή: https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/)	8
Εικόνα 1.6: Ζήτηση πλαστικών ανά τομέα παραγωγής, 2020 (Πηγή: https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/)	9
Εικόνα 1.7: Κατάληξη πλαστικών απορριμάτων, 2020 (Πηγή: https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/)	10
Εικόνα 1.8: Παραδείγματα διαφορών στην κατηγοριοποίηση των πλαστικών αποβλήτων σύμφωνα με το μέγεθος όπως εφαρμόζεται (ή/και ορίζεται) στην επιστημονική βιβλιογραφία και σε θεσμικές εκθέσεις. (Hartmann et al. 2019).....	11
Εικόνα 1.9: Μικροπλαστικά (Πηγή: https://newstube.gr/).....	12
Εικόνα 1.10: Μικροπλαστικά (Πηγή: https://www.healthweb.gr/)	12
Εικόνα 1.11: Μηχανισμοί αποδόμησης πλαστικών στο περιβάλλον (Andrady 2015)	14
Εικόνα 1.12: Μηχανισμοί απομάκρυνσης μικροπλαστικών με το σύστημα ενεργού ιλύος (Zhang et al., 2020a).	18
Εικόνα 1.13: Οπτικά ισομερή του γαλακτικού οξέος. (Gupta, Revagade, and Hilborn 2007)	20
Εικόνα 1.14: Η πεττροχημική διαδρομή προς το πολυγαλακτικό οξύ. (Gupta, Revagade, and Hilborn 2007)	20
Εικόνα 1.15: Σύνθεση πολυγαλακτικού οξέος. (Gupta, Revagade, and Hilborn 2007)	22
Εικόνα 1.16: Ιδιότητες πολυγαλακτικού οξέος . (Gupta, Revagade, and Hilborn 2007)	23
Εικόνα 1.17: Δομή του πολυ (3-υδροξύ βουτυρικού) εστέρα. (Doyle, Tanner, and Bonfield n.d.) ..	24
Εικόνα 1.18: Ιδιότητες PHB και PP. (Doyle, Tanner, and Bonfield n.d.).....	24
 Εικόνα 3.1: Χρώση δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδες.....	30
Εικόνα 3.2: Διαδικασία υπολογισμού ολικών πρωτεϊνών	32
Εικόνα 3.3: Διαδικασία υπολογισμού ολικών πρωτεϊνών	32

Εικόνα 3.4: Κυτταρόμετρο CytoFLEX. (Πηγή: https://www.beckman.com/flow-cytometry/research-flow-cytometers/cytoflex)	36
--	----

Εικόνα 4.1: Τα πέντε στάδια ανάπτυξης του βιοφίλμ. Κάθε στάδιο ανάπτυξης στο διάγραμμα συνδυάζεται με μία φωτομικρογραφία ενός αναπτυσσόμενου βιοφίλμ <i>P. aeruginosa</i> . Όλες οι φωτομικρογραφίες εμφανίζονται στην ίδια κλίμακα. (Monroe 2007)	41
Εικόνα 4.2: Διαχωρισμός του IR φάσματος σε επιμέρους περιοχές, όπου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ομάδες οργανικών ενώσεων.	49
Εικόνα 4.3: Χαρακτηριστικές ομάδες και οι κυματοριθμοί τους (Βαλαβανίδης 2006).	49
Εικόνα 4.4: Φασματογραφία παρθένου πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB).	50
Εικόνα 4.5: Φασματογραφία παρθένου πολυγαλακτικού οξέος (PLA).....	51
Εικόνα 4.6: Φασματογραφία πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB).....	52
Εικόνα 4.7: Φασματογραφία πολυγαλακτικού οξέος (PLA).	52

Πίνακες

Πίνακας 4. 1 :Μείωση βάρους στα αβιοτικά δείγματα	40
Πίνακας 4.2: Τιμές δείκτη δεσμού καρβονυλίου (CI)	50
Πίνακας 4.3: Μέτρηση μικροπλαστικών στο μικροσκόπιο.	53
Πίνακας 4.4: Μέτρηση μικροπλαστικών αβιοτικών δειγμάτων στο μικροσκόπιο.....	54
Πίνακας 4.5:Χημικά χαρακτηριστικά ενεργού ιλύος.	54

Διαγράμματα

Διάγραμμα 4.1: Ποσοστό μείωσης βάρους πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB).....	39
Διάγραμμα 4. 2: Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των PHB pellet.	43
Διάγραμμα 4. 3: Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των PLA pellet.....	43
Διάγραμμα 4. 4: Συγκέντρωση πρωτεϊνών πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB) (μg/cm ²)	45
Διάγραμμα 4. 5: Συγκέντρωση πρωτεϊνών πολυγαλακτικού οξέος (PLA) (μg/cm ²).....	45
Διάγραμμα 4. 6: Συγκέντρωση κυττάρων στο βιοφίλμ των PHB pellets.	46
Διάγραμμα 4. 7: Συγκέντρωση κυττάρων στο βιοφίλμ των PLA pellets.	47

1. Εισαγωγή

1.1 Πολυμερή

Πολυμερή, ονομάζονται οι χημικές ενώσεις με μεγάλα μόρια (μακρομόρια) που σχηματίζονται από τη σύνδεση πολλών όμοιων μικρών μορίων τα μονομερή (Encyclopædia Britannica n.d.). Μπορεί να είναι (α) φυσικά προϊόντα (κυτταρίνη, μαλλί, βαμβάκι, ξύλο) (β) τροποποιημένα φυσικά προϊόντα (τεχνητό μετάξι, εβονίτης) ή (γ) συνθετικές ουσίες που σχηματίζονται με χημικές αντιδράσεις από πρώτες ύλες με μικρή σχετική μοριακή μάζα όπως τα πλαστικά (Τσαπαρλής and Στεργίου 2015). Οι χημικές αντιδράσεις που οδηγούν στον σχηματισμό των πολυμερών προϊόντων διακρίνονται σε αντιδράσεις πολυμερισμού και αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης. Η ποιότητα και οι ιδιότητες των πολυμερών που παρασκευάζονται με πολυμερισμό επηρεάζονται από διαφόρους φυσικούς και χημικούς παράγοντες όπως, το μονομερές, η θερμοκρασία, η πίεση, το περιβάλλον στο οποίο γίνεται ο πολυμερισμός και η παρουσία ουσιών που προκαλούν την έναρξη του πολυμερισμού (Τσαπαρλής and Στεργίου 2015).

Τα πολυμερή παρουσιάζουν ένα τεράστιο εύρος χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων, οι οποίες μπορούν να ενισχυθούν με την χρήση πρόσθετων. Ακόμα, είναι δυνατός ο σχεδιασμός πολυμερών με ειδικά χαρακτηριστικά για χρήση σε συγκεκριμένες εφαρμογές. Κάθε πολυμερές έχει μοναδικά χαρακτηριστικά, ωστόσο τα περισσότερα έχουν κάποιες γενικές ιδιότητες, όπως (History Science Institute 1911-2020 n.d.):

1. Ανθεκτικότητα στις χημικές ουσίες.
2. Δεν διαβρώνονται από τον αέρα ή το νερό.
3. Αποτελούν μονωτές θερμότητας και ηλεκτρικής ενέργειας.
4. Είναι ελαφρύτερα από το ξύλο, το γυαλί και το μέταλλο.
5. Οι βαθμοί αντοχής τους ποικίλουν.
6. Μπορούν να υποστούν επεξεργασία με διάφορους τρόπους για την παραγωγή ινών, φύλλων, αφρών ή περίπλοκων χυτών τμημάτων.
7. Διασπώνται δύσκολα, γι' αυτό αποτελούν ρύπους για το περιβάλλον.
8. Είναι εύφλεκτα, και όταν καίγονται παράγονται τοξικά αέρια

Είδη πολυμερών

Τα πολυμερή ανάλογα με τις ιδιότητες τους διακρίνονται σε (Τσαπαρλής and Στεργίου 2015):

- a. Πλαστικά, που σε μεγάλες θερμοκρασίες μαλακώνουν (εύκαμπτα πλαστικά) και σε μεγάλη κλίμακα θερμοκρασιών σχηματίζουν ανθεκτικά στερεά υλικά (άκαμπτα πλαστικά).
- b. Ελαστομερή, που όταν η θερμοκρασία μεταβάλλεται διατηρούν τις ελαστικές τους ιδιότητες.
- c. Λάκες και χρώματα, που είναι ανθεκτικά στην τριβή και ενώνονται σταθερά με το ξύλο, το γυαλί, το μέταλλο και δεν αποχωρίζονται από αυτά όταν συμβούν θερμικές ή ατμοσφαιρικές αλλαγές.
- d. Συνθετικές ίνες, που σε θερμοκρασία πάνω από 200°C μαλακώνουν και μπορεί να σχηματίσουν στερεά νήματα.

1.1.1 Πλαστικά



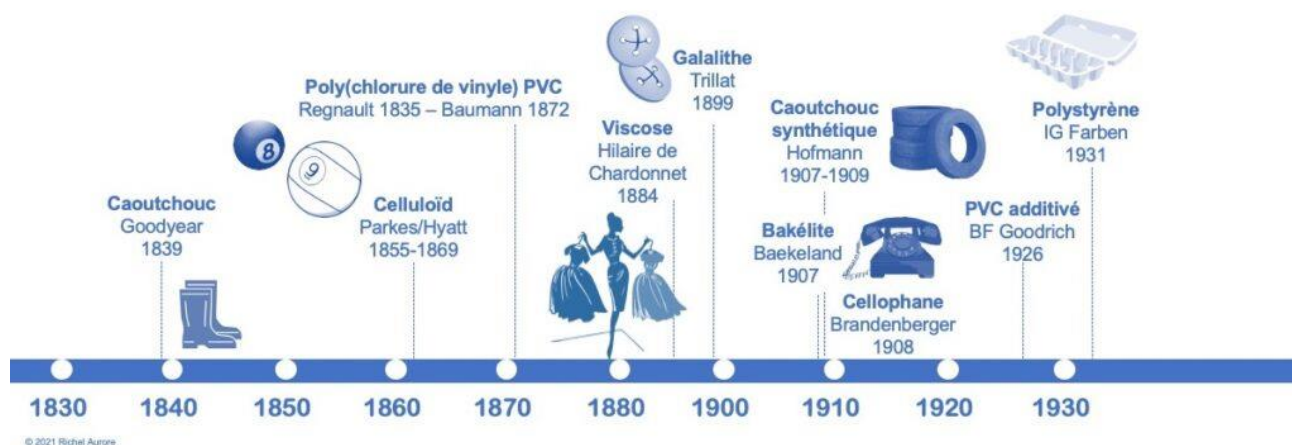
Εικόνα 1.1: Πλαστικά (Πηγή: <https://universeplast.com/the-history-and-future-of-plastics/>)

Τα πλαστικά είναι μια ομάδα πολυμερών υλικών, είτε συνθετικών είτε φυσικών, που μπορούν να σχηματιστούν όταν είναι μαλακά και στη συνέχεια να σκληρυνθούν για να διατηρήσουν το δοσμένο τους σχήμα (History Science Institute 1911-2020 n.d.). Μπορούν να παραχθούν από μια ποικιλία πρώτων υλών όπως, υλικά ορυκτής προέλευσης (αργό πετρέλαιο και φυσικό αέριο), ανανεώσιμες και ανόργανες πρώτες ύλες (Plastics Europe 2019). Η πλαστικότητα τους, δηλαδή η ιδιότητα τους να μεταβάλλουν το σχήμα τους, από μόνη της ή και σε συνδυασμό με άλλες ιδιότητες όπως η χαμηλή πυκνότητα ή η χαμηλή ηλεκτρική

αγωγιμότητα, οφείλεται για την μεγάλη χρηστικότητα τους και την πληθώρα προϊόντων που παράγονται από αυτά. Στη σημερινή εποχή τα πλαστικά προϊόντα έχουν ενσωματωθεί πλήρως στην καθημερινότητα του ανθρώπου καθώς αποτελούν βασικό υλικό για μια πληθώρα εφαρμογών χάρη στην πολυλειτουργικότητά και την πολυχρηστικότητά τους, την ανθεκτικότητα, το χαμηλό κόστος παραγωγής και την ιδιότητα τους να παίρνουν οποιοδήποτε σχήμα (Plastics Europe 2019).

Παρά το μεγάλο πλήθος και τις αμέτρητες διαφοροποιήσεις τους, τα πλαστικά κατατάσσονται σε 2 βασικές κατηγορίες, τα θερμοπλαστικά και θερμοσκληρυνόμενα πλαστικά. Τα πρώτα είναι πολυμερή που αποκτούν μεγαλύτερη πλαστικότητα και έχουν δυνατότητα παραμόρφωσης όταν θερμαίνονται. Αυτή η παραμόρφωση μπορεί να γίνει όσες φορές χρειαστεί. Στη οικογένεια των θερμοπλαστικών ανήκουν είδη όπως πολυαιθυλένιο (PE), πολυαμίδιο (PA), πολυπροπυλένιο (PP), πολυανθρακικό (PC), διογκωμένη πολυστερίνη (EPS), πολυαρυλοσουλφόνη (PSU), πολυστυρένιο (PS), θερμοπλαστικά ελαστομερή (TPE), τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) και άλλα. Τα θερμοσκληρυνόμενα πλαστικά κατά την πρώτη τους ανάμιξη και θέρμανση πολυμερίζονται, σκληραίνουν και η μορφή που παίρνουν δεν μπορεί να αλλάξει. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν είδη όπως πολουρεθάνη (PUR), ακόρεστοι πολυεστέρες, φαινολικές ρητίνες, εποξειδικές ρητίνες, εστέρες βινυλίου, σιλικόνη, ρητίνη μελαμίνης, ακρυλικές ρητίνες και άλλα (Baeurle, Hotta, and Gusev 2006; Plastics Europe 2019).

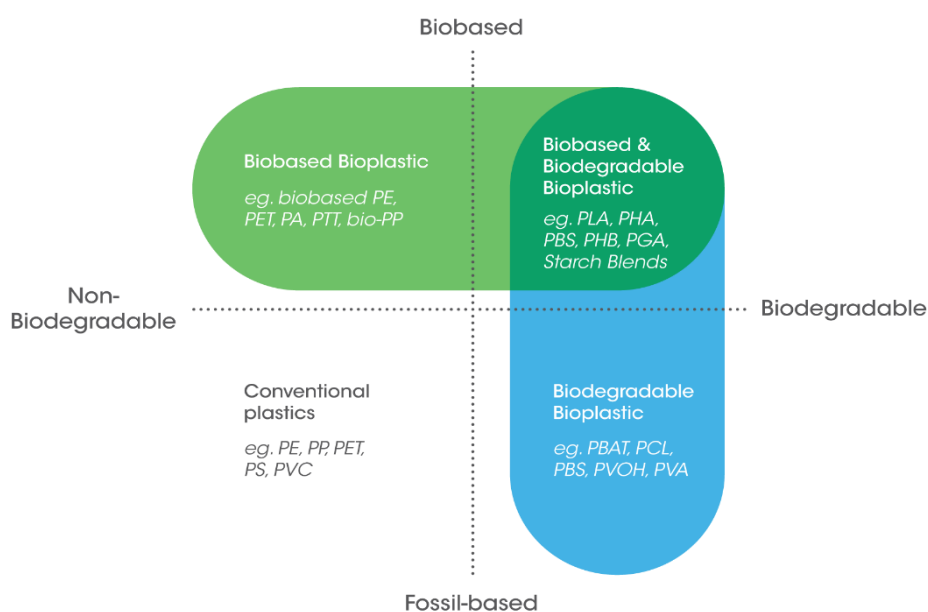
1.1.2 Ιστορικά Στοιχεία



Εικόνα 1.2: Ιστορία πλαστικού (Πηγή: <http://www.chem4us.be/plastics-and-bioplastics-a-200-year-history-of-research-and-development/>)

Τα πλαστικά θεωρούνται μια σχετικά σύγχρονη εφεύρεση, αν και πάντα προϋπήρχαν ως φυσικά πολυμερή όπως το κελύφι των χελωνών και τα κέρατα ζώων. Τα συγκεκριμένα υλικά συμπεριφέρονταν σε μεγάλο βαθμό σαν τα σημερινά κατασκευασμένα πλαστικά και πολλές φορές χρησιμοποιούνταν και με παρεμφερείς τρόπους. Το πρώτο τεχνητό πλαστικό δημιουργήθηκε από τον Alexander Parkes και ονομάστηκε “Parkesine”. Η πρώτη επίσημη παρουσίαση του πραγματοποιήθηκε το 1862 στο Λονδίνο στη Μεγάλη Διεθνή Έκθεση. Ήταν ένα οργανικό υλικό παραγόμενο από κυτταρίνη το οποίο μπορούσε να μορφοποιηθεί μέσω θέρμανσης, ενώ διατηρούσε το σχήμα του όταν ψυχόταν. Η ονομασία που έχει σήμερα το parkesine είναι κυτταρίνη. Αργότερα, το 1907, ο χημικός Leo Hendrik Baekland, στην προσπάθειά του να παράγει ένα συνθετικό βερνίκι, βρήκε τον τύπο για ένα νέο συνθετικό πολυμερές που προέρχεται από πίσσα άνθρακα. Το υλικό ονομάστηκε “Βακελίτης” και χρησιμοποιήθηκε κυρίως στην παραγωγή αντικειμένων τεχνολογίας, όπως κάμερες και τηλέφωνα λόγω των ηλεκτρομονωτικών ιδιοτήτων του. Η νέα αυτή κατηγορία υλικών ορίστηκε ως “πλαστικά” από τον Baekland. Μετά τον Πρώτο Παγκόσμιο Πόλεμο, λόγω της χρήσης πετρελαίου το οποίο επεξεργάζεται ευκολότερα από τον άνθρακα σε πρώτες ύλες, υπήρξε μεγάλη ανάπτυξη στον τομέα των πλαστικών. Με το πέρας του Δεύτερου Παγκόσμιου Πόλεμου ανακαλυφθήκαν νεότερα πλαστικά, όπως 3 πολυουρεθάνη, πολυεστέρας, σιλικόνες, πολυπροπυλένιο κ.α, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε εκτεταμένες εφαρμογές. Μέχρι τη δεκαετία του 1960, τα πλαστικά προϊόντα είχαν πλέον γίνει προϊόντα που χρησιμοποιούνταν καθημερινά λόγω του φθηνού κόστους τους. Από τη δεκαετία του 1970 ξεκίνησε η χρήση πλαστικών «υψηλής τεχνολογίας» σε τομείς όπως η υγεία και η τεχνολογία.

1.1.3 Βιοπλαστικά



Εικόνα 1.3: Κατηγορίες βιοπλαστικών (Πηγή: <https://www.tainstruments.com/material-analysis-for-bioplastics-quality-assurance-and-degradation/>)

Τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται από τα απορριπτόμενα συνθετικά πλαστικά έχουν ανοίξει το δρόμο για την αναζήτηση υποκατάστατων. Τα βιοπλαστικά, τα οποία είναι τόσο παρόμοια λειτουργικά με τα συνθετικά πλαστικά όσο και περιβαλλοντικά βιώσιμα, διαφημίζονται ως πολλά υποσχόμενα νέα υλικά για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων. Τα βιοπλαστικά είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να αναφέρεται σε πλαστικά που (1) είναι βιοαποδομήσιμα, όπως PCL ή PBS, ή (2) μπορεί να μην είναι αποικοδομήσιμα, αλλά παράγονται από βιολογικά υλικά ή ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως άμυλο, κυτταρίνη, φυτικά έλαια και φυτικά λίπη. Όπως κάθε άλλο πολυμερές υλικό, η ικανότητα αποικοδόμησης των βιοπλαστικών είναι επίσης ένας παράγοντας της σύνθεσής τους, του βαθμού κρυσταλλικότητας και των περιβαλλοντικών παραγόντων, που οδηγεί σε χρόνους αποικοδόμησης που κυμαίνονται από αρκετές ημέρες έως αρκετά χρόνια. Για αυτούς τους λόγους, η ανάπτυξη βιοαποικοδομήσιμων βιοπλαστικών έχει κέρδισε την προσοχή τα τελευταία χρόνια. (Atiweh et al. 2021a)

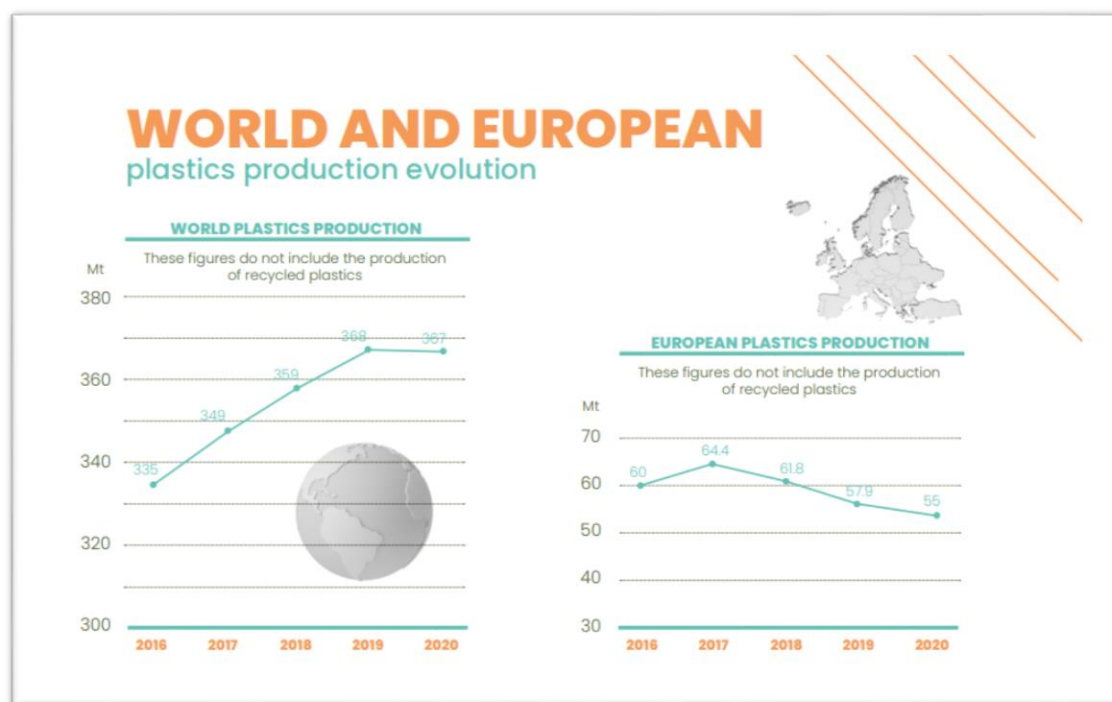
Με βάση τους μηχανισμούς αποδόμησης, υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες βιοαποδομήσιμων βιοπλαστικών, πιο συγκεκριμένα τα οξο-βιοαποικοδομήσιμα και τα υδρο-βιοαποικοδομήσιμα. Τα οξο-βιοδιασπώμενα πλαστικά είναι κατασκευασμένα από πολυμερή με βάση το πετρέλαιο αναμειγμένα με ένα προ-αποδοτικό πρόσθετο που καταλύει τη

διαδικασία αποικοδόμησης του πλαστικού . Το πρόσθετο είναι μεταλλικό άλας (άλατα μαγγανίου ή σιδήρου), το οποίο ενισχύει την διεργασία της αβιοτικής αποικοδόμησης του οξο-βιοδιασπώμενου πλαστικού παρουσία οξυγόνου . Επί του παρόντος, τα οξο-βιοδιασπώμενα πλαστικά παράγονται κυρίως από νάφθα, ένα υποπροϊόν πετρελαίου ή φυσικού αερίου . Είναι ενδιαφέρον ότι ο χρόνος που λαμβάνουν τα οξο-βιοαποδομήσιμα προϊόντα για αποικοδόμηση μπορούν να «προγραμματιστούν» στην κατασκευή, όπως οι βιομηχανικές διεργασίες μεθανίου ή οξειδίου του αζώτου . Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή κάνει μια αναγκαία και σαφή διάκριση μεταξύ βιοαποδομήσιμων πλαστικών και οξο-αποικοδομήσιμων πλαστικών, τα τελευταία από τα οποία δεν μπορούν να θεωρηθούν βιοπλαστικά. Είναι συμβατικά πλαστικά υλικά με τεχνητά πρόσθετα που δεν βιοδιασπώνται αλλά απλώς τεμαχίζονται σε μικρά κομμάτια που παραμένουν στη φύση και δυνητικά βλάπτουν το περιβάλλον και θέτουν σε κίνδυνο την ανακύκλωση και την κομποστοποίηση (<https://www.google.com/search?q=translate&oq=&aqs=chrome.3.35i39i362l7j46i39i175i199i362.3066618j0j15&sourceid=chrome&ie=UTF-8>). Από την άλλη πλευρά, τα υδρο-βιοδιασπώμενα πλαστικά αποσυντίθενται υδρολυτικά με ρυθμό ταχύτερο από τα οξοδιασπώμενα πλαστικά. Αυτά τα πλαστικά μπορεί να μετατραπούν σε συνθετικά λιπάσματα. Τα παραδείγματα περιλαμβάνουν βιοπλαστικά που παράγονται από φυτικές πηγές (όπως άμυλο) και πολυγαλακτικό οξύ (PLA). (Atiweh et al. 2021a)

Τα βιοπλαστικά έχουν και φιλικά προς το περιβάλλον χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, η παραγωγή PLA εξοικονομεί τα δύο τρίτα της ενέργειας που απαιτείται για να κατασκευαστούν τα κλασικά πλαστικά. Επιπλέον, είναι επιστημονικά αποδεδειγμένο ότι κατά τη βιοαποδόμηση των βιοπλαστικών PLA, δεν υπάρχει καθαρή αύξηση του αερίου διοξειδίου του άνθρακα. Αυτό αποδείχθηκε από το γεγονός ότι τα φυτά από τα οποία παράγονταν απορροφούσαν την ίδια ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα όταν καλλιεργήθηκαν όπως και όταν απελευθερώθηκαν κατά τη βιοαποδόμησης τους. Συγκεκριμένα, το PLA εκπέμπει 70% λιγότερα αέρια του θερμοκηπίου όταν αποικοδομείται σε χώρους υγειονομικής ταφής . Άλλες μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι η αντικατάσταση του παραδοσιακού πλαστικού με PLA με βάση το καλαμπόκι μπορούν να μειώσουν τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου κατά 25%. Τέτοια παραδείγματα παρέχουν διαβεβαίωση ότι η μελλοντική παραγωγή νέων βιοπλαστικών μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας μειώνοντας ουσιαστικά τις εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου. (Atiweh et al. 2021a).

