



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Κατεύθυνση: Μηχανικών Περιβάλλοντος

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ»



ΚΑΡΑΚΟΥΛΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΧΑΝΙΑ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2022



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Κατεύθυνση: Μηχανικών Περιβάλλοντος

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη οικοτοξικότητας και βιοαποδόμησης βιοπλαστικών»

“Study of the ecotoxicity and biodegradation of bioplastics”

ΚΑΡΑΚΟΥΛΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ
Α.Μ. 2016050041

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βενιέρη Δανάη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Παρανυχιανάκης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ψυλλάκη Ελευθερία, Καθηγήτρια

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα Βενιέρη Δανάη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, για την άριστη συνεργασία, την πολύτιμη καθοδήγηση αλλά και την στήριξη και υπομονή της σε όλες τις δυσκολίες που αντιμετώπισα. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την κα Γουνάκη Ιωσηφίνα, ΕΔΙΠ του εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, για τη βοήθεια της κατά τη διεκπεραίωση των πειραμάτων και τις εργαστηριακές γνώσεις που μου μετέδωσε. Ήταν μεγάλη μου χαρά που συνεργάστηκα μαζί τους.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τη φίλη μου Κοσσυβάκη Δέσποινα για τη βοήθεια που μου προσέφερε όσον αφορά την επιλογή της πρώτης μου εργασιακής εμπειρίας στο Istituto Italiano di Tecnologia, η οποία μου άλλαξε τη ζωή και της έδωσε μία κατεύθυνση. Συνεχίζοντας, ευχαριστώ θερμά την κα. Φραγκούλη Δέσποινα και την κα. Αθανασίου Αθανασία, επικεφαλές της διεπιστημονικής ομάδας Smart Materials στο Istituto Italiano di Tecnologia, για την άριστη συνεργασία και την επιλογή των δειγμάτων βιοπλαστικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική καθώς και τον Tedeschi Giacomo μεταδιδακτορικό ερευνητή του Istituto Italiano di Tecnologia που ετοίμασε τα δείγματα και τα έστειλε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Παρανυχιανάκη Νικόλαο και την κα. Ψυλλάκη Ελευθερία για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή και το χρόνο τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω ακόμη στους φίλους μου, για τη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχαν όλους αυτούς τους μήνες, συμβάλλοντας με το δικό τους ξεχωριστό τρόπο στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Κλείνοντας, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου για την ηθική τους στήριξη, συμπαράσταση και την ολόψυχη αγάπη τους. Τους ευγνωμονώ που στέκονται πάντα δίπλα μου, στις επιτυχίες αλλά και στις αποτυχίες μου.

Κωνσταντίνα Καρακούλα

Χανιά, Δεκέμβριος 2022

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ – ABBREVIATIONS.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	10
Κεφάλαιο 1 ^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1. ΠΛΑΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	12
1.2. ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	15
1.2.1. ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΑ.....	17
2. PLA (ΠΟΛΥΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ).....	19
3. PBAT (ΤΕΡΕΦΘΑΛΙΚΟ ΑΔΙΠΙΚΟ ΠΟΛΥΒΟΥΤΥΛΕΝΙΟ)	20
4. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ (ΒΙΟ)ΠΛΑΣΤΙΚΩΝ.....	22
4.1. ΤΥΠΟΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ.....	23
4.1.1. ΦΩΤΟ – ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ.....	23
4.1.2. ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ.....	23
4.1.3. ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ.....	24
4.1.4. ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ.....	25
4.1.4.1. ΑΕΡΟΒΙΑ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ.....	25
4.1.4.2. ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ.....	26
4.1.4.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ.....	28
5. ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ.....	28
5.1. ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ.....	28
5.2. ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ.....	29
5.2.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	29
5.2.2. ΜΥΚΗΤΕΣ.....	30
5.3. ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ.....	31
5.4. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ.....	32
5.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ.....	33

Κεφάλαιο 2° : ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	34
Κεφάλαιο 3° : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	35
3.1. ΥΛΙΚΑ.....	35
3.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	36
3.2.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	36
3.2.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΗ ΜΗΤΡΑ.....	39
3.2.2.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ <i>Vibrio fischeri</i>	39
3.2.2.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ <i>Penicillium rubrum</i>	39
3.2.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΔΑΦΟΣ.....	41
3.2.3.1. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕΣΩ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ.....	41
3.2.3.2. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ (Real Time – qPCR).....	43
Κεφάλαιο 4° : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΗ ΜΗΤΡΑ ΜΕ ΤΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ <i>Vibrio fischeri</i>	47
4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΗ ΜΗΤΡΑ ΜΕ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ <i>Penicillium rubrum</i>	55
4.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΔΑΦΟΣ.....	61
4.3.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΔΑΦΟΣ ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΩΝ ΜΕΣΩ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ.....	63
4.3.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ (REAL TIME – qPCR).....	85
Κεφάλαιο 5° : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	98

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ - ABBREVIATIONS

cAMP – Cyclic Adenosine monophosphate

MPs – Microplastics

MBPs - Microbioplastics

MMT Clays – Montmorillonite Clays

TEM – Transmission Electron Microscopy

PHB – Polyhydroxybutyrate

P. rubrum – *Penicillium rubrum*

V. fischeri – *Vibrio fischeri*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα μεγάλο μέρος των πλαστικών αποβλήτων που παράγονται παγκοσμίως καταλήγει στα χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα, με αποτέλεσμα τη χημική ρύπανση του πλανήτη και την απειλή της ακεραιότητας των παγκόσμιων οικοσυστημάτων, από τα οποία εξαρτάται η επιβίωση του φυσικού περιβάλλοντος και κατ' επέκταση της ανθρωπότητας. Τα πλαστικά αποτελούν σοβαρό παράγοντα ρύπανσης του περιβάλλοντος καθώς, με την πρόοδο της επιστήμης και της τεχνολογίας οι ολοένα και αυξανόμενες ανθρώπινες δραστηριότητες οδήγησαν στην υπερβολική χρήση άρα, και παραγωγή τους. Η χρήση βιοπλαστικών μπορεί να λύσει τη ρύπανση που προκαλείται από τα συμβατικά πλαστικά στο μέλλον. Ωστόσο, τα μικροπλαστικά και τα νανοπλαστικά που παράγονται κατά τη διαδικασία γήρανσης των βιοαποδομήσιμων πλαστικών αποτελούν παγκόσμια ανησυχία λόγω της ευρείας κατανομής και των μεγάλων ποσοτήτων τους.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής μελετήθηκε η οικοτοξικότητα των βιοπλαστικών PLA και PBAT, που αποτελούν δύο από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα βιοπλαστικά, σε συνδυασμό με Coffee Silverskin και MMT Clays σε βιοδείκτες, όπως είναι το βακτήριο *Vibrio fischeri* και ο μύκητας *Penicillium rubrum*. Ο έλεγχος οικοτοξικότητας πραγματοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα αλλά και δύο διαφορετικά είδη εδαφικού δείγματος. Πραγματοποιήθηκε επίσης απομόνωση και ποσοτικοποίηση του βακτηριακού γενετικού υλικού στα εδαφικά δείγματα, με σκοπό τη διερεύνηση τυχόν επίδρασης των βιοπλαστικών στους βακτηριακούς μικροοργανισμούς του εδάφους.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα από τον έλεγχο τοξικότητας των βιοπλαστικών έναντι του βακτηρίου *V. fischeri* και του μύκητα *P. rubrum*, μετά την πάροδο 30 d και 14 d αντίστοιχα, δεν παρατηρήθηκε κάποια μείωση του βακτηριακού ή του μυκητιακού πληθυσμού καθώς οι τιμές σε σύγκριση με το control παρέμεναν σχεδόν σταθερές ή εμφάνιζαν μικρές διαφορές οι οποίες όμως δεν υποδηλώνουν κάποια τοξικότητα έναντι των μικροοργανισμών. Το συγκεκριμένο βακτήριο δεν είναι ένα αρκετά ευαίσθητο μοντέλο για εξέταση τοξικότητας πλαστικών και οργανικής ρύπανσης με συνέπεια τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης να συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Ομοίως, τοξικότητα δεν εκδηλώθηκε ούτε έναντι του μύκητα, αλλά αντιθέτως στο διάστημα των μετρήσεων υποδεικνύεται μια μικρή αύξηση του πληθυσμού, η οποία οφείλεται στο γεγονός ότι οι μύκητες είναι πιο ανθεκτικοί σε δοκιμασίες τοξικότητας από ότι τα βακτήρια αλλά και στην βιοαποδόμηση των δειγμάτων από το μικροοργανισμό. Ο *P. rubrum* μπορεί να χρησιμοποιεί το δείγμα ως πηγή άνθρακα συμβάλλοντας έτσι στην πιο γρήγορη ανάπτυξή του.

Στα αποτελέσματα που αφορούσαν στο μικροβιακό πληθυσμό του εδάφους για τα δύο εδαφικά δείγματα, στο διάστημα των 60 d, κανένα από τα δείγματα βιοπλαστικού δεν εμφανίζει τοξικότητα έναντι των βακτηρίων και των μυκήτων του εδάφους. Η συγκέντρωση των βακτηρίων παραμένει σταθερή σε σχέση με το control ενώ η συγκέντρωση του μυκητιακού πληθυσμού δείχνει να αυξάνεται και οι τιμές κυμαίνονται περίπου στις ίδιες τάξεις μεγέθους και για τα δύο εδάφη. Τα βιοπλαστικά είναι εγγενώς πολύπλοκα υλικά στη σύστασή τους αλλά μη τοξικά σε συγκεκριμένες ποσότητες στο έδαφος. Οι μύκητες είναι καλοί αποικοδομητές του εδάφους με αποτέλεσμα να εμφανίζουν εξαιρετικές ικανότητες αποδόμησης υλικών.

Η μοριακή ποσοτικοποίηση για τα βακτήρια που υπήρχαν στα δύο εδαφικά δείγματα εμφάνισε μικρές διαφορές μεταξύ των δύο ειδών χώματος, με μείωση πληθυσμού για το δεύτερο δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, για τις περιπτώσεις παρουσίας των βιοπλαστικών PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays και PBAT, σημειώθηκε μικρός βαθμός τοξικότητας τουλάχιστον όσον αφορά στη συγκεκριμένη ποσότητα βιοπλαστικού που προστέθηκε και το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα των δύο μηνών που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε έλλειψη θρεπτικών συστατικών στο έδαφος με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση ανάπτυξης των βακτηρίων αλλά και στις εδαφολογικές διαφορές μεταξύ των δύο δειγμάτων.

Συνοψίζοντας, το PLA και το PBAT δεν είναι βιοπλαστικά που καθίστανται τοξικά στους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Οι μύκητες και στην περίπτωση εργαστηριακής ανάπτυξης αλλά και στα εδαφικά δείγματα παρουσίασαν εξαιρετική ανθεκτικότητα με ταυτόχρονη ανάπτυξη που οφείλεται στο ότι μπορούν να βιοαποδομήσουν τα βιοπλαστικά, σε χερσαίο περιβάλλον όπου χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα τα πλαστικά μικροσφαιρίδια.

ABSTRACT

A large part of the plastic waste produced worldwide ends up in terrestrial and aquatic ecosystems, resulting in chemical pollution of the planet and threatening the integrity of global ecosystems, on which the survival of the natural environment and, by extension, humanity depends. Plastics are a serious factor in environmental pollution as, with the progress of science and technology, the ever-increasing human activities have led to their excessive use, and thus their production. The use of bioplastics can solve the pollution caused by conventional plastics in the future. However, microplastics and nanoplastics produced during the aging process of biodegradable plastics are a global concern due to their wide distribution and large quantities.

In the context of this thesis, the ecotoxicity of PLA and PBAT bioplastics, which are two of the most widely used bioplastics, was studied in combination with Coffee Silverskin and MMT Clays on biomarkers such as the bacterium *Vibrio fischeri* and the fungus *Penicillium rubrum*. The ecotoxicity test was carried out in aqueous solutions as well as two different types of soil sample. Isolation and quantification of the bacterial genetic material in the soil samples was also carried out, to investigate any effect of bioplastics on soil bacterial microorganisms.

Regarding the results from the toxicity test of the bioplastics against the bacterium *V. fischeri* and the fungus *P. rubrum*, after 30 d and 14 d respectively, no reduction of the bacterial or fungal population was observed as the values compared to control remained almost constant or showed small differences which, however, did not indicate any toxicity against microorganisms. This bacterium is not a sufficiently sensitive model for examining plastic toxicity and organic pollution, so the results of the present study agree with the literature.

Likewise, toxicity was not manifested against the fungus either, but instead a small population increase was indicated during the measurement interval, which is because fungi are more resistant to toxicity tests than bacteria and to the biodegradation of the samples by the microorganism. *P. rubrum* can use the sample as a carbon source thus contributing to its faster growth.

In the results concerning the soil microbial population for the two soil samples, at the interval of 60 d, none of the bioplastic samples shows toxicity against soil bacteria and fungi. The concentration of bacteria remains constant in relation to the control, while the concentration of the fungal population appears to be increasing and the values range approximately in the same orders of magnitude for both soils. Bioplastics are inherently complex materials in their composition but non-toxic in specific amounts in the soil. Fungi are good decomposers of the soil and as a result show excellent abilities to degrade materials.

Molecular quantification for the bacteria presents in the two soil samples showed small differences between the two soil types, with a population decrease for the second sample. More specifically, for the cases of the presence of the bioplastics PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays and PBAT, a small degree of toxicity was noted, at least in terms of the specific amount of bioplastic added and the specific period of two months that the samplings were carried out. This may be due to a lack of nutrients in the soil resulting in the inhibition of bacterial growth, but also to the soil differences between the two samples.

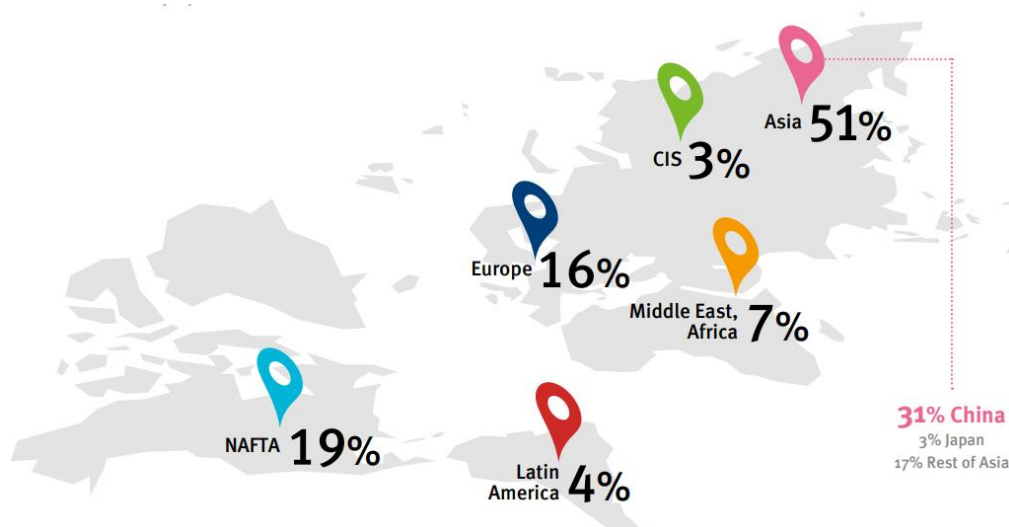
In summary, PLA and PBAT are not bioplastics that become toxic to the microorganisms studied. The fungi both in the case of laboratory growth and in soil samples showed excellent resistance with simultaneous growth since they can biodegrade bioplastics, in a terrestrial environment where they use plastic microspheres as a carbon source.

Κεφάλαιο 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΠΛΑΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Στις μέρες μας, τα πλαστικά προσφέρουν πολλά οφέλη στην κοινωνία. Αποτελούν σημαντικά υλικά που χρησιμοποιούνται καθημερινά από τον άνθρωπο και έχουν μεταβάλει σημαντικά την ποιότητα ζωής του. Συμβάλλουν στην πιο γρήγορη εξέλιξη του κόσμου με έναν ασφαλές και παράλληλα βιώσιμο τρόπο και ευνοούν την κατασκευή πιο αποδοτικών ενεργειακά κτιρίων και σπιτιών σε σχέση με το παρελθόν. Επιτρέπουν επίσης, τη μεγάλη εξοικονόμηση καυσίμων σε όλες τις μεταφορές και ως αποτέλεσμα βοηθούν στη διασφάλιση της μετάβασης σε μια πράσινη κινητικότητα. Αναμφίβολα, τα πλαστικά είναι βασικά υλικά στην καινοτομία και στη μείωση της ζήτησης ενέργειας αλλά και στη μείωση των εκπομπών επιβλαβών αερίων. Τον τελευταίο μισό αιώνα, τα πλαστικά έχουν χρησιμοποιηθεί σε όλες τις πτυχές της ανθρώπινης παραγωγής και σταδιακά έχουν γίνει αναπόσπαστο μέρος της καθημερινότητας. Με την πρόοδο της επιστήμης και της τεχνολογίας, τα πλαστικά υλικά έχουν σταδιακά αντικαταστήσει τα παραδοσιακά υλικά όπως το ξύλο, το μέταλλο και το γυαλί σε ποικίλες εφαρμογές λόγω του χαμηλού κόστους κατασκευής, της ανθεκτικότητας και της υψηλής αντοχής σε σύγκριση με τα παραδοσιακά υλικά (Ahmed et al., 2018).

Ωστόσο τις τελευταίες δεκαετίες η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών έχει αυξηθεί δραματικά. Από το 1950, οι άνθρωποι έχουν παράξει περισσότερους από 8 δισεκατομμύρια τόνους πλαστικού, από τους οποίους άνω των μισών κατέληξαν κατευθείαν σε χωματερές και εξ αυτών μόνο το 9% περίπου ανακυκλώθηκε (World Population Review, 2021). Από το 1960 η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών έχει εικοσαπλασιαστεί (359 εκατομμύρια τόνους το 2018), και αναμένεται να διπλασιαστεί ξανά την επόμενη 20ετία. Η Ασία είναι η ήπειρος με τη μεγαλύτερη παραγωγή πλαστικού παγκοσμίως με μια οικονομία που βασίζεται κυρίως στη συγκεκριμένη παραγωγή. Αξιοσημείωτο είναι ότι η Κίνα παρασκευάζει το ¼ του πλαστικού παγκοσμίως. Δεύτερη σε κατάταξη, έρχεται η Ευρώπη, με ποσοστό 16%. Ανάμεσα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η Γερμανία κυριαρχεί στην παραγωγή πλαστικού λόγω της τεράστιας βιομηχανικής ανάπτυξής της (Plastics Europe, 2020).



Εικόνα 1: Κατανομή παγκόσμιας παραγωγής πλαστικού 2019 (πηγή: Plastics Europe, 2020)

Ως αποτέλεσμα της έντονης χρήσης των πλαστικών, η ρύπανση του περιβάλλοντος που προέρχεται από αυτά είναι ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα που επηρεάζει όλα τα οικοσυστήματα συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων (Koelmans et al., 2019).