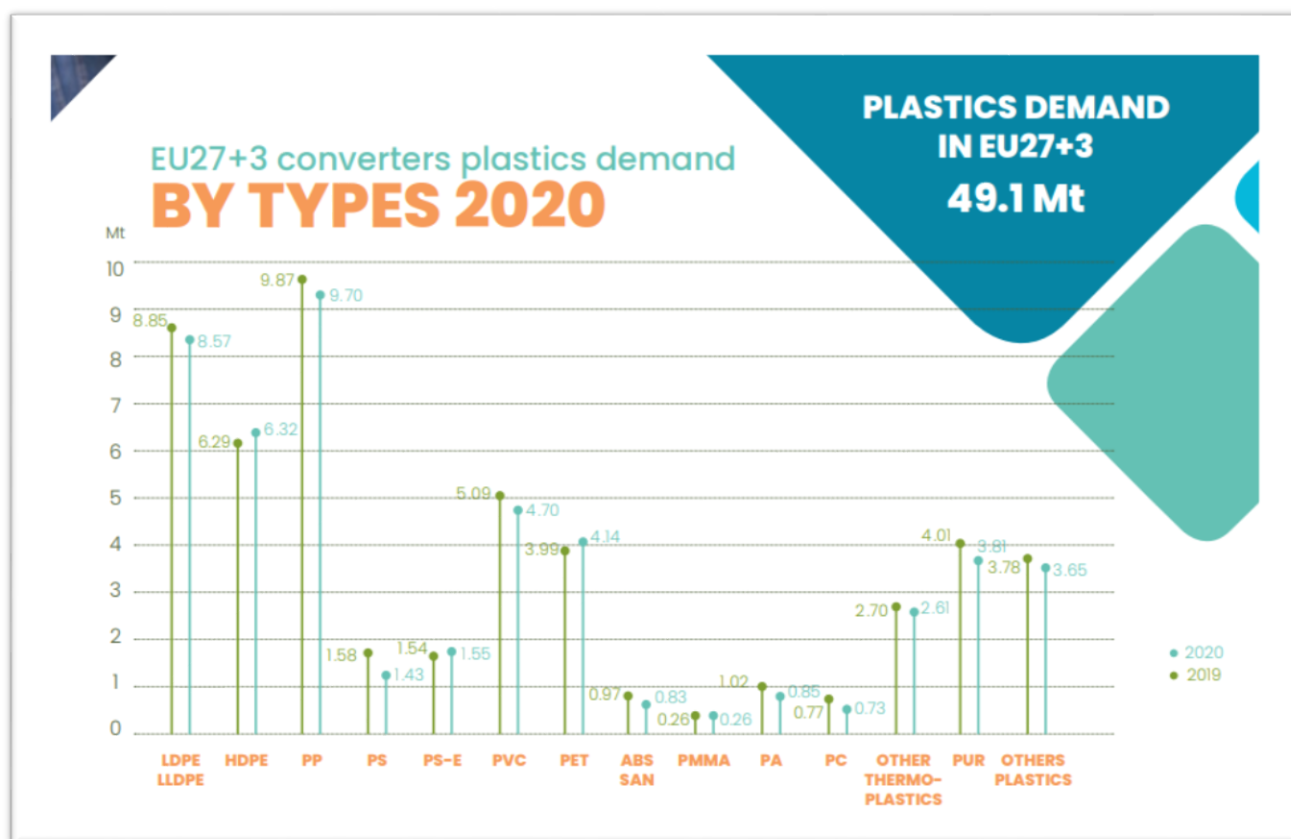
1.2 Στατιστικά Στοιχεία

Η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών αυξάνεται εκθετικά από τη δεκαετία του 1950, από 1,5 εκατομμύρια τόνους (Mt) σε 348 Mt το 2017 (W. Xu et al. 2020). Όμως, όπως φαίνεται από την εικόνα 1.4 η παραγωγή πλαστικού μετά το 2017 έχει μειωθεί όσον αφορά την ευρωπαϊκή και τη παγκόσμια κλίμακα. Η μείωση στο παγκόσμιο δίκτυο πλαστικών εμφανίστηκε το 2020 ενώ στον ευρωπαϊκό χώρο από το 2018, από όπου μετέπειτα μειώνεται συνεχώς.



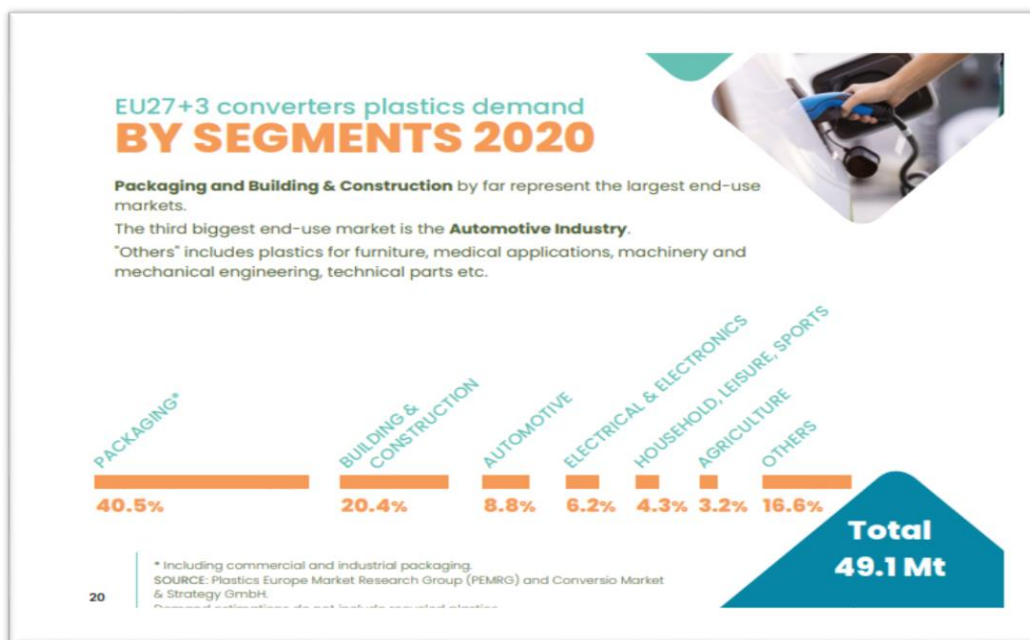
Εικόνα 1.4: Παγκόσμια παραγωγή πλαστικού, 2020 (Πηγή: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>)

Στην εικόνα 1.5 παρατηρούμε την ευρωπαϊκή ζήτηση σε πλαστικά βάσει το είδος τους. Η συνολική ζήτηση φτάνει τους 49.1 Mt, ενώ είναι φανερό ότι το χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (LDPE), το υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (HDPE) και το πολυπροπυλένιο (PP) έχουν τη μεγαλύτερη ζήτηση με διαφορά από όλα τα υπόλοιπα.



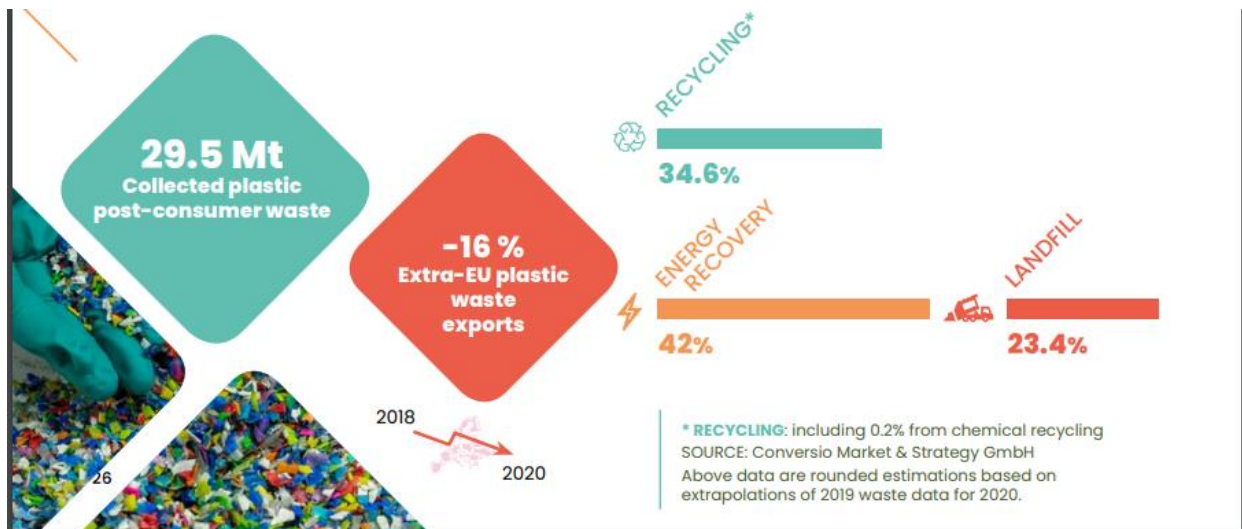
Εικόνα 1.5: Ευρωπαϊκή ζήτηση πλαστικού ανά είδος, 2020 (Πηγή: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>)

Σημαντικό είναι να αναφερθεί και ποιες βιομηχανίες αφορά η ζήτηση αυτή. Στην εικόνα 1.6 βλέπουμε πως η κατανομή των πλαστικών βάση τομέα αφορά κυρίως τη παραγωγή συσκευασιών η οποία κυριαρχεί με διπλάσια διαφορά από τον δεύτερο τομέα που απευθύνεται στα κτίρια και τις κατασκευές. Ακολουθούν η αυτοκινητοβιομηχανία και οι ηλεκτρολογικές και ηλεκτρικές συσκευές, ενώ τη κατάταξη συμπληρώνουν τα νοικοκυριά και η γεωργία.



Εικόνα 1.6: Ζήτηση πλαστικών ανά τομέα παραγωγής, 2020 (Πηγή: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>)

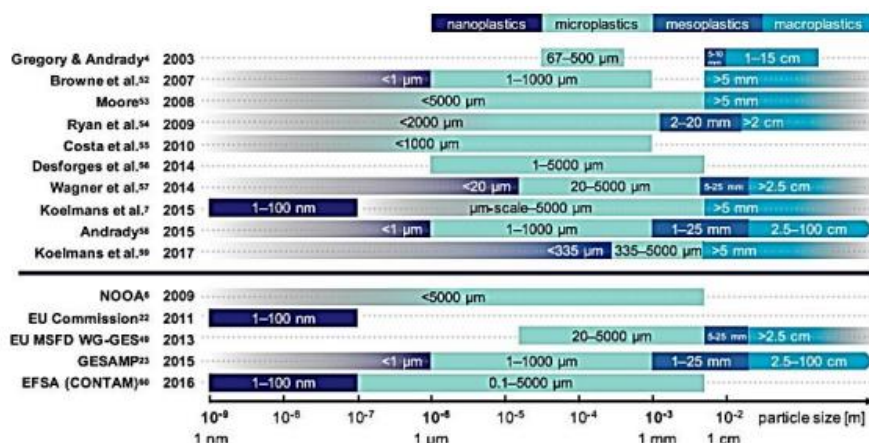
Το 2020, περισσότερα από 29 εκατομμύρια τόνους πλαστικών απορριμάτων παράχθηκαν στην Ευρώπη. Στην εικόνα 1.6 γίνεται λόγος για τη παραγωγή πλαστικών αποβλήτων από τους Ευρωπαίους πολίτες η οποία επηρεάζεται σημαντικά από την πρωτογενή χρήση πλαστικών και από τη διάρκεια ζωής του εκάστοτε προϊόντος. Παράδειγμα αυτού αποτελούν οι πλαστικές συσκευασίες οι οποίες έχουν πολύ μικρή διάρκεια ζωής, συνήθως περίπου 6 μήνες, σε αντίθεση με τα κτίρια και τις κατασκευές στα οποία η χρήση πλαστικών έχει μέση διάρκεια ζωής 35 έτη. Περισσότερο από το ένα τρίτο ανακυκλώθηκε, αλλά ακόμα ένα μεγάλο ποσοστό , γύρω στα 23% , κατέληξε σε χωματερές ενώ περισσότερο από το 40% οδηγήθηκε σε διεργασίες ανάκτησης ενέργειας.



Εικόνα 1.7: Κατάληξη πλαστικών απορριμμάτων, 2020 (Πηγή: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>)

1.3 Κατηγοριοποίηση πλαστικών

Όσον αφορά την κατηγοριοποίηση των πλαστικών θραυσμάτων με βάση το μέγεθός τους, παρατηρείται μια μεγάλη ποικιλία αναφορών καθώς οι τιμές από έρευνα σε έρευνα ποικίλουν. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αυτού του προβλήματος αποτελεί η σύγκριση ως προς το μέγεθος των μικροπλαστικών. Σύμφωνα με τους Thompson κ.α. (2009) ως μικροπλαστικά ορίζονται τα πλαστικά θραύσματα διαμέτρου μικρότερης των 10 χιλιοστών (mm), ενώ κατά τους Ryan κ.α. (2009) μικροπλαστικά χαρακτηρίζονται όσα έχουν διάμετρο μικρότερη από 2 mm. Αντίθετα, σε πληθώρα άλλων ερευνών, η διάμετρος τους θεωρείται μικρότερη του 1 mm (Browne, Galloway, and Thompson 2010; Mark A. Browne, Tamara Galloway 2007; Claessens et al. 2011). Σε νεότερες έρευνες, το μέγεθος τους χαρακτηρίζεται μικρότερο από 1 mm (Andrady 2017). Στην εικόνα 1.7 φαίνεται η διαφοροποίηση στα όρια κατηγοριοποίησης που χρησιμοποιούν θεσμικές εκθέσεις και επιστημονικά άρθρα.



Εικόνα 1.8: Παραδείγματα διαφορών στην κατηγοριοποίηση των πλαστικών αποβλήτων σύμφωνα με το μέγεθος όπως εφαρμόζεται (ή/και ορίζεται) στην επιστημονική βιβλιογραφία και σε θεσμικές εκθέσεις. (Hartmann et al. 2019).

Η μη ύπαρξη μιας ομώνυμης κλίμακας για το χαρακτηρισμό και την κατηγοριοποίηση των πλαστικών θραυσμάτων προκαλεί σύγχυση και δυσχεραίνει την επικοινωνία μεταξύ των ερευνητών θέτοντας σε κίνδυνο την επιστημονική πρόοδο. Σε άρθρο που δημοσιεύτηκε το 2019 (Hartmann et al. 2019) περιγράφεται εκτενώς το συγκεκριμένο πρόβλημα, καταγράφονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα χρήσης μιας ενοποιημένης ορολογίας, προτείνεται ένα πλαίσιο καθορισμού και κατηγοριοποίησης, και επισημαίνονται περιοχές αβεβαιότητας που απαιτούν περαιτέρω μελέτη. Τα όρια που προτείνονται για κάθε κατηγορία, από το μεγαλύτερο στο μικρότερο, είναι (Hartmann et al. 2019):

- Μακροπλαστικά: μεγαλύτερα του 1cm
- Μεσοπλαστικά: 1-10 mm
- Μικροπλαστικά: 1-1000 µm
- Νανοπλαστικά: 1-1000 nm

Επιπλέον, πέρα από τις τάξεις μεγέθους, γίνεται αναφορά στις φυσικοχημικές ιδιότητες (σύνθεση πολυμερούς, στερεά κατάσταση, διαλυτότητα) ως καθοριστικά κριτήρια κατηγοριοποίησης σε συνδυασμό με το μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα και την προέλευση του πλαστικού θραύσματος (Hartmann et al. 2019).

1.3.1 Μικροπλαστικά

Ως μικροπλαστικά ορίζονται τα μικρού μεγέθους υπολείμματα και θραύσματα μεγαλύτερων τμημάτων, όπως πλαστικές ίνες, κόκκοι, μικροσφαιρίδια, κάθε είδους πλαστικού. Αποτελούν απειλή για το υδάτινο φυσικό περιβάλλον αφού οι ποσότητες τους επηρεάζουν έντονα τα υδατικά οικοσυστήματα και προκαλούν βλάβες στους υδρόβιους οργανισμούς.



Εικόνα 1.9: Μικροπλαστικά (Πηγή: <https://newstube.gr/>)



Εικόνα 1.10: Μικροπλαστικά (Πηγή: <https://www.healthweb.gr/>)

1.3.1.1 Ταξινόμηση μικροπλαστικών

Ανάλογα τον τρόπο δημιουργίας και την προέλευση τους, τα μικροπλαστικά ταξινομούνται σε δυο κατηγορίες, τα πρωτογενή ή κύρια μικροπλαστικά (PMs, Primary Microplastics) και τα δευτερογενή ή δευτερεύοντα μικροπλαστικά (SMs, Secondary Microplastics) (Andrady 2017).

Πρωτογενή μικροπλαστικά

Τα πρωτογενή μικροπλαστικά (PMs, Primary Microplastics) χρησιμοποιούνται κυρίως σε καλλυντικά και φαρμακευτικά είδη, αλλά και σε διαδικασίες αμμοβολής με συνθετικά υλικά, και χύτευσης (Derraik 2002; Gregory 1996). Περιέχονται σε προϊόντα στοματικής υγιεινής, περιποίησης προσώπου, και προϊόντα ομορφιάς όπως οδοντόκρεμες, αντηλιακά προσώπου και σώματος, αφρόλουτρα, σαμπουάν, κρέμες για απολέπιση και αποσμητικά. Βρίσκονται επίσης και στα συνθετικά υφάσματα με την μορφή συνθετικών μικροϊνών (MFs) (Zitko and Hanlon 1991). Η κυριότερη πηγή πρωτογενών μικροπλαστικών στο θαλάσσιο σύστημα είναι η ρύπανση από οικιακές διαδικασίες πλύσης συνθετικών ρούχων (Singh, Mishra, and Das

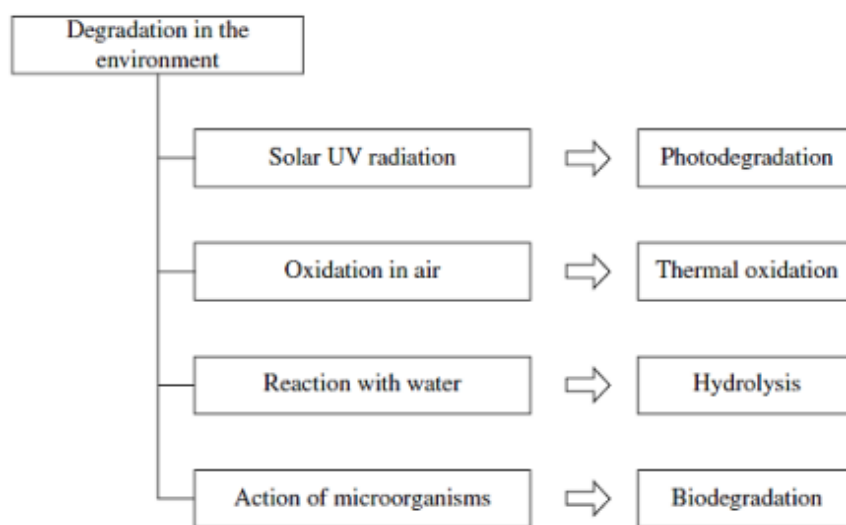
2020). Οι μικροπλαστικές ίνες (MPF), που περιλαμβάνουν τις συνθετικές μικροΐνες, αποτελούν το μεγαλύτερο κλάσμα της μικροπλαστικής ρύπανσης στο υδάτινο περιβάλλον (Sait et al. 2021). Οι συνθετικές μικροΐνες αποτελούνται από μη βιοαποδομήσιμα πολυμερή που περιλαμβάνουν νάιλον, πολυεστέρα (PE), ρεγίων, τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET), πολυπροπυλένιο (PP), ακρυλικό ή σπαντέξ με διάμετρο μικρότερη από 5 mm (Alimi et al. 2018). Απελευθερώνονται στα υδάτινα οικοσυστήματα κυρίως μέσω των νερών του πλυντηρίου, λόγω της αδυναμίας των φίλτρων των πλυντηρίων αλλά και των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων να τα συγκρατήσουν. Το νερό αυτό τελικά, αναμιγνύεται με το νερό του ωκεανού και ρυπαίνει το οικοσύστημα παγκοσμίως. Η διασπορά των μικροΐνων γίνεται μέσω των ωκεάνιων ρευμάτων λόγω της χαμηλής τους πυκνότητας (Singh et al. 2020). Πρωτογενή μικροπλαστικά θεωρούνται και τα μικροσφαιρίδια (pellets), τα οποία αποτελούν πρώτη ύλη στη βιομηχανία πλαστικών. Συνήθως διαφεύγουν από τα εργοστάσια παραγωγής κατά την διαχείριση και τη μεταφορά τους, λόγω του μικροσκοπικού τους μεγέθους και καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον λόγω των καιρικών συνθηκών (άνεμος, βροχή) ή παραμένουν στο έδαφος (US Environmental Protection Agency 2002).

Δευτερογενή μικροπλαστικά

Τα δευτερογενή μικροπλαστικά (SMs, Secondary Microplastics) αποτελούν μικροσκοπικά πλαστικά υπολείμματα που προέρχονται από τον κατακερματισμό και τη διάβρωση μεγαλύτερων πλαστικών τμημάτων και αποβλήτων είτε στον υδάτινο, είτε στον εδαφικό χώρο. (Ryan et al. 2009; Thompson et al. 2004). Εφόσον τα πλαστικά εκτίθενται σε συνθήκες περιβάλλοντος ξεκινάει η σταδιακή υποβάθμιση τους, μια διεργασία που ονομάζεται γήρανση και προκαλείται από μια σειρά από φυσικές, βιολογικές και χημικές διεργασίες που έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της δομικής ακεραιότητας των πλαστικών και τελικά, λόγω μηχανικών καταπονήσεων από την κυματική δράση, την τριβή και την αναταραχή λόγω ρευμάτων, τον κατακερματισμό τους (Barnes et al. 2009; Mark A. Browne, Tamara Galloway 2007). Μετά τον κατακερματισμό τους δημιουργούνται ακόμα μικρότερα θραύσματα τα οποία ονομάζονται νανοπλαστικά.