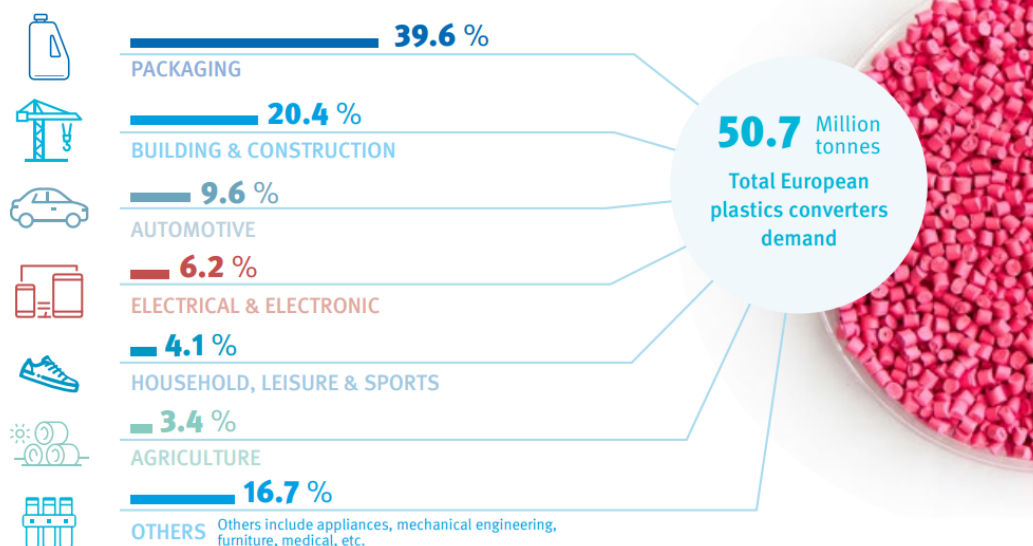
Η περιβαλλοντική ζημιά που προκύπτει από την έντονη χρήση των μη αποικοδομήσιμων πλαστικών απορριμμάτων, που παράγονται συνήθως από την πετροχημεία, έχει δημιουργήσει μια ολοένα και πιο αρνητική αλλαγή στη δημόσια αντίληψη για τα πετροχημικά πλαστικά (Rochman et al., 2016). Η Ευρωπαϊκή πολιτική στοχεύει στη μείωση των ποσοτήτων πετροχημικών πλαστικών μιας χρήσης που χρησιμοποιούνται και παράγονται. Για την αντιμετώπιση των μεταβαλλόμενων επιθυμιών και ανησυχιών αλλά και για τη μείωση των περιβαλλοντικών προβλημάτων (European Commission, 2018a, 2018b, 2008, 1994).

Ως γνωστόν, η ευρεία εφαρμογή πλαστικών υλικών ωφελεί όλες τις πτυχές της σύγχρονης καθημερινής ζωής, συμπεριλαμβανομένης της δημιουργίας συσκευασιών φαγητού, της γεωργικής επένδυσης, τις κατασκευές αλλά και της βιομηχανίας (Chae and An, 2018).

PLASTICS DEMAND BY SEGMENT 2019

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

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



Εικόνα 2: Κατανομή παγκόσμιας παραγωγής πλαστικού 2019 ανά κατηγορία (πηγή: PlasticsEurope, 2020)

Όμως, τι ακριβώς είναι το πλαστικό; Ο όρος αναφέρεται σε μια ομάδα συνθετικών υλικών από υδρογονάνθρακες, τα οποία σχηματίζονται με πολυμερισμό: μια σειρά χημικών αντιδράσεων σε οργανικές πρώτες ύλες (που περιέχουν άνθρακα), κυρίως φυσικό (ορυκτό) αέριο και αργό πετρέλαιο. Διάφοροι τύποι πολυμερισμού καθιστούν δυνατή την παραγωγή πλαστικών με συγκεκριμένες ιδιότητες: σκληρά ή μαλακά, διαφανή ή μη, εύκαμπτα ή άκαμπτα. Το πρώτο πλαστικό παρουσιάστηκε στη Μεγάλη Έκθεση του Λονδίνου το 1862. Λεγόταν «Parkesine» από το όνομα του εφευρέτη του, Alexander Parkers (Αλεξάντερ Πάρκερς). Ο Πάρκερς είχε φτιάξει από κυτταρίνη αυτό το οργανικό υλικό, στο οποίο μπορούσε κανείς να αλλάξει σχήμα όταν το ζέσταινε, και το σχήμα αυτό διατηρούνταν όταν το υλικό κρύωνε (Böll Stiftung, 2021). Με βάση τις θερμικές ιδιότητες τα πλαστικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, δηλαδή τα θερμοπλαστικά και τα θερμοσκληρυνόμενα πολυμερή ή θερμοσκληρυντές. Με τον πολυμερισμό μικρών μορίων, μπορούν να συντεθούν τα πλαστικά (Zeenat et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα:

Θερμοπλαστικά: Είναι η οικογένεια πλαστικών που μπορούν να λιώσουν όταν θερμανθούν και να σκληρύνουν όταν ψυχθούν. Αυτά τα χαρακτηριστικά, τα οποία δίνουν στο υλικό και το όνομά του, είναι αναστρέψιμα. Δηλαδή το υλικό μπορεί να ζεσταθεί ξανά, να αναδιαμορφωθεί και να καταψυχθεί επανειλημμένα. Αυτά τα πλαστικά κυμαίνονται από 20.000 έως 500.000 amu (μονάδα ατομικής μάζας) σε μοριακό βάρος και είναι γενικά γνωστά ως κοινά πλαστικά. Τα μακρομόρια είναι διατεταγμένα με γραμμικό τρόπο με τη μορφή αλυσίδας στην οποία άτομα και μόρια συνδέονται από άκρη σε άκρη σε αλυσίδες άνθρακα. Με τη διάνοιξη διπλού δεσμού που απαιτείται για να σχηματιστούν γραμμικά μακρομόρια, η αντίδραση προχωρά με μηχανισμό ελεύθερων ριζών (Zeenat et al., 2021). Αυτός ο τύπος πολυμερισμού είναι γνωστός ως πολυμερισμός προσθήκης και παραδείγματα τέτοιων πλαστικών αποτελούν τα Polyethylene (PE) Polypropylene (PP) Polyvinyl-chloride (PVC) Polyethylene Terephthalate (PET) Polystyrene (PS) (Plastics Europe, 2021).

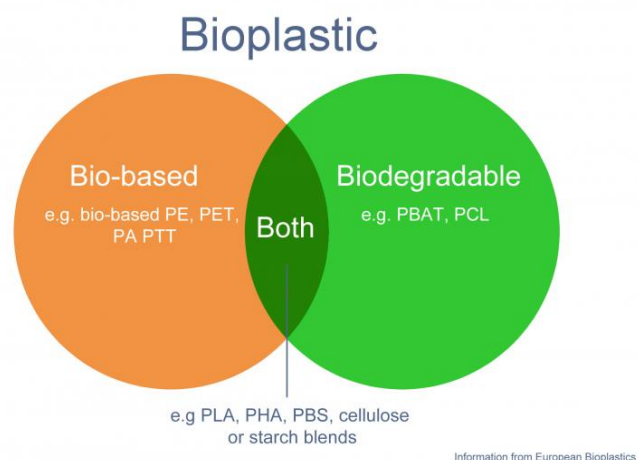
Θερμοσκληρυντές: Είναι η οικογένεια πλαστικών που υφίστανται χημική αλλαγή όταν θερμαίνονται δημιουργώντας ένα τρισδιάστατο δίκτυο. Αφού ζεσταθούν και διαμορφωθούν δεν μπορούν να λιώσουν ξανά ή να αναμορφωθούν. Σε κάθε βήμα, το H_2O και το HCl απελευθερώνονται ως παραπροϊόντα και επιτρέπουν τη συμπύκνωση δι-λειτουργικών μορίων διαμοριακά. Στο θερμοσκληρυνόμενο πλαστικό, τα μονομερή μετατρέπονται σε μια εγχύσιμη μάζα που υφίσταται μικρές χημικές αλλαγές κατά τη θέρμανση (Singh and Sharma, 2008). Παραδείγματα τέτοιων πλαστικών αποτελούν τα Polyurethane (PUR), ακόρεστοι πολυεστέρες, εποξειδικές ρητίνες, ρητίνες μελαμίνης, βινυλεστέρες, σιλικόνη (Plastics Europe, 2021).



Εικόνα 3: Πλαστικά και χρήσεις τους (πηγή: Η τροφή μας το φάρμακό μας, 2019)

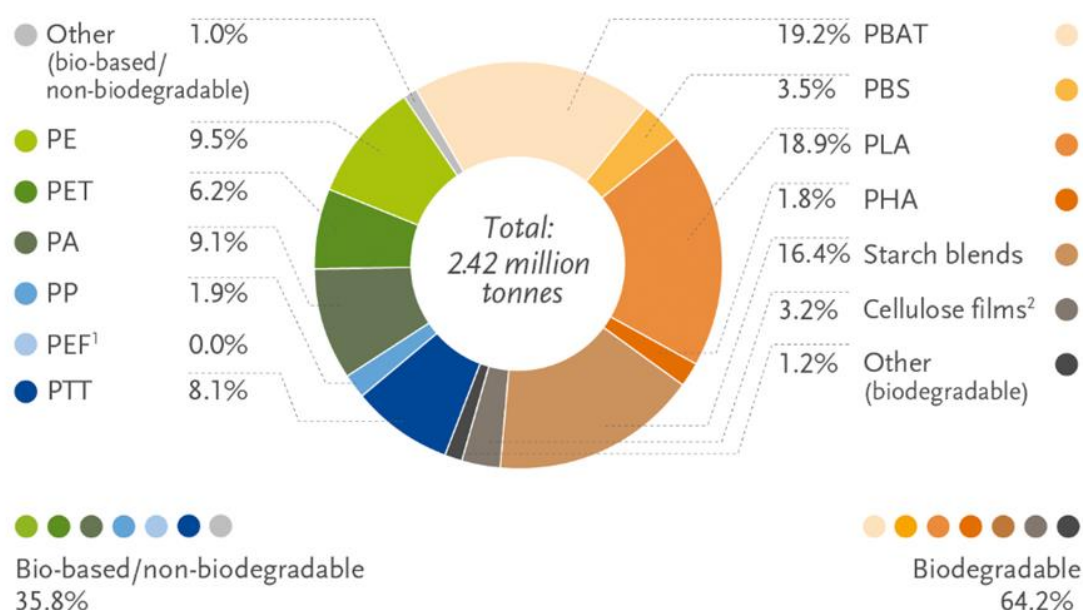
1.2. ΒΙΟΠΛΑΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Σχεδόν το 1% της παγκόσμιας παραγωγής πλαστικών (2 εκατομμύρια τόνοι) το 2019 αποτελούνταν από πλαστικά βιολογικής βάσης (European Bioplastics, 2020). Τα πλαστικά με βιολογική βάση είναι πολυμερή που συντίθενται από ανανεώσιμες πηγές όπως το άμυλο, η ζάχαρη, οι φυτικές ίνες ή άλλα οργανικά συστατικά σε ποικίλη σύνθεση (Niaounakis, 2013). Η παραγωγή πολυμερών από ανανεώσιμες πηγές θεωρείται ως ένας από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους κλάδους υλικών και αναμένεται ότι η συνεισφορά των πλαστικών βιολογικής βάσης θα ανέλθει περίπου στο 2% των πλαστικών που θα εισαχθούν στην παγκόσμια αγορά έως το 2025 (Niaounakis, 2013, European Bioplastics, 2020). Τα πλαστικά με βιολογική βάση δεν χρειάζεται να είναι βιοδιασπώμενα. Υπολογίστηκε ότι σχεδόν τα μισά από τα βίο-βασισμένα πολυμερή δεν ήταν ευαίσθητα στη βιολογική αποσύνθεση στο περιβάλλον (European Bioplastics, 2020). Τόσο τα βίο-βασισμένα όσο και τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά μπορούν να ταξινομηθούν ως βιοπλαστικά. Σύμφωνα με τον ορισμό που προτείνεται από την European Bioplastics «ένα βιοπλαστικό μπορεί να είναι είτε βίο-βασισμένο, είτε βιοαποικοδομήσιμο είτε να έχει και τις δύο αυτές ιδιότητες» (EUBIO_Admin, 2020).



Εικόνα 4: Βιοπλαστικά: Βιοαποδομήσιμα και βίο-βασισμένα (πηγή: Bioplastics Europe, 2021)

Τα πλαστικά που προέρχονται από το πετρέλαιο καθώς και τα βιοπλαστικά που εισάγονται στην αγορά συνήθως περιέχουν πρόσθετα ή/και τροποποιητές για τη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των καθαρών πολυμερών. Τα πρόσθετα αυξάνουν την ευκαμψία, αντιστέκονται στην υπεριώδη ακτινοβολία, μειώνουν την ευφλεκτότητα ή προσδίδουν άλλα προτιμώμενα φυσικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Lambert et al., 2014). Αυτά είναι για παράδειγμα πλαστικοποιητές, χρωστικές, αντιοξειδωτικά, σταθεροποιητές φωτός και UV. Πρόσθετα ή τροποποιητές μπορούν να ενσωματωθούν σε ένα πολυμερές σε οποιαδήποτε αναλογία κατά τη διάρκεια οποιουδήποτε σταδίου πολυμερισμού ή επεξεργασίας (Niaounakis, 2013). Αυτές οι ενώσεις αλλάζουν όχι μόνο τις φυσικοχημικές ιδιότητες των πολυμερών αλλά και τις βιολογικές τους ιδιότητες συμπεριλαμβανομένων της δυνατότητας βιοδιαποδόμησης και της τοξικότητας (Liwarska-Bizukojc, 2021).



¹PEF is currently in development and predicted to be available at commercial scale in 2023. ² Regenerated cellulose films

Εικόνα 5: Παγκόσμια παραγωγή βιοπλαστικών 2021 (πηγή: Bioplastics, nova Institute (2021))

Τα βιοδιασπώμενα πλαστικά αποτελούνται από φυσικά ή μικροβιακά εκκρινόμενα πολυμερή (Rujnic-Sokele and Pilipovic, 2017). Είναι σχεδιασμένα να αποικοδομούνται πλήρως μέσω της βιολογικής δραστηριότητας σε ένα συγκεκριμένο μέσο (νερό, έδαφος και κομπόστ) και τελικά να εισέρχονται στον φυσικό κύκλο του άνθρακα (Dilkes-Hoffman et al., 2019). Ωστόσο, τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά μπορούν να αποσυντεθούν πλήρως μόνο μέσω των βιολογικών παραγόντων κάτω από ειδικές συνθήκες σε συγκεκριμένη διάρκεια. Ως εκ τούτου, μπορεί να παραμείνουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα υπό ανεπαρκείς συνθήκες υποβάθμισης (Tong et al., 2022).

Μετά τη χρήση, τόσο τα πλαστικά που προέρχονται από πετρέλαιο όσο και τα βιοπλαστικά αποτελούν απόβλητα που πρέπει να αντιμετωπίζονται σωστά. Το 2018 περίπου 250 εκατομμύρια τόνοι πλαστικών απορριμμάτων δημιουργήθηκαν παγκοσμίως (Coversio Market&Strategy, 2020). Τα περισσότερα από αυτά, δηλαδή περίπου το 70%, συλλέχθηκαν και στη συνέχεια οδηγήθηκαν σε διαχειριζόμενες χωματερές, χώρους ανακύκλωσης ή μονάδες ανάκτησης ενέργειας.

Τα υπόλοιπα πλαστικά απορρίμματα (περίπου 30%) απορρίφθηκαν ακατάλληλα (Coversio Market&Strategy, 2020). Στην πράξη εισήλθαν απευθείας στο χερσαίο ή/και στο υδάτινο οικοσύστημα. Λαμβάνοντας υπόψη πόσα πλαστικά απόβλητα παράγονται, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι τα πλαστικά σωματίδια θεωρούνται ως ο πιο άφθονος τύπος αποβλήτων που συναντώνται στο περιβάλλον (Chae and An, 2018). Υπολογίστηκε ότι περίπου το 32% όλων των πλαστικών που παράγονται μπορεί να παραμείνει στα ηπειρωτικά συστήματα. Επίσης, το γεωγραφικό έδαφος μπορεί να αποθηκεύσει ακόμη περισσότερα πλαστικά από τις ωκεάνιες λεκάνες (Nizzetto et al., 2016; de Souza Machado et al., 2018). Προφανώς αποτελεί σοβαρή απειλή για τα χερσαία οικοσυστήματα. Ταυτόχρονα, το έδαφος είναι ένα ουσιαστικό, βιολογικά ενεργό συστατικό του περιβάλλοντος που παρέχει νερό και θρεπτικά συστατικά για τους ζωντανούς οργανισμούς και συμμετέχει στον κύκλο του άνθρακα και άλλων στοιχείων μέσω των παγκόσμιων οικοσυστημάτων.

1.2.1. Μικροπλαστικά

Τα βιοπλαστικά αλλά και τα πλαστικά που προέρχονται από το πετρέλαιο και εισέρχονται στο έδαφος υπόκεινται σε πολλές βιολογικές, χημικές και φυσικές διεργασίες. Οι βιολογικοί μετασχηματισμοί συνδέονται κυρίως με τη δραστηριότητα των γαιοσκωλήκων, τη βιοστροβιλοποίηση από τις ρίζες των φυτών και τη μικροβιολογική αποσύνθεση (Rillig et al., 2017a, Rillig et al., 2017b; Zhang and Liu, 2018; Li et al., 2020). Οι φυσικοχημικές διεργασίες περιλαμβάνουν προσρόφηση, εκρόφηση, καθίζηση, ενσωμάτωση σε συσσωματώματα εδάφους, χημικές αλληλεπιδράσεις με νερό, χουμικές ενώσεις και ορισμένα άλλα συστατικά που βρίσκονται στο έδαφος (Guo et al., 2020; Li et al., 2020). Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφόρων μετασχηματισμών και διακύμανσης των καιρικών συνθηκών, (όπως η υπερϊώδης ακτινοβολία, η βροχόπτωση κ.λπ.) τα πλαστικά κατακερματίζονται σε μακροπλαστικά (<150mm), μικροπλαστικά (<5mm) και νανοπλαστικά (<100nm) σωματίδια.

Τα μικροπλαστικά που συναντώνται στο περιβάλλον διακρίνονται ανάλογα με τον τρόπο δημιουργίας τους και την προέλευση τους σε δυο κατηγορίες:

- Τα πρωτογενή μικροπλαστικά
- Τα δευτερογενή μικροπλαστικά

Πρωτογενή μικροπλαστικά

Τα πρωτογενή μικροπλαστικά (PMs, Primary Microplastics) είναι τα μικροπλαστικά που απελευθερώνονται στο περιβάλλον απευθείας με τη μορφή μικρών σωματιδίων. Περιέχονται σε προϊόντα καθημερινής περιποίησης και καλλυντικά (π.χ. οδοντόκρεμα, αφρός ξυρίσματος, κρέμες απολέπισης, αντηλιακά, σαμπουάν, αποσμητικά κ.λπ.), καθώς επίσης εμπεριέχονται σαν συνθετικές μικροΐνες στα συνθετικά υφάσματα και απελευθερώνονται κατά την πλύση (Zitko and Hanlon 1991). Τα μικροσφαιρίδια διαφεύγουν από το σημείο παραγωγής τους ή κατά την μεταφορά τους και με τη βοήθεια του ανέμου ή του θαλάσσιου κυματισμού, διασκορπίζονται και ρυπαίνουν έδαφος και νερό (Weber 1993). Τα πρωτογενή μικροπλαστικά αξιοποιούνται σε πολλούς τομείς όπως σε φαρμακευτικά προϊόντα, διαδικασίες αμμοβολής με

συνθετικά υλικά για χύτευση και σε ποικίλες εφαρμογές ως πλαστικά νάνο-σωματίδια (Derraik 2002; Gregory 1996). Μπορούν να προέλθουν επίσης από την τριβή μεγαλύτερων πλαστικών αντικειμένων κατά την κατασκευή τους π.χ. διάβρωση ελαστικών κατά την οδήγηση καθώς είναι κατασκευασμένα από συνθετικά πολυμερή αναμεμιγμένα με καουτσούκ.

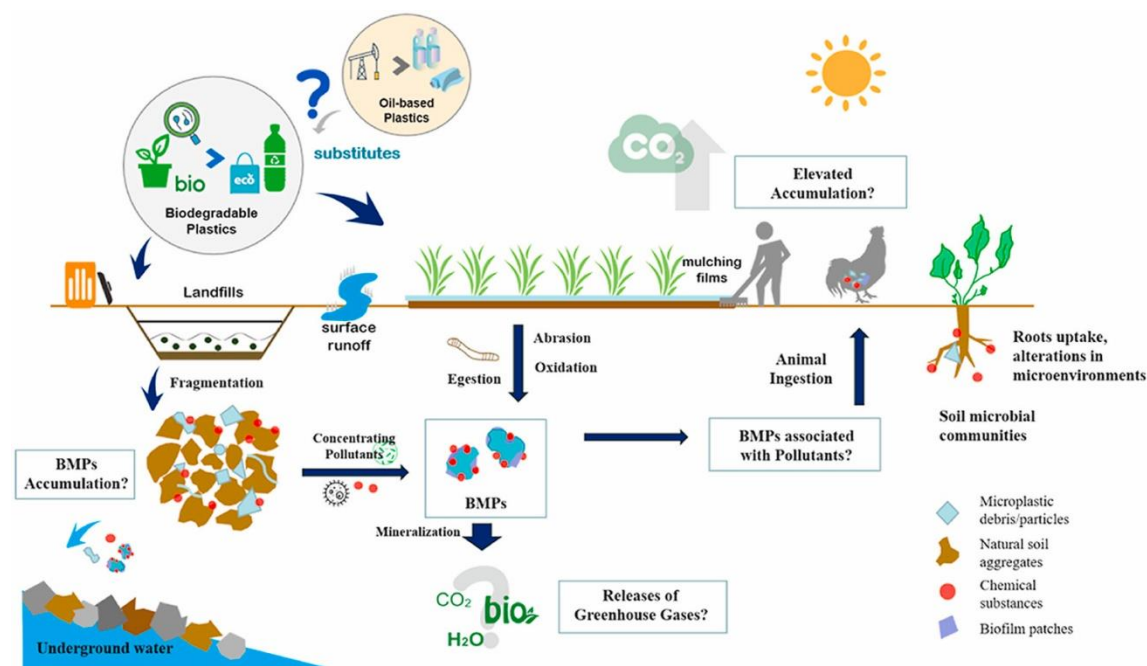
Δευτερογενή μικροπλαστικά

Τα δευτερογενή μικροπλαστικά (SMs, Secondary Microplastics) αποτελούν μικροσκοπικά πλαστικά υπολείμματα που προέρχονται από τον κατακερματισμό μεγαλύτερων πλαστικών αντικειμένων (Ryan et al. 2009; Thompson et al. 2004). Με την πάροδο του χρόνου και ενώ τα πλαστικά παραμένουν στο χερσαίο περιβάλλον, μια σειρά βιολογικών, χημικών και φυσικών διεργασιών λαμβάνουν χώρα με αποτέλεσμα τη μείωση της δομικής τους ακεραιότητας και τον σταδιακό κατακερματισμό τους σε μικρότερα κομμάτια (Barnes et al. 2009). Συγκεκριμένα η έκθεση των πλαστικών στην ηλιακή ακτινοβολία UV έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση της πολυμερικής αλυσίδας και το σπάσιμο των δεσμών της, οδηγώντας στο σχηματισμό ρηγματώσεων και αλλοιώσεων στο χρώμα τους (Andrady 2011; Barnes et al. 2009; Moore 2008). Υπάρχουν μικροπλαστικά τα οποία αποδομούνται περαιτέρω δημιουργώντας τα νανοπλαστικά, τα οποία ανιχνεύονται πλέον σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο έδαφος (Galgani et al. 2010). Η παρουσία νανοπλαστικών στο χερσαίο περιβάλλον είναι πιθανό να έχει αυξανόμενη σημασία στα επόμενα χρόνια επηρεάζοντας τους μικροοργανισμούς και καταλήγοντας στην τροφική αλυσίδα.



Εικόνα 6: Μικροπλαστικά (πηγή: Tsianta, 2022)

Τα πετροχημικά πλαστικά και τα βιοπλαστικά σωματίδια, ιδιαίτερα τα μικρότερα (μικρό- και νανοσωματίδια), μπορούν εύκολα να μεταφερθούν κάθετα και οριζόντια στη μήτρα του εδάφους και μερικά από αυτά μπορεί να φτάσουν στον υδροφόρο ορίζοντα συμβάλλοντας στη μόλυνση των υπογείων υδάτων. Ως αποτέλεσμα, η ρύπανση του χερσαίου διαμερίσματος από πλαστικά και βιοπλαστικά συνέβαλε στις αλλαγές στη χημική σύνθεση του εδάφους και επιπλέον επηρέασε τη δομή και τις λειτουργίες του, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης στους οργανισμούς του εδάφους. Η τύχη και η συμπεριφορά των πλαστικών σωματιδίων στο επίγειο διαμέρισμα εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες ένας εκ των οποίων είναι η ευαισθησία τους στη μικροβιολογική αποσύνθεση (Liwarska-Bizukojc, 2021).



Εικόνα 7: Βιοπλαστικά στο έδαφος (πηγή: Qin et al., 2021)

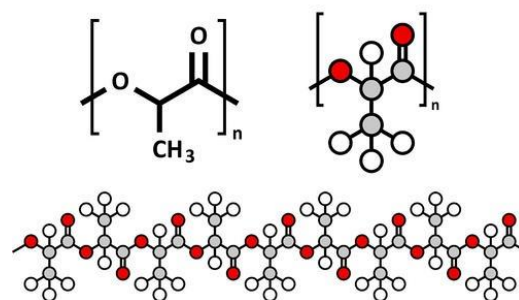
2. PLA (POLYLACTIC ACID - ΠΟΛΥΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ)

Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) είναι ένας φιλικός προς το περιβάλλον και βιοαποικοδομήσιμος αλειφατικός πολυεστέρας, ο οποίος μπορεί να παραχθεί από καλαμπόκι που περιέχει άμυλο ή άλλα γεωργικά απόβλητα με πολυμερισμό συμπύκνωσης ή πολυμερισμό ανοιχτού δακτυλίου. Το PLA είναι ένας εξαιρετικός υποψήφιος για την ανάπτυξη βιοσύνθετων υλικών, επειδή μπορεί να υποβαθμιστεί πλήρως και να οδηγήσει σε μικρότερη αρνητική επίδραση στο περιβάλλον σε σύγκριση με τα συμβατικά πλαστικά με βάση το πετρέλαιο. Ως ένα από τα θερμοπλαστικά υλικά, το πολυγαλακτικό οξύ έχει εμπορευματοποιηθεί και χρησιμοποιείται ευρέως στους τομείς της γεωργίας, της ιατρικής, της συσκευασίας, της αυτοκινητοβιομηχανίας και άλλων βιομηχανιών λόγω της καλής επεξεργασιμότητας και της υψηλής αντοχής του. Ωστόσο, η ευρύτερη εφαρμογή του περιορίζεται από ορισμένα μειονεκτήματα, όπως η φύση της ευθραυστότητας, το υψηλό κόστος και η χαμηλή θερμική σταθερότητα και σκληρότητα. Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων, οι φυσικές ίνες χρησιμοποιούνται συνήθως για ενισχυμένο PLA, επειδή είναι επίσης μη τοξικές και πλήρως βιοαποικοδομήσιμες, οι οποίες μπορούν να εξαχθούν από ανανεώσιμες πηγές και να ανακυκλωθούν εύκολα (Guo et al., 2022).

Το μονομερές, γαλακτικό οξύ, που χρησιμοποιείται στις διαδικασίες πολυμερισμού, παράγεται συνήθως με ζύμωση. Παρά τη βιοσυμβατή φύση του, η αποδόμηση του PLA στο περιβάλλον δεν είναι εύκολη επειδή, υπό συνθήκες περιβάλλοντος, το PLA στο έδαφος ή στα λύματα βρέθηκε να είναι ανθεκτικό σε μικροβιακές επιθέσεις (Hamad et al., 2015). Όπως ο Hamad et al. (2015) εξηγεί, το PLA πρέπει πρώτα να υδρολυθεί σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 58°C) για να μειωθεί το μοριακό βάρος πριν αρχίσει η βιοαποδόμηση (Bátori et al., 2018).



Εικόνα 8: Ανάλυση κύκλου ζωής PLA
(πηγή: Biodegradable Food Pack, 2019)

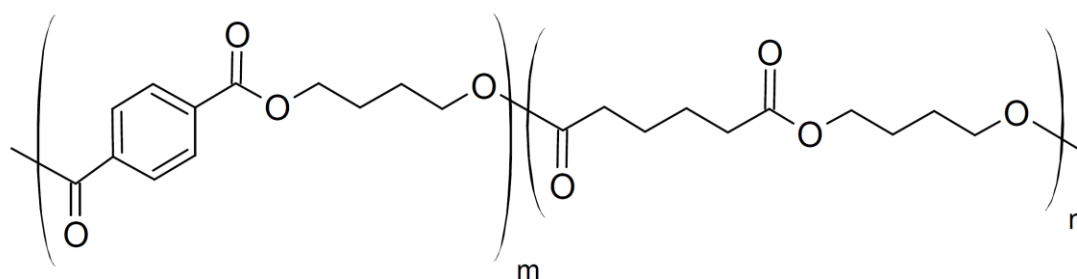


Εικόνα 9: Χημικός μοριακός τύπος PLA και δομή χημικών δεσμών του (πηγή: Anon, 2021)

3. PBAT (POLYBUTYLENE ADIPATE TEREPHTHALATE – ΤΕΡΕΦΘΑΛΙΚΟ ΑΔΙΠΙΚΟ ΠΟΛΥΒΟΥΤΥΛΕΝΙΟ)

Το PBAT είναι ένας κομποστοποιήσιμος βιοπολυεστέρας, που μπορεί να ληφθεί από ανανεώσιμες πηγές, με μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον. Χάρη στη χαμηλότερη τιμή του, την ευκολία επεξεργασίας και ιδιαίτερα την υψηλή ολκιμότητα, το PBAT θα εμφανιστεί πολύ πιθανότατα τα επόμενα χρόνια ως το κατεξοχήν εύκαμπτο βιοπλαστικό, μπροστά από ανταγωνιστές όπως το ηλεκτρικό πολυβουτυλένιο (PBS) ή η πολυκαπρολακτόνη (PCL) και θα γίνει ένα από τα πιο σημαντικά βιοδιασπώμενα πλαστικά, μαζί με το PLA το οποίο παραμένει το κύριο βιοπολυμερές για άκαμπτες εφαρμογές. Το PBAT αναμιγνύεται συχνά με το PLA επειδή του προσδίδει ακαμψία. Το PLA είναι ένα πολύ άκαμπτο υλικό με χαμηλή αντοχή στην κρούση επομένως είναι συμπληρωματικό του PBAT στο σχεδιασμό βιοδιασπώμενων πλαστικών υψηλής απόδοσης και πολλαπλών λειτουργιών (Aversa et al., 2022). Το PBAT χρησιμοποιείται κυρίως για κομποστοποιήσιμες πλαστικές σακούλες στη γεωργία. Ενώ αυτό το υλικό έχει αποδειχθεί ότι είναι κομποστοποιήσιμο, η συμπεριφορά του σε επαφή με το νερό δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή. Έχει τονιστεί στο παρελθόν ότι το PBAT υφίσταται υδρόλυση, ωστόσο, οι οδοί αποδόμησης είναι ακόμα ασαφείς.

Το PBAT έχει 3 τύπους εστέρων στη ραχοκοκαλιά του άνθρακα που σημαίνει ότι η υδρόλυση μπορεί να συμβεί σε 3 διαφορετικές θέσεις. Η Ferreira et al. πρότεινε ότι η υδρόλυση λαμβάνει χώρα κυρίως στον εστερικό δεσμό που βρίσκεται μεταξύ των ομάδων τereφθαλικού και αδιπικού αλλά χωρίς καμία σαφή ένδειξη. Επιπλέον, η επίδραση των σχισμών της αλυσίδας που προκαλούνται από την υδρόλυση στη μορφολογία και τις μηχανικές ιδιότητες του πολυμερούς δεν έχει εξεταστεί λεπτομερώς μέχρι τώρα, παρά τη σημασία της στον σχηματισμό δευτερογενών μικροπλαστικών. Στην πραγματικότητα, για την κατανόηση των μηχανισμών που σχετίζονται με τον κατακερματισμό του πολυμερούς, είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψη οι αλλαγές στη μηχανική συμπεριφορά με το χρόνο. Πιο συγκεκριμένα, υποτίθεται ότι τα μικροπλαστικά δημιουργούνται με κατακερματισμό όταν το πολυμερές είναι εύθραυστο (Aversa et al., 2022). Παρά την έλλειψη γνώσης σχετικά με την επίδραση της υδρόλυσης PBAT στη μηχανική του συμπεριφορά, είναι ευρέως γνωστό ότι η σχάση της αλυσίδας που προκαλείται από χημική αποδόμηση ημι-κρυσταλλικών πολυμερών οδηγεί σε ευθραυστότητα του υλικού, δηλαδή το υλικό αλλάζει από όλκιμο σε εύθραυστο μετά τη γήρανση. Αυτή ευθραυστότητα συνήθως οφείλεται σε απώλεια εμπλοκών εντός του πολυμερούς (Aversa et al., 2022).



Εικόνα 10: Χημικός μοριακός τύπος PBAT (πηγή: Polymerdatabase.com, 2011)



Εικόνα 11: Βασικές χρήσεις του PBAT (πηγή: 1,4-Butanediol / Polytetramethylene Ether Glycol / Gamma Butyrolactone / N-Methylpyrrolidone / Tetrahydrofuran / Poly Butylene Adipate-Co-Terephthalate / Welinks Petrochemicals and Relevant Chemicals Manufacturer and Supplier in China, 2022)

4. ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ (ΒΙΟ)ΠΛΑΣΤΙΚΩΝ

Είτε πρόκειται για την πλαστική ρύπανση που προκαλείται από τη συσσώρευση μικροπλαστικών είτε για την έμμεση βλάβη που προκαλείται από την ύπαρξή τους, θα πρέπει να αναζητήσουμε έναν ή περισσότερους φιλικούς και αποτελεσματικούς προς το περιβάλλον τρόπους αφαίρεσης (μικρό)πλαστικών. Επί του παρόντος, έχουν γίνει ορισμένες μελέτες για την αποδόμηση των (μικρό)πλαστικών. Η αποδόμηση χωρίζεται σε μεθόδους αποδόμησης, χωρίς βιολογική παρέμβαση και σε μεθόδους αποδόμησης με βιολογική παρέμβαση (Lambert et al., 2014). Υπάρχουν κυρίως οι ακόλουθες τέσσερις οδοί αποδόμησης:

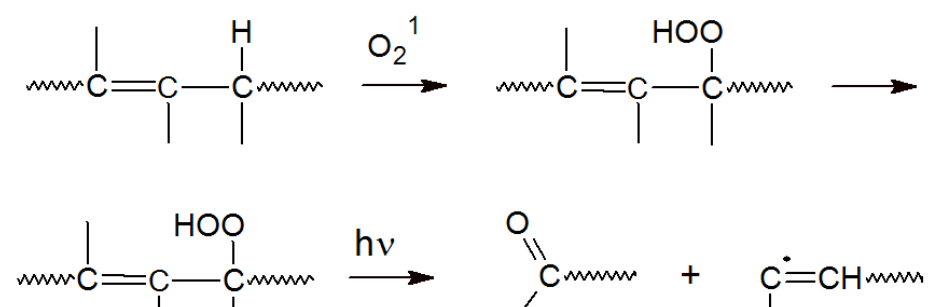
- Φώτο-οξειδωτική αποδόμηση
- Θερμική αποδόμηση
- Υδρολυτική αποδόμηση και
- Βιοαποδόμηση (Webb et al., 2013)

Τα πλαστικά μπορούν να διαφοροποιηθούν σε αποικοδομήσιμα και μη αποικοδομήσιμα πολυμερή με βάση τις χημικές τους ιδιότητες (Ghosh et al., 2013). Τα πλαστικά που προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές είναι βιοδιασπώμενα πλαστικά. Αυτά αποικοδομούνται φυσικά ως πηγή κυτταρίνης, αμύλου και υλικού φυκιών, ένα σημαντικό συστατικό στα φυτά, στα ζώα και στα φύκια. Αυτά τα πολυμερή παράγονται επίσης από μικροοργανισμούς. Τα μη αποικοδομήσιμα πλαστικά, συνήθως γνωστά ως συνθετικά πλαστικά, προέρχονται από πετροχημικά και έχουν υψηλότερο μοριακό βάρος λόγω των επαναλήψεων μικρών μονάδων μονομερών (Imre and Pukánszky, 2013). Τα πλαστικά που αποικοδομούνται από μικροοργανισμούς είναι γνωστά ως βιοαποδομήσιμα πλαστικά και οι μικροοργανισμοί μπορούν να τα αποικοδομήσουν σε H_2O και CO_2 (Nakajima-Kambe et al., 2009). Ο ρυθμός αποδόμησης των πολυμερών μπορεί να αυξηθεί με τη χρήση θερμό-οξειδωτικών και φωτοαποικοδομητών παραγόντων (Mahdiah and Mukti, 2013). Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν τη ρήξη των αλυσίδων οξειδώνοντας τα πολυμερή μόρια. Πολλές φυσικές και χημικές αλλαγές συμβαίνουν λόγω της φωτοξείδωσης, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης του μοριακού βάρους των πολυμερών και της παραγωγής καρβονυλικών ομάδων. Στη θερμική οξείδωση δίνεται υψηλή θερμοκρασία μεγαλύτερη από το σημείο τήξης που μειώνει τη θερμότητα σύντηξης και αυξάνει το επίπεδο παραγωγής καρβονυλομάδας. Ως αποτέλεσμα, τα πολυμερή είναι πιο πιθανό να αποικοδομηθούν από μικροοργανισμούς (Manzur et al., 2004). Ο διαχωρισμός φάσεων, η διάβρωση, οι τύποι επεξεργασίας αποχρωματισμού, οι ρωγμές και οι τύποι πολυμερών είναι οι διάφοροι παράγοντες που ευθύνονται για τη βιοαποδόμηση και την πηγή ρύπανσης στο περιβάλλον (Thomas et al., 2015).