1.4 Αποδόμηση πλαστικών

Ως αποδόμηση ενός πλαστικού υλικού, χαρακτηρίζεται η υποβάθμιση των χημικών του ιδιοτήτων υπό την επίδραση ενός ή περισσότερων περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η θερμότητα, το φως ή η έκθεσή του σε χημικά σε συνάρτηση με τη μεταβολή του μοριακού του βάρους (Andrady 2015). Αυτές οι αλλαγές είναι ανεπιθύμητες καθώς προκαλούν μια ποικιλία αλλοιώσεων στην επιφάνεια των πλαστικών υλικών όπως ρωγμές, αποχρωματισμό, και διαρρήξεις. Ακόμα προκαλούν υποβάθμιση των ευνοϊκών ιδιοτήτων των υλικών, όπως την υψηλή τους αντοχή και τη δυνατότητα κάμψης τους, ή και την πλήρη χημική αποσύνθεση τους (Andrady 2011; Moore 2008; Barnes et al. 2009). Οι μηχανισμοί αποδόμησης ενός πλαστικού στο περιβάλλον, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.13, είναι η φωτοαποδόμηση (photodegradation), η θερμική οξείδωση (thermal oxidation), η υδρόλυση (hydrolysis) και η βιοαποδόμηση (biodegradation) από μικροοργανισμούς και αυτότροφους οργανισμούς (Andrady 2015).



Εικόνα 1.11: Μηχανισμοί αποδόμησης πλαστικών στο περιβάλλον (Andrady 2015)

1.4.1 Φωτοαποδόμηση

Φωτοαποδόμηση ονομάζεται η υποβάθμιση των ιδιοτήτων των πλαστικών που επιτυγχάνεται υπό την επίδραση υπεριώδους ηλιακής ακτινοβολίας (UV) μέσω φυσικών και χημικών μεταβολών στην δομή του πολυμερούς. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας παρατηρείται σταδιακή υποβάθμιση της δομικής ακεραιότητας των πλαστικών λόγω της απορρόφησης της ενέργειας της υπεριώδους ακτινοβολίας από τους ακόρεστους δεσμούς της

πολυμερικής αλυσίδας, που προκαλεί διάρρηξη των δεσμών και δημιουργία ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες στη συνέχεια αντιδρούν με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο και παράγουν καρβονυλομάδες στην κύρια αλυσίδα. Έπειτα οι επιφάνειες που έχουν εκτεθεί αποχρωματίζονται και διασπώνται. Το καταστροφικότερο μήκος κύματος για κάθε πλαστικό εξαρτάται από το πλήθος των υπάρχοντων δεσμών. Για το πολυαιθυλένιο, το καταστροφικότερο μήκος κύματος συναντάται περίπου στα 300 nm (Singh and Sharma 2008).

Πιο αναλυτικά, ο μηχανισμός της φωτοαποδόμησης αποτελείται από τρία στάδια την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό.

- Έναρξη (initiation)

Στο πρώτο αυτό στάδιο γίνεται η απορρόφηση του υπεριώδους φωτός έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η διάσπαση των χημικών δεσμών C-C και C-H της κύριας αλυσίδας του πολυμερούς και τέλος, να δημιουργηθούν οι αρχικές ελεύθερες ρίζες. Η απορρόφηση του φωτός πραγματοποιείται από ειδικές ακόρεστες χρωμοφόρες ομάδες (κετόνες, καρβονυλικές ομάδες). Υπάρχουν όμως και πολυμερή όπως το πολυαιθυλένιο και το πολυπροπυλένιο που δεν διαθέτουν χρωμοφόρες ομάδες. Ωστόσο, μικρές ποσότητες εξωτερικών ή δομικών προσμίξεων που ενσωματώνονται στη μακρομοριακή αλυσίδα μπορούν να επιτρέψουν την φωτοαπορρόφηση έως κάποιο βαθμό (Gewert, Plassmann, and Macleod 2015).

- Διάδοση (propagation)

Σε αυτό το στάδιο η ρίζα του πολυμερούς, που δημιουργήθηκε στο πρώτο στάδιο, αντιδρά με οξυγόνο και σχηματίζει μια ρίζα υδροϋπεροξειδίου. Έπειτα πραγματοποιούνται και άλλες οξειδωτικές αντιδράσεις που έχουν σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση της αλυσίδας (chain scission) ή τη δημιουργία διασταυρωμένης σύνδεσης (cross linking) μέσω ιοντικών ή ομοιοπολικών δεσμών. Η κρυσταλλικότητα του μορίου στη γήρανση, μέσω διάσπασης της αλυσίδας, τείνει να αυξάνεται ενώ αντίθετα κατά τη σύνδεση αλυσίδων η κρυσταλλικότητα του μορίου μειώνεται.

- Τερματισμός (termination)

Στο τελευταίο στάδιο γίνεται ο σχηματισμός αδρανών προϊόντων (ολεφίνες, αλδεΐδες και κετόνες) από τον συνδυασμό των ελεύθερων ριζών (Andrew Peacock Andrew J 2000). Καθώς το μοριακό βάρος ελαττώνεται και αλλάζουν οι μηχανικές του ιδιότητες, το υλικό γίνεται πιο εύθραυστο και θρυμματίζεται πιο εύκολα γεγονός που αυξάνει τις διαθέσιμες επιφάνειες για περαιτέρω αντιδράσεις.

1.4.2 Υδρόλυση

Με τον όρο υδρόλυση πολυμερών χαρακτηρίζεται η διαδικασία διάσπασης των χημικών δεσμών που πραγματοποιείται σε πολυμερή με υδρόφιλους υδrolυτικά ασταθείς δεσμούς. Καθώς το νερό προστίθεται στο μακρομόριο, η αλυσίδα διασπάται και δημιουργούνται δύο ή περισσότερες αλυσίδες (Ioakeimidis et al. 2016). Στο πρώτο στάδιο γίνεται τυχαία διάσπαση υδrolυτικού εστέρα αφού οι εστέρες είναι οι βασικές λειτουργικές ομάδες που αλληλοεπιδρούν με το νερό. Η διάρκεια της αποδόμησης εξαρτάται από το αρχικό μοριακό βάρος και από τη χημική δομή του πολυμερούς (Singh and Sharma 2008).

1.4.3 Θερμο-οξειδωτική αποδόμηση

Η θερμο-οξειδωτική αποδόμηση πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες άνω των 100°C. Αυτές οι θερμοκρασίες εμφανίζονται σπάνια στο φυσικό περιβάλλον και ακόμα πιο σπάνια στο θαλάσσιο (Gardette et al. 2013). Τα προϊόντα της θερμο-οξειδωτικής αποδόμησης πολυεστέρων είναι η φορμαλδεΐδη, η ακεταλδεΐδη, το μεθανικό οξύ, το οξικό οξύ, το CO₂ και το H₂O. Αποτέλεσμα της είναι η υποβάθμιση των φυσικών ιδιοτήτων του πολυμερούς όπως η δυσκαμψία, η αλλαγή χρώματος, ρωγμές κ.ά. (Παπαδάκη 2020).

1.4.4 Βιοαποδόμηση

Η βιοαποδόμηση (Biodegradation) είναι η διαδικασία κατά την οποία γίνεται διάσπαση της οργανικής ύλης σε διοξείδιο του άνθρακα, μεθάνιο, νερό, ανόργανες ενώσεις ή βιομάζα από

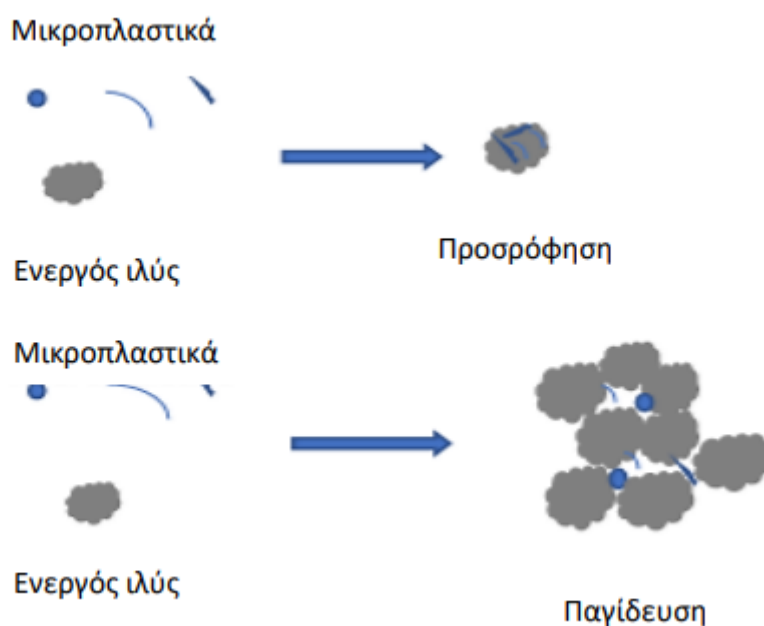
την ενζυματική δράση μικροοργανισμών, όπως βακτήρια και μύκητες (Focht 2020). Βιοαποδομήσιμα ονομάζονται τα πλαστικά που μπορούν να αποσυντεθούν μέσω της δράσης ζωντανών οργανισμών, συνήθως μικροβίων, σε νερό, διοξείδιο του άνθρακα και βιομάζα (Ammala et al. 2011). Η βιοαποδόμηση των συνθετικών πολυμερών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε περιβάλλον με περίσσεια οξυγόνου (αερόβια βιοαποδόμηση) ή σε περιβάλλον με έλλειψη οξυγόνου (αναερόβια βιοαποδόμηση) (Ahmed et al. 2018). Στο τελικό στάδιο της διαδικασίας διασπώνται οι πλευρικές αλυσίδες ή ο σκελετός του πολυμερούς και σχηματίζονται μικρότερες μονάδες πολυμερών ή μονομερή από εξωκυτταρικά ένζυμα (Gu and Gu 2005). Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτό το πρώτο στάδιο αποπολυμερισμού περιλαμβάνει μία ενζυματικά καταλυόμενη υδρόλυση αμιδίων, εστέρων ή δεσμών ουρεθάνης. Αυτά τα μικρότερα μόρια μπορούν στη συνέχεια να απορροφηθούν από μικροοργανισμούς και να μεταβολιστούν, δηλαδή να περάσουν από τις ημιδιαπερατές μεμβράνες των βακτηριακών κυττάρων και να χρησιμοποιηθούν ως πηγή ενέργειας και άνθρακα (Ahmed et al. 2018).

Ωστόσο η πλειονότητα των πλαστικών, όπως το πολυαιθυλένιο και το πολυπροπυλένιο (πολυολεφίνες), είναι μη βιοαποδομήσιμα (Tokiwa et al. 2009). Η βιοαποδόμηση αυτών είναι συνδυασμός βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Οι πολυολεφίνες για παράδειγμα, που είναι η μεγαλύτερη ομάδα θερμοπλαστικών και απαρτίζεται από πολυμερή που αποτελούνται από απλές ολεφίνες, δεν βιοαποδομούνται επειδή ο σκελετός αλκυλίου δεν είναι εύκολα προσβάσιμος από τους μικροοργανισμούς (Fotopoulou and Karapanagioti 2017). Η αλκυλική τους ραχοκοκαλιά φέρει υψηλή αντίσταση ενάντια στην υδρόλυση αλλά συνήθως είναι ευαίσθητη σε οξειδωτική αποδόμηση. (Weinstein, Crocker, and Gray 2016).

1.4.5 Αποδόμηση βιοπλαστικών στην ενεργό ιλύς

Στη δεξαμενή αερισμού οι βιοκροκίδες ή οι βακτηριακές εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (εκκρίνονται από τα βακτήρια) ενισχύουν, επίσης, τη συσσώρευση των υπαρχόντων πλαστικών σωματιδίων στα λύματα, τα οποία στη συνέχεια καθιζάνουν στη δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης. Επίσης, τα μικροπλαστικά δύνανται να παγιδευτούν στις βιοκροκίδες (Scherer et al., 2018). Οι μικροοργανισμοί, που υποβοηθούν τη βιολογική επεξεργασία, δεν δύνανται να αποδομήσουν τα μικροπλαστικά (Zhang et al., 2020a). Ως εκ τούτου, ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης των μικροπλαστικών στο σύστημα ενεργού ιλύος είναι η προσρόφηση και η καθίζηση με τις βιοκροκίδες (Εικόνα 4.3). Υπάρχει, επίσης, πιθανότητα ορισμένα μικροπλαστικά να παγιδευτούν σε ασταθείς κροκίδες και να μην καθιζάνουν με

αποτελεσματικό τρόπο, γεγονός που οδηγεί σε επαναιώρηση αυτών των σωματιδίων και σε απομάκρυνσή τους κατά το στάδιο της καθίζησης (Carr et al., 2016).



Εικόνα 1.12: Μηχανισμοί απομάκρυνσης μικροπλαστικών με το σύστημα ενεργού ιλύος (Zhang et al., 2020a).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απομάκρυνση των μικροπλαστικών στο σύστημα ενεργού ιλύος είναι ο χρόνος επαφής (Carr et al., 2016) και η ποσότητα θρεπτικών ουσιών στα λύματα (Rummel et al., 2017). Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επαφής, τόσο μεγαλύτερες είναι οι πιθανότητες της δημιουργίας βιοφίλμ στην επιφάνεια των πλαστικών σωματιδίων (Carr et al., 2016). Το βιοφίλμ μπορεί να τροποποιήσει τις ιδιότητες της επιφάνειας (Rummel et al., 2017), το μέγεθος και την σχετική πυκνότητα των πλαστικών σωματιδίων (Carr et al., 2016). Επομένως, μικροπλαστικά μέσης πυκνότητας με ανάπτυξη βιοφίλμ στην επιφάνειά τους δύνανται να καθιζάνουν και να απομακρυνθούν με την ιλύ από τα λύματα, με ταυτόχρονη αύξηση της αποτελεσματικότητας του συστήματος ενεργού ιλύος (Ngo et al., 2019 , Μαρία Κωστάκη, 2020) .

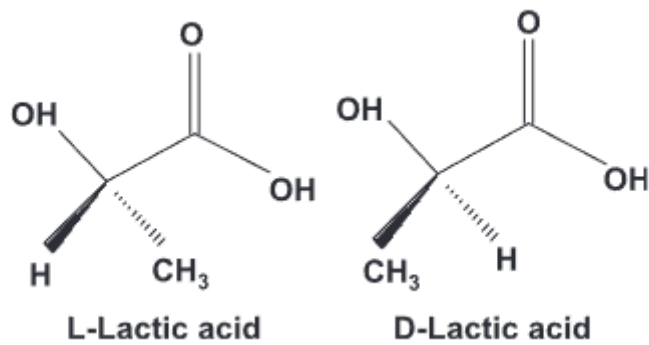
1.5 Πολυγαλακτικό οξύ (PLA)

Το πολυ(γαλακτικό οξύ) ή πολυγαλακτικό οξύ ή πολυλακτίδιο (PLA) έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον ως ένα από τα πιο καινοτόμα υλικά που αναπτύσσονται για μία μεγάλη ποικιλία εφαρμογών. Είναι βιοδιασπάσιμος και βιοδραστικός θερμοπλαστικός αλειφατικός

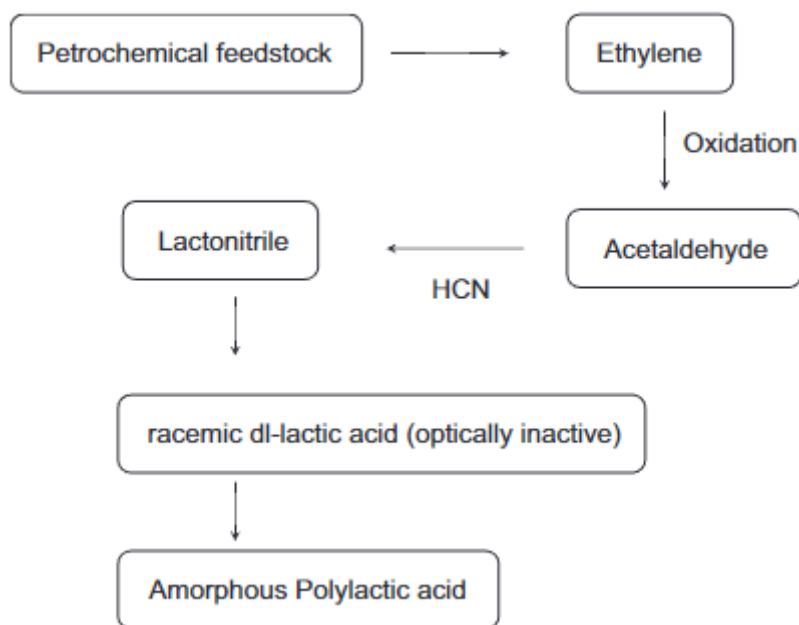
πολυεστέρας που προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές, όπως το άμυλο καλαμποκιού, οι ρίζες ταπιόκα σε φλούδες ή το άμυλο, ή το ζαχαροκάλαμο, γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικό για βιολογικές και ιατρικές εφαρμογές. Μπορεί να μετατραπεί σε νήματα για την επακόλουθη κατασκευή του επιθυμητού υφάσματος. Οι ιατρικές εφαρμογές του πολυμερούς προκύπτει από τη βιοσυμβατότητά του: το προϊόν αποικοδόμησης, το γαλακτικό οξύ, είναι μεταβολικά αβλαβές. Οι ίνες του μπορούν να κατασκευαστούν σε διάφορες μορφές και μπορεί να χρησιμοποιηθούν για εμφυτεύματα και άλλες χειρουργικές εφαρμογές όπως ράμματα. Το όνομα "πολυγαλακτικό οξύ" δεν συμμορφώνεται με τυπική ονοματολογία κατά IUPAC, και είναι δυνητικά διφορούμενη ή δημιουργεί σύγχυση, επειδή το PLA δεν είναι πολυοξύ (πολυηλεκτρολύτης), αλλά μάλλον πολυεστέρας. (Gupta et al. 2007)

1.5.1 Χημεία γαλακτικού και πολυγαλακτικού οξέος

Η χημεία του πολυγαλακτικού οξέος (PLA) περιλαμβάνει την επεξεργασία και το πολυμερισμό του μονομερούς γαλακτικού οξέος. Το γαλακτικό οξύ $\text{HOCH}_2\text{CHCOOH}$ είναι ένα απλό χειρόμορφο μόριο που υπάρχει ως δύο εναντιομερή, το L- και το D-γαλακτικό οξύ (Εικ. 1.11), που διαφέρουν ως προς την επίδρασή τους στο πολωμένο φως. Το ισομερές L περιστρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός δεξιόστροφα, το ισομερές D το περιστρέφει αριστερόστροφα. Η οπτικά ανενεργή μορφή D, L ή meso είναι ένα ισομοριακό (ρακεμικό) μίγμα ισομερών D και L. Το γαλακτικό οξύ παράγεται στους θηλαστικούς μυς κατά τη γλυκογονόλυση και εμπλέκεται στο κύκλο του Krebs μέσω πυροσταφυλικού οξέος και ακετυλ-CoA. Το γαλακτικό οξύ παρασκευάζεται εύκολα σε υψηλή απόδοση με ζύμωση μελάσας ή αμύλου πατάτας ή από δεξτρόζη καλαμποκιού. Το γαλακτικό οξύ παράγεται στο εμπόριο από τη ζύμωση όπως μόλις αναφέρθηκε, ή μέσω πετροχημικών πρώτων υλών. Η πετροχημική διαδρομή προς το γαλακτικό οξύ φαίνεται στην εικόνα 1.12. Το γαλακτικό οξύ που παράγεται από αυτή τη διαδρομή είναι το οπτικά ανενεργό ρακεμικό μείγμα των L και D εναντιομερών. Το πετροχημικό σχέδιο της παραγωγής μονομερών ήταν διαδεδομένο μέχρι περίπου 1990 όταν μια πιο οικονομική προσέγγιση ζύμωσης αναπτύχθηκε. Σήμερα η πιο δημοφιλής διαδικασία είναι ζύμωση, κατά την οποία το άμυλο καλαμποκιού μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ με βακτηριακή ζύμωση χρησιμοποιώντας ένα βελτιστοποιημένο στέλεχος *Lactobacillus*. (Gupta et al. 2007)



Εικόνα 1.13: Οπτικά ισομερή του γαλακτικού οξέος. (Gupta, Revagade, and Hilborn 2007)



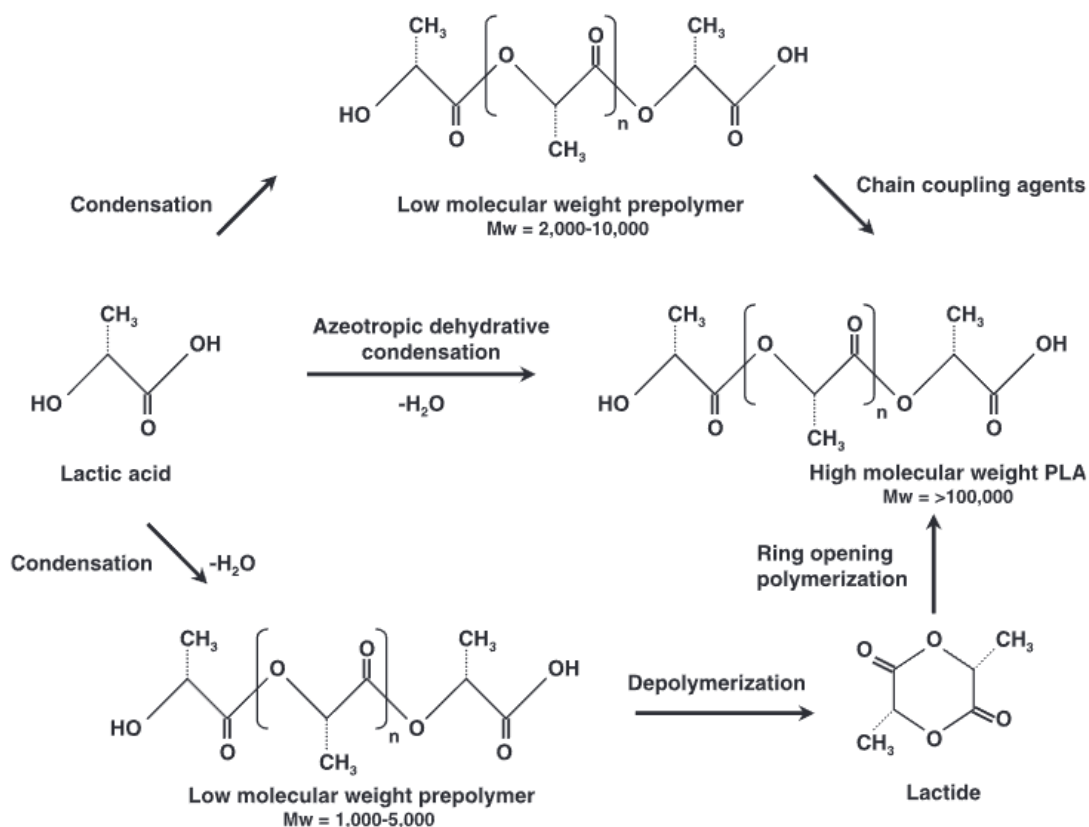
Εικόνα 1.14: Η πετροχημική διαδρομή προς το πολυγαλακτικό οξύ. (Gupta, Revagade, and Hilborn 2007)

Όπως όλα τα βιολογικά γαλακτικά οξέα, το γαλακτικό οξύ που παράγεται είναι αποκλειστικά (>99,5%) το L-ισομερές, που είναι ένας λόγος που ευνοεί την παραγωγή από ανανεώσιμες πηγές και όχι πετροχημικά. Στο παρόν, η Cargill Dow Polymers λειτουργεί τη μεγαλύτερη μονάδα παραγωγής PLA στον κόσμο.