4.1. ΤΥΠΟΙ ΥΠΟΒΑΘΜΙΣΗΣ

4.1.1. Φώτο-οξειδωτική αποδόμηση

Η κύρια πηγή αλλοίωσης των πολυμερών είναι το φως. Αυτή η διαδικασία ξεκινά με απορρόφηση φωτός και παραδείγματα αυτής της διαδικασίας αποδόμησης είναι η φωτοαποδόμηση και η φωτοοξείδωση (Rånby, 1989). Τα συνθετικά πολυμερή είναι επιρρεπή στην αποδόμηση από διεργασίες που ξεκινούν από την υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Η διάρκεια ζωής του πολυμερούς υλικού, που χρησιμοποιείται για διάφορες εφαρμογές, καθορίζεται από τις ακτινοβολίες UV που κυμαίνονται από 290 έως 400nm και το ηλιακό φως είναι η πηγή τέτοιων ακτινοβολιών (Jensen and Kops, 1980). Η φωτοακτινοβολία οδηγεί στην παραγωγή ομάδων εστέρα, αλδεΐδης, προπυλίου. Οι δεσμοί C-C διασπώνται εύκολα από την υπεριώδη ακτινοβολία (Nagai et al., 2005)

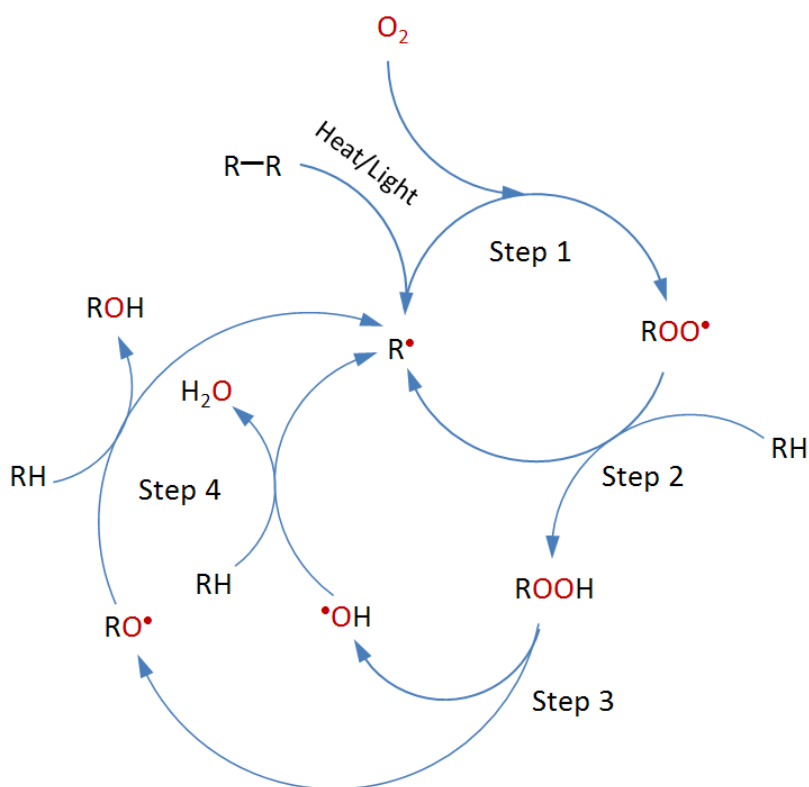


Εικόνα 12: Φώτο-οξειδωτική αντίδραση πολυμερών (πηγή: Polymerdatabase.com, 2021)

4.1.2. Θερμική αποδόμηση

Κανονικά, η θερμική και η φωτοχημική αποδόμηση θεωρούνται παρόμοιες διεργασίες καθώς και οι δύο ταξινομούνται ως οξειδωτικές διεργασίες ή οξειδωτική αποδόμηση. Η πρώτη διαφορά είναι στην αλληλουχία των αρχικών βημάτων ενώ η δεύτερη διαφορά είναι στη θέση της αντίδρασης.

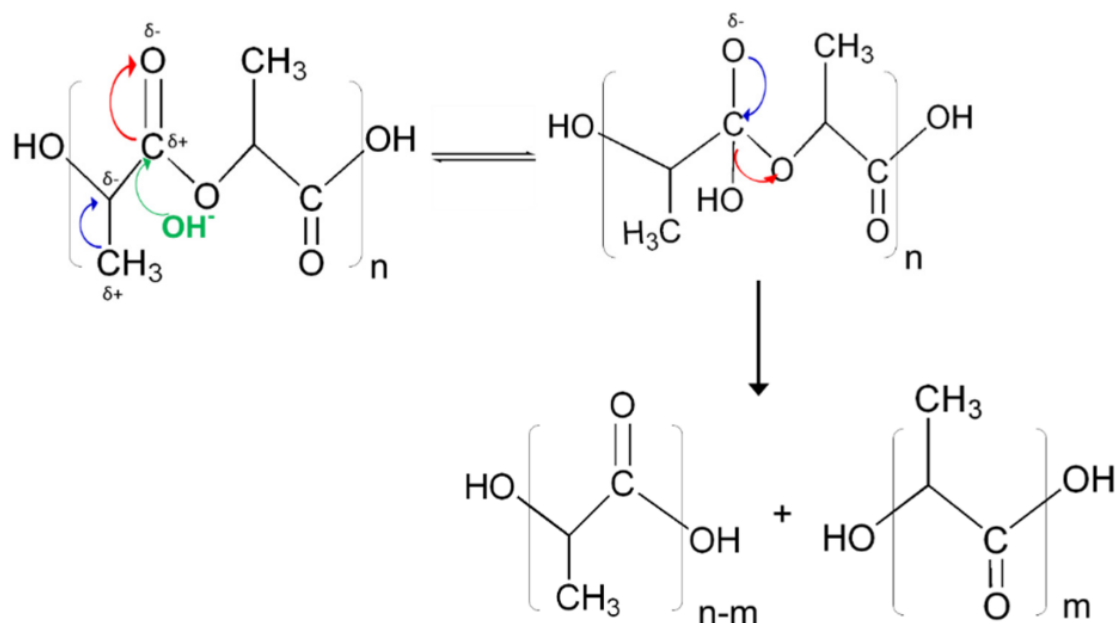
Πιο συγκεκριμένα, στη θερμική αποδόμηση, οι αντιδράσεις συμβαίνουν σε ολόκληρο το τμήμα του πολυμερούς ενώ στη φωτοχημική αποδόμηση, οι αντιδράσεις αποδόμησης συμβαίνουν μόνο στην επιφάνεια του πολυμερούς (Tyler, 2004). Η θερμική αποδόμηση λαμβάνει χώρα με τυχαία αντίδραση ή αντίδραση αποπολυμερισμού. Για την έναρξη του απαιτείται θερμοκρασία και υπεριώδες φως (Teare et al., 2000). Λόγω ατελειών, οι δεσμοί (υπεροξείδιο/αιθερικός σύνδεσμος) που υπάρχουν στην αλυσίδα γίνονται αδύναμοι και ο αποπολυμερισμός συνήθως ξεκινά από τέτοιους ασθενείς δεσμούς. Σε υψηλή θερμοκρασία, μεγάλη ποσότητα πολυμερών αποπολυμερίζεται π.χ. το PE αποσυντίθεται σε υψηλή θερμοκρασία και παράγει μικρά μονομερή. Ο μεθακρυλικός πολυμεθυλεστέρας (PMMA) μπορεί επίσης να μετατραπεί ποσοτικά σε μονομερή (Ramis et al., 2004).



Εικόνα 13: Θερμική αποδόμηση πολυμερών (πηγή: Polymerdatabase.com, 2015)

4.1.3. Υδρολυτική αποδόμηση

Η υδρόλυση είναι ένας τρόπος με τον οποίο τα πλαστικά υφίστανται χημική αποδόμηση. Η ικανότητα ενός πλαστικού να αποσυντίθεται από το νερό εξαρτάται από το εάν το πλαστικό περιέχει υδρολυόμενους ομοιοπολικούς δεσμούς όπως ομάδες εστέρα, αιθέρα, ανυδρίτη, αμίδιο, καρβαμίδιο ή εστεραμίδιο κ.λπ. Η δραστηριότητα του νερού, η θερμοκρασία, το pH και ο χρόνος είναι τα κλειδιά παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της υδρόλυσης (Lucas et al., 2008). Τα πλαστικά με υδρολυόμενους ομοιοπολικούς δεσμούς (π.χ. PET) μπορούν να απορροφήσουν νερό, προάγοντας έτσι την υδρολυτική αποδόμηση του πολυμερούς (Krzan et al., 2006). Τα ιόντα υδρογόνου σε όξινα ή αλκαλικά μέσα προσβάλλουν τους εστερικούς δεσμούς και ο πολυεστέρας υφίσταται υδρολυτική αποδόμηση (Magued et al., 2001). Εκτός από το σπάσιμο της αλυσίδας, η υδρολυτική αποδόμηση σε αλκαλικά μέσα οδηγεί επίσης σε διάβρωση της επιφάνειας των πολυεστέρων (Magued et al., 2001).



Εικόνα 14: Υδρολυτική αντίδραση PLA (πηγή: Vaid et al., 2021)

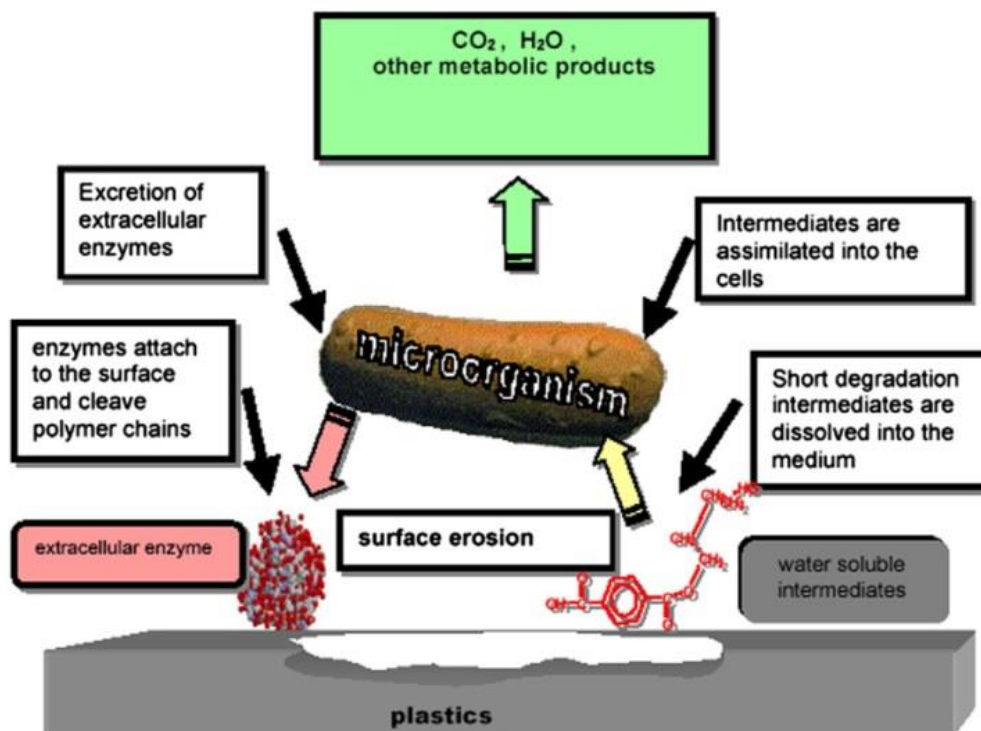
4.1.4. Βιοαποδόμηση

Σε ένα υλικό, οποιαδήποτε φυσική και χημική αλλαγή που προκαλείται από τη δράση μικροοργανισμών είναι γνωστή ως βιοαποδόμηση. Τα φυσικά και τα συνθετικά πλαστικά αποικοδομούνται από τη δράση μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ακτινομυκήτων και των μυκήτων (Ishigaki et al., 2004; Alshehrei, 2017).

4.1.4.1. Αερόβια βιοαποδόμηση (αερόβια αναπνοή)

Σε αυτόν τον τύπο αποδόμησης, οι μικροοργανισμοί διασπούν μεγάλες οργανικές ενώσεις σε μικρότερες ενώσεις χρησιμοποιώντας το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων. Υποπροϊόντα αυτής της διαδικασίας είναι το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό (Müller, 2005; Priyanka and Archana, 2011).

Άνθρακας (πλαστικού) + Οξυγόνο → Διοξείδιο του άνθρακα + νερό + υπολείμματα άνθρακα



Εικόνα 15: Αερόβια βιοαποδόμηση (πηγή: Lakna, 2019)

4.1.4.2. Αναερόβια βιοαποδόμηση

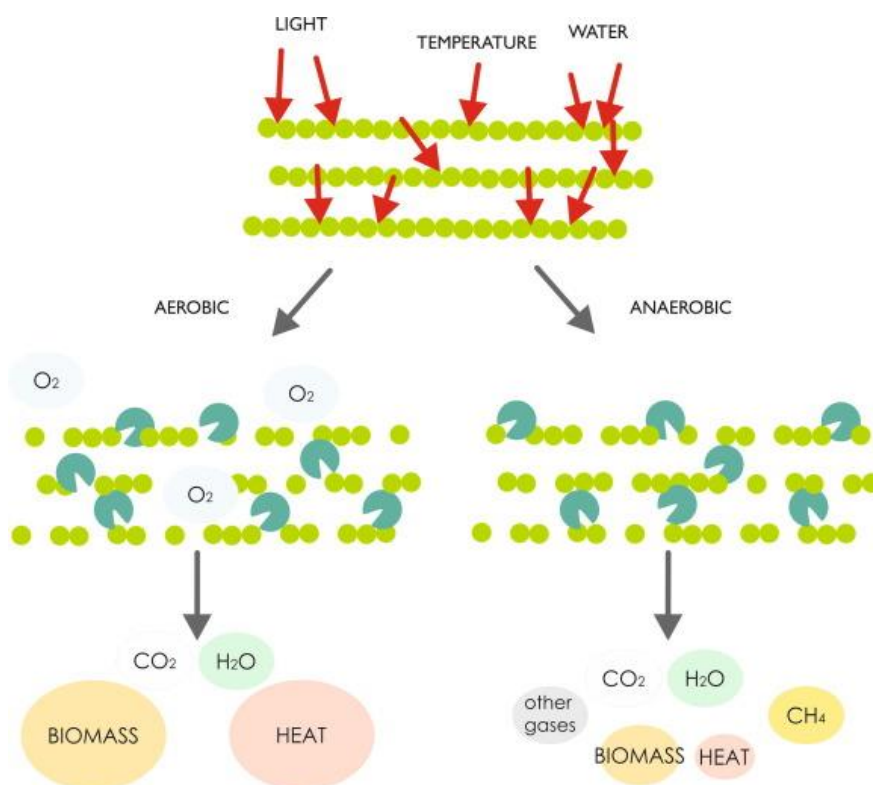
Στην αναερόβια βιοαποδόμηση, το οξυγόνο δεν είναι απαραίτητο για τη διάσπαση των ενώσεων από τη δράση των μικροοργανισμών. Το οξυγόνο είναι ένα σημαντικό συστατικό για τη φυσική εξασθένηση των ρύπων σε χώρους επικίνδυνων αποβλήτων. Τα αναερόβια βακτήρια χρησιμοποιούν νιτρικά, σίδηρο, θειικό άλας, μαγγάνιο και διοξείδιο του άνθρακα ως δέκτη ηλεκτρονίων στη θέση του οξυγόνου για να διασπάσουν μεγάλες οργανικές ενώσεις σε μικρότερες ενώσεις (Zeenat et al., 2021).

Άνθρακας (πλαστικού) → μεθάνιο + διοξείδιο του άνθρακα + νερό + υπολείμματα άνθρακα

Τα πολυμερή δεν μεταφέρονται απευθείας στα κύτταρα των μικροοργανισμών μέσω των κυτταρικών τοιχωμάτων τους επειδή είναι μεγάλα στο μέγεθός τους και δεν είναι υδατοδιαλυτά. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτά τα πολυμερή ως πηγή ενέργειας εκκρίνοντας εξωκυτταρικά ένζυμα. Τα πολυμερή αποπολυμερίζονται από αυτά τα ένζυμα έξω από τα βακτηριακά κύτταρα. Τα ένζυμα παίζουν το ρόλο τους στη βιοαποδόμηση των πολυμερών τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά. Ο αποπολυμερισμός και η ανοργανοποίηση είναι οι δύο διαδικασίες που εμπλέκονται στη βιολογική αποδόμηση των πλαστικών πολυμερών (Zeenat et al., 2021).

Τα εξωένζυμα, εξωκυτταρικά εκκρινόμενα ένζυμα, διασπούν τα μεγάλα πολυμερή και παράγουν μικρά μόρια που είναι αρκετά μικρά και υδατοδιαλυτά. Αυτά τα μόρια μπορούν να περάσουν από ημιπερατή βακτηριακή μεμβράνη και να χρησιμοποιηθούν ως πηγή ενέργειας.

Η διαδικασία κατά την οποία διασπώνται μεγάλα πολυμερή είναι γνωστή ως αποπολυμερισμός ενώ η διαδικασία κατά την οποία τα τελικά προϊόντα είναι ανόργανα όπως H_2O , CH_4 , CO_2 είναι γνωστή ως ανοργανοποίηση (Gu, 2003). Στην περίπτωση αερόβιου περιβάλλοντος, παρατηρείται μόνο παραγωγή H_2O , CO_2 και μικροβιακής μάζας ως τελικών προϊόντων, ενώ υπό αναερόβιες/μεθανογόνες και σουλφιδογενείς συνθήκες, εκτός από αυτά τα τρία βασικά συστατικά, παρατηρείται παραγωγή CH_4 και H_2S ως επιπλέον τελικά προϊόντα του πολυαιθυλενίου (Shahnawaz et al., 2016).



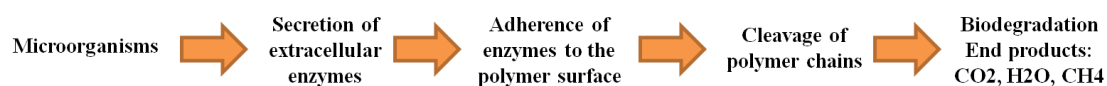
Εικόνα 16: Βιοαποδόμηση βιοπολυμερών: αερόβια έναντι αναερόβιας αποδόμησης. Τα σκούρα πράσινα σύμβολα αντιπροσωπεύουν τους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στις διαδικασίες (πηγή: Bátori et al., 2018)

4.1.4.3. Μηχανισμός της βιοαποδόμησης

Η βιοαποδόμηση των πολυμερών αποτελείται από τρία στάδια:

1. Προσκόλληση μικροοργανισμού στην επιφάνεια του πολυμερούς
2. Χρήση πολυμερούς ως πηγής άνθρακα και
3. Αποδόμηση πολυμερούς

Οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται στην επιφάνεια των πολυμερών και αποικοδομούν αυτά τα πολυμερή εκκρίνοντας ένζυμα προκειμένου να λάβουν ενέργεια για την ανάπτυξή τους (Danso et al., 2018). Μεγάλα πολυμερή αποικοδομούνται σε μονομερή και ολιγομερή που είναι μόρια χαμηλού μοριακού βάρους. Ορισμένα ολιγομερή μπορεί να αφομοιωθούν στο εσωτερικό περιβάλλον των μικροοργανισμών αφού διαχυθούν στο εσωτερικό τους (εικόνα δεξιά), (Zeenat et al., 2021).



Εικόνα 17: Μηχανισμός ενζυματικής βιοαποδόμησης των πολυμερών (πηγή: Alshehrei, 2017).

5. ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

5.1. ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΕΛΑΦΟΥΣ

Το έδαφος είναι ένας πολύπλοκος μικροβιότοπος που ρυθμίζει την παραγωγικότητα των φυτών και τη διατήρηση βιογεωχημικών κύκλων μέσω της δραστηριότητας μικροοργανισμών ικανών να αποικοδομούν οργανικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των ξενοβιοτικών. Δεδομένου ότι ο αέρας, τα υπόγεια και τα επιφανειακά ύδατα θα μπορούσαν να επηρεαστούν αρνητικά από την υποβάθμιση του εδάφους, η υγεία του που προκύπτει από το συνδυασμό χημικών, φυσικών και βιολογικών συστατικών, καθίσταται θεμελιώδης για την ακεραιότητα του χερσαίου οικοσυστήματος (Nannipieri et al., 2003). Από την άλλη πλευρά, είναι καλά τεκμηριωμένο ότι οι ανθρώπινες βιομηχανικές δραστηριότητες επηρεάζουν έντονα τα βιολογικά συστήματα και, ειδικότερα, την κατάσταση του εδάφους. Η έννοια της υγείας του εδάφους εισήχθη στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Σύμφωνα με τον πρόσφατο ορισμό των Doran και Safley (1997), η υγεία του εδάφους είναι «η συνεχής ικανότητα του εδάφους να λειτουργεί ως ζωτικό ζωντανό σύστημα, εντός των ορίων του οικοσυστήματος και της χρήσης γης, για τη διατήρηση της βιολογικής παραγωγικότητας, την προώθηση της ποιότητας του αέρα και του υδάτινου περιβάλλοντος καθώς και τη διατήρηση της υγείας των φυτών, των ζώων και των ανθρώπων» (Avidano et al., 2005).