Ο πολυμερισμός του γαλακτικού οξέος σε υψηλό μοριακό βάρος PLA μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους (Εικ. 1.13):

- (1) Άμεση συμπύκνωση—η οποία περιλαμβάνει διαλύτες υπό υψηλό κενό.
- (2) Σχηματισμός του ενδιάμεσου κυκλικού διμερούς (λακτίδιο)—το οποίο δεν περιέχει διαλύτες.

Στην άμεση συμπύκνωση, ο διαλύτης χρησιμοποιείται υπό υψηλό κενό και θερμοκρασίες για την απομάκρυνση του νερού που παράγεται στη συμπύκνωση. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε από την Carothers και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται από τη Mitsui Chemicals. Το προκύπτον πολυμερές είναι ένα χαμηλού ,έως ενδιάμεσο υλικό, μοριακού βάρους πολυμερές, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έχει, ή σε συνδυασμό με ισοκυανικά, εποξειδία ή υπεροξειδία παράγοντας μια σειρά μοριακών βαρών . Στη διαδικασία χωρίς διαλύτες, ένα κυκλικό ενδιάμεσο διμερές, που συνήθως αναφέρεται ως λακτίδιο , παράγεται και καθαρίζεται με απόσταξη. Το καταλυτικό άνοιγμα του δακτυλίου προκύπτει στο πολυμερισμό του ενδιάμεσου λακτιδίου σε PLA με ελεγχόμενο μοριακό βάρος. Με τον έλεγχο του χρόνου παραμονής και των θερμοκρασιών σε συνδυασμό με τον τύπο καταλύτη που χρησιμοποιείται και τη συγκέντρωση είναι δυνατός ο έλεγχος της αναλογίας και της ακολουθίας των μονάδων D- και L-γαλακτικού οξέος στο τελικό πολυμερές. Δεδομένου ότι, το γαλακτικό οξύ είναι ένα χειρόμορφο μόριο, η στερεοχημεία του PLA μπορεί να είναι προσαρμοσμένη ώστε να ταιριάζει στις απαιτήσεις. Είναι η στερεοκανονικότητα που κάνει το πολυ(L-γαλακτικό οξύ) ένα υψηλά κρυσταλλικό πολυμερές. Οι δυάδες μονομερών στην αλυσίδα PLA μπορεί να περιέχουν πανομοιότυπα στερεόκεντρα (L:L ή D:D) ή εναντιομερή στερεόκεντρα (L/D). Πρόσφατες εξελίξεις στη βιομηχανική ζύμωση της γλυκόζης που λαμβάνεται από καλαμπόκι έχουν οδηγήσει σε δραματική μείωση του κόστους παραγωγής του γαλακτικού οξέος. (Gupta et al. 2007)



Εικόνα 1.15: Σύνθεση πολυγαλακτικού οξέος. (Gupta, Revagade, and Hilborn 2007)

Το PLA έχει πολλά πλεονεκτήματα:

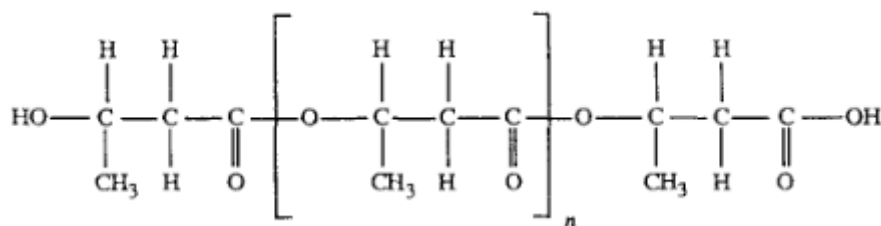
- είναι βιοσυμβατό και βιοαποικοδομήσιμο, και μπορεί να διασπαστεί εύκολα θερμικά με υδρόλυση.
- Διατίθεται από ανανεώσιμους γεωργικούς πόρους. Αυτό συμβάλλει επίσης στη βελτίωση της αγροτικής οικονομίας.
- Υπάρχει μείωση των εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα σε σύγκριση με συμβατικά προϊόντα με βάση το πετρέλαιο.
- Η πιο σημαντική ικανότητα του PLA είναι ότι μπορεί κανείς να προσαρμόσει τις φυσικές του ιδιότητες από τροποποιήσεις υλικών. Το πολυμερές είναι σχετικά σκληρό, με την υαλώδες μετάβαση στη θερμοκρασία των $60-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ και τήξη στους $170-180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Μερικά από τα φυσικά χαρακτηριστικά του PLA φαίνονται στο παρακάτω πίνακα. (Gupta et al. 2007)

Property	Units	Condition	Value
Degree of crystallinity X_c	%	L-PLA	0–37
Density ρ	g/cm ³	Amorphous	1.248
		Single crystal	1.290
Heat of fusion ΔH_f	KJ/mol	L-PLA complete crystalline	146
		L-PLA fiber	
		As-extruded	2.5
		After hot drawing	6.4
Heat capacity C_p	J/K/g	L-PLA with	
		$M_v = 5300$	0.60
		$M_v = (0.2-6.91) \times 10^5$	0.54
Glass transition temperature	K		326–337
Melting point	K		418–459
Decomposition temperature	K		500–528
Swelling in water %		pH 7 buffer	2
Intrinsic viscosity (η) in chloroform at 25 °C	dl/g		3.8–8.2
Radiation resistance	G value	Under nitrogen	
Co ⁶⁰ in benzene solution, 30 °C		Chain scission	26.5
		Cross linking	4.5
In water		Chain scission	
		Cross linking	23.0
IR peaks	cm ⁻¹		6.5
OH (alcohol/carboxylic)			3700–3450
–C = O			1750–1735
–COO			1600–1580
C–O			1200–1000
CH			950–700

Εικόνα 1.16: Ιδιότητες πολυγαλακτικού οξέος . (Gupta, Revagade, and Hilborn 2007)

1.6 Πολυ (3-υδροξυ βουτυρικός) εστέρας (PHB)

Το πολυυδροξυβουτυρικό (PHB) είναι ένας πολυεστέρας που παράγεται από πολλούς μικροοργανισμούς, όπως *Cupriavidus nectar*, *Methylobacterium rhodesianum* ή *Bacillus megaterium* υπό συνθήκες ανεπάρκειας αζώτου και με τη βοήθεια του μεθανίου. Το μεθάνιο αρχικά οξειδώνεται σε μεθανόλη μέσω του ενζυμικού καταλυτικού μονοπατιού της μονοοξυγένασης μεθανίου. Αυτό ακολουθείται από τη εξαρτώμενη αφυδρογονάση μετατροπή της μεθανόλης σε φορμαλδεΐδη. Τα μεθανοτροφικά βακτήρια, όπως τα γ-πρωτεοβακτήρια και τα α-πρωτεοβακτήρια, μπορούν να μετατρέψουν περαιτέρω τη φορμαλδεΐδη προς ακετυλοσυνένζυμο Α (Acetyl-CoA). Το ακετύλιο CoA συμπυκνώνεται στο διμερές ακετοακέτυλο-CoA, το οποίο στη συνέχεια ανάγεται από το ένζυμο ακετοακέτυλο-CoA για σχηματισμό μονομερούς PHB β-υδροξυβουτυρικό-CoA. Τέλος, το β-υδροξυβουτυρικό-CoA πολυμερίζεται σε PHB μέσω του ενζύμου σύνθεσης PHB . (Atiwesh et al., 2021, Doyle, Tanner, and Bonfield n.d.)



Εικόνα 1.17: Δομή του πολυ (3-υδροξυ βουτυρικού) εστέρα. (Doyle, Tanner, and Bonfield n.d.)

Τα βιοπλαστικά PHB είναι βιοδιασπώμενα, καθιστώντας τα ελκυστικά και φιλικά προς το περιβάλλον ως εναλλακτική λύση στα θερμοπλαστικά με βάση τα ορυκτά. Το επεξεργάσιμο με τήξη PHB μπορεί να σχηματιστεί χρησιμοποιώντας ημι-κρυσταλλικά θερμοπλαστικά που παράγονται μέσω ζύμωσης, έχοντας ως πρώτη ύλη τους υδατάνθρακες. Επιπλέον, οι εμπορικές χρήσεις του πολυεστέρα PHB διαθέτουν ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες του πολυπροπυλениου που παράγεται από ορυκτά καύσιμα (PP) αν και το κόστος κατασκευής του είναι μεγαλύτερο.

	PHB	PP
Melting point (°C)	175	176
Percentage crystallinity	80	70
T_g (°C)	15	-10
Density (g/cc)	1.25	0.9
Young's modulus (GPa)	4	1.7
Tensile strength (MPa)	40	38
Strain to failure (%)	6	400

Εικόνα 1.18: Ιδιότητες PHB και PP. (Doyle, Tanner, and Bonfield n.d.)

Οι κοινές εφαρμογές του PHB περιλαμβάνουν επιτραπέζια σκεύη μιας χρήσης, σακούλες απορριμμάτων και υλικά συσκευασίας. Έχει προταθεί ότι υλικά που βασίζονται στο PHB (συμπολυμερή και σύνθετα υλικά) θα μπορούσαν να είναι κατάλληλα για ιατρικές εφαρμογές και να είναι βιοδιασπώμενα. Είναι σίγουρο ότι η αντοχή και η ακαμψία αυτών των υλικών μειώνονται στην *in vitro* έκθεση στο περιβάλλον σε φωσφορικά ρυθμισμένο αλατούχο διάλυμα στους 37°C για περιόδους έως 4 μήνες και ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης είναι συνάρτηση της σύνθεσης του και τις συνθήκες επεξεργασίας του. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι υλικά που βασίζονται στο PHB παράγουν μια σταθερή ευνοϊκή απόκριση προσαρμογής οστικού ιστού χωρίς ένδειξη ανεπιθύμητης χρόνιας φλεγμονώδους απόκρισης μετά από

περιόδους εμφύτευσης έως και 12 μήνες. Το οστό σχηματίζεται γρήγορα κοντά στο υλικό και στη συνέχεια γίνεται εξαιρετικά οργανωμένο, με έως και 80% της επιφάνειας του εμφυτεύματος να βρίσκεται σε άμεση τοποθέτηση σε νέο οστό. (Atiweh et al., 2021, Doyle et al., n.d.)

1.7 Οικολογικές επιπτώσεις από τη χρήση βιοπλαστικών

Τα βιοπλαστικά αναδεικνύονται ως εξαιρετικά αμφιλεγόμενα όταν πρόκειται για τον προσδιορισμό των επιπτώσεών τους στο περιβάλλον. Ενώ τα βιοπλαστικά συχνά χαιρετίζονται ως εξαιρετικές εναλλακτικές λύσεις σε σχέση με τα συμβατικά πλαστικά, συνδέονται επίσης με διάφορα μειονεκτήματα. Ας εξετάσουμε την περίπτωση του βιοαποδομήσιμων βιοπλαστικών. Τα βιοαποδομήσιμα βιοπλαστικά μπορούν να αποσυντεθούν σε ουρικά υλικά μέσω μικροβιακών μηχανισμών και να αναμειγνύονται ακίνδυνα με το χώμα. Αυτή η διαδικασία αποσύνθεσης υποβοηθάται από νερό και/ή οξυγόνο. Για παράδειγμα, όταν ένα βιοπλαστικό που προέρχεται από άμυλο καλαμποκιού κομποστοποιείται, τα μόρια του αμύλου καλαμποκιού απορροφούν αργά νερό και διογκώνονται όταν θάβονται. Αυτό αναγκάζει το βιοπλαστικό του αμύλου να διασπαστεί σε μικρά θραύσματα που μπορεί στη συνέχεια να αφομοιωθεί εύκολα από τα βακτήρια. Ωστόσο, ορισμένα βιοπλαστικά χαμηλής αποικοδόμησης ή μη αποικοδομήσιμα διασπώνται μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες ή όταν υποβάλλονται σε επεξεργασία σε κομποστοποιητές ή χωνευτές. Επιπλέον, ορισμένα βιοδιασπώμενα πλαστικά μπορούν μόνο να διασπαστούν σε συγκεκριμένους ενεργούς χώρους υγειονομικής ταφής υπό ορισμένες καθορισμένες και δοκιμασμένες συνθήκες. Η αποσύνθεση κατά την κομποστοποίηση παράγει μεθάνιο αέριο, ένα αέριο θερμοκηπίου πολλές φορές πιο ισχυρό από το διοξείδιο του άνθρακα. Αυτό το αέριο του θερμοκηπίου συμβάλλει στο πρόβλημα της υπερθέρμανσης του πλανήτη. (Atiweh et al. 2021a)

Ακόμα, η παραγωγή βιοπλαστικών από φυτά όπως το καλαμπόκι και ο αραβόσιτος απαιτεί επαναχρησιμοποίηση της γης για την παραγωγή πλαστικού αντί για πλήρη κάλυψη των απαιτήσεων για τρόφιμα. Μια πρόσφατη στατιστική μελέτη αποκάλυψε πως σχεδόν το ένα τέταρτο της γεωργικής γης που παράγει σιτηρά χρησιμοποιείται για τη παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοπλαστικών. Καθώς περισσότερη αγροτική γη χρησιμοποιείται για να παράγουν βιοκαύσιμα και βιοπλαστικά, ενδέχεται να υπάρξει σημαντική αύξηση στις τιμές

των τροφίμων, επηρεάζοντας τα οικονομικά ασθενέστερα στρώματα της κοινωνίας. Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη, η οποία συγκρίνει επτά παραδοσιακά πλαστικά, τέσσερα βιοπλαστικά και ένα από ορυκτά καύσιμα και ανανεώσιμες πηγές, καθόρισε ότι η παραγωγή βιοπλαστικών είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερες ποσότητες ρύπων, λόγω των λιπασμάτων και των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες, πέρα από τη χημική επεξεργασία που απαιτείται για να μετατραπεί το οργανικό υλικό σε πλαστικό. Βρέθηκε επίσης ότι τα βιοπλαστικά συμβάλλουν περισσότερο στην καταστροφή του όζοντος από τα πλαστικά που προέρχονται από ορυκτά καύσιμα. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι το βιολογικής βάσης PET, ένα υβριδικό βιοπλαστικό, είναι δυνητικό καρκινογόνο και επίσης έχει καταστροφικές τοξικές επιδράσεις στα γήινα οικοσυστήματα. (Atiweh et al. 2021a)

2. Σκοπός εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της ικανότητας μικροοργανισμών της ενεργού ιλύος, που συλλέχθηκε από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων του δήμου Πλατανιά, να βιοαποδομήσουν τα βιοπλαστικά PLA (πολυγαλακτικό οξύ) και PHB (πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα) που ήταν σε μορφή μικροπλαστικών. Για να επιτευχθεί αυτό τα μικροπλαστικά τοποθετήθηκαν σε περιβάλλον προσομοίωσης ενεργού ιλύος με τη χρήση φλασκών των 250 ml. Τα δείγματα τέθηκαν σε συνεχή ανάδευση για διάστημα 3 μηνών.

3. Υλικά και μέθοδοι

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

3.1 Υλικά

Μικροπλαστικά

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πολυμερή σε μορφή μικροσφαριδίων (pellets) :

- πολυ-3-υδροξυβουτανικός εστέρας (PHB) .
- πολυγαλακτικό οξύ (PLA) .

Έχουν σφαιρικό σχήμα και η διάμετρο τους είναι κατά μέσο όρο cm. Τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες φιάσκες των 250 ml οι οποίες εμπεριείχαν 100 ml ενεργού ιλύος.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Προετοιμασία Δειγμάτων

Ενεργό ιλύς

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ενεργό ιλύς από τη περιοχή του Δήμου Πλατανιά (ΕΕΛ Γερανίου). Η συλλογή και αποθήκευσή της ενεργό ιλύς έγινε σε μπουκάλια του 1,5 λίτρου.

Φιάσκες

Η προετοιμασία των δειγμάτων ξεκινάει με την αποστείρωση, σε αυτόκαυστο κλίβανο, φλασκών των 250 ml που θα χρησιμοποιηθούν για τη διεξαγωγή του πειράματος. Σε κάθε φιάσκα προστέθηκαν 100 ml ενεργού ιλύος με την χρήση ενός ογκομετρικού κυλίνδρου.

Έπειτα γίνεται η προσθήκη 0,500 gr κατά μέσο όρο PHB και PLA pellets. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη τράπεζα ανάδευσης για διάρκεια 3 μηνών περίπου. Τα pellets πριν τοποθετηθούν στις φλάσκες, αποστειρώθηκαν με διάλυμα 70% αιθανόλης για να απομακρυνθούν οι μικροοργανισμοί που είχαν τυχόν προσκολληθεί και τοποθετήθηκαν σε φούρνο ξήρανσης στους 37°C για 6 ημέρες.

Αβιοτικά δείγματα ελέγχου

Τα αβιοτικά δείγματα ελέγχου περιέχουν 0,500 gr κατά μέσο όρο PHB και PLA pellets. Η παραγωγή τους πραγματοποιήθηκε σε 6 αποστειρωμένες φλάσκες, 3 για κάθε μικροπλαστικό, οι 2 εκ των οποίων περιείχαν 100 ml αποστειρωμένης ενεργού ιλύος και η 1 100 ml αποστειρωμένου νερού βρύσης για το PHB και αντίστοιχα για το PLA. Τα δείγματα καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στον αναδευτήρα.

3.2.2 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιούταν κάθε 30 μέρες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Κάθε φορά απομακρύνονταν από τη τράπεζα ανάδευσης έξι τυχαίες φλάσκες, τρεις για κάθε μικροπλαστικό.
- Με αποστειρωμένη λαβίδα αφαιρούνταν κάθε φορά 3 pellets από κάθε treatment και έμεναν στο θάλαμο σε ανοιχτά τριβλία ώστε στεγνώσουν για διάρκεια 45 λεπτών ώστε αργότερα να πραγματοποιηθεί η χρώση τους με κρυσταλλικό ιώδες.
- Τα λοιπά pellets τοποθετούνταν σε ένα falcon χωρητικότητας 15 ml στο οποίο προθέτονταν 8-10 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και τρεις σταγόνες της ουσίας tween 80. Τα falcons αφήνονταν για ένα μικρό χρονικό διάστημα (1 μέρα) στην τράπεζα ανάδευσης ώστε να απομακρυνθεί το βιοφίλμ που είχε προσκολληθεί στην επιφάνεια των pellets και να μετρηθεί αργότερα η καθαρή διαφορά βάρους τους. Το νερό της πλύσης αποθηκεύονταν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C για περαιτέρω αναλύσεις.
- 50ml από το «διάλυμα» συλλέγονταν και αποθηκευόταν στην κατάψυξη.

3.2.3 Χρώση δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδες (sample staining with crystal violet).

Για την χρώση των δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδες ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Αερισμός των δειγμάτων στον θάλαμο για 45 λεπτά .
2. Χρωματισμός με 1% κρυσταλλικού ιώδους (1 σταγόνα) .
3. Αερισμός των βαμμένων δειγμάτων στον θάλαμο για 45 λεπτά .
4. Πλύση των δειγμάτων με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό .
5. Αερισμός των δειγμάτων στον θάλαμο για 45 λεπτά .
6. Τοποθέτηση σε erpendorf χωρητικότητας 2 ml με 1 ml 95% αιθανόλης για 10 λεπτά.
7. 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.



Εικόνα 3.1: Χρώση δειγμάτων με κρυσταλλικό ιώδες.

3.2.4 Μέτρηση Κυττάρων

Για την μέτρηση των κυττάρων στο κυτταρόμετρο και την διατήρηση τους χρησιμοποιούνται οι ουσίες γλουταραλδεϋδη (glutaraldehyde) και glyte αντίστοιχα. Για κάθε δείγμα, σε eppendorf των 2 ml, προθέτονταν οι παρακάτω ποσότητες:

❖ Glutaraldehyde: 1380 μ l Βιοφιλμ + 120 μ l glutaraldehyde 25%

❖ Glyte: 1350 μ l Βιοφιλμ + 150 μ l glyte

Έπειτα έγινε ανάδευση αυτών με χρήση του αναδευτήρα στροβιλισμού (Vortex). Τα eppendorf που περιείχαν γλουταραλδεϋδη παρέμεναν μία ώρα στο ψυγείο πριν μεταφερθούν στην κατ΄ψυξη όπου φυλάσσονταν για περαιτέρω αναλύσεις, ενώ αυτά που περιείχαν glyte φυλάσσονταν κατευθείαν.

3.2.5 Προσδιορισμός Βάρους

Για τον προσδιορισμό του ξηρού βάρους των pellet ακολουθήθηκε η εξής προεργασία:

- Πλύση των pellets με αιθανόλη 99% .
- Τοποθέτηση σε φούρνο ξήρανσης στους 35 °C για περίπου μια εβδομάδα .
- Μέτρηση ξηρού βάρους των πλαστικών σφαιριδίων κάθε τριβλίου.

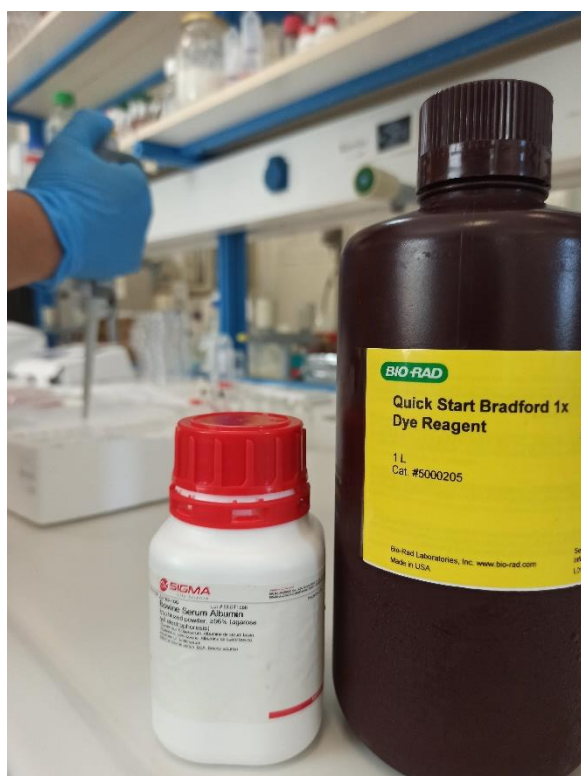
3.2.6 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών

Για την δημιουργία της καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν μικρά γυάλινα μπουκαλάκια. Αρχικά, έγινε η παραγωγή του διαλύματος Α με προσθήκη 10 ml απιονισμένου νερού και 20 mg bovine serum albumin (BSA). Έπειτα ακολουθεί η παραγωγή των εξής αραιώσεων:

- Διάλυμα Β (500 μ g/ml): 7,5 ml H_2O + 5 ml Α
- Διάλυμα C (250 μ g/ml): 2,5 ml H_2O + 2,5 ml Β
- Διάλυμα D (200 μ g/ml): 3 ml H_2O + 2 ml Β
- Διάλυμα Ε (150 μ g/ml): 3,5 ml H_2O + 1,5 ml Β
- Διάλυμα F (125 μ g/ml): 2,5 ml H_2O + 2,5 ml C
- Διάλυμα G (100 μ g/ml): 4 ml H_2O + 1 ml Β

- 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

Έπειτα σε 10 κυψελίδες, μία για κάθε αραιώση από το B – J, προστέθηκε 1 ml Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent και 20 μl αραιώσης B, C, D, ..., J αντίστοιχα για κάθε αραιώση. Το υγρό στις κυψελίδες ομογενοποιείται με την χρήση της πιπέτας. Για κάθε κυψελίδα λαμβάνουμε 3 μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο και αφού υπολογίσουμε τον μέσο όρο δημιουργούμε την καμπύλη. Τέλος, με παρόμοιο τρόπο, δηλαδή με προσθήκη σε κυψελίδες 1 ml Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent και 20 μl Βιοφίλμ (1, 2, 3, ...) υπολογίζουμε τις τιμές απορρόφησης για το βιοφίλμ. Μέσω της καμπύλης γίνεται η αντιστοίχιση και τελικά η εύρεση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.