5.2. ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Η πολυπλοκότητα της έννοιας της βιοποικιλότητας αντανακλάται στους διάφορους ορισμούς που έχουν υιοθετηθεί από διάφορους συγγραφείς. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των ορισμών είναι ότι όλοι αναφέρονται στα τρία κύρια επίπεδα της βιοποικιλότητας, δηλαδή οικοσυστήματα, είδη και γονίδια. Τα τρία επίπεδα αυτά αναγνωρίζονται και στον ορισμό που υιοθετήθηκε από τη Σύμβαση για τη Βιολογική Ποικιλότητα (ΣΒΠ). “Βιολογική ποικιλότητα σημαίνει την ποικιλία όλων των ζώντων οργανισμών απ’ όλα τα οικοσυστήματα όπου απαντούν (χερσαία, θαλάσσια και άλλα υδάτινα) και τα οικολογικά συμπλέγματα των οποίων αποτελούν μέρος. Περιλαμβάνει δε, την ποικιλότητα των ειδών, την ενδοειδική ποικιλότητα και την ποικιλότητα των οικοσυστημάτων” (άρθρο 2, ΣΒΠ). Το έδαφος είναι βιολογικά ενεργό, επειδή μέσα στη μάζα του ζει πλήθος οργανισμών, από μικροσκοπικού μεγέθους βακτήρια έως μεγαλύτερα σε μέγεθος σπονδυλωτά (π.χ. τρωκτικά). Ο αριθμός αλλά και το είδος των οργανισμών μεταβάλλονται με το βάθος και άλλα γνωρίσματα του εδάφους. Οι οργανισμοί επιζούν και αναπτύσσονται ευκολότερα εκεί όπου υπάρχουν οι βέλτιστες αβιοτικές συνθήκες και κυρίως το κατάλληλο δυναμικό οξειδοαναγωγής, το pH, η αλατότητα, η θερμοκρασία, το φως και η υγρασία, για την επιβίωσή τους (Σακελλαριάδης 1990). Η πλειονότητα των οργανισμών του εδάφους ζει στα 5 πρώτα 10 cm, τα οποία συνήθως αντιστοιχούν στον οργανικό Α εδαφικό ορίζοντα. Μια μέση κατά βάρος ποσοστιαία κατανομή των οργανισμών στα εδάφη είναι η παρακάτω (Σακελλαριάδης 1990).

1. Μύκητες και φύκη, περίπου 40%,
2. Ακτινομύκητες και βακτήρια, 40%,
3. Γαιοσκώληκες και άλλοι οργανισμοί, 15% και
4. Μεγαλύτεροι σε μέγεθος οργανισμοί. 5%.

Από τους οργανισμούς του εδάφους, εκείνοι που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από την άποψη των βιολογικών διεργασιών είναι τα βακτήρια, οι ακτινομύκητες, οι μύκητες, τα πρωτόζωα, οι νηματώδεις, οι γαιοσκώληκες, τα μαλάκια και τα αρθρόποδα (Σακελλαριάδης 1990). Αναφορικά με την εδαφική γονιμότητα και γενικότερα την ποιότητα του εδάφους το σημαντικότερο ρόλο κατέχουν οι μικροοργανισμοί. Θεωρείται για παράδειγμα ότι η ύπαρξη ποικίλων, από άποψη δομική και λειτουργική, εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων συνιστά εχέγγυο βιώσιμης απόδοσης της γεωργικής γης, της υγείας του οικοσυστήματος και της ισορροπίας της τροφικής αλυσίδας. (Παπαθεοδώρου and Στάμου, 2013).

5.2.1. Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι οι μικρότεροι σε μέγεθος μονοκύτταροι οργανισμοί που ζουν στο έδαφος. Έχουν διάφορα σχήματα και σε ορισμένες περιπτώσεις περιβάλλονται από τριχίδια που τους επιτρέπουν να αναπτύξουν αυξημένη κινητικότητα, προϋπόθεση σημαντική για τη δραστηριότητά τους. Τα βακτήρια του εδάφους ανάλογα με τον μεταβολισμό τους χαρακτηρίζονται ως φωτοαυτότροφα, φωτοετερότροφα χημειοαυτότροφα και χημειοετερότροφα. Οι δυνατότητές του έγκεινται στο γεγονός ότι χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τον ήλιο και ως πηγή άνθρακα το CO₂ ή άλλες οργανικές ή ανόργανες ουσίες όπως αλκοόλες, οργανικά οξέα και υδατάνθρακες. Η σημασία των βακτηρίων οφείλεται στην εξαιρετικά μεγάλη προσαρμοστικότητά τους σε μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών. Τα βακτήρια είναι δραστικά σε όλα τα είδη των οργανικών ουσιών εκτός της λιγνίνης. Επειδή ο ρυθμός αύξησης των βακτηρίων είναι πιο γρήγορος σε σχέση με αυτόν των μυκήτων, τα

βακτήρια κυριαρχούν στην αποδόμηση υποστρωμάτων μικρού μοριακού βάρους. Τα βακτήρια αποτελούν τη μόνη ομάδα μικροοργανισμών της οποίας πολλά μέλη είναι ικανά για μεταβολισμό και σε αναερόβιες συνθήκες (Meyer 1994).

5.2.2. Μύκητες

Οι περισσότεροι μύκητες είναι ετερότροφοι και διαθέτουν ποικιλία ενζύμων για την αποδόμηση των νεκρών οργανικών ουσιών στο έδαφος (σαπρόφιλα). Σε επαρκώς αεριζόμενα εδάφη, οι μύκητες αποτελούν το μεγαλύτερο τμήμα της μικροβιακής μάζας λόγω της εκτεταμένης αύξησης των μυκηλιακών τους υφών. Ο βιολογικός ρόλος των μυκήτων (Burns και Martin 1986) στο εδαφικό οικοσύστημα είναι σημαντικός γιατί προμηθεύονται τον άνθρακα για την αύξησή τους συνήθως από τις πηκτίνες, κυτταρίνες, ημικυτταρίνες και λιγότερο από τη λιγνίνη των φυτικών υπολειμμάτων που προστίθενται στο έδαφος. Επίσης, ακινητοποιούν μεγάλες ποσότητες N, λόγω της μεγάλης τους βιομάζας και της αντοχής των μυκηλίων τους στην αποδόμηση. Οι μύκητες πλεονεκτούν έναντι των άλλων μικροοργανισμών του εδάφους, διότι ορισμένα είδη επιβιώνουν και εξακολουθούν την αποικοδομητική τους δραστηριότητα και σε όξινες εδαφικές συνθήκες. Περιοριστικό παράγοντα για αυτήν τη δραστηριότητα των μυκήτων αποτελεί η έλλειψη οξυγόνου. Έτσι, οι μύκητες δεν μπορούν να αποικοδομούν σε εδάφη κατακλυζόμενα από νερά, καθώς και στους βαθύτερους εδαφικούς ορίζοντες, όπου η διάχυση του ατμοσφαιρικού αέρα, και άρα η ανανέωση του οξυγόνου, είναι πολύ μικρή.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι χάρη στους υψηλούς ρυθμούς αύξησης που διαθέτουν, τα βακτήρια και οι μύκητες αποκρίνονται ταχύτατα στις διαταραχές και αποτελούν δείκτες των αλλαγών που συμβαίνουν στο έδαφος. Η μικροβιακή δραστηριότητα στο έδαφος περιορίζεται κυρίως από ελλείψεις σε πηγές C. Αυτός είναι και ο λόγος που σημειώνεται άμεσα αύξηση αυτής της δραστηριότητας όταν προστεθεί στο έδαφος γλυκόζη. Μάλιστα, η έρευνα διαπιστώνει υψηλή συσχέτιση ανάμεσα στο ποσό του οργανικού C (C_{org}) και το ποσό της μικροβιακής βιομάζας ($C_{μικρ}$). Επιπρόσθετα, η προσθήκη οργανικών πρόσθετων, όπως το κομπόστ, η ιλύς από εγκαταστάσεις βιολογικών καθαρισμών κλπ, συνιστά διαταραχή που ενδεχόμενα επάγει αλλαγές στη εδαφική μικροβιακή κοινότητα. Τα οργανικά πρόσθετα χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση υποβαθμισμένων-διαβρωμένων εδαφών λειτουργώντας σταθεροποιητικά για το έδαφος, ενώ αυξάνουν την διαθεσιμότητα των θρεπτικών στοιχείων, προϋπόθεση απαραίτητη για την ανάπτυξη φυτικής βιομάζας (Παπαθεοδώρου and Στάμου, 2013). Έχει διαπιστωθεί ότι το εύρος αλλά και το είδος των επιδράσεων των πρόσθετων πάνω στους μικροοργανισμούς εξαρτάται από την ποσότητα, τη χημική σύσταση του προστιθέμενου υλικού καθώς και από τη συχνότητα εφαρμογής του. Για παράδειγμα, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι ρυθμός αλλαγών στη δομή της μικροβιακής βιοκοινότητας (συνήθως υπέρ των βακτηριακών πληθυσμών) αυξάνει σχεδόν πάντα με την προσθήκη κατάλληλου υλικού. Κι αν ο ρυθμός μεταβολής της δομής της βιοκοινότητας μεταβάλλεται, δε συμβαίνει το ίδιο και με τη συνολική μικροβιακή βιομάζα. Αυτή άλλοτε μπορεί να μειωθεί λόγω της τοξικότητας του υλικού που προστίθεται, άλλοτε να αυξηθεί επειδή την ίδια στιγμή αυξάνεται η παραγωγικότητα της φυτικής βιομάζας και άλλοτε να μη συμβεί τίποτα από αυτά. Σε κάθε περίπτωση οι μεταβολές στη δομή, τη λειτουργία και το πληθυσμιακό μέγεθος των μικροβίων, που μπορεί να προκύψουν, εξαρτώνται από την ποσότητα την ποιότητα και τη συχνότητα προσθήκης των πρόσθετων (Παπαθεοδώρου and Στάμου, 2013).

5.3. ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Από τη δεκαετία του 1960 ξεκίνησε ένα δραστήριο κίνημα περιβαλλοντικής αφύπνισης για τα αυξανόμενα προβλήματα περιβαλλοντικής ρύπανσης σε διεθνές επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, ο όρος οικοτοξικολογία εμφανίσθηκε το 1969 ως μία φυσική προέκταση της τοξικολογίας και της περιβαλλοντικής τοξικολογίας, που μελετούν τις επιδράσεις τοξικών ουσιών σε μεμονωμένους οργανισμούς, σε συνδυασμό με τις οικολογικές επιδράσεις των ουσιών που ρυπαίνουν το φυσικό περιβάλλον (Newman, 2001).

Η οικοτοξικότητα αναφέρεται στην ικανότητα μιας ένωσης ή οποιουδήποτε φυσικού παράγοντα να δείχνει την επιβλαβή επίδραση τόσο στο περιβάλλον όσο και σε οργανισμούς, για παράδειγμα, ψάρια, έντομα, μικροοργανισμούς, άγρια ζωή και φυτά (Roy and Kar, 2016). Η οικοτοξικολογία ως ανεξάρτητη επιστήμη αναπτύχθηκε τις τελευταίες τρεις με τέσσερις δεκαετίες του 20^{ου} αιώνα (Κούγκολος, 2007). Κατά την ανάλυση της οικοτοξικότητας μελετώνται οι επιδράσεις που δημιουργούν οι τοξικές χημικές ουσίες στο οικοσύστημα και διεξάγονται αποτελέσματα μέσω της επιστημονικής έρευνας κατά την οποία χρησιμοποιούνται τόσο εργαστηριακές μέθοδοι όσο και μελέτες πεδίου (Βλαχογιάννη & Βαλαβανίδης, 2010). Μελετώνται αναλυτικά οι οικολογικές διαστάσεις και η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βιολογικών οργανισμών και των οργανισμών με το φυσικό περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσονται και παράλληλα γίνεται προσδιορισμός των βιολογικών επιπτώσεων των τοξικών χημικών ενώσεων στους βιολογικούς οργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με τη μελέτη συγκεκριμένων επιδράσεων σε συγκεκριμένα είδη, είτε με τη μελέτη επιδράσεων σε ανώτερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης σε μεμονωμένους οργανισμούς ή πληθυσμούς (Βλαχογιάννη & Βαλαβανίδης, 2010).

Τις περισσότερες φορές, όσον αφορά σε έρευνες Περιβαλλοντικής Τοξικολογίας οι οργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιούνται είναι αυτοί που μπορούν να βρεθούν στη φύση με αφθονία. Επίσης σημαντικός παράγοντας για την επιλογή των οργανισμών αποτελεί η εκτροφή και ανάπτυξή τους στο εργαστήριο που πρέπει να είναι σχετικά εύκολη καθώς και τα βιολογικά τους χαρακτηριστικά που υποβοηθούν τις τοξικολογικές αναλύσεις, χωρίς να επεκτείνονται στο οικολογικό υπόβαθρο. Μετά το τέλος των πειραμάτων και των ερευνών τα αποτελέσματα των τοξικολογικών αναλύσεων χρησιμοποιούνται για την καθιέρωση νομοθετικών διατάξεων προστασίας του περιβάλλοντος, όπως επίσης και περιβαλλοντικά πρότυπα για ανεκτά όρια ρύπων στον αέρα, τα νερά και το έδαφος. Τις τελευταίες δεκαετίες σημειώθηκε μεγάλη εξέλιξη και σημαντικές ανακαλύψεις για τη δράση των τοξικών ρύπων στο περιβάλλον και πιο συγκεκριμένα σε κάποιους οργανισμούς. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι η επιστημονική επιβεβαίωση του χημικού παράγοντα που προκαλεί την περιβαλλοντική ρύπανση και των μηχανισμών μέσω των οποίων συσσωρεύεται ή δρα στους βιολογικούς οργανισμούς αποδείχθηκε αρκετά επίπονη και χρονοβόρα (Βλαχογιάννη & Βαλαβανίδης, 2010).

5.4. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

Η ορολογία «Βιολογικοί δείκτες» είναι ένας όρος εποπτείας που περιγράφει όλες τις πηγές βιοτικών και αβιοτικών αντιδράσεων που σχετίζονται με αλλαγές σε ένα δεδομένο οικοσύστημα. Αντί να λειτουργούν απλώς ως μέτρα φυσικής αλλαγής, χρησιμοποιούνται για να δείξουν τις επιπτώσεις των φυσικών αλλαγών στο περιβάλλον ή τις αλλαγές στο οικοσύστημα. Συνήθως χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό και την ένδειξη αρνητικών ή θετικών επιπτώσεων σε φυσικά περιβάλλοντα (Zaghloul et al., 2020). Αυτά θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση αλλαγών στα οικοσυστήματα λόγω της εμφάνισης ρύπανσης που μπορεί να επηρεάσει τη βιοποικιλότητα σε αυτά. Κανένας βιολογικός οργανισμός μεταξύ των 1.7 εκατομμυρίων ειδών που καταγράφονται επί του παρόντος στη γη δεν θα μπορούσε να υποδεικνύει ικανοποιητικά κάθε τύπο διαταραχής ή στρες σε όλα τα οικοσυστήματα (Holt and Miller, 2010). Πάντα, τα εγκατεστημένα είδη και οι τοπικές διαταραχές σε ένα δεδομένο οικοσύστημα είναι κατάλληλα για την επιλογή των βιολογικών δεικτών ή ομάδων ειδών. Οι οικολόγοι καθιέρωσαν πρόσφατα μια ολοκληρωμένη σειρά κριτηρίων για να θεωρούνται οι βιώσιμες πηγές ως άξιοι βιολογικοί δείκτες (Zaghloul et al., 2020).

Οι βιολογικοί δείκτες είναι δείκτες που βοηθούν στην εξαγωγή συμπερασμάτων και γεγονότων σε βιολογικά συστήματα ή δείγματα. Είναι χρήσιμο να γίνει ταξινόμηση των βιολογικών δεικτών σε τρεις τύπους, αυτούς της έκθεσης, της επίδρασης και της ευαισθησίας και στη συνέχεια να περιγραφούν τα γεγονότα πιο συγκεκριμένα για κάθε τύπο. Ένας βιολογικός δείκτης επίδρασης μπορεί να είναι δείκτης ενός ενδογενούς συστατικού του βιολογικού συστήματος, ένα μέτρο της λειτουργικής ικανότητας του συστήματος, ή μια αλλοιωμένη κατάσταση του συστήματος δηλαδή να αναγνωρίζεται ως βλάβη ή ασθένεια (Biological Markers in Environmental Health Research, 1987). Ένας βιολογικός δείκτης ευαισθησίας ορίζεται ως ο δείκτης όπου η υγεία του συστήματος είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην πρόκληση της έκθεσης σε μια ξеноβιοτική ένωση, μια ένωση δηλαδή που προέρχεται έξω από τον οργανισμό. Ένας βιολογικός δείκτης έκθεσης μπορεί να είναι η ταυτοποίηση μιας εξωγενούς ουσίας μέσα στο σύστημα, δηλαδή το διαδραστικό προϊόν μεταξύ μιας ξеноβιοτικής ένωσης και ενδογενών συστατικών ή άλλο συμβάν στο βιολογικό σύστημα που σχετίζεται με την έκθεση. Μέγιστης σημασίας είναι η συσχέτιση των βιολογικών δεικτών έκθεσης με τη βλάβη της υγείας ή την πιθανή βλάβη της υγείας. Πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχει μια συνέχεια μεταξύ των δεικτών έκθεσης και των δεικτών της κατάστασης υγείας, με ορισμένα συμβάντα να σχετίζονται και με τους δύο τύπους δεικτών (Biological Markers in Environmental Health Research, 1987).

Πολλά είδη είναι πολύ ευαίσθητα στους ρύπους που υπάρχουν στο οικοσύστημά τους, επομένως εάν υπάρχουν τοξίνες, μπορεί να αλλάξουν την ανατομία, τη φυσιολογία ή τη συμπεριφορά τους. Πολλά φυτά, ζώα και μικροοργανισμοί είναι προικισμένα εργαλεία για την ένδειξη των ρύπων σε ένα δεδομένο οικοσύστημα. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή των πρακτικών διαχείρισης παρασίτων σε ένα δεδομένο οικοσύστημα καθώς και στη διαφοροποίηση μεταξύ των μολυσμένων και των μη. Πρόσφατα, οι δραστηριότητες μικροοργανισμών επεκτείνονται για να καλύψουν την ανοργανοποίηση του αζώτου, τη μικροβιακή ποικιλότητα και ορισμένες λειτουργικές τάξεις πανίδας. Τα εθνικά και διεθνή προγράμματα παρακολούθησης ποιότητας περιλαμβάνουν πλέον μετρήσεις βιομάζας και αναπνοής (Zaghloul et al., 2020).

5.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΙΚΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ

Αρκετοί βιοδείκτες της υγείας και της ποιότητας του εδάφους έχουν αναπτυχθεί και αναθεωρηθεί (Trasar-Cepeda et al., 2000, Van Bruggen and Semenov, 2000, Nielsen et al., 2002, Anderson, 2003). Μεταξύ αυτών, οι μικροοργανισμοί, λόγω της ικανότητάς τους να ανταποκρίνονται γρήγορα στις περιβαλλοντικές αλλαγές, αναμένεται να είναι αποτελεσματικοί βιοδείκτες. Ο μικροβιακός δείκτης έχει οριστεί ως «μια μικροβιακή παράμετρος που αντιπροσωπεύει τις ιδιότητες του περιβάλλοντος ή τις επιπτώσεις στο περιβάλλον, οι οποίες μπορούν να ερμηνευθούν πέρα από τις πληροφορίες που αντιπροσωπεύει η ίδια η μετρούμενη ή παρατηρούμενη παράμετρος» (Nielsen et al., 2002).

Οι μικροβιακοί βιοδείκτες θα μπορούσαν να βασίζονται στη λειτουργική και δομική ποικιλομορφία της βακτηριακής κοινότητας. Η λειτουργική ποικιλομορφία μπορεί να οριστεί ως ο αριθμός, ο τύπος, η δραστηριότητα και ο ρυθμός με τον οποίο ένα σύνολο υποστρώματος χρησιμοποιείται από μια βακτηριακή κοινότητα (Zak et al., 1994). Μεταξύ των δεικτών λειτουργικής ποικιλότητας, το πρότυπο χρήσης του άνθρακα και η μέτρηση των ενζυματικών δραστηριοτήτων που εκφράζονται από ολόκληρη τη βακτηριακή κοινότητα έχουν προταθεί ως χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της κατάστασης του εδάφους (Nielsen et al., 2002). Η δομική ποικιλομορφία αφορά τον αριθμό των τμημάτων ή στοιχείων μέσα σε ένα σύστημα, που υποδεικνύεται από μέτρα όπως ο αριθμός των ειδών, των γονιδίων, των κοινοτήτων ή των οικοσυστημάτων. Διάφοροι δείκτες όπως ο πλούτος των ειδών, η ποικιλομορφία και η ομαλότητα χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τη δομική ποικιλότητα μιας κοινότητας και να παρακολουθήσουν τις αλλαγές στη μικροβιακή ποικιλότητα λόγω περιβαλλοντικών διακυμάνσεων, πρακτικών διαχείρισης της γης και ρύπανσης (Övreås, 2000). Η δομική ποικιλομορφία μιας βακτηριακής κοινότητας έχει βρεθεί ότι είναι πολύ ευαίσθητη στις περιβαλλοντικές αλλαγές που αντιδρούν με αλλαγή στη σύνθεσή της (Kandeler et al., 1999). Σε αρκετές περιπτώσεις, η διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού και της δραστηριότητας θα μπορούσε επίσης να λειτουργήσει ως προγνωστικός παράγοντας αλλαγής στην υγεία του εδάφους (Nielsen et al., 2002). Ακόμη περισσότερο, η αναλογία κοπιότροφων/ολιγότροφων έχει προταθεί για να αντικατοπτρίζει την ανοχή σε θρεπτικά συστατικά των ειδών που υπάρχουν στο έδαφος (Van Bruggen and Semenov, 2000). Ως εκ τούτου, η σύγκριση της πυκνότητας, της δραστηριότητας και τη σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για την αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών στον οικότοπο του εδάφους (Avidano et al., 2005).

Κεφάλαιο 2^ο: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη οικοτοξικότητας και βιοαποδόμησης βιοπλαστικών και συγκεκριμένα των βιοπλαστικών PLA (polylactic acid – πολυγαλακτικό όξύ) και PBAT (polybutylene adipate terephthalate – τερεφθαλικό αδιπικό πολυβουτυλένιο) ξεχωριστά αλλά και συνδυασμένα με φλούδες καφέ (Coffee Silverskin) καθώς και με αργίλους μοντοριλλονίτη (MMT Clays).

Πιο αναλυτικά πραγματοποιήθηκαν τα κάτωθι:

1. Έλεγχος οικοτοξικότητας σε υδατικά διαλύματα ως προς την επίδραση των βιοπλαστικών στην επιβίωση και ανάπτυξη του βιοδείκτη *Vibrio fischeri*.
2. Έλεγχος οικοτοξικότητας σε υδατικά διαλύματα ως προς την επίδραση των βιοπλαστικών στην επιβίωση και ανάπτυξη του μύκητα *Penicillium rubrum*.
3. Έλεγχος οικοτοξικότητας των βιοπλαστικών σε εδαφικά δείγματα με συλλογή δύο διαφορετικών ειδών χώματος. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκε η επίδραση των υλικών στους πληθυσμούς βακτηρίων και μυκήτων μέσω καλλιεργητικών τεχνικών.
4. Έλεγχος επίδρασης των βιοπλαστικών στους βακτηριακούς πληθυσμούς των δειγμάτων χώματος μέσω εφαρμογής της Real-Time PCR και ποσοτικοποίηση του γονιδίου 16S rRNA.

Κεφάλαιο 3^ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΥΛΙΚΑ

ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης Elvem K103
- Ζυγός KERN 440-21A
- Αναλυτικός ζυγός (Adventurer OHAUS Balance)
- Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu)
- Φυγόκεντρος - Centrifuge 5418R (Eppendorf)
- StepOnePlus - Real Time PCR System (Applied Biosystems)
- Υδατόλουτρο (GFL)
- Φωτόμετρο Biophotometer Eppendorf
- ARE Heating Magnetic Stirrer VELP SCIENTIFICA
- MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems)

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Nutrient Agar (NEOGEN Culture Media)
- Nutrient Broth 'E' (NEOGEN LAB M)
- Potato Dextrose Broth (NEOGEN Culture Media Acumedia LAB M)
- Potato Dextrose Agar (NEOGEN Culture Media)
- Agar (SIGMA – ALDRICH)
- Peptone (NEOGEN LAB M)

ΧΗΜΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Potassium phosphate monobasic (SIGMA – ALDRICH)
- Magnesium sulfate heptahydrate (SIGMA – ALDRICH)
- Rose bengal (SIGMA)
- D - (+) – Glucose (SIGMA – Life Science)
- NucleoSpin Soil DNA extraction Kit (Macherey-Nagel)
- SYBR Green qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS)

ANTIBIOTIKO

- Streptomycin (SIGMA)

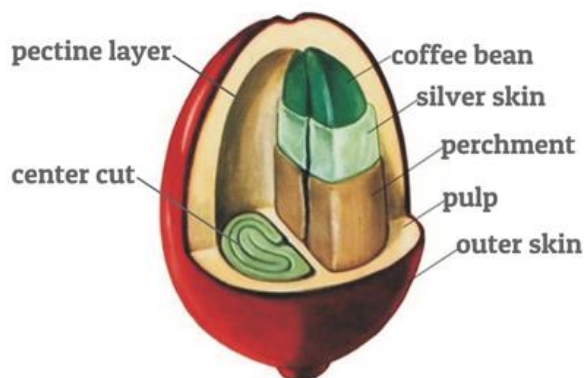
3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

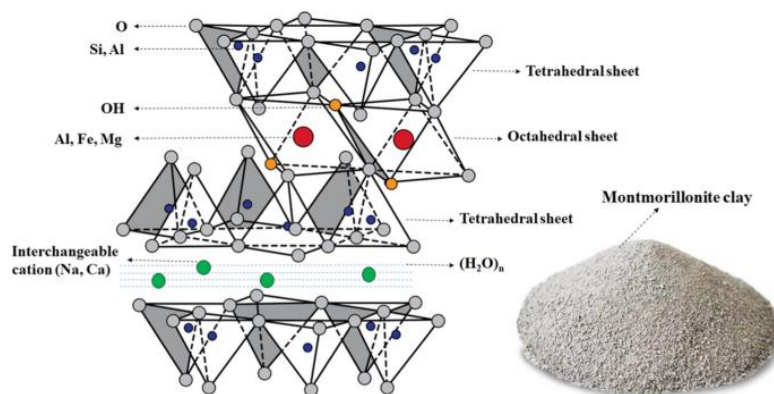
Τα βιοπλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διατάξεις που περιγράφονται παρακάτω στάλθηκαν στο εργαστήριο περιβαλλοντικής μικροβιολογίας από το Istituto Italiano di Tecnologia (Italy, Genoa). Τα δύο βασικά είδη βιοπλαστικών που αποτέλεσαν βάση και στα πέντε δείγματα είναι το PLA4043D καθώς και το Ecoflex PBAT.

1. PLA4043D: Προϊόν της NatureWorks LLC.
2. Ecoflex PBAT: Προϊόν της βιομηχανίας με λευκό χρώμα σε μορφή pellet.

Τα άλλα δύο υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και στη συνέχεια αναμείχθηκαν με το PLA4043D και το Ecoflex PBAT είναι οι φλούδες καφέ (Coffee Silverskin) που αποτελούν οργανικό υπόλειμμα καθώς και οι άργιλοι μοντοριλλονίτη (MMT Clays) που είναι μια πολύ μαλακή φυλλοπυριτική ομάδα ορυκτών που σχηματίζεται όταν καθιζάνει από υδατικό διάλυμα ως μικροσκοπικοί κρύσταλλοι.



Εικόνα 18: Κόκκος καφέ εσωτερική διάταξη
(πηγή: Essense Coffee, 2019)



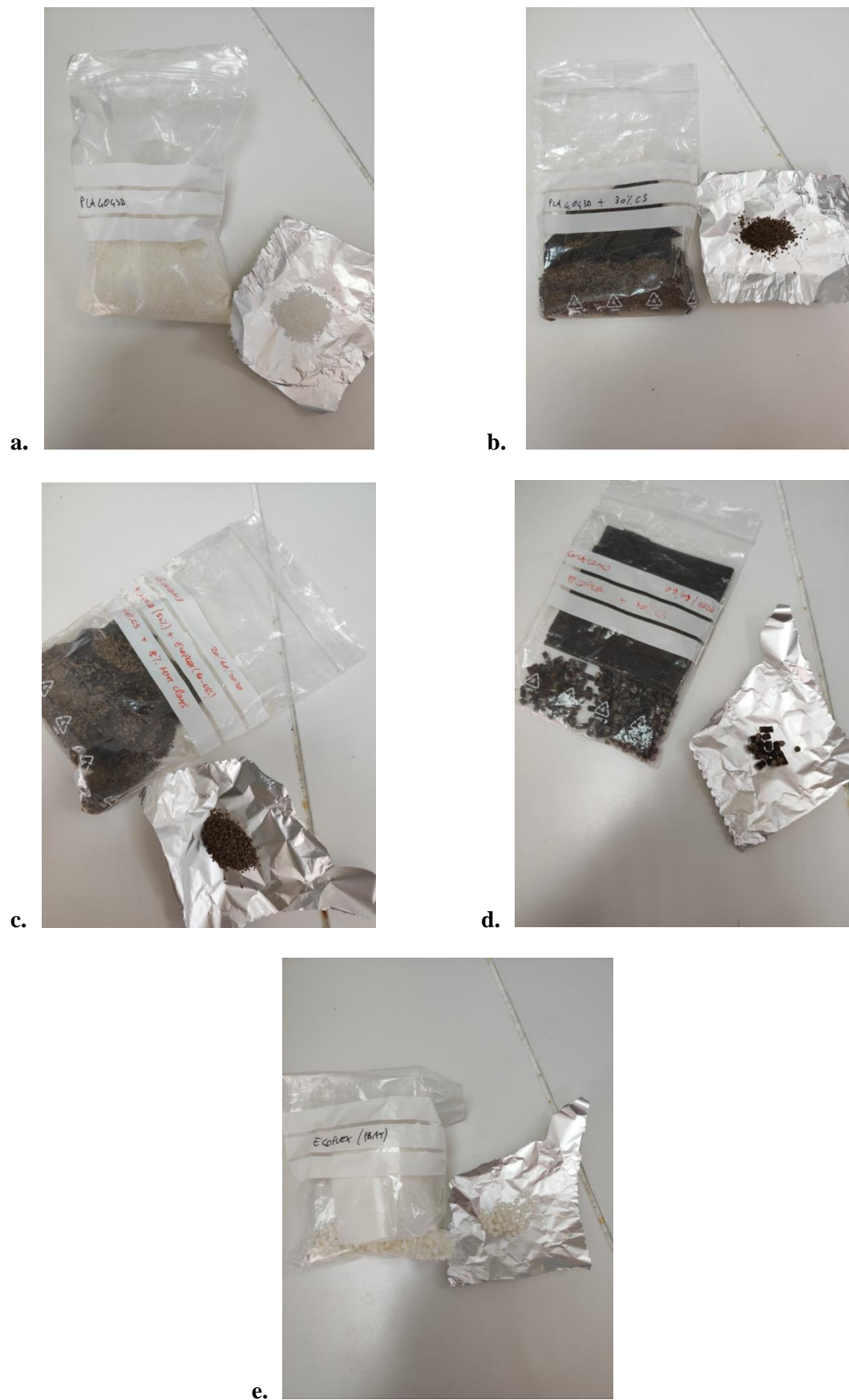
Εικόνα 19: MMT Clays (πηγή: Moradihamedani, 2022)

Η ανάμειξη των υλικών πραγματοποιήθηκε σε plastic extruder με την κατάλληλη θερμοκρασία και επιλογή του μεγέθους κοπής των υλικών. Τελικά:

Πίνακας 1: Δείγματα βιοπλαστικών

Δείγματα βιοπλαστικών	Ονομασία
PLA4043D	PLA
PLA4043D + 30% Coffee Silver skin	PLA+30% CS
PLA4043D + Ecoflex PBAT + 30% Coffee Silver skin+ 8% MMT Clays	PLA+PBAT+30% CS+8% MMT Clays
Ecoflex PBAT + 30% Coffee Silver skin	PBAT+30% CS
Ecoflex PBAT	PBAT

Ακολουθούν φωτογραφίες των πέντε βιοπλαστικών που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα:



Εικόνα 20: Δείγματα βιοπλαστικών α. PLA4043D β. PLA4043D+30%CS γ. PLA4043D+Ecoflex PBAT+30%CS+8% MMT CLAYS δ. Ecoflex PBAT+30%CS ε. Ecoflex PBAT

3.2.2. Έλεγχος οικοτοξικότητας σε υδατική μήτρα

Για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ήταν απαραίτητη η χρήση συγκεκριμένων μικροοργανισμών, όπως το βακτήριο *Vibrio fischeri* που χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης και ο μύκητας *Penicillium rubrum*.

3.2.2.1. Έλεγχος οικοτοξικότητας με το βιοδείκτη *Vibrio fischeri*

Το *V. fischeri* είναι ένα βιοφωταυγές, αρνητικό κατά Gram θαλάσσιο βακτήριο που μπορεί να ζει μόνο του ή σε αμοιβαία σύνδεση με κάποια ψάρια (Dunn, 2012). Είναι μη παθογόνο φωτοβακτήριο που είναι ευαίσθητο σε ένα ευρύ φάσμα τοξικών ουσιών (P. Bond and Martin, 2005).

Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία αρχικά ήταν απαραίτητη η ανακαλλιέργεια του βακτηρίου *V. fischeri* σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Nutrient Agar και στη συνέχεια επώασή του στους 30°C για 1 d. Συνολικά ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των βιοπλαστικών (1000mg/L, 500mg/L και 100mg/L) ως προς την επίδρασή τους στην επιβίωση και ανάπτυξη του βακτηρίου, το οποίο σε κάθε δοκιμή είχε αρχική συγκέντρωση 10^5 CFUs/mL. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκάλια, τα οποία περιείχαν Nutrient Broth, ενώ παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και ένα μπουκάλι χωρίς κανένα δείγμα βιοπλαστικού που αποτέλεσε το Control, απαραίτητο για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Η ρύθμιση του αρχικού πληθυσμού του βακτηρίου σε κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την κλίμακα Mcfarland, σύμφωνα με την οποία όταν η οπτική απορρόφηση βακτηριακού εναιωρήματος στα 600 nm είναι 0,1, τότε ο πληθυσμός είναι $\sim 10^8$ CFUs/mL.

Συνολικά το πείραμα διήρκησε έναν μήνα και δείγματα ελήφθησαν στους χρόνους 0, 1, 4, 7, 20 και 30 d. Ο χρόνος 0 d αντιστοιχεί στον χρόνο που δεν έχει υπάρξει επίδραση του βιοπλαστικού στο *V. fischeri*. Μετά την δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε Nutrient agar (επίστρωση 100μL δείγματος πυκνού ή αραιωμένου) και ακολούθησε επώαση στους 30°C για 1d και καταμέτρηση των αποικιών.

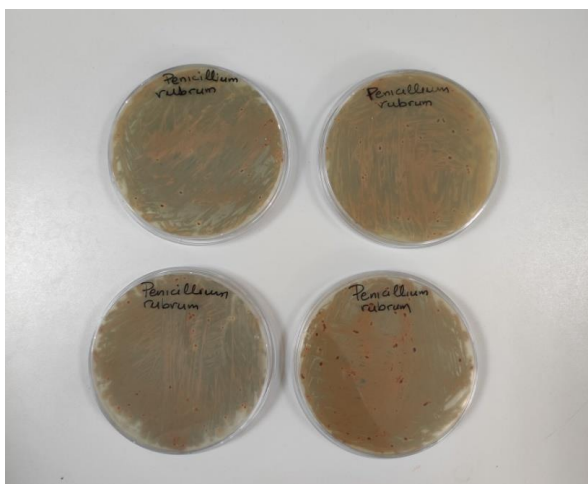
3.2.2.2. Έλεγχος οικοτοξικότητας με τον μύκητα *Penicillium rubrum*

Το *Penicillium Rubrum* είναι ένα είδος μύκητα που υπάγεται στο γένος *Penicillium*. Το *Penicillium* είναι ένα γένος ασκοκυτταρικών μυκήτων που αποτελεί μέρος του μυκοβιώματος πολλών ειδών και έχει μεγάλη σημασία στο φυσικό περιβάλλον, στην καταστροφή των τροφίμων και στην παραγωγή τροφίμων και φαρμάκων.

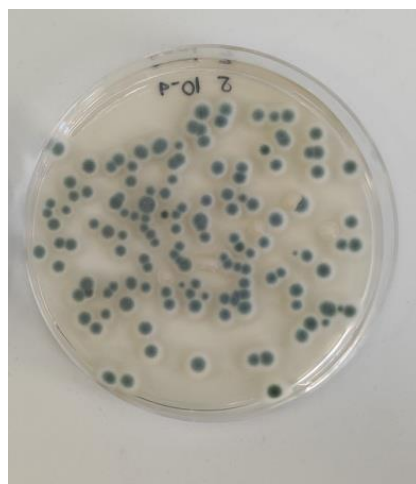
Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία αρχικά πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια του μύκητα σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Potato Agar και επώασή του σε θερμοκρασία δωματίου για 3-4 d. Μετά το πέρασ των 4 d σε αποστειρωμένο μπουκάλι τοποθετήθηκαν 600mL Potato Broth και στη συνέχεια, με κρίκο εμβολιασμού προστέθηκε επαρκής ποσότητα από την ανακαλλιέργεια του μύκητα. Ύστερα από καλή ανάδευση, ακολούθησε ισομερής καταμερισμός του διαλύματος σε αποστειρωμένα μπουκάλια, δηλαδή το κάθε μπουκάλι περιείχε 100mL. Ζυγίστηκαν επίσης 100mg του κάθε είδους πλαστικού και προστέθηκαν στα

πέντε από τα έξι μπουκάλια που χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα αντίστοιχα. Το μπουκάλι χωρίς κανένα δείγμα αποτέλεσε το control, απαραίτητο για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Ο συνολικός χρόνος του πειράματος ήταν δυο εβδομάδες και δείγματα ελήφθησαν στους χρόνους 0, 7 και 14 d. Ο χρόνος 0 d αντιστοιχεί στον χρόνο που δεν έχει υπάρξει επίδραση της πρόσθετης ουσίας στο μύκητα και αποτελεί σημαντική παράμετρο καθώς δείχνει τον αρχικό αριθμό αποικιών ανά mL διαλύματος. Μετά την δειγματοληψία το πρώτο βήμα για την καταμέτρηση των μικροοργανισμών σε ένα τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα είναι η αραιώση του δείγματος με εφαρμογή δεκαδικών αραιώσεων. Έπειτα, έγινε η επίστρωση ποσότητας 100μL με κρίκο εμβολιασμού πάνω σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Potato Agar και ακολούθησε η επώαση τους για 3-4 d σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των αποικιών CFUs/mL για την διεξαγωγή αποτελεσμάτων.