Εικόνα 3.2: Διαδικασία υπολογισμού ολικών πρωτεϊνών



Εικόνα 3.3: Διαδικασία υπολογισμού ολικών πρωτεϊνών

3.2.7 Φασματοσκοπία Υπέρυθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR)

Μία από τις σημαντικότερες τεχνικές ανάκλασης που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ευρέως από τα φασματοφωτόμετρα FTIR, κυρίως για επιφανειακές αναλύσεις, είναι η τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (attenuated total reflectance, ATR). Είναι κατάλληλη για μελέτη δειγμάτων μεγάλου πάχους ή υψηλά απορροφητικών και αδιαφανών στερεών ή υγρών υλικών που περιλαμβάνουν λεπτά φιλμ και επικαλύψεις, κονιοποιημένα υλικά (σκόνες), νήματα, πάστες, κόλλες, λεπτά υμένα πολυμερών και υδατικά διαλύματα (Κουή et al. 2015). Το βασικό πλεονέκτημα της ATR-FTIR είναι ότι δεν απαιτεί προ επεξεργασία του δείγματος ή ομογενοποίηση του, παρά μόνο μία απειροελάχιστη ποσότητα δείγματος που τοποθετείται σε επαφή με τον κρύσταλλο. Για να επιτυγχάνεται απόλυτη επαφή άρα και σωστή μέτρηση, επιλέγεται πάντα ο κατάλληλος εξοπλισμός, που εξασφαλίζει ότι το δείγμα πιέζεται πάνω στον κρύσταλλο.

Αρχή Λειτουργίας Μηχανήματος

Η λειτουργία του βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης, το οποίο συμβαίνει όταν μία δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας (με υψηλότερο δείκτη διάθλασης, n_1) σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας (με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, n_2) (Κουή et al. 2015). Το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που ανακλάται αυξάνεται όσο μεγαλώνει η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας. Όταν η γωνία πρόσπτωσης θ είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη γωνία θ_c , η οποία αποτελεί συνάρτηση των δεικτών διάθλασης των δύο μέσων ($\theta_c = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1}$) τότε όλες οι προσπίπτουσες ακτινοβολίες ανακλώνται πλήρως στη διεπιφάνεια των δύο μέσων με αποτέλεσμα να συμβαίνει ολική εσωτερική ανάκλαση όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.8 (Κουή et al. 2015).

Ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης χρησιμοποιείται ένας διαφανής κρύσταλλος στην υπέρυθρη ακτινοβολία με υψηλό δείκτη διάθλασης πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο υφίσταται πολλαπλές ολικές ανακλάσεις στον κρύσταλλο, με αποτέλεσμα να διέρχεται από το δείγμα πολλές φορές, από το οποίο και απορροφάται. Η εσωτερική ολική ανάκλαση της ακτινοβολίας στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο μέσων με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός φθίνοντος κύματος, το οποίο διεισδύει κι εκτείνεται στο μέσο με τον χαμηλότερο δείκτη διάθλασης και εξασθενεί στις περιοχές του υπέρυθρου ηλεκτρομαγνητικού φάσματος όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια (Κουή et al. 2015).

Σημαντική παράμετρος σε αυτή τη διαδικασία είναι και το βάθος διείσδυσης του φθίνοντος πεδίου dp (ή της υπέρυθρης ακτινοβολίας στο δείγμα), το οποίο αποτελεί συνάρτηση του μήκους κύματος λ , του δείκτη διάθλασης του κρυστάλλου n_1 , του δείκτη διάθλασης του δείγματος n_2 , και της γωνίας πρόσπτωσης της ακτινοβολίας ως προς την κάθετο στην επιφάνεια του κρυστάλλου θ . Έτσι λοιπόν ένα φάσμα μπορεί να προκύψει μέσω της μέτρησης της αλληλεπίδρασης του φθίνοντος κύματος με το δείγμα. Όταν ένα απορροφητικό υλικό τοποθετηθεί σε επαφή με τον ATR κρύσταλλο, το φθίνον κύμα απορροφάται από το δείγμα και η ένταση του θα εξασθενήσει στις περιοχές μήκους κύματος του IR φάσματος όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια, με αποτέλεσμα η ανάκλαση να είναι χαμηλότερης έντασης. Η μέτρηση και καταγραφή της προκύπτουσας αποσβένουσας ακτινοβολίας συναρτήσει του μήκους κύματος παράγει ένα IR φάσμα που παρουσιάζει ομοιότητα με ένα συμβατικό φάσμα απορρόφησης. (Κουή et al. 2015). Έπειτα το λογισμικό του ATR-FTIR πραγματοποιεί αυτοματοποιημένη επιλογή κορυφών (peak picking), αναγνωρίζει τις κορυφές και προσδιορίζει τους κυματοαριθμούς στην μέγιστη απορρόφηση, διορθώνει το σφάλμα της γραμμής βάσης (baseline correction), την αντιστάθμιση, και εφαρμόζει φασματική εξομάλυνση (spectral smoothing) (Κουτσουμπίδης 2018; Παπαδάκη 2020). Τελικά, από τις σχηματιζόμενες κορυφές αναγνωρίζονται κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στο υπό μελέτη υλικό και κάποιες καινούργιες που υποδεικνύουν την επεξεργασία που έχει υποστεί. Στον Πίνακα 3.4. παρουσιάζονται οι ομάδες που υποδεικνύουν ότι το πολυμερές έχει υποστεί επεξεργασία.

Πίνακας 3. 1: Χαρακτηριστικές ομάδες και κυματοαριθμοί

Χαρακτηριστική Ομάδα	Δομή	Κυματοαριθμός (cm) ⁻¹
Κετόνη	-CO-	1715
Εστέρας	-COO-	1740
Μεθύλιο	-CH ₃ -	1465
Ενώσεις Βινυλίου	H ₂ C=C-	1640
Διπλός Δεσμός	-CH=CH-	908
Υδροξύλιο	-OH	3340

Οι σχέσεις με βάση τις οποίες προκύπτουν οι χαρακτηριστικές ομάδες που μελετήσαμε για να εκτιμήσουμε τις αλλαγές των δεσμών στην επιφάνεια των μικροσφαιριδίων για τον πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα (PHB) και για το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) είναι οι εξής (Albertsson, Andersson, and Karlsson 1987):

- Δείκτης κετόνης = A (1715) / A (1465)
- Δείκτης εστέρας = A (1740) / A (1465)
- Δείκτης ενώσεων βινυλίου = A (1640) / A (1465)
- Δείκτης διπλού δεσμού = A (908) / A (1465) 45

Σημειώνεται ότι A είναι η απορρόφηση που αντιστοιχεί στον ανάλογο κυματοαριθμό.

Ο βαθμός κρυσταλλικότητας εκφράζει το ποσοστό του κρυσταλλικού υλικού επί του συνόλου. Το πολυμερές αποτελείται από κρυσταλλικές και άμορφες περιοχές. Στην δική μας περίπτωση όταν το υλικό αποδομείται, δημιουργούνται άμορφες περιοχές στο πολυμερές, γεγονός που αποτελεί ένδειξη βιοαποδόμησης (Zerbi et al. 1989). Το ποσοστό της κρυσταλλικότητας της επιφάνειας του πολυαιθυλενίου προκύπτει από την ποσοτική αξιολόγηση των άμορφων έναντι των κρυσταλλικών περιοχών, και υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση (Δασενάκης 2019; Παπαδάκη 2020):

$$\text{Κρυσταλλικότητα (\%)} = 100 - \left[\left(1 - \frac{I_a - (1,233 * I_b)}{1 + \frac{I_a}{I_b}} \right) * 100 \right]$$

Όπου:

ο I_a η απορρόφηση στα 730 μήκη κύματος (cm^{-1})

ο I_b η απορρόφηση στα 720 μήκη κύματος (cm^{-1})

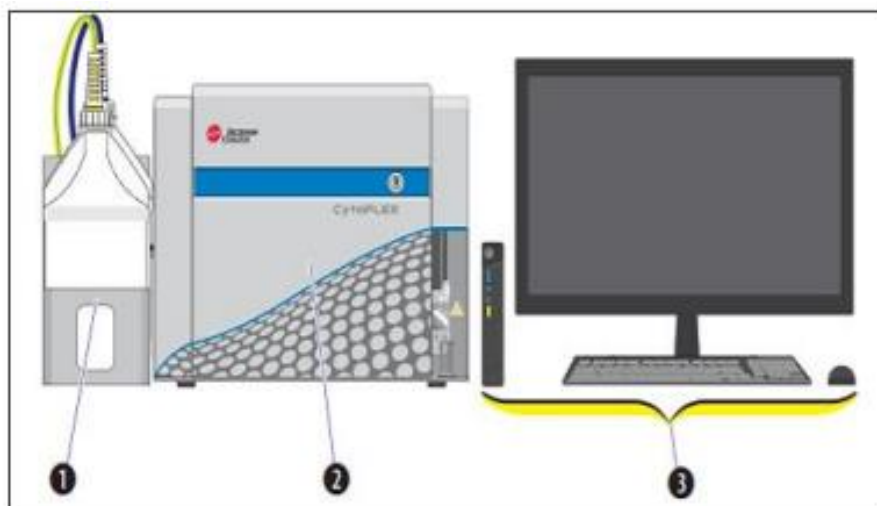
Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία μέτρησης των δειγμάτων δεν απαιτούσε καμία προεργασία. Μετρήθηκαν συνολικά 5 pellet από κάθε τριβλίο (συνολικά 15 από κάθε δειγματοληψία), τα οποία τοποθετούνται πάνω στον κρύσταλλο και με την κεφαλή του μηχανήματος ασκούνταν πίεση μέχρι αυτά να αστοχήσουν. Πάντα από την μία μέτρηση στην άλλη, η επιφάνεια και ο κρύσταλλος καθαρίζονταν με ειδικό πανί.

3.2.8 Κυτταρομετρία ροής (Κυτταρόμετρο CytoFLEX)

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη κυτταρικών πληθυσμών μέσω ανάλυσης της σκέδασης του φωτός από τα κύτταρα καθώς και της εκπομπής φθορισμού από αυτά. Τα κύτταρα, που βρίσκονται σε διάλυμα, διέρχονται μοναδιαία από μία δέσμη

διεγερμένου φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ), το οποίο σκεδάζεται σε διαμορφώσεις χαρακτηριστικές των κυττάρων και του περιεχομένου τους. Τα κύτταρα επισημαίνονται με φθορίζουσες χρωστικές, έτσι ώστε το φως που απορροφάται στη συνέχεια εκπέμπεται σε διαφορετικές συχνότητες (Kaile et al. 2020). Γύρω από τη δέσμη του φωτός που διαπερνάει τη ροή του υγρού υπάρχουν ένας ανιχνευτής σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Ο φθορισμός μπορεί να είναι ενδογενής ή να προέρχεται από εξωγενείς ενώσεις με τις οποίες μαρκάζονται οι κυτταρικοί πληθυσμοί. Κάθε αιωρούμενο σωματίδιο που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά αφού το αναλύσουν δίνουν στοιχεία σχετικά με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ανάλυσης των δεδομένων όπως το ιστόγραμμα, το δυσδιάστατο γράφημα, η τριδιάστατη γραφική παράσταση και το contour plot (Εικόνα 3.11). Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου όπως το σχήμα του πυρήνα ή τον αριθμό κυτταροπλασματικών σωματιδίων.



Εικόνα 3.4: Κυτταρόμετρο CytoFLEX. (Πηγή: <https://www.beckman.com/flow-cytometry/research-flow-cytometers/cytoflex>)

Στο συγκεκριμένο πείραμα για την ποιοτική και ποσοτική μέτρηση των βιολογικών και φυσικών ιδιοτήτων των κυττάρων και άλλων σωματιδίων χρησιμοποιείται το κυτταρόμετρο CytoFLEX της Beckman Coulter Life Sciences. Το όργανο αποτελείται από τρία βασικά

συστατικά: τα δοχεία ρευστών (Fluid Containers) που είναι το σημείο που εισέρχεται η θήκη των ρευστών και των υγρών απόβλητων, το κυτταρόμετρο (Cytometer) που παράγει και συλλέγει τα σήματα και το λογισμικό ανάλυσης δεδομένων κυτταρομετρίας (Workstation) (Beckman Coulter 2015).

Πειραματική διαδικασία

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στα δείγματα που εμπεριείχαν τα erpendorf και είχαν συλλεχθεί κατά την διάρκεια κάθε δειγματοληψίας και φυλάσσονταν στην κατάψυξη. Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν 20 μm nylon net φίλτρα για την αποφυγή εμφράξεων των σωληνώσεων του κυτταρόμετρου. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε αρχικά με φιλτραρισμένα δείγματα των 1000 μL χωρίς βαφή με σκοπό να βρούμε τις ρυθμίσεις που αντιστοιχούν στα δείγματα που επξεργαστήκαμε. Έπειτα, έγινε αραιώση 1:100 λόγω υψηλής συγκέντρωσης κυττάρων όπου προσθέσαμε 990 μL φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό και 10 μL φιλτραρισμένο δείγμα. Για τα δείγματα με βαφή προσθέσαμε 990 μL από το αραιωμένο δείγμα και 10 μL βαφής thiazole green, και τα αφήσαμε για 20 λεπτά στο σκοτάδι πριν τη μέτρηση. Στη συνέχεια, βάλαμε με τη σειρά ένα ένα τα δείγματα στην υποδοχή ώστε να ληφθεί η μέτρηση η οποία αποθηκεύτηκε στην καρτέλα που δημιουργήθηκε.

3.2.9 Μικροσκόπιο

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο Leica DM LB, πιο συγκεκριμένα πρόκειται για ένα μικροσκόπιο φθορισμού το οποίο είναι εξοπλισμένο με υπεριώδεις φως και με λυχνία υδραργύρου. Διευκολύνει τη διαδικασία διάκρισης της φύσης αυτού που παρατηρείται χρησιμοποιώντας την απόκριση φθορισμού των υλικών. Για αυτό το πείραμα η ενεργό ιλύς μετά από διπλή φυγοκέντρωση και κατάλληλες αραιώσεις βαφόταν με nile red. Το nile red είναι μια χρωστική ουσία που έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται επιλεκτικά με τα πλαστικά, βοηθώντας στην ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίησή τους. Οι πλαστικές επιφάνειες μπορούν να προσροφήσουν τη βαφή κάνοντας τα θραύσματα να φθορίζουν όταν ακτινοβολούνται με μπλε φως. (Maes et al. 2017)

3.2.10 Μετρήσεις των παραμέτρων της ενεργού ιλύος (COD, TN, TP)

Για τη μέτρηση των παραμέτρων:

- COD (Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο).
- TP (Ολικός Φώσφορος).
- TN (Ολικό Άζωτο).
- TSS (Ολικά αιωρούμενα στερεά).
- $\text{NO}_{3\text{-N}}$ (Συγκέντρωση αζώτου στην νιτρική μορφή).
- $\text{NH}_{4\text{-N}}$ (Συγκέντρωση αζώτου στην αμμωνιακή μορφή).

Χρησιμοποιήθηκαν τα kits της εταιρίας Hach. Από τα 50 ml «διαλύματος» που συλλέχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν γύρω στα 5 ml για τη μέτρηση αυτών των παραμέτρων.

3.2.11 Διαχωρισμός πυκνότητας με CaCl_2 για την ανάκτηση των μικροπλαστικών και καταμέτρηση.

Για την ανάκτηση των μικροπλαστικών με διαχωρισμό πυκνότητας με CaCl_2 ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Δημιουργία διαλύματος με 150 gr CaCl_2 και 100 ml απιονισμένο νερό (dH_2O) σε μπουκάλι Boro των 500 ml.
2. Ανάδευση διαλύματος βάζοντας μια μαγνητική μπάρα ανάδευσης και τοποθετώντας το σε μια πλάκα ανάδευσης.
3. Σε ένα μπουκάλι Boro των 100 ml τοποθετήθηκαν 20 ml ιλύος του δείγματός, 40 ml του διαλύματος CaCl_2 / dH_2O και τα μικροπλαστικά.
4. Τοποθέτηση του μπουκαλιού Boro στο shaker για μία ημέρα.
5. Αφαίρεση μπουκαλιού Boro από το shaker και παραμονή σε ηρεμία για μία ώρα.
6. Συλλογή υπερκείμενου υγρού με ηλεκτρονική πιπέτα και σιφώνια πλήρωσης των 50 ml και συλλογή μικροπλαστικών με ειδική λαβίδα.
7. Τοποθέτηση του υπερκείμενου υγρού και των μικροπλαστικών σε Falcon των 50 ml.
8. Φυγοκέντρωση για 15 λεπτά με 3500 στροφές.
9. Συλλογή υπερκείμενου υγρού με ηλεκτρονική πιπέτα και σιφώνια πλήρωσης των 50 ml και συλλογή μικροπλαστικών με ειδική λαβίδα.
10. Τοποθέτηση του υπερκείμενου υγρού και των μικροπλαστικών σε Falcon των 50 ml.

11. Φυγοκέντριση για 15 λεπτά με 3500 στροφές.
12. Συλλογή υπερκείμενου υγρού με ηλεκτρονική πιπέτα και σιφώνια πλήρωσης των 50 ml και συλλογή μικροπλαστικών με ειδική λαβίδα, για περεταίρω μετρήσεις.

4. Αποτελέσματα & συζήτηση

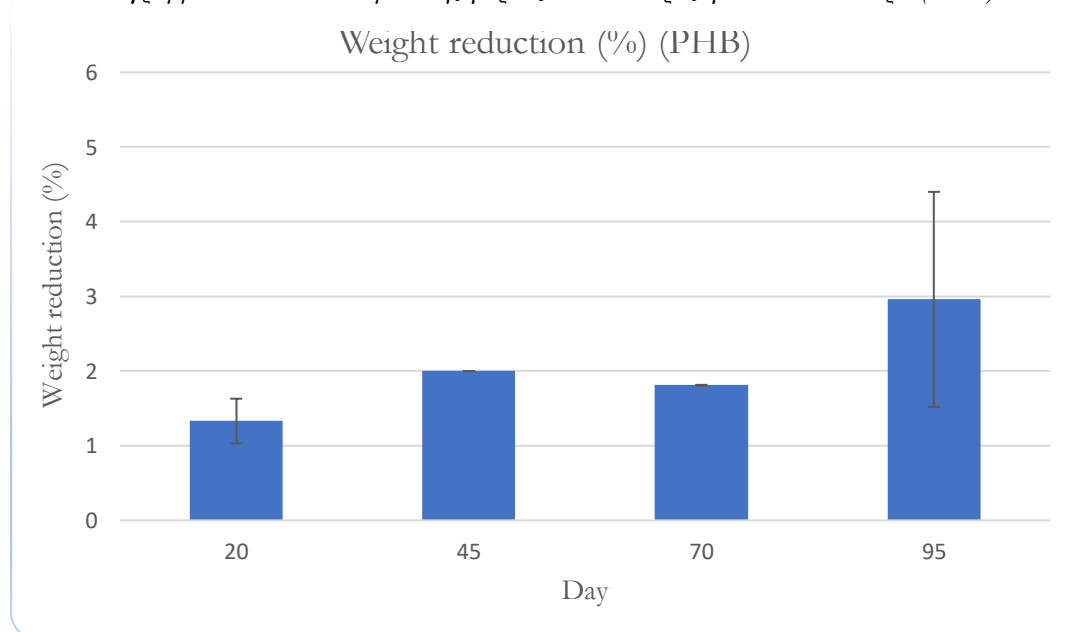
4.1 Μείωση βάρους μικροπλαστικών PLA και PHB

Σε κάθε δειγματοληψία πραγματοποιούνταν μέτρηση του βάρους των pellet πολυγαλακτικού οξέος (PLA) και του πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB) σε κάθε δείγμα που συλλέγονταν. Η απώλεια βάρους, σε ποσοστό επί τοις εκατό (%), αναφέρεται στη διαφορά βάρους μεταξύ του αρχικού και του τελικού βάρους των pellets PLA και PHB η οποία μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τον εξής τύπο:

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

Στο διάγραμμα 4.1 παρουσιάζονται οι μεταβολές βάρους για τον πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα (PHB) ανά τις ημέρες δειγματοληψιών.

Διάγραμμα 4.1: Ποσοστό μείωσης βάρους πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB).



Όσον αφορά τον πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα (PHB) παρατηρείται μια συνεχής μείωση του βάρους, ξεπερνώντας κατά μέσο όρο το 2 % σε αντίθεση με τη μηδαμινή μείωση στο βάρος του πολυγαλακτικού οξέος (PLA) που υπολογίζεται στο 0,27 %.. Αξίζει να σημειωθεί ότι την 70^η ημέρα παρατηρείται μία πτώση στο ποσοστό ενώ στη 95^η ημέρα αυτό αυξάνεται και πάλι. Πιθανότατα, αυτή η πτώση να οφείλεται στο σχεδιασμό του πειράματος καθώς παρατηρείται και μία τάση σταθεροποίησης της μεταβολής του βάρους, που ήταν και ο λόγος ενίσχυσης της δραστηριότητας των μικροοργανισμών της λάσπης με τη προσθήκη θρεπτικού (yeast) .

Αβιοτικά δείγματα

Πίνακας 4.1 :Μείωση βάρους στα αβιοτικά δείγματα

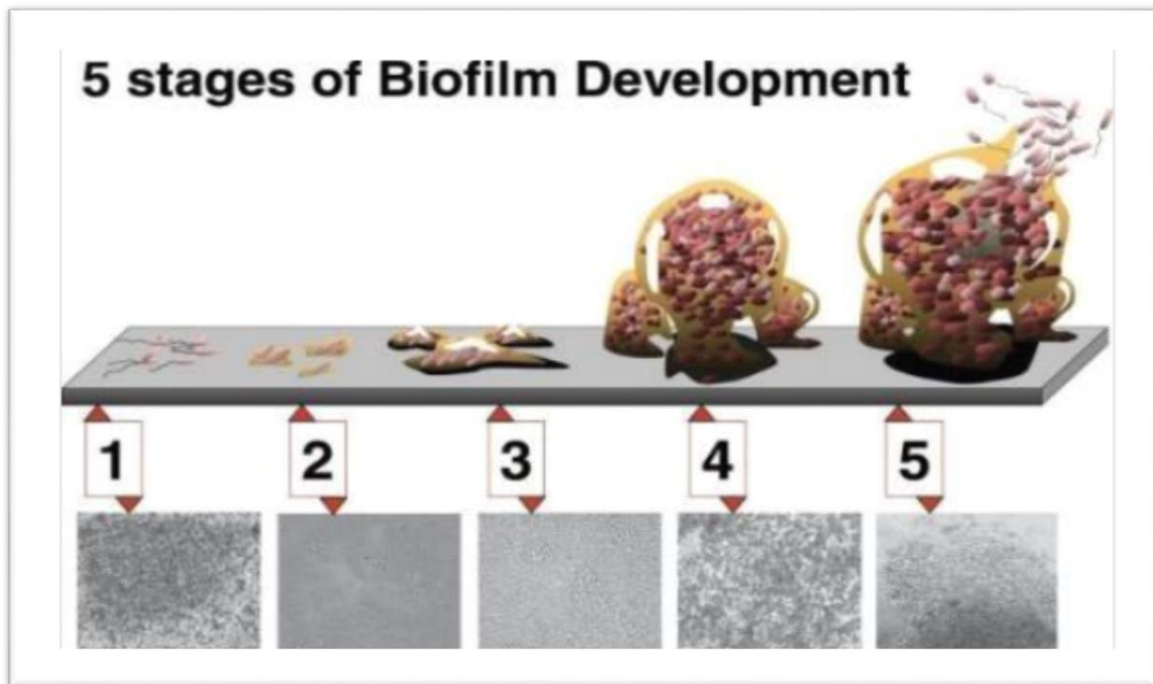
Δείγμα	Μείωση Βάρους (%)
PHB tap water	2.96
PHB sludge	1.82
PLA tap water	0.4
PLA sludge	0.2

Από τον πίνακα 4.1 γίνεται αντιληπτό ότι όσον αφορά και το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) και το πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα (PHB) η μείωση βάρους στα αβιοτικά δείγματα συμφωνεί με αυτή στα βιοτικά. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι ένα μεγάλο κομμάτι της αποδόμησης προέρχεται αποκλειστικά από μηχανικές ιδιότητες όπως είναι η υδρόλυση.

4.2 Μικροβιακοί πληθυσμοί (Βιοφίλμ)

Μικροοργανισμοί όπως τα βακτήρια μπορούν να προσκολληθούν σε φυσικές ή τεχνητές επιφάνειες γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό πολύπλοκων πολυκυτταρικών κοινοτήτων γνωστές ως βιομεμβράνες ή βιουμένια-βιοφίλμ. Ο βακτηριακός αποικισμός σε αβιοτικά υλικά ή βιοτικές επιφάνειες θεωρείται ως βασική στρατηγική επιβίωσης επειδή παρέχει στους μικροοργανισμούς σημαντικά πλεονεκτήματα όπως: αυξημένη πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά, προστασία από τοξίνες και αντιβιοτικά, διατήρηση των δραστηριοτήτων των εξωκυτταρικών ενζύμων και καταφύγιο από περιβαλλοντικές απειλές (Kumar, Anandapandian, and Parthiban 2011). Η ανάπτυξη του βιοφίλμ μπορεί να διαχωριστεί σε πέντε στάδια (Monroe 2007):

- Αρχική προσκόλληση
- Μη αναστρέψιμη προσκόλληση
- Στάδιο αναπαραγωγής
- Ωρίμανση - Δημιουργία κοινοτήτων
- Διασπορά - Οργάνωση σε πολλαπλά επίπεδα



Εικόνα 4.1: Τα πέντε στάδια ανάπτυξης του βιοφίλμ. Κάθε στάδιο ανάπτυξης στο διάγραμμα συνδυάζεται με μία φωτομικρογραφία ενός αναπτυσσόμενου βιοφίλμ *P. aeruginosa*. Όλες οι φωτομικρογραφίες εμφανίζονται στην ίδια κλίμακα. (Monroe 2007)

Τα βιοφίλμ αποτελούνται από εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS), μικροοργανισμούς, πολυσθενή κατιόντα, βιογενή και ανόργανα σωματίδια. Οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS) αποτελούνται από πολυσακχαρίτες (εξωπολυσακχαρίτες), νουκλεϊκά οξέα (eDNA και eRNA), πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα βιομόρια. Τα EPS καθιερώνουν τη λειτουργική και δομική ακεραιότητα των βιοφίλμ και θεωρούνται το θεμελιώδες συστατικό που καθορίζει τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες ενός βιοφίλμ (Karygianni et al. 2020). Ακόμα, είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση βακτηρίων στα υποστρώματα και για το σχηματισμό συγκολλητικών συνδέσεων σε ξένες βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες, αρά συνεπώς και για την ανάπτυξη του βιοφίλμ (Ashton and Williams 2019). Τα EPS αποτελούν το 50% έως 90% της συνολικής οργανικής ύλης ενός βιοφίλμ (Donlan 2002).

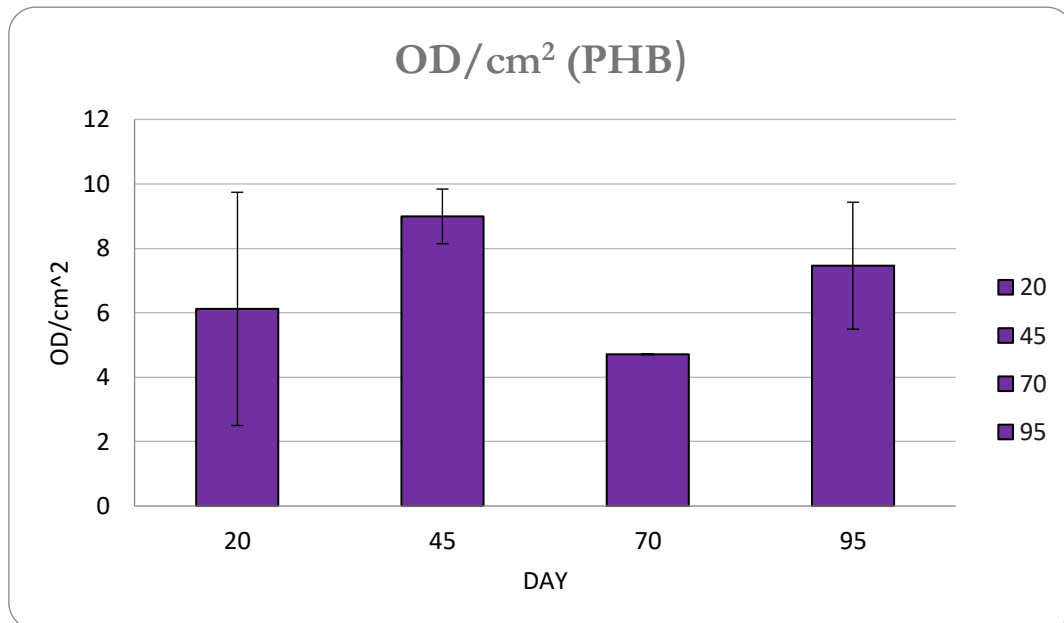
Αλληλεπιδράσεις βιοφίλμ-πλαστικού

Η ικανότητα διαφορετικών υδρόβιων κοινοτήτων να αποικούν και να σχηματίζουν μικροβιακά βιοφίλμ στις επιφάνειες πλαστικών στο περιβάλλον συντελεί πολύ σημαντικό ρόλο στη βιοαποδόμηση τους. Αρχικά, τα προσκολλημένα μικρόβια ξεκινούν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις κατά την επαφή του με την επιφάνεια του πολυμερούς. Οι πολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα του EPS που εκκρίνονται από τους πρώτους αποικιστές της επιφάνειας του πλαστικού (φίλμ), διευκολύνουν τον αποικισμό για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση των ενώσεων άνθρακα του πλαστικού μέσου (Ghosh, Qureshi, and Purohit 2019). Επιπλέον, ο σχηματισμός βιοφίλμ εξασφαλίζει την επιβίωση της μικροβιακής κοινότητας ακόμα και σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα αρκετές φορές να ενισχύεται και η διαδικασία της βιοαποδόμησης των βιοπλαστικών. Πληθώρα ερευνών έχουν μελετήσει την αλληλεπίδραση και την σχέση βιοαποδόμησης και πλαστικών υλικών. Για παράδειγμα ένα μείγμα γηρασμένων τμημάτων PE, PS και PET επώαστηκαν με διαφορετικές μικροβιακές κοινότητες σε χρονικό διάστημα τριών μηνών και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι μικροβιακές κοινότητες μπόρεσαν να προσκολληθούν και να σχηματίσουν πληθυσμούς στις επιφάνειες όλων των τύπων από τον πρώτο κιόλας μήνα με μια τάση να αυξάνονται στον δεύτερο (Ashar et al. 2020). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε θετική μείωση του βάρους σε όλους τους τύπους των πολυμερών σε σχέση με τα αβιοτικά δείγματα ελέγχου (Ashar et al. 2020 , Κυρίτση Σοφία, 2021) .

4.2.1. Ποσοτικός προσδιορισμός ανάπτυξης του βιοφίλμ

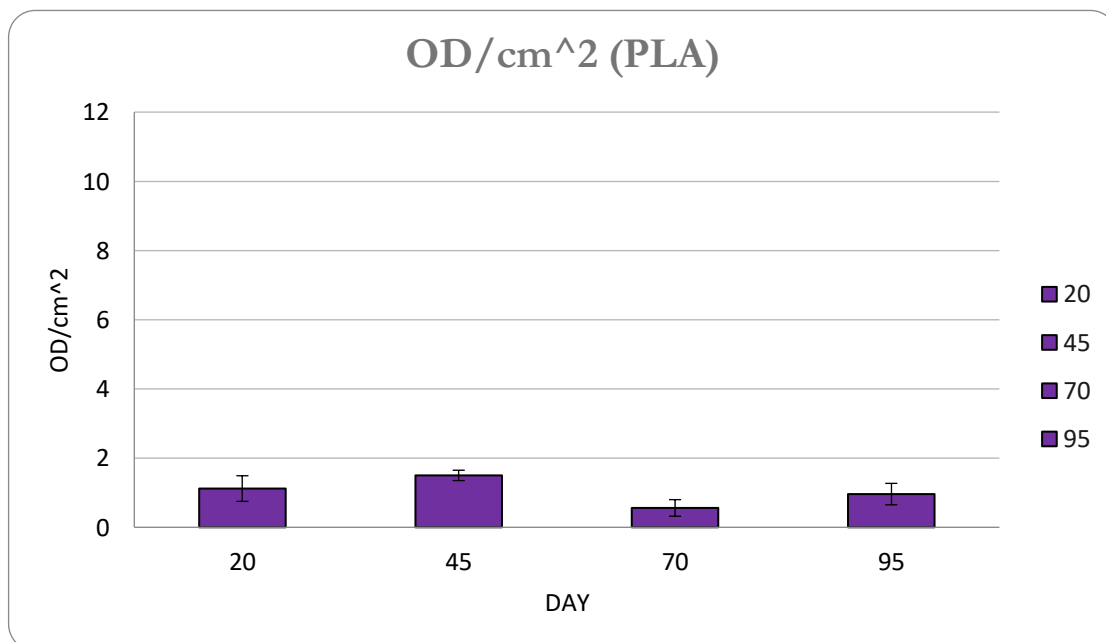
Η ανάπτυξη των βιοφίλμ παρακολούθηθηκε μετρώντας φασματοφωτομετρικά στα 595 nm την οπτική τους πυκνότητα (Optical Density, OD) μέσω της διαδικασίας sample staining with crystal violet (χρώση με κρυσταλλικό ιώδες) που περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 3.2.3. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε τρία pellet από κάθε τριβλίο και υπολογίστηκε ανά μονάδα επιφάνειας (OD/cm²). Το crystal violet είναι μια βαφή τριαρυλομεθανίου που χρησιμοποιείται ως ιστολογική χρώση για την ταξινόμηση των βακτηρίων. Έχει αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και ανθελμινθικές ιδιότητες. Η συγκεκριμένη βαφή χρησιμοποιείται επίσης και στην δημοφιλή μέθοδο του Hans Christian Gram που αναπτύχθηκε το 1884 και ονομάστηκε χρώση κατά Gram, μια τεχνική που στηρίζεται στην ικανότητα του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων να συγκρατούν το κρυσταλλικό ιώδες κατά την επεξεργασία με διαλύτες. Στην δική μας περίπτωση χρησιμοποιούμε το crystal

violet για να μετρήσουμε το βιοφίλμ που αναπτύχθηκε στην επιφάνεια των PLA και PHB. Στο διάγραμμα 4.2 παρουσιάζεται η έκταση του βιοφίλμ στην επιφάνεια των PHB pellets.



Διάγραμμα 4. 2: Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των PHB pellet.

Στο διάγραμμα 4.3 παρουσιάζεται η έκταση του βιοφίλμ στην επιφάνεια των PLA pellets.



Διάγραμμα 4. 3: Μέτρηση της έκτασης του βιοφίλμ στην επιφάνεια των PLA pellet

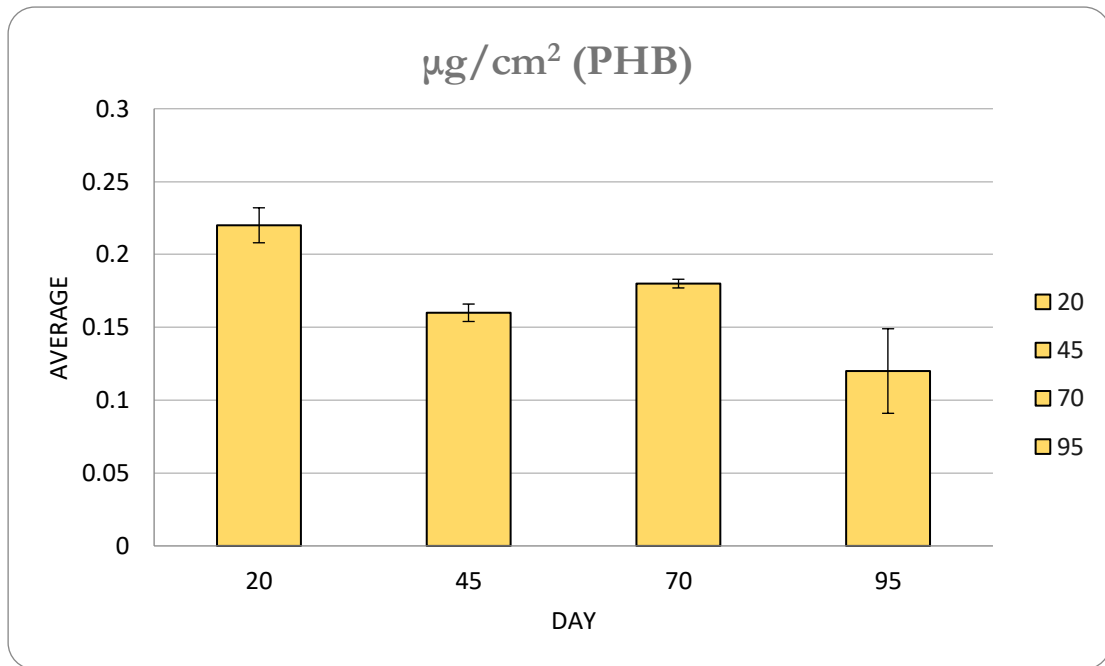
Όσον αφορά το PHB παρατηρείται αύξηση της έκτασης του βιοφίλμ πάνω στα μικροπλαστικά στις δύο πρώτες δειγματοληψίες από έναν μέσο όρο, από τα τρία δείγματα που συλλέχθηκαν σε κάθε δειγματοληψία, της τάξης του 6,12 OD/cm² στο 8,99 OD/cm². Όπως ακριβώς και στη μείωση του βάρους, έτσι και εδώ στη τρίτη δειγματοληψία (Day 70) έχουμε μείωση της έκτασης του βιοφίλμ στο 7,23 OD/cm² ενώ στη τελευταία δειγματοληψία, μετά από σχεδόν 3 μήνες, αυξάνεται η έκταση του βιοφίλμ περισσότερο από τις υπόλοιπες δειγματοληψίες στο 12,91 OD/cm².

Αντίστοιχα, στο PLA παρατηρείται επίσης αύξηση της έκτασης του βιοφίλμ πάνω στα μικροπλαστικά στις δύο πρώτες δειγματοληψίες από το 1,12 OD/cm² στο 1,5 OD/cm². Όπως και στο PHB, παρατηρείται μείωση της έκτασης του βιοφίλμ στη τρίτη δειγματοληψία (Day 70) στο 0,56 OD/cm² ,ενώ αξίζει να σημειωθεί πως στη τέταρτη και τελευταία δειγματοληψία (Day 95) η έκταση αυξάνεται σε σχέση με τη προηγούμενη της δειγματοληψία στο 0,96 OD/cm² αλλά έχει μικρότερη τιμή από τις δύο πρώτες (Day 20 & Day 45) .

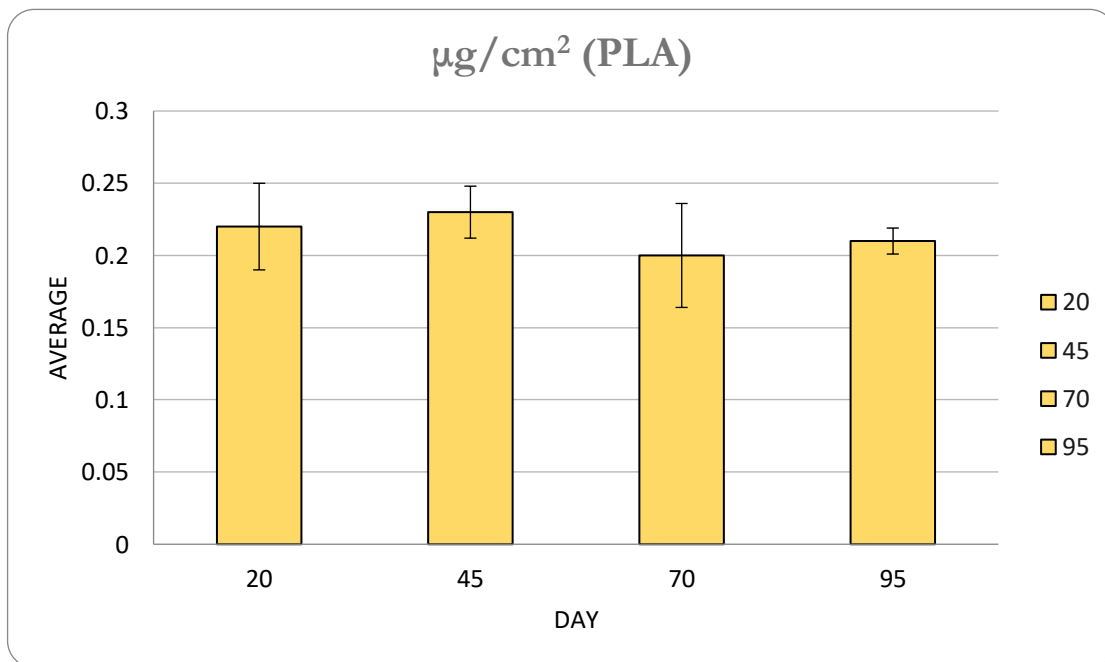
4.2.2 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι πολύπλοκες, πολυδιάστατες ουσίες και αποτελούν ένα από τα βασικότερα δομικά συστατικά των κυττάρων. Συναντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και έχουν μεγάλη θρεπτική αξία, ενώ ταυτόχρονα συμμετέχουν σε μια πληθώρα διαδικασιών του οργανισμού όπως, η αναπαραγωγή, η θρέψη, κ.α. Είναι οργανικά μακρομόρια με μοριακό βάρος από 10.000 μέχρι πάνω από 1 εκατομμύριο, και αποτελούνται από αμινοξέα ενωμένα μεταξύ τους μέσω πεπτιδικών δεσμών οι οποίοι σχηματίζονται από την ένωση της καρβοξυλομάδας ενός αμινοξέος με την αμινομάδα του επόμενου με ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου νερού. Η ακολουθία των αμινοξέων καθορίζεται από ένα γονίδιο και κωδικοποιείται κατά τον γενετικό κώδικα DNA. Έτσι, πρωτεΐνες που έχουν παρόμοια λειτουργία έχουν και παρόμοια σύνθεση και αλληλουχία αμινοξέων. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες περιέχονται στα EPS και διαδραματίζουν μεγάλο ρόλο ως δομικές, ενζυμικές πρωτεΐνες, καθώς και στην αποδόμηση των EPS (Haurowitz and Koshland 2020).

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford στα δείγματα του βιοφίλμ και υπολογίστηκε ανά μονάδα επιφάνειας. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στον πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα (PHB) και στο πολυγαλακτικό οξύ (PLA) εμφανίζονται στα διαγράμματα 4.5 & 4.6 που παρουσιάζονται παρακάτω:



Διάγραμμα 4. 4: Συγκέντρωση πρωτεϊνών πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)



Διάγραμμα 4. 5: Συγκέντρωση πρωτεϊνών πολυγαλακτικού οξέος (PLA) ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

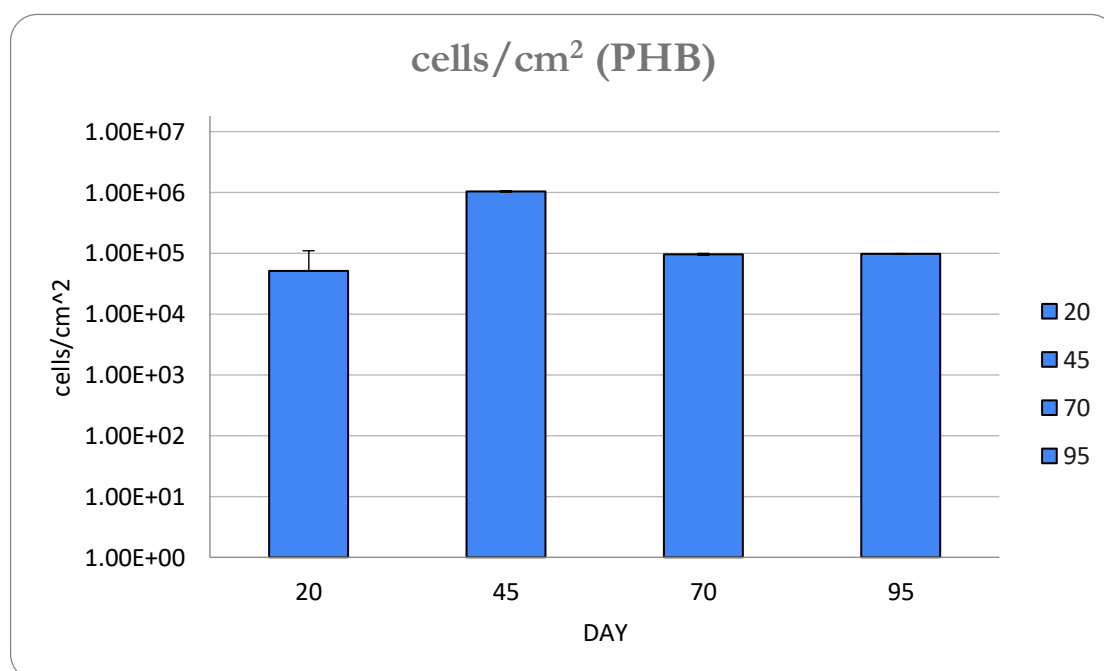
Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 4.5 για τα δείγματα του πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB) κατά τη τριμηνή δειγματοληψία παρατηρείτε μια μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα. Πιο αναλυτικά, υπολογίστηκαν συγκεντρώσεις: $0.220 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $0.160 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $0.180 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ και $0.120 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ αντιστοίχως. Ωστόσο στην τρίτη

δειγματοληψία παρατηρείται μια σχετικά μικρή αύξηση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών σε σχέση με τη δεύτερη δειγματοληψία. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στις oligοτροφικές συνθήκες που επικράτησαν στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ή και στην προσπάθεια προσαρμογής των μικροοργανισμών σε αυτές. Η σημαντικότερη πληροφορία που λαμβάνεται από τις συγκεκριμένες μετρήσεις είναι η επιβεβαίωση της ικανότητας επιβίωσης των μικροοργανισμών κατά την διάρκεια και των τριών μηνών.

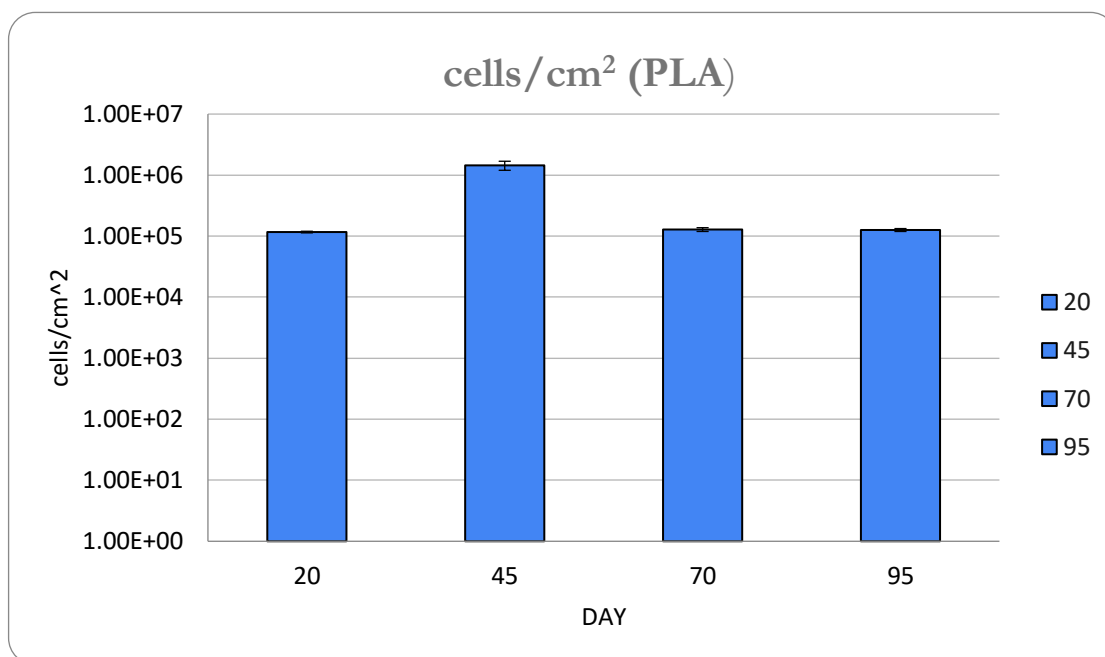
Όσον αφορά το διάγραμμα 4.6 και τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο πολυγαλακτικό οξύ (PLA) παρατηρείται παρόμοια μείωση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ανά δειγματοληψία. Πιο αναλυτικά, υπολογίστηκαν συγκεντρώσεις: $1.830 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $0.230 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $0.200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ και $0.210 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ αντιστοίχως. Ο μέσος όρος συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών στο πολυγαλακτικό οξύ είναι μεγαλύτερος από αυτόν στον πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα. Επίσης, παρατηρείται πως η συγκέντρωση πρωτεϊνών στη πρώτη δειγματοληψία (Day 20) ακολουθεί μία ακραία τιμή η οποία πιθανότατα οφείλεται σε καποιού είδος σφάλμα.