Εικόνα 21: Ανακαλλιέργεια μύκητα *P. rubrum*



Εικόνα 22: Καλλιέργεια μύκητα *P. rubrum* σε τρυβλίο petri



Εικόνα 23: Μύκητας *P. rubrum* σε υγρό μέσο Broth με τα δείγματα βιοπλαστικών

3.2.3. Έλεγχος οικοτοξικότητας σε έδαφος

Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας συλλέχθηκαν ποσότητες από δύο διαφορετικά είδη χώματος, το ένα από την περιοχή Ακρωτηρίου και πιο συγκεκριμένα από το Πολυτεχνείο Κρήτης και το δεύτερο από την περιοχή της Αγιάς Χανίων.

Πίνακας 2: Κατηγοριοποίηση χωμάτων

Περιοχή συλλογής χώματος	Ονομασία
Ακρωτήρι Χανίων, Πολυτεχνείο Κρήτης	Χώμα Α
Αγιά Χανίων	Χώμα Β

Οι ποσότητες του πρώτου και του δεύτερου χώματος συλλέχθηκαν στις 13/12/2021 και 5/5/2022 αντίστοιχα.

Προεπεξεργασία χώματος

Λόγω της διαφορετικής σύστασης του κάθε χώματος ήταν αναγκαία η κατάλληλη επεξεργασία τους πριν την πειραματική διάταξη. Πιο συγκεκριμένα, καθώς το χώμα Α ήταν πιο πετρώδες από το χώμα Β και περιείχε αδρανή υλικά και ρίζες έπρεπε να κοσκινιστεί.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά σε έξι πλαστικά δοχεία τοποθετήθηκαν 100gr χώματος, ένα για κάθε δείγμα καθώς και ένα για το control και στη συνέχεια ζυγίστηκαν 2gr του κάθε βιοπλαστικού και προστέθηκαν και αυτά στα πλαστικά δοχεία. Επίσης, το κάθε πλαστικό δοχείο ενυδατώθηκε με 15mL αποστειρωμένου νερού. Τα δοχεία παρέμειναν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος σε σκιερό μέρος στο χώρο του εργαστηρίου και πραγματοποιούνταν η ενυδάτωση τους με αποστειρωμένο νερό σε τακτά χρονικά διαστήματα μεταξύ των δειγματοληψιών για τη διατήρηση της επιθυμητής υγρασίας.

Συνολικά, το πείραμα διήρκησε 60 d και δείγματα ελήφθησαν στους χρόνους 0, 30 και 60 d.

3.2.3.1. Ποσοτικοποίηση πληθυσμών βακτηρίων και μυκήτων μέσω καλλιεργητικών τεχνικών

Σημαντική παράμετρος στο συγκεκριμένο πείραμα αποτέλεσε η βαρομετρική περιεχόμενη υγρασία. Για αυτό το λόγο, λήφθηκε μικρή ποσότητα του κάθε χώματος, η οποία προηγουμένως είχε ζυγιστεί, και παρέμεινε στον κλίβανο στους 105°C για 24h. Μετά το πέρας των 24h η ποσότητα αυτή ζυγίστηκε εκ νέου και τελικά υπολογίστηκε μαθηματικά η περιεχόμενη υγρασία του κάθε χώματος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Συντελεστής υγρασίας χωμάτων

Είδος χώματος	Βαρομετρική περιεχόμενη υγρασία θ_g
Χώμα Α	0.176
Χώμα Β	0.207

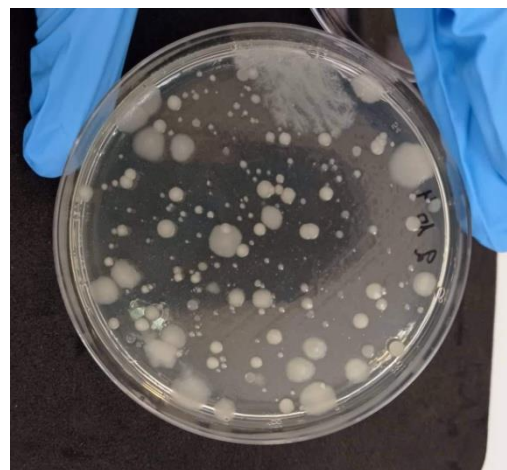
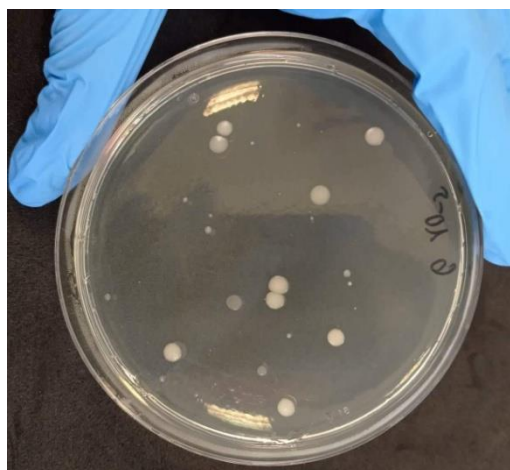
Στη συνέχεια αναφέρεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την καλλιέργεια βακτηρίων και μυκήτων :

1. Ζύγιση 10gr χώματος από κάθε δείγμα και το control
2. Διάλυση των 10gr σε 95mL αποστειρωμένο νερό με καλή ανάδευση
3. Δημιουργία δεκαδικών αραιώσεων για κάθε δείγμα

Η διαδικασία αυτή είναι όμοια για τα βακτήρια και τους μύκητες. Ωστόσο η επίστρωση τους σε θρεπτικό υλικό αλλά και η επώασή τους διαφέρει. Πιο συγκεκριμένα:

ΒΑΚΤΗΡΙΑ

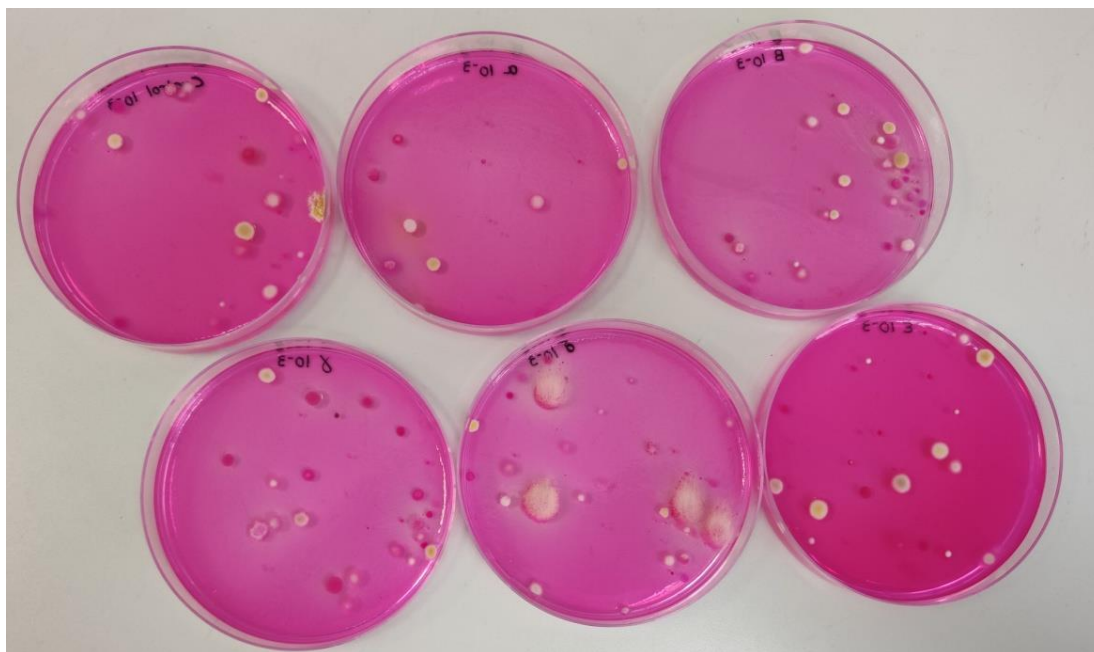
- Επίστρωση ποσότητας 100μL από κάθε δείγμα με κρίκο εμβολιασμού πάνω σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Nutrient Agar
- Επώαση στους 37°C για 18-24h
- Καταμέτρηση των αποικιών



Εικόνα 24: Καλλιέργεια βακτηρίων από δείγμα χώματος σε τρυβλίο petri

ΜΥΚΗΤΕΣ

- Επίστρωση με ενσωμάτωση (pour plate technique) 1 mL κάθε δείγματος σε θρεπτικό υλικό Rose Bengal, το οποίο περιείχε άγαρ καθώς και ελάχιστη ποσότητα του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη για την παρεμπόδιση ανάπτυξης βακτηρίων.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 4-6 d
- Καταμέτρηση των αποικιών



Εικόνα 25: Καλλιέργεια μυκήτων από δείγμα χώματος σε τρυβλία petri

3.2.3.2. Ποσοτικοποίηση βακτηρίων με μοριακή μεθοδολογία (Real Time – qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR), είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που αποσκοπεί στην απομόνωση και στον πολλαπλασιασμό *in vitro*, μιας αλληλουχίας DNA. Είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού. Η PCR βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μιας μήτρας DNA. Η PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά από 25 έως 35 φορές.

Κατόπιν εφαρμογής της qPCR είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση του αρχικού αριθμού αντιγράφων του πρότυπου DNA με ακρίβεια και υψηλή ευαισθησία σε ένα ευρύ δυναμικό εύρος.

Στο συγκεκριμένο πείραμα αρχικά πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του γενετικού υλικού με τη χρήση του NucleoSpin Soil DNA extraction kit. Μετά το τέλος της απομόνωσης από κάθε δείγμα προέκυψαν 50μL. Στη συνέχεια με τη χρήση της μεθόδου SYBR Green, έγιναν οι qPCR. Συνολικά για 14 δείγματα (χρόνος 0 d και χρόνος 60 d για το control καθώς και για όλα τα δείγματα) έγινε μία qPCR με σκοπό την ποσοτικοποίηση του γονιδίου 16S-rRNA με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών. Το γονίδιο αυτό συναντάται σε όλα τα βακτήρια.

Αναλυτικά, το μίγμα και οι συνθήκες της αντίδρασης Real Time – PCR φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 4: Περιεχόμενα αντίδρασης Real Time-PCR για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
Mastermix	1X
Primer F	500nM
Primer R	500nM
DNA	2μL

Πίνακας 5: Αλληλουχία εκκινητών

Γονίδιο στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Προϊόν PCR (bp)	Βιβλιογραφία
16S rRNA	8-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	(Dupont et al., 2013)
	1492-R	GGTTACCTTGTTACGACTT		

Πίνακας 6: Κύκλοι αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA

Θερμοκρασία	Χρόνος	
95°C	4min	30 cycles
95 °C	1min	
55 °C	30s	
72 °C	30s	

Κεφάλαιο 4^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω κατά τη διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε μελέτη οικοτοξικότητας βιοπλαστικών και συγκεκριμένα των βιοπλαστικών PLA και PBAT ξεχωριστά αλλά και συνδυασμένα με φλούδες καφέ (Coffee Silverskin) καθώς και με αργίλους μοντμοριλλονίτη (MMT Clays).

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζονται παρακάτω:

Πίνακας 7: Δείγματα βιοπλαστικών

Δείγματα βιοπλαστικών	Ονομασία
PLA4043D	PLA
PLA4043D + 30% Coffee Silver skin	PLA+30%CS
PLA4043D + Ecoflex PBAT + 30% Coffee Silver skin+ 8% MMT Clays	PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays
Ecoflex PBAT + 30% Coffee Silver skin	PBAT+30%CS
Ecoflex PBAT	PBAT

PLA

Σημαντικά χαρακτηριστικά του υλικού αποτελούν η πυκνότητα ίση με 1.24 g/cm³ και το σημείο τήξης ίσο με 145-160°C. Το πολυμερές 4043D διατίθεται σε μορφή pellet και είναι σταθερό στην τετηγμένη κατάσταση. Πριν από οποιαδήποτε επεξεργασία του είναι απαραίτητη η ξήρανση. Στα πειράματα το συγκεκριμένο βιοπλαστικό ήταν σε μορφή μικρόκοκκων – flakes.

PBAT

Ακολουθεί πίνακας με τα χαρακτηριστικά του υλικού:

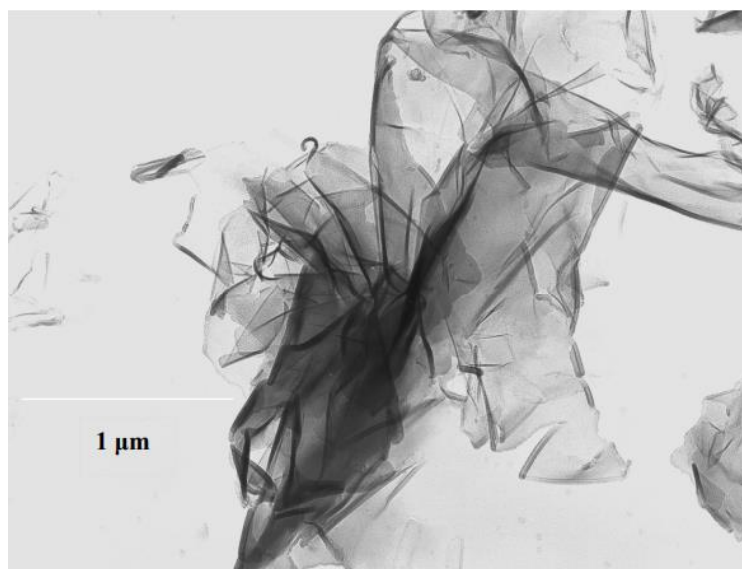
Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά PBAT

Παράμετρος	Μονάδες	Πιστοποίηση	Τιμή
Πυκνότητα	g/cm ³	ISO1183	1.21
MRF 190°C, 2160g	g/10min	ISO1183	2.5-4.5
Σημείο τήξης	°C	ISO11357	116~122
Vicat A/50	°C	ISO306	≥80
Αντοχή εφελκυσμού	MPa	ISO527	≥25
Επιμήκυνση	%	ISO527	≥400
Υγρασία	%		≤0.06

Μοντοριλλονίτης (MMT)

Ο ΜΜΤ πήρε για πρώτη φορά την ονομασία του όταν ανακαλύφθηκε το 1847 στην τοποθεσία Μοντοριλλον της δυτικής Γαλλίας, περισσότερο από πενήντα χρόνια πριν την ανακάλυψη του μπεντονίτη στις ΗΠΑ. Αφενός αποτελεί το πιο συνηθισμένο ορυκτό της αργίλου (σημηκτικού τύπου) που απαντά στην επιφάνεια της γης, και αφετέρου παρουσιάζει το πιο ευρύ φάσμα χρήσεων. Το γεγονός αυτό οφείλεται εν μέρει στην εμφάνιση τεράστιων κοιτασμάτων, που αποδίδουν υλικό προς χρήση σε πολύ χαμηλό κόστος, και κυρίως στις εξαιρετικές ιδιότητες προσρόφησης, οξύτητας και ανταλλαγής κατιόντων. Τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά επιτρέπουν τη χρησιμοποίηση του ΜΜΤ σε εφαρμογές όπως η απομάκρυνση ρύπων από τα απόνερα, η ενίσχυση σύνθετων πολυμερικών υλικών, η κατάλυση, η απελευθέρωση φαρμακευτικών ουσιών και η ιοντική αγωγιμότητα. Όσον αφορά την προέλευση του, ως φυσικό αργιλικό ορυκτό, ο ΜΜΤ αποτελεί το κύριο συστατικό του μπεντονίτη, ο οποίος προέρχεται κατά γενικό κανόνα από την επί τόπου αποσάθρωση της ηφαιστειακής στάχτης (Νικολαΐδης, 2012).

Ο ΜΜΤ αποτελεί ένα νανοσύνθετο πολυμερικό υλικό. Αν τα νανοσύνθετα υλικά συγκριθούν με τα αντίστοιχα μακρο- και μικρο-ομόλογά τους, καθώς και με το παρθένο πολυμερές η ειδοποιός διαφορά συνίσταται στις πρόσθετες και συχνά κατά πολύ βελτιωμένες μηχανικές, θερμικές, ηλεκτρικές, μαγνητικές και οπτικές τους ιδιότητες. Επιπρόσθετα, τα νανοσύνθετα υλικά έχουν ξεχωρίσει έως τώρα για την αυξημένη ικανότητα φραγής έναντι των αερίων και της υγρασίας, την επιβράδυνση της ανάφλεξής τους, τη σταθερότητα των διαστάσεών τους, τη βιοαποικοδομησιμότητά τους, την υψηλή αντίστασή τους στη χημική διάβρωση, στη φθορά λόγω τριβής, καθώς και στην παλαιώση λόγω ατμοσφαιρικών παραγόντων (επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας, μεταβολές θεοκρασίας, υγρασίας) (Νικολαΐδης, 2012).

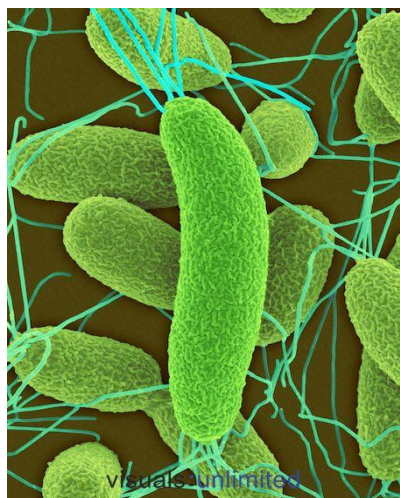


Εικόνα 26: Φωτογραφία TEM του ΜΜΤ (πηγή: Kamena, 2011)

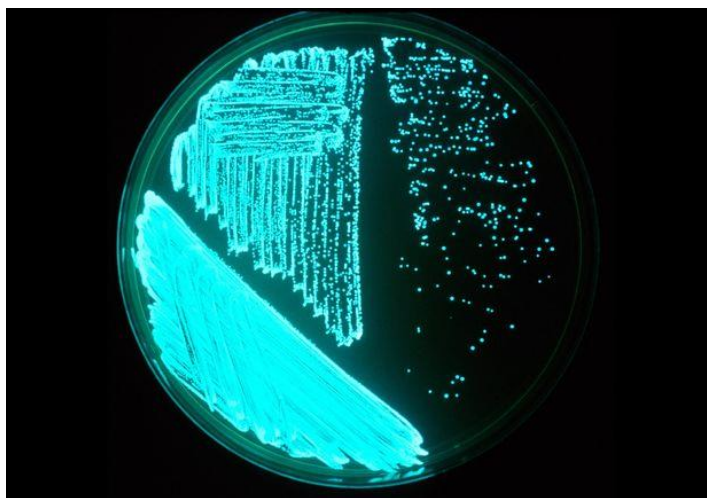
4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΗ ΜΗΤΡΑ ΜΕ ΤΟ ΒΙΟΔΕΙΚΤΗ *Vibrio fischeri*

Τα βακτήρια ως ομάδα έχουν πολύ διαφορετικό μεταβολισμό και αυτό το χαρακτηριστικό συμβάλλει στην ικανότητά τους να επιβιώνουν και να ευδοκιμούν σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλόντων. Παρά τη συνολική αυτή ποικιλομορφία, μεμονωμένοι τύποι βακτηρίων μπορεί να ποικίλλουν ευρέως ως προς τη μεταβολική τους ευελιξία. Το *V. fischeri* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1889 από τον μικροβιολόγο Bernhard Fischer. Από μια μελέτη του 2007 που δημοσιεύθηκε στο “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology” προέκυψε ανάλυση ορισμένων γονιδίων του *V. fischeri* και ότι αυτά είχαν διακριτά χαρακτηριστικά από την οικογένεια *Vibrionaceae*. Έτσι εισήχθη ένα νέο γένος *Aliivibrio* (Polanco, 2020). Τα *Vibrionaceae* είναι μια μεγάλη οικογένεια θαλάσσιων γ-πρωτεοβακτηρίων που περιλαμβάνει αρκετές δεκάδες είδη που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε μια ποικιλία ευεργετικών ή παθογόνων αλληλεπιδράσεων με ζωικό ιστό. Μεταξύ του μικρού αριθμού παθογόνων ειδών *Vibrio* που προκαλούν ασθένειες είναι το *Vibrio cholerae*, το *Vibrio parahaemolyticus* και το *Vibrio vulnificus*, τα μόνα μέλη των *Vibrionaceae* στα οποία έχουν αναφερθεί οι αλληλουχίες του γονιδιώματός τους (Ruby et al., 2005).