4.2.3 Μέτρηση Κυττάρων (Κυτταρόμετρο CytoFLEX)

Η μελέτη των κυτταρικών πληθυσμών στα δείγματα μας πραγματοποιήθηκε μέσω του κυτταρόμετρου CytoFLEX. Η κυτταρομετρία ροής παρουσιάζεται στα διαγράμματα 4.7 & 4.8.



Διάγραμμα 4. 6: Συγκέντρωση κυττάρων στο βιοφίλμ των PHB pellets.



Διάγραμμα 4. 7: Συγκέντρωση κυττάρων στο βιοφίλμ των PLA pellets.

Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα οι συγκεντρώσεις των κυττάρων είναι αρκετά υψηλές αλλά και σχετικά σταθερές ταυτόχρονα ανά τις ημέρες των δειγματοληψιών. Αυτό αλλάζει μόνο στη δεύτερη δειγματοληψία (Day 45), όπου έχουμε μεγάλη αύξηση στους πλυθισμούς των κυττάρων, μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από όλες τις άλλες ημέρες δειγματοληψίας.

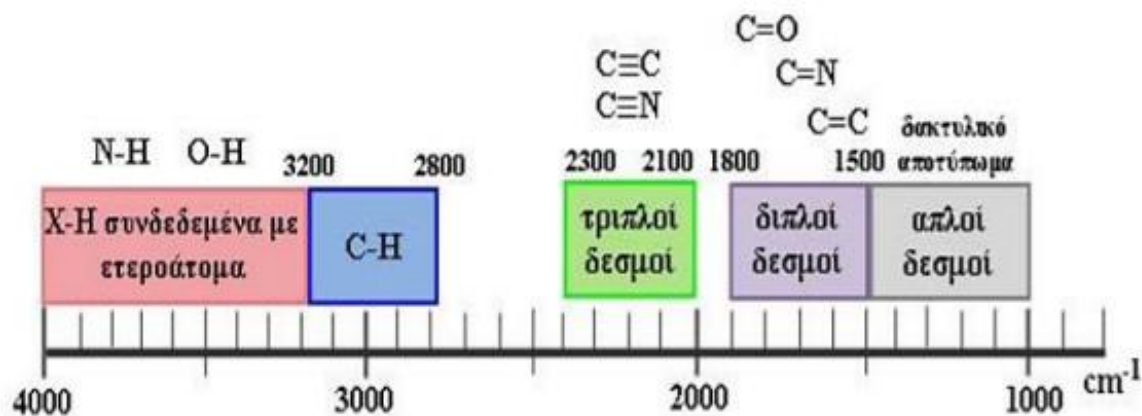
4.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με την τεχνική της Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (FTIR-ATR)

Στον τομέα της επιστήμης και τεχνολογίας των πολυμερών η φασματοσκοπία χρησιμοποιείται σε βιομηχανικές εφαρμογές αλλά και στον ερευνητικό τομέα. Αποτελεί μία από τις σπουδαιότερες αναλυτικές μεθόδους, και χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση των ομοιοπολυμερών, συμπολυμερών και μειγμάτων πολυμερών, καθώς και τον χαρακτηρισμό της μοριακής δομής τους (τακτικότητα, διακλάδωση, κρυσταλλικότητα, δεσμοί υδρογόνου, προσανατολισμός), τη μέτρηση του βαθμού πολυμερισμού και τον έλεγχο των διαφόρων διεργασιών πολυμερισμού, την εξέταση των επιφανειακών ιδιοτήτων των πολυμερών, καθώς και τη μελέτη και διερεύνηση των διεργασιών και μηχανισμών αποσύνθεσής τους (Κεφάλαιο 7. Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση n.d.). Στο πείραμα μας, η φασματοσκοπία ATR

χρησιμοποιείται ώστε να μπορέσει να γίνει ανίχνευση των οξειδώσεων της επιφάνειας του πολυγαλακτικού οξέος (PLA) και του πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB) , να παρατηρηθούν οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των χαρακτηριστικών ομάδων που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένους κυματοαριθμούς και να εντοπιστούν τυχόν καινούργιες χαρακτηριστικές ομάδες κατά την διάρκεια του πειράματος, δηλαδή κατά τη γήρανση και αποδόμηση.

4.3.1 Χαρακτηριστικά φάσματα

Το φάσμα απορρόφησης υπερύθρου αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει ως δακτυλικό αποτύπωμα (fingerprint) της ένωσης και της διαμόρφωσης των χαρακτηριστικών ομάδων της. Επιπλέον, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στην ποιοτική ανάλυση και για την απόδοση της μοριακής δομής μιας ένωσης, παρέχοντας πληροφορίες για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο, και τη διάταξή τους στον χώρο (Κουή et al. 2015). Υπάρχουν κάποιες βασικές αρχές που κάνουν την μελέτη των φασμάτων IR παρά την πολυπλοκότητα τους πιο εύκολη. Μια από αυτές είναι ότι τα μόρια που έχουν την ίδια χαρακτηριστική ομάδα ατόμων (π.χ. CH₃, C≡C, NO₂, OH,) απορροφούν περίπου στην ίδια περιοχή υπερύθρου (Βαλαβανίδης 2006). Έτσι, το μέσο υπέρυθρο φάσμα (MIR) υποδιαιρείται ανάλογα με τις χαρακτηριστικές ομάδες του μορίου σε επιμέρους περιοχές. Σημειώνεται ότι το μέσο υπέρυθρο (MIR) φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 2,5 μm έως 25 μm και αντιστοιχεί στους κυματοαριθμούς 4.000-400 cm⁻¹ (Κουή et al. 2015).



Εικόνα 4.2: Διαχωρισμός του IR φάσματος σε επιμέρους περιοχές, όπου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ομάδες οργανικών ενώσεων.

Πιο αναλυτικά, οι περιοχές χαρακτηριστικών ομάδων είναι οι εξής:

(4000-1500 cm^{-1}):

- 4000-2500 cm^{-1} : Δονήσεις τάσης δεσμού (επιμήκυνση - συμπίεση) O-H, N-H, C-H
- 2500-2000 cm^{-1} : Δονήσεις τάσης $\text{-C}\equiv\text{C-}$, $\text{R-C}\equiv\text{N}$ (τριπλός δεσμός)
- 2000-1500 cm^{-1} : Δονήσεις τάσης -C=C- , -C=O , C=N (διπλός δεσμός)
- 1500-400 cm^{-1} : Περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος

Στην εικόνα 4.3 παρουσιάζεται ένας αναλυτικός πίνακας χαρακτηριστικών ομάδων του MIR φάσματος καθώς και τους κυματαριθμούς στους οποίους αντιστοιχούν.

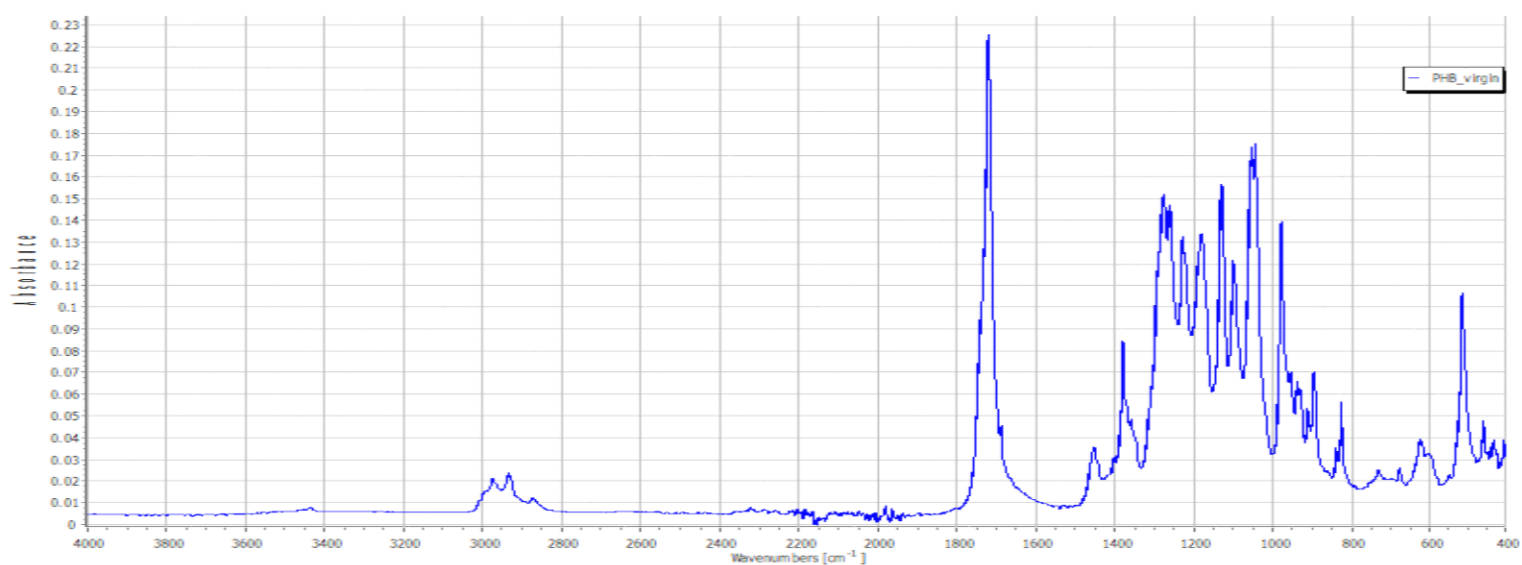
Functional Group	Absorption (cm^{-1})	Intensity	Functional Group	Absorption (cm^{-1})	Intensity
Alkane C-H	2850-2960	Medium	Amine N-H	3300-3500	Medium
Alkene =C-H	3020-3100	Medium	C-N	1030-1230	Medium
C=C	1640-1680	Medium	Carbonyl compound C=O	1670-1780	Strong
Alkyne =C-H	3300	Strong	Aldehyde	1730	Strong
C=C	2100-2260	Medium	Ketone	1715	Strong
Alkyl halide C-Cl	600-800	Strong	Ester	1735	Strong
C-Br	500-600	Strong	Amide	1690	Strong
Alcohol O-H	3400-3650	Strong, broad	Carboxylic acid	1710	Strong
C-O	1050-1150	Strong	Carboxylic acid O-H	2500-3100	Strong, broad
Arene C-H	3030	Weak	Nitrile C=N	2210-2260	Medium
Aromatic ring	1660-2000	Weak	Nitro NO ₂	1540	Strong
	1450-1600	Medium			

Εικόνα 4.3: Χαρακτηριστικές ομάδες και οι κυματαριθμοί τους (Βαλαθανίδης 2006).

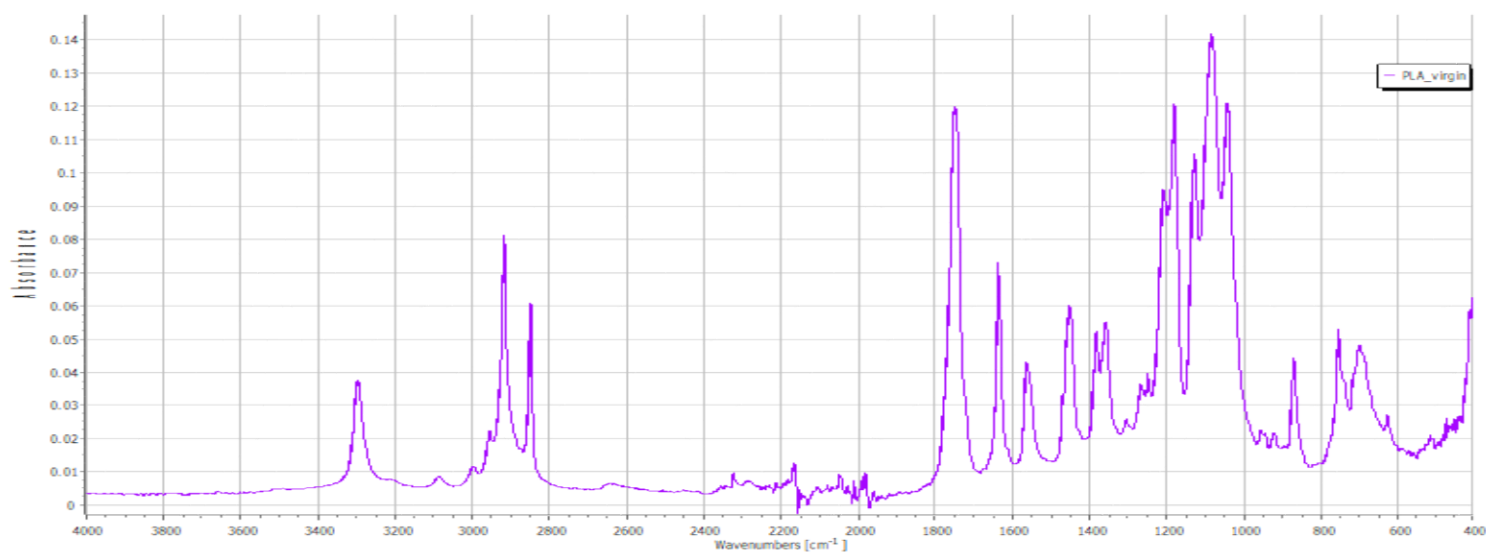
Πίνακας 4.2: Τιμές δείκτη δεσμού καρβονυλίου (CI)

DAY	PLA	PHB
0	0.66 (± 0.092)	10.34 (± 1)
20	1.73 (± 0.018)	5.5 (± 1.2)
45	1.65 (± 0.079)	7.89 (± 0.84)
70	1.67 (± 0.063)	8.38 (± 0.98)
95	1.55 (± 0.035)	7.52 (± 1.03)

Στην εικόνα 4.4 και 4.5 παρουσιάζεται η φασματογραφία του πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB) και του πολυγαλακτικού οξέος (PLA), αντίστοιχα, χωρίς αυτά να έχουν υποστεί οποιαδήποτε επεξεργασία ή αποδόμηση (virgin) .

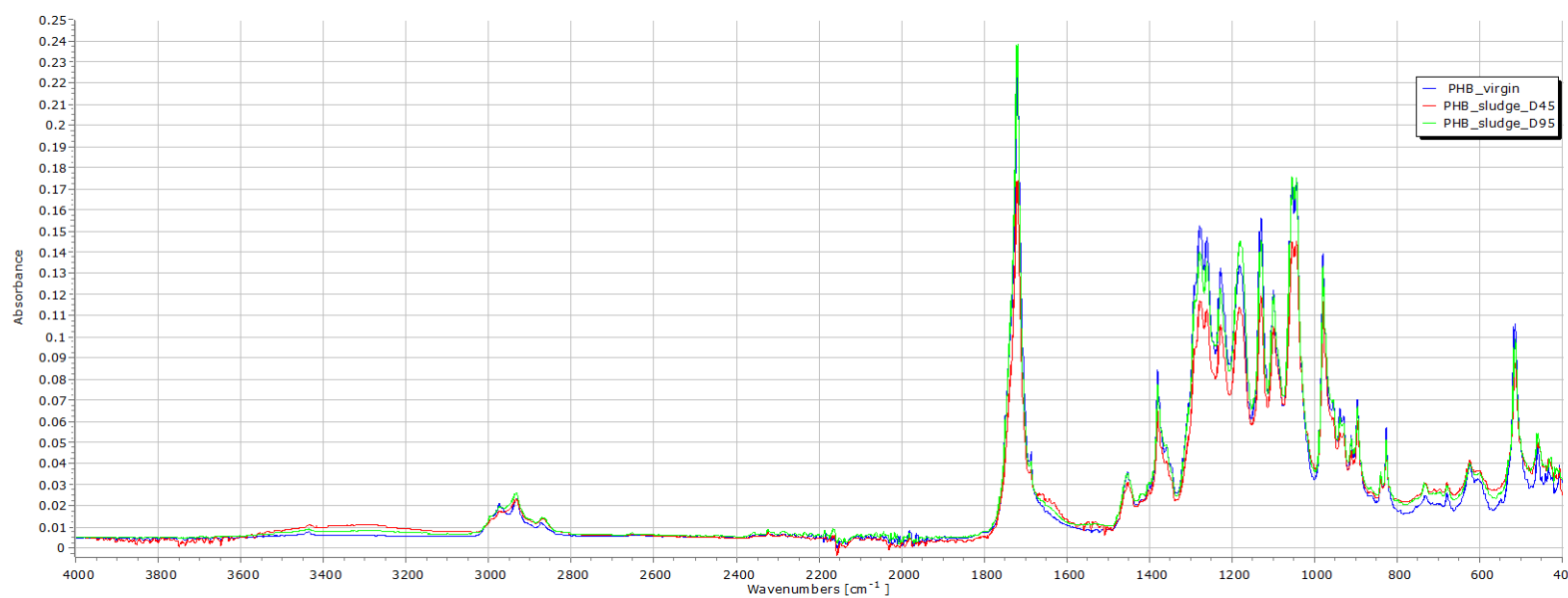


Εικόνα 4.4: Φασματογραφία παρθένου πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB).

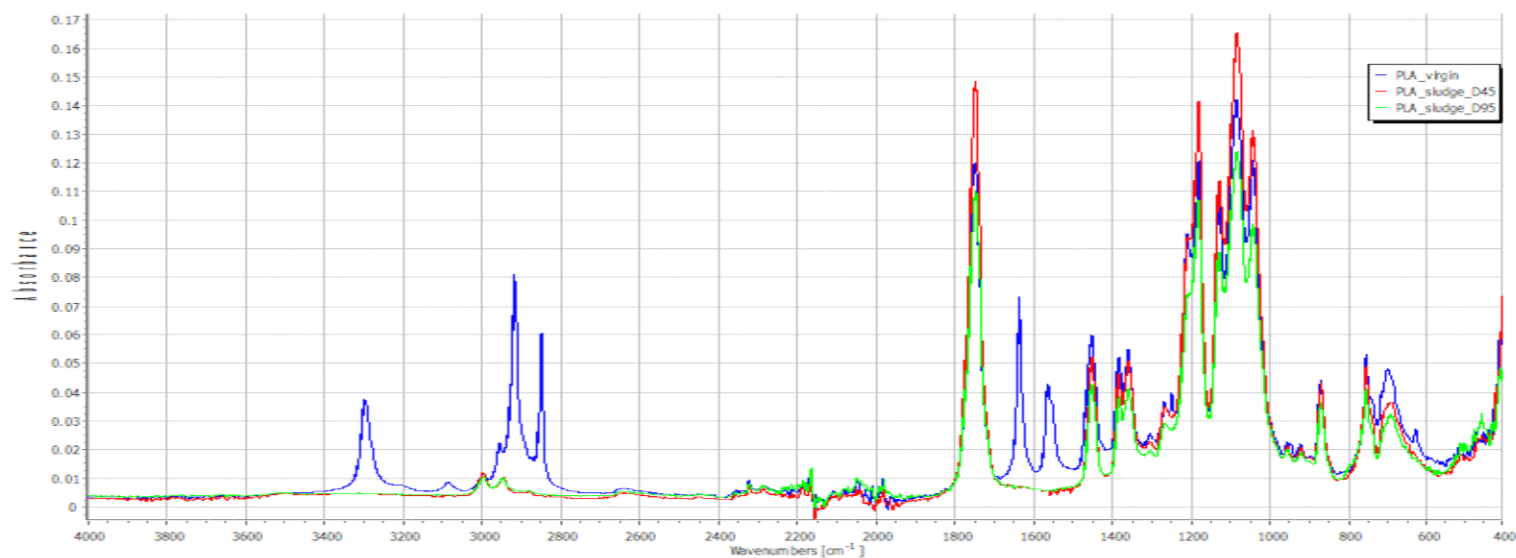


Εικόνα 4.5: Φασματογραφία παρθένου πολυγαλακτικού οξέος (PLA).

Η φασματογραφία των δύο βιοπλαστικών παρουσιάζεται στα παρακάτω διαγράμματα όπου υπάρχει σύγκριση μεταξύ των παρθένων pellet (DAY 0) και των pellet από την ενδιάμεση (DAY 45) και τη τελική δειγματοληψία (DAY 95).



Εικόνα 4.6: Φασματογραφία πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB).



Εικόνα 4.7: Φασματογραφία πολυγαλακτικού οξέος (PLA).

Όσον αφορά τον πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα (PHB), εντοπίζονται μεγαλύτερες διαφορές ανάμεσα στα pellets της μέσης δειγματοληψίας (DAY 45) με τα παρθένα pellets και με τα pellets της τελευταίας δειγματοληψίας (DAY 95). Οι διαφορές στις κορυφές συναντώνται στα 1659 cm^{-1} που αφορά κυκλικά αλκένια ($C = C$), στα 1530 cm^{-1} και στα 1514 cm^{-1} όπου αντιστοιχεί σε νιτρικές ενώσεις ($N - O$), στα 1420 cm^{-1} που μεταφράζεται σε καρβοξυλικό οξύ ($O - H$) και τέλος στα 547 cm^{-1} όπου αναφέρεται στις ενώσεις με αλογόνο ($C - I$) και ($C - Br$).

Από την άλλη πλευρά, οι νέες κορυφές του πολυγαλακτικού οξέος (PLA), παρατηρούνται στα 3298 cm^{-1} και στα 3086 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε καρβοξυλικό οξύ ($O - H$), στα 2956 cm^{-1} και στα 2919 cm^{-1} που αφορά άλατα ($N - H$), στα 2848 cm^{-1} όπου αναφέρεται στα αλκάνια ($C - H$), στα 1636 cm^{-1} που εντοπίζονται τα αλκένια ($C = C$) και στα 629 cm^{-1} όπου αφορά ενώσεις με αλογόνο ($C - Br$).

4.4 Μικροσκοπιο

Πίνακας 4.3: Μέτρηση μικροπλαστικών στο μικροσκοπιο.

Δείγμα	Μικροπλαστικά
DAY 0	
Αρχική Ιλύς	409 (± 247.7)
DAY 20	
PHB	4226 (± 1566.7)
PLA	8460 (± 9124.1)
DAY 45	
PHB	14100 (± 4106.1)
PLA	14689 (± 7651.5)
DAY 70	
PHB	7344 (± 7230.2)
PLA	5256 (± 2466.8)
DAY 95	
PHB	17267 (± 6309.1)
PLA	17800 (± 2916.8)

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 4.1, η διαφορά στη ποσότητα των μικροπλαστικών ανάμεσα στην αρχική ιλύς και στις υπόλοιπες δειγματοληψίες είναι εμφανής. Αρχικά, η ποσότητα ήταν της τάξεως των εκατοντάδων ενώ με το πέρας των 3 μηνών εκτοξεύθηκαν στη τάξη των χιλιάδων.

Αβιοτικά δείγματα

Πίνακας 4.4: Μέτρηση μικροπλαστικών αβιοτικών δειγμάτων στο μικροσκόπιο.

Δείγμα	Μικροπλαστικά
PHB tap water	2267 (\pm 550.8)
PHB sludge	4300 (\pm 1697.1)
PLA tap water	3500 (\pm 556.8)
PLA sludge	2450 (\pm 777.8)

Επίσης, στα αβιοτικά δείγματα παρατηρείται πληθώρα μικροπλαστικών που αποδεικνύει ότι μέρος της βιοαποδόμησης των βιοπλαστικών οφείλεται και σε μηχανικές ιδιότητες όπως είναι η υδρόλυση.

4.5 Χημικά χαρακτηριστικά

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 3.2.10 για τη μέτρηση των παραμέτρων της ενεργού ιλύος όπου εμπεριείχε τα pellets των PLA και PHB χρησιμοποιήθηκαν τα kits της εταιρείας Hatch ακολουθώντας τα βήματα που αναφέρουν. Μετά το πέρας των τριών σχεδόν μηνών τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

Πίνακας 4.5: Χημικά χαρακτηριστικά ενεργού ιλύος.

Χημικά Χαρακτηρ. Είδος	TP (mg/L)	TN (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	COD (mg/L)	TSS (mg/L)
DAY 0						
Αρχική Ιλύς	19,7	66,6	8,47	2,67	2415	-
DAY 20						
PHB	28 (\pm 1,61)	276,33 (\pm 16,56)	-	>3,5	3310,67 (\pm 524)	5000 (\pm 2645,75)
PLA	26,23 (\pm 1,75)	226,33 (\pm 34,5)	-	>3.5	2873,33 (\pm 111,54)	4000 (\pm 1000)
DAY 45						
PHB	31 (\pm 1,58)	279 (\pm 46,97)	9,47 (\pm 0,38)	>3.5	2424 (\pm 362,14)	1087,67 (\pm 487,31)
PLA	30,97	296,83	10,36	>3.5	2936,67	644,33

	(± 2,45)	(± 91,98)	(± 1,47)		(± 394,39)	(± 525)
DAY 70						
PHB	3,84 (± 0,99)	568 (± 22,55)	13,5 (± 0)	18,6 (± 0,36)	2294 (± 387,49)	1320 (± 566,66)
PLA	3,06 (± 1,34)	876,67 (± 609,62)	13,50	20,00 (± 1,75)	2658,67 (± 214,07)	2663,33 (± 966,56)
DAY 95						
PHB	3,73 (± 1,36)	970 (± 113,03)	68,1 (± 61,19)	2,76 (± 0,46)	2715 (± 364,59)	3333,33 (± 577,35)
PLA	2,93 (± 0,62)	857,50 (± 159,10)	65,60 (± 28,77)	>2.5	3089,33 (± 230,67)	3000 (± 1000)

Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του πίνακα 4.1 τα ολικά φωσφορικά (TP – Total Phosphorus), παρέμειναν σταθερά για τη 1^η (Day 20) και για τη 2^η (Day 45) δειγματοληψία ενώ στη 3^η (Day 70) και 4^η (Day 95) δειγματοληψία εμφανίζεται μία μείωση κοντά στα 30 mg/L. Όσον αφορά τα ολικά νιτρικά (TN – Total Nitrogen), για τον πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα (PHB) παρατηρείται μία σταθερότητα στη 1^η και στη 2^η δειγματοληψία, ενώ μία μικρή αύξηση διαπιστώνεται στη 3^η δειγματοληψία η οποία κορυφώνεται στην 95^η ημέρα κατά 400 mg/L περίπου πιθανότατα λόγω προσθήκης του θρεπτικού (yeast). Για το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) παρατηρείται παρόμοια σταθερότητα στις δύο πρώτες δειγματοληψίες ενώ μία αύξηση της τάξεως των 600 mg/L παρουσιάζεται στις δύο τελευταίες. Ακόμα, η συγκέντρωση του αζώτου στη νιτρική μορφή (NO₃ – N) και για τα δύο μικροπλαστικά PLA και PHB εκδηλώνει μία σταθερότητα στις τρεις πρώτες δειγματοληψίες ενώ στην 95^η ημέρα η αύξηση είναι σημαντική, κοντά 50 mg/L, πιθανότατα λόγω θρεπτικού (yeast) και πάλι. Τα ολικά αιωρούμενα στερεά (TSS – Total Suspended Solids), εμφανίζουν μία σταθερότητα για το PHB στη 1^η και στη 4^η δειγματοληψία ενώ στη 2^η και στη 3^η παρατηρείται μία μείωση η οποία οφείλεται σε λάθοι κατά τη διαδικασία. Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζει και το PLA με μία σταθερότητα σε όλες τις δειγματοληψίες εκτός από τη δεύτερη που μειώνονται κατά πολύ τα TSS για τον ίδιο λόγο. Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD – Chemical Oxygen Demand), εκδηλώνει μεγάλη σταθερότητα και για τα δύο είδη μικροπλαστικών καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (3 μήνες).

5. Συμπεράσματα

Στη παρούσα διπλωματική εργασία διερευνάται η δυνατότητα των μικροοργανισμών της ενεργού ιλύος να βιοαποδομήσουν τα βιοπλαστικά PLA ή αλλιώς πολυγαλακτικό οξύ και το PHB ή αλλιώς πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα. Το πείραμα διήρκεσε για περίπου 3 μήνες (95 ημέρες) και μέσω των αποτελεσμάτων βγήκαν τα εξής συμπεράσματα:

Βάρος

Όσον αφορά το βάρος παρατηρείται μία μείωση για το PHB κοντά στο 3% ενώ για το PLA οι διαφορές είναι μηδαμινές. Η μείωση αυτή και γενικά η ικανότητα βιοδιάσπασης του PHB έχει καταγραφεί και σε άλλες επιστημονικές μελέτες (Briese et al. 1994; Dircks et al. 2001; Gilmore et al. 1993) . Πιο συγκεκριμένα, οι (Briese et al. 1994) παρατήρησαν, σε περιβάλλον με $7.5 < \text{pH} < 8$, μείωση του βάρους σε ποσοστά 60%, 85% και 100% μετά από 4,8 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα. Η μείωση αυτή των μικροπλαστικών του πειράματος μας, δεν οφείλεται μόνο στην ικανότητα των μικροοργανισμών να βιοαποδομήσουν τα PHB βιοπλαστικά αλλά γενικά στην ικανότητα βιοαποδόμησης του συγκεκριμένου πολυμερούς καθώς παρόμοια μείωση βάρους παρατηρήθηκε και στα αβιοτικά δείγματα (βλ. Πίνακα 4.1), η οποία οφείλεται σε μηχανικές ιδιότητες όπως είναι η υδρόλυση. Αντιθέτως, οι (Gilmore et al. 1993) διαφωνούν με αυτό το ενδεχόμενο καθώς μέσω της επιστημονικής τους μελέτης διαπιστώνουν ότι η αποδόμηση του πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB) προέρχεται αποκλειστικά από ενζυματική δράση. Ακόμα, διάφορες άλλες μελέτες (Ishii et al. 2008; Lee and Kim 2010), αποδεικνύουν την ικανότητα μυκητών από άλλα περιβάλλον, όπως το χώμα, να βιοδιασπάσουν διάφορα βιοπλαστικά όπως τα PHB, PBSA και PCL όχι όμως και του PLA. Παρόμοια αποτελέσματα για τη μη αποδόμηση του πολυγαλακτικού οξέος (PLA) εμφανίζει και η μελέτη των (Kamiya et al. 2007) , όπου μετά από 120 ημέρες μέσα στο χώμα το PLA δεν εμφάνισε καμία απολύτως διαφορά. Επιπλέον, η μελέτη της (Rom et al. 2017) περιγράφει παρόμοια αποτελέσματα, τονίζοντας πως το σύστημα ενεργού ιλύος δεν είναι ικανό να βιοαποδομήσει το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), ενώ οι μικρές διαφορές στα δείγματα προέρχονται κυρίως από την υδρόλυση. Αντιθέτως, η έρευνα του (Kim et al. 2008), αποδεικνύει τη βιοαποδόμηση του PLA σε κομπόστ γύρω στο 45% μετά το πέρας 40 ημερών. Εν συνεχεία, σε άλλα περιβάλλον όπως οι Χ.Υ.Τ.Α οι (Tokiwa and Jarerat 2004) αναφέρουν πως η διαβάθμιση της βιοαποδόμησης των βιοπλαστικών σε αυτούς έχει ως εξής : Πολυ-3-υδροξυβουτανικός εστέρας (PHB) > Πολυγαλακτικό οξύ (PLA) . Ακόμα, η έρευνα των (Bubpach et al. 2018) αναφέρει πως το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) είναι πιο δύσκολο να

αποδομηθεί σε σχέση με άλλα βιοαποδομήσιμα πλαστικά και πως η αποδόμηση αυτή εξαρτάται και από ενζυματική αλλά και από χημική υδρόλυση.

Μικροβιακοί πληθυσμοί (Βιοφίλμ)

Συνεχίζοντας στο κομμάτι των μικροβιακών πληθυσμών και πιο συγκεκριμένα στο ποσοτικό προσδιορισμό της ανάπτυξης του βιοφίλμ εντοπίζεται μία αύξηση στην έκταση του βιοφίλμ πάνω στα pellets του πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα η οποία είναι σχετικά σταθερή με εξαίρεση μία πτώση στη τρίτη δειγματοληψία (Day 70). Το ίδιο ισχύει και για το πολυγαλακτικό οξύ, όσον αφορά τη πτώση στη τρίτη δειγματοληψία, το οποίο όμως γενικά δεν παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνει η μελέτη των (Swiontek Brzezinska et al. 2020), όπου εντόπισαν τις εξής τιμές:

- $OD_{PHB} = 8 \pm 1.15$
- $OD_{PLA} = 2 \pm 0.12$

Επίσης, η μείωση στις πρωτείνες κατά τη διάρκεια δειξαγωγής του πειράματος είναι ασήμαντη και για τα δύο πολυμερή PLA & PHB.

Επιπλέον, η μέτρηση των κυττάρων παρουσίασε μία σταθερότητα και στα δύο βιοπλαστικά με εξαίρεση τη δεύτερη δειγματοληψία (Day 45) όπου υπήρχε μία αύξηση δύο και μίας τάξης μεγέθους για το PHB και το PLA, αντίστοιχα.

ATR-FTIR

Όσον αφορά τις φασματογραφίες των μικροπλαστικών στο πολυ-3-υδροξυβουτανικό εστέρα (PHB) οι μεγαλύτερες διαφορές εντοπίστηκαν ανάμεσα στα pellets της μέσης δειγματοληψίας (DAY 45) με τα παρθένα pellets και με τα pellets της τελευταίας δειγματοληψίας (DAY 95). Στη δομή του PHB υπάρχουν δεσμοί καρβονυλίου ($C = O$), το οποίο δικαιολογεί τη ψιλή τιμή του δείκτη δεσμού καρβονυλίου (CI). Η μείωση του δείκτη αυτού αποδεικνύει ότι ο δεσμός καρβονυλίου έχει σπάσει, ενώ η αύξηση του στις επόμενες δειγματοληψίες δείχνει ενδεχομένως την απομάκρυνσή τη κατανάλωση του φθαρμένου στρώματος και επομένως την μερική επαναφορά στην αρχική κατάσταση. Ενώ η δημιουργία νέων κορυφών από τους μικροοργανισμούς εμφανίζονται στα 1659 cm^{-1} στη περιοχή των αλκενίων δημιουργώντας τους εξής δεσμούς ($C = C$), στα 1530 cm^{-1} και στα 1514 cm^{-1} τους δεσμούς ($N - O$) που αφορά τη περιοχή με τις ενώσεις αζώτου, στα 1420 cm^{-1} ($O - H$) στη περιοχή των καρβοξυλικών οξέων και τέλος στα 547 cm^{-1} με δεσμούς ($C - I$).

Συνεχίζοντας με το πολυγαλακτικό οξύ πιθανότατα δεν αναφερόμαστε σε 100% καθαρό PLA αλλά σε εμπορικό με πρόσθετα καθώς οι χαρακτηριστικές κορυφές δε παρουσιάζουν καμία διαφορά ενώ αυτές που σχετίζονται με τα πρόσθετα εξαφανίζονται μέσω των μικροοργανισμών με το πέρασ των 45 ημερών, άρα η επώαση με την ιλύ οδηγεί στην απομάκρυνση των πρόσθετων που απαντώνται στο επιφανειακό στρώμα των pellets ενώ το PLA παραμένει ανεπηρέαστο. Σα κορυφές των πρόσθετων θεωρούνται αυτές στα 3298 cm^{-1} και 3086 cm^{-1} ($O-H$) που αφορούν καρβοξυλικά οξέα ή στα 2956 cm^{-1} και 2919 cm^{-1} ($N-H$) περιοχή που αναφέρεται στα αμμωνιακά άλατα, στα 2848 cm^{-1} ($C-H$) περιοχή με αλκάνια, στα 1636 cm^{-1} με τη απομάκρυνση δεσμών ($C=C$) που μεταφράζεται με περιοχή των αλκενίων.

Μικροσκόπιο

Μετά τον έλεγχο των δειγμάτων στο μικροσκόπιο παρατηρείται υψηλή αύξηση στη ποσότητα των μικροπλαστικών σε σχέση με την αρχική ιλύ. Με το πέρασ της 95^{ης} ημέρας, η ποσότητα των μικροπλαστικών στα βιοτικά δείγματα είναι κατά μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από αυτή των αβιοτικών. Αυτό εν μέρει μπορεί να οφείλεται στην ικανότητα αποδόμησης των μικροοργανισμών αλλά και σε χημικές διεργασίες, όπως η υδρόλυση.

Γενικό συμπέρασμα:

Έπειτα από 3 μήνες πειραμάτων και επεξεργασία των αποτελεσμάτων, καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως το σύστημα ενεργού ιλύος δεν είναι ένα περιβάλλον ικανό για βιοαποδόμηση του πολυ-3-υδροξυβουτανικού εστέρα (PHB) και του πολυγαλακτικού οξέος (PLA) καθώς δεν εμφάνισε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά σε κανένα τομέα διεργασίας του, κάτι που επιβεβαιώνει και η 3% μείωση του βάρους σε διάστημα 3 μηνών και η τεράστια αύξηση στα δευτερογενή μικροπλαστικά. Παρόλα αυτά, η διαδικασία της βιοαποδόμησης αποδεικνύεται αρκετά αργή αποδεικνύοντας έτσι πως η δε πρέπει να υπάρχει αλόγιστη χρήση βιοπλαστικών και επανάπαυση σχετικά με την απόρριψή τους καθώς οι συνέπειες θα είναι παρόμοιες, αν όχι χειρότερες, με αυτές των κλασικών πλαστικών.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Στον επιστημονικό κλάδο των βιοπλαστικών παρατηρείται ένα μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια για την ικανότητα και τη ταχύτητα της βιοαποδόμησης των βιοπλαστικών από φυσικά περιβάλλον όπως είναι αυτά του θαλάσσιου νερού, του χώματος, της ενεργού ιλύος

και των Χ.Υ.Τ.Α . Οι επιστημονικές έρευνες ολοένα και αυξάνονται με στόχο την εύρεση μιας πρακτικής και αποτελεσματικής λύσης στο χρόνιο πρόβλημα της πλαστικής/βιοπλαστικής ρύπανσης.

Θεωρείται απαραίτητο να υπάρξει μια πιο εκτενής έρευνα και ενημερώση για τη πραγματική δυνατότητα ορισμένων λεγόμενων βιοπλαστικών να βιοαποδομηθούν και να καταστηθούν ασφαλές προς το περιβάλλον. Οι υπάρχων μελέτες αναφέρονται κυρίως σε συγκεκριμένα βακτήρια ή μύκητες που έχουν τη δυνατότητα να αποδομήσουν συγκεκριμένα βιοπλαστικά μέχρι ένα σημείο ή διάφορα περιβάλλοντα τα οποία παρουσιάζουν αρχικά θετικά αποτελέσματα αλλά καταλήγουν σε ένα κορεσμό και σταθεροποιούνται.

Ενδιαφέρον αποτελεί η έρευνα του (Castro-Aguirre et al. 2017), σύμφωνα με την οποία η βιοαποικοδόμηση του πολυγαλακτικού οξέος (PLA) απαιτεί σα πρώτο βήμα την υδρόλυσή του η οποία διασπά την αλυσίδα του πολυμερούς σε oligo-γαλακτικό οξύ μερή ή μονομερή που αφομοιώνονται εύκολα από μικροοργανισμούς. Έτσι, η αβιοτική υδρόλυση είναι η κύρια συμβολή στην διαδικασία αποικοδόμησης του PLA στο πρώιμο στάδιο της αποικοδόμησης και γίνεται περιοριστικός παράγοντας για την επακόλουθη βιοαποικοδόμηση αυτού του υλικού. Ωστόσο, ο ρυθμός υδρόλυσης εξαρτάται επίσης από τις ιδιότητες του PLA όπως η κρυσταλλικότητα και το αρχικό μοριακό βάρος.

Επομένως, θα μπορούσε στις μελλοντικές έρευνες να ελεγχθεί μία διαδικασία δύο σταδίων. Αρχικά, να υπάρξει μία ενισχυμένη υδρόλυση του μικροπλαστικού ακολουθούμενη από την επώασή του με ενεργό ιλύ προς τη βιοαποδόμησή του.

6. Βιβλιογραφία

Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I., & Muhammad, S. (2018). Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7287–7298. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1234-9>

Ammala, A., Bateman, S., Dean, K., Petinakis, E., Sangwan, P., Wong, S., Yuan, Q., Yu, L., Patrick, C., & Leong, K. H. (2011). An overview of degradable and biodegradable polyolefins. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 36, Issue 8, pp. 1015–1049). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.12.002>

Andrady, A. L. (2017). The plastic in microplastics: A review. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 119, Issue 1, pp. 12–22). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.082>

Andrady Anthony L. [Book]. - 2011.

Andrady Anthony L. *Plastics and Environmental Sustainability* [Book]. - 2015.

Atiweh, G., Mikhael, A., Parrish, C. C., Banoub, J., & Le, T. A. T. (2021). Environmental impact of bioplastic use: A review. *Heliyon*, 7(9). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07918>

Barnes David K. A. Galgani Francois, Thompson Richard C. and Barlaz Morton 2009 *Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments* Phil. Trans. R. Soc. B364 1985–1998 [Book].

Baeurle, S. A., Hotta, A., & Gusev, A. A. (2006). On the glassy state of multiphase and pure polymer materials. *Polymer*, 47(17), 6243–6253. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.05.076>

Britannica, The Editors of Encyclopaedia. “polymer”. Encyclopedia Britannica, 2 May. 2022, https://www.britannica.com/science/polymer. Accessed 6 August 2022. (n.d.).

Browne, M. A., Galloway, T. S., & Thompson, R. C. (2010). Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. *Environmental Science and Technology*, 44(9), 3404–3409. <https://doi.org/10.1021/es903784e>

Bubpachat, T., Sombatsompop, N., & Prapagdee, B. (2018). Isolation and role of polylactic acid-degrading bacteria on degrading enzymes productions and PLA biodegradability at mesophilic conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 152, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.03.023>

Castro-Aguirre, E., Auras, R., Selke, S., Rubino, M., & Marsh, T. (2017). Insights on the aerobic biodegradation of polymers by analysis of evolved carbon dioxide in simulated composting conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 137, 251–271. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.017>

Derraik, B. (n.d.). *The pollution of the marine environment by plastic debris: a review* Jos e e G. www.elsevier.com/locate/marpolbul

Dircks, K., Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Mosbaek, H., & Aspegren, H. (2001). STORAGE AND DEGRADATION OF POLY-b-HYDROXYBUTYRATE IN ACTIVATED SLUDGE UNDER AEROBIC CONDITIONS. In *Wat. Res* (Vol. 35, Issue 9).

Doyle, C., Tanner, E. T., & Bonfield, W. (n.d.). *In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite*.

Focht Dennis D. 2020. "Biodegradation." AccessScience. [Book]. - 2020.

Fotopoulou, K. N., & Karapanagioti, H. K. (2017). *Degradation of Various Plastics in the Environment* (pp. 71–92). https://doi.org/10.1007/698_2017_11

Hartmann, N. B., Hüffer, T., Thompson, R. C., Hassellöv, M., Verschoor, A., Dagaard, A. E., Rist, S., Karlsson, T., Brennholt, N., Cole, M., Herrling, M. P., Hess, M. C., Ivleva, N. P., Lusher, A. L., & Wagner, M. (2019). Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environmental Science and Technology*, 53(3), 1039–1047. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05297>

Ishii, N., Inoue, Y., Tagaya, T., Mitomo, H., Nagai, D., & Kasuya, K. ichi. (2008). Isolation and characterization of poly(butylene succinate)-degrading fungi. *Polymer Degradation and Stability*, 93(5), 883–888. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.02.005>

Gilmore, D. F., Antoun, S., Lenz, R. W., & Fuller, R. C. (1993). Degradation of poly(?-hydroxyalkanoates) and polyolefin blends in a municipal wastewater treatment facility. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1(4), 269–274. <https://doi.org/10.1007/BF01458293>

Gregory, M. R. (1996). Plastic “Scrubbers” in Hand Cleansers: a Further (and Minor) Source for Marine Pollution Identified. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 32, Issue 12).

Gu, J.-G., & Gu, J.-D. (2005). Methods Currently Used in Testing Microbiological Degradation and Deterioration of a Wide Range of Polymeric Materials with Various Degree of Degradability: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, 13(1), 65–74. <https://doi.org/10.1007/s10924-004-1230-7>

Gupta, B., Revagade, N., & Hilborn, J. (2007). Poly(lactic acid) fiber: An overview. In *Progress in Polymer Science (Oxford)* (Vol. 32, Issue 4, pp. 455–482). <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.01.005>

Kamiya, M., Asakawa, S., & Kimura, M. (2007). Molecular analysis of fungal communities of biodegradable plastics in two Japanese soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 53(5), 568–574. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00169.x>

Kim, M. N., Kim, W. G., Weon, H. Y., & Lee, S. H. (2008). Poly(L-lactide)-degrading activity of a newly isolated bacterium. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(1), 234–239. <https://doi.org/10.1002/app.26658>

Kumar, M. A., Anandapandian, K. T. K., & Parthiban, K. (2011). Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(2), 259–265. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000200006>

Lee, S. H., & Kim, M. N. (2010). Isolation of bacteria degrading poly(butylene succinate-co-butylene adipate) and their lip A gene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(3), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.01.002>

Maes Thomas A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red [Journal].

Monroe, D. (2007). Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology*, 5(11), e307. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050307>

Papadaki_Elisavet_Dip_2020. (n.d.).

PlascticsEurope. (n.d.). *Plastics-the Facts 2021 An analysis of European plastics production, demand and waste data*.

Rom, M., Fabia, J., Grubel, K., Sarna, E., Graczyk, T., & Janicki, J. (2017). Study of the biodegradability of polylactide fibers in wastewater treatment processes. *Polimery*, 62(11/12), 834–840. <https://doi.org/10.14314/polimery.2017.834>

Ryan Peter G. Moore Charles J., van Franeker Jan A. and Moloney Coleen L.
2009Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment [Book]. - 2012.
Science of Plas-cs. (n.d.).

Singh, R. P., Mishra, S., & Das, A. P. (2020). Synthetic microfibers: Pollution toxicity and remediation. In *Chemosphere* (Vol. 257). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127199>

Singh, B., & Sharma, N. (2008). Mechanistic implications of plastic degradation. In *Polymer Degradation and Stability* (Vol. 93, Issue 3, pp. 561–584).
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008>

Swiontek Brzezinska, M., Walczak, M., Kalwasińska, A., Richert, A., Świątczak, J., Deja-Sikora, E., & Burkowska-But, A. (2020). Biofilm formation during biodegradation of polylactide, poly (3,4 hydroxybutyrate) and poly(ε-caprolactone) in activated sludge. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 539–546.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.107>

Tokiwa, Y., Calabia, B., Ugwu, C., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742.
<https://doi.org/10.3390/ijms10093722>

Tokiwa, Y., & Jarerat, A. (2004). Biodegradation of poly(l-lactide). *Biotechnology Letters*, 26(10), 771–777. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000025927.31028.e3>

Weinstein, J. E., Crocker, B. K., & Gray, A. D. (2016). From macroplastic to microplastic: Degradation of high-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene in a salt marsh habitat. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(7), 1632–1640. <https://doi.org/10.1002/etc.3432>

Xu, W., Chen, W. Q., Jiang, D., Zhang, C., Ma, Z., Ren, Y., & Shi, L. (2020). Evolution of the global polyethylene waste trade system. *Ecosystem Health and Sustainability*, 6(1). <https://doi.org/10.1080/20964129.2020.1756925>

Διερεύνηση της διαίτας των μικροπλαστικών και νανοπλαστικών στα αστικά λύματα Κωστάκη Μαρία. (n.d.).

Κεφάλαιο 7. Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση. (n.d.).

Τσαπαρλής, Γ. and Ε. Στεργίου. (2015). 3. Πολυμερη-Πλαστικά ΧΗΜΕΙΑ ΓΕΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ.