Το *V. Fischeri* είναι ένα βιοφωτανγές, αρνητικό κατά Gram θαλάσσιο βακτήριο που μπορεί να ζει μόνο του ή σε αμοιβαία σύνδεση με κάποια ψάρια (Dunn, 2012). Χαρακτηριστικό του είναι ότι μπορεί να φωσφορίζει στο σκοτάδι. Είναι μη παθογόνο φωτοβακτήριο που είναι ευαίσθητο σε ένα ευρύ φάσμα τοξικών ουσιών (P. Bond and Martin, 2005).



Εικόνα 27: *V. fischeri* σε μικροσκόπιο (πηγή: LIBRARY, 2020)

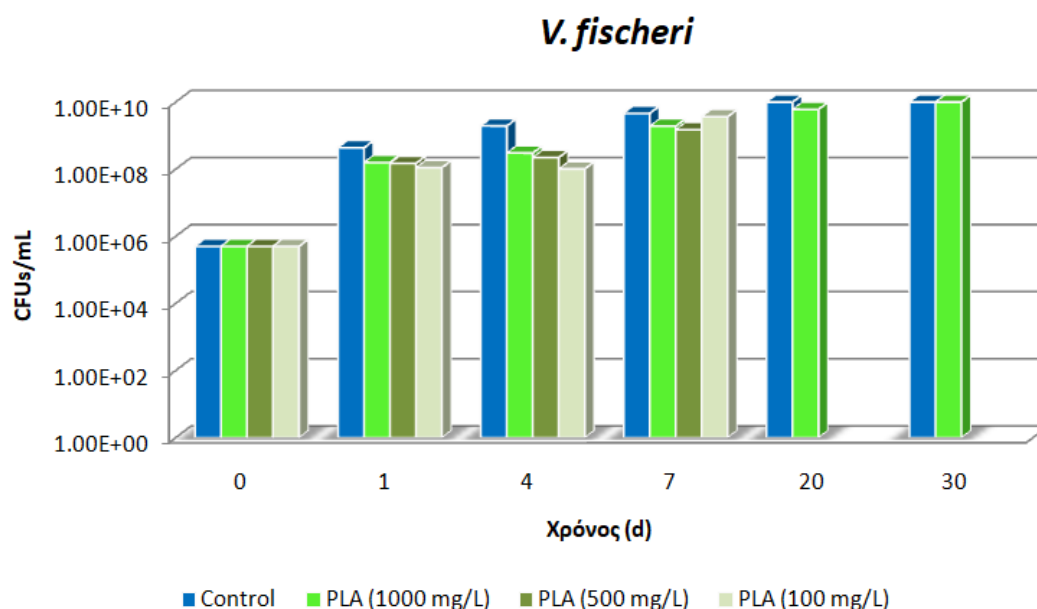


Εικόνα 28: *V. fischeri* σε τρυβλίο (πηγή: Polanco, 2020)

Συνολικά το πείραμα διήρκησε έναν μήνα και οι δειγματοληψίες ελήφθησαν για χρόνους 0, 1, 4, 7, 20 και 30 d. Ο χρόνος 0 d αντιστοιχεί στον χρόνο που δεν έχει υπάρξει επίδραση των βιοπλαστικών στο *V. fischeri* (control δείγμα).

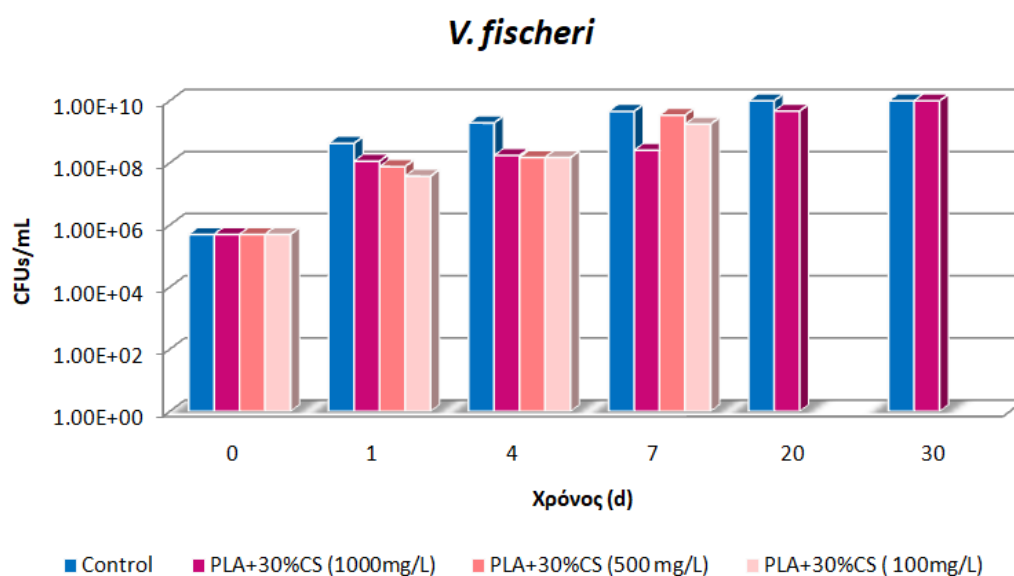
Πιο συγκεκριμένα το πείραμα διεξήχθη δύο φορές για έλεγχο επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Και τις δύο φορές η διάρκεια ήταν ίδια, δηλαδή 30 d ενώ όπως επεξηγήθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο 3.2.2.1 οι συγκεντρώσεις των βιοπλαστικών ήταν 1000mg/L, 500mg/L και 100mg/L για κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα γραφήματα που ακολουθούν:

PLA



Γράφημα 1: Επίδραση PLA σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*

PLA+30%CS



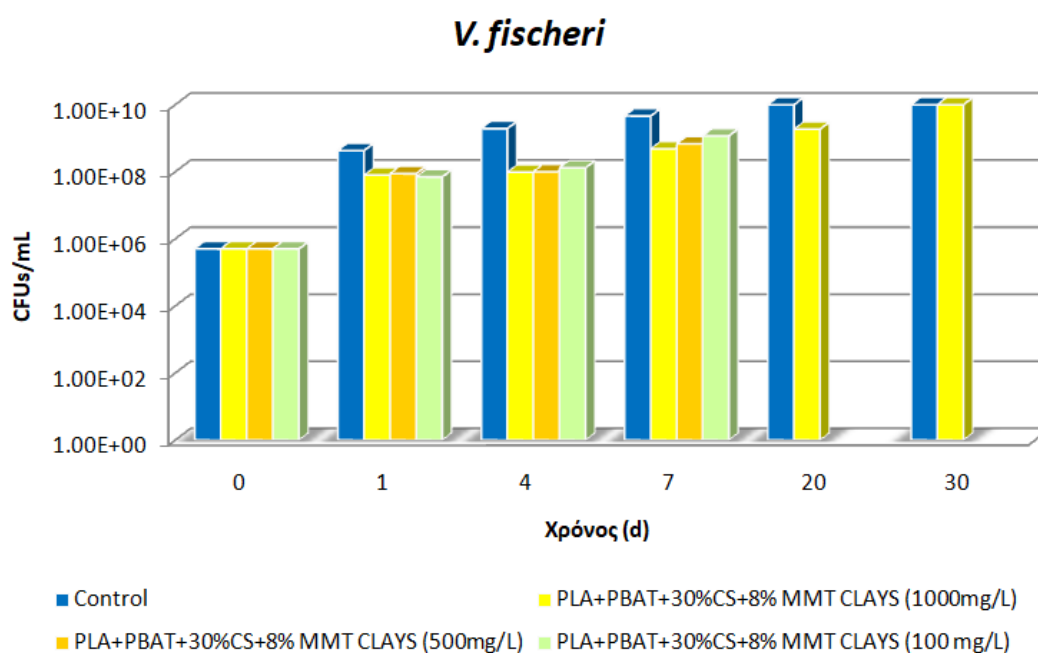
Γράφημα 2: Επίδραση PLA+30%CS σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*

Στο γράφημα 1, εξετάζεται η ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού *V. fischeri* (CFUs/mL) για διάστημα ενός μήνα μετά την προσθήκη του βιοπλαστικού PLA σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μείωση στον πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη δειγματοληψία για τον χρόνο 1 d το control υπολογίστηκε ίσο με $4.32 \cdot 10^8$ CFUs/mL ενώ για τις τρεις συγκεντρώσεις του PLA δηλαδή 1000mg/L, 500mg/L και 100mg/L οι τιμές υπολογίστηκαν ίσες με $1.59 \cdot 10^8$, $1.49 \cdot 10^8$ και $1.11 \cdot 10^8$ CFUs/mL αντίστοιχα. Αυτό δείχνει ότι το βιοπλαστικό PLA μετά το πέρας των 24h δεν είχε απολύτως καμία αρνητική επίδραση στο μικροοργανισμό. Το ίδιο ισχύει και για τους υπόλοιπους χρόνους αφού ακόμη και μετά το τέλος του ενός μήνα, για χρόνο δηλαδή 30 d, όλες οι μετρήσεις είναι της τάξης $1-2.5 \cdot 10^{10}$ CFUs/mL.

Στο γράφημα 2, εξετάζεται όπως και πριν η ανάπτυξη του βακτηριακού πληθυσμού *V. fischeri* (CFUs/mL) για διάστημα ενός μήνα μετά την προσθήκη του βιοπλαστικού PLA αναμεμιγμένο με 30% CS, δηλαδή Coffee silverskin, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι φλούδες καφέ αποτελούν οργανικό υπόλειμμα. Κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μείωση στον πληθυσμό ωστόσο για χρονικές περιόδους 1 d και 4 d τα δείγματα που περιείχαν το βιοπλαστικό εμφάνισαν μια μικρή μείωση. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη δειγματοληψία για τον χρόνο 4 d το control υπολογίστηκε ίσο με $1.95 \cdot 10^9$ CFUs/mL ενώ για τις τρεις συγκεντρώσεις του PLA+30%CS δηλαδή 1000mg/L, 500mg/L και 100mg/L οι τιμές υπολογίστηκαν ίσες με $1.74 \cdot 10^8$, $1.51 \cdot 10^8$ και $1.50 \cdot 10^8$ αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι το βιοπλαστικό PLA+30%CS μετά το πέρας των 4 d δεν είχε κάποια ιδιαίτερα αρνητική επίδραση στο μικροοργανισμό. Όσον αφορά στη μέτρηση για τις 30 d το *V. fischeri* αναπτύσσεται κανονικά χωρίς αλλά και με την παρουσία του βιοπλαστικού. Οι τιμές είναι $1.88 \cdot 10^{10}$ CFUs/mL και $1.25 \cdot 10^{10}$ CFUs/mL για control και PLA+30%CS στην συγκέντρωση των 1000mg/L.

Συνολικά, μετά την προσθήκη του βιοπλαστικού PLA δεν υπάρχει κάποια αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη του *V. fischeri* και το ίδιο ισχύει και με την προσθήκη του PLA αναμεμιγμένο με φλούδες καφέ. Αυτό αποτελεί λογικό συμπέρασμα αφού, το πολυγαλακτικό οξύ (PLA) μπορεί να παραχθεί από καλαμπόκι που περιέχει άμυλο ή άλλα γεωργικά απόβλητα και οι φλούδες καφέ είναι οργανικό υπόλειμμα και έτσι κανένα από τα δύο δεν φαίνεται να εμποδίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays



Γράφημα 3: Επίδραση PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d

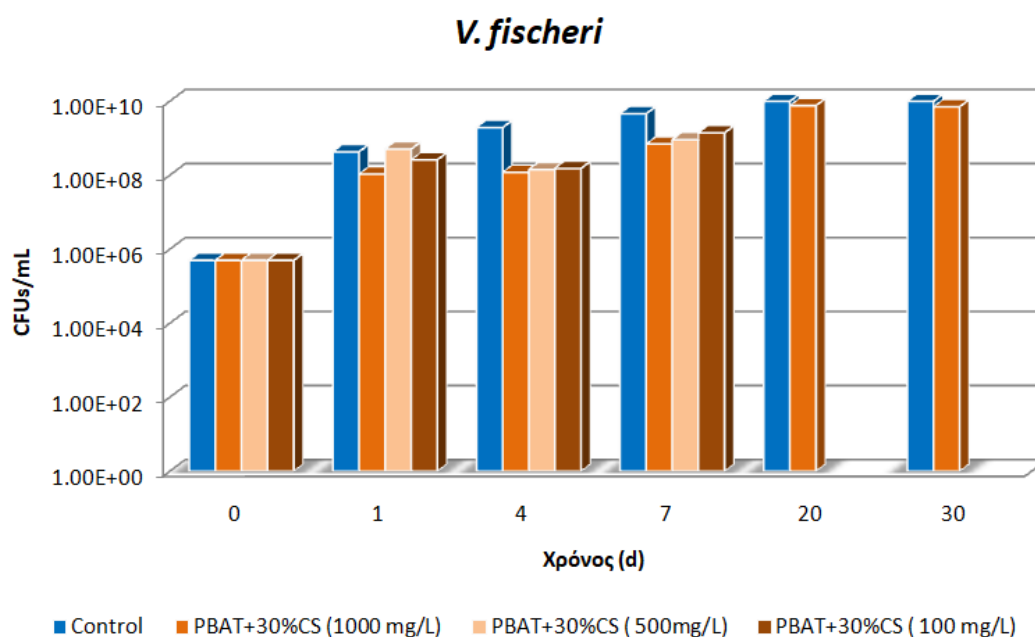
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*

Στο γράφημα 3, εξετάζεται η αντίδραση του μικροοργανισμού *V. fischeri* μετά την προσθήκη των βιοπλαστικών PLA και PBAT αναμεμειγμένα με 30% CS, δηλαδή Coffee silverskin, καθώς και 8% αργίλους μοντμοριλλονίτη, δηλαδή MMT Clays. Κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μείωση στον πληθυσμό. Για χρονικές περιόδους 4 και 7 d τα δείγματα που περιείχαν τα βιοπλαστικά εμφάνισαν μια μικρή μείωση. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη δειγματοληψία για τον χρόνο 4 d το control υπολογίστηκε ίσο με $1.95 \cdot 10^9$ CFUs/mL ενώ για τις τρεις συγκεντρώσεις του PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays, δηλαδή 1000mg/L, 500mg/L και 100mg/L οι τιμές υπολογίστηκαν ίσες με $9.80 \cdot 10^7$, $1.01 \cdot 10^8$ και $1.32 \cdot 10^8$ αντίστοιχα.

Παρατηρείται ακόμη ότι το βιοπλαστικό PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays μετά το πέρας των 7 d δεν είχε κάποια ιδιαίτερα αρνητική επίδραση στο μικροοργανισμό αφού οι τιμές κυμαίνονται στις ίδιες τάξεις μεγέθους όπως και πριν. Όσον αφορά στη μέτρηση για τις 30 d το *V. fischeri* αναπτύσσεται κανονικά χωρίς αλλά και με την παρουσία του βιοπλαστικού. Οι τιμές είναι $1.88 \cdot 10^{10}$ CFUs/mL και $1.55 \cdot 10^{10}$ CFUs/mL για control και PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays στην συγκέντρωση των 1000mg/L.

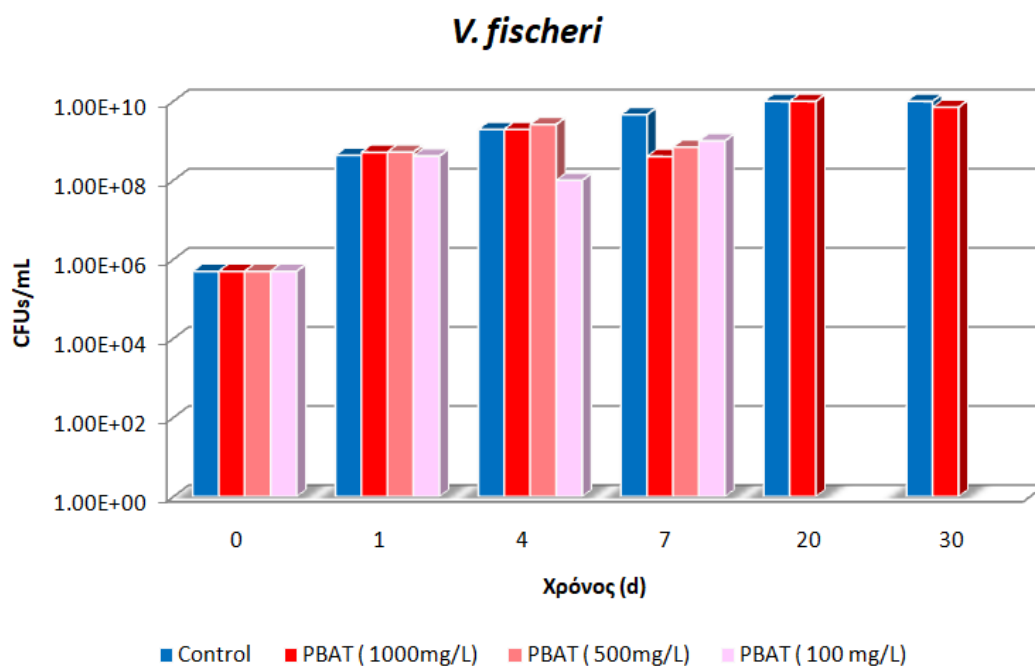
Το συγκεκριμένο δείγμα αποτελείται από τέσσερα διαφορετικά υλικά το PLA, το PBAT, τις φλούδες καφέ και τους αργίλους μοντμοριλλονίτη. Το PBAT είναι ένας κομποστοποιήσιμος βιοπολυεστέρας, που μπορεί να ληφθεί από ανανεώσιμες πηγές. Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μπορεί να παραχθεί από καλαμπόκι που περιέχει άμυλο ή άλλα γεωργικά απόβλητα (Aversa et al., 2022) και οι φλούδες καφέ είναι οργανικό υπόλειμμα. Όσον αφορά στους αργίλους μοντμοριλλονίτη είναι μια πολύ μαλακή φυλλοπυριτική ομάδα ορυκτών που σχηματίζεται όταν καθιζάνει από υδατικό διάλυμα ως μικροσκοπικοί κρύσταλλοι. Αποτελεί ένα νανοσύνθετο πολυμερικό υλικό, μη τοξικό και βιοαποικοδομήσιμο (Νικολαΐδης, 2012). Άρα, τα αποτελέσματα είναι λογικά καθώς τα υλικά είναι βιοβασισμένα, κομποστοποιήσιμα ή βιοαποικοδομήσιμα και συνεπώς μη τοξικά για τον μικροοργανισμό.

PBAT+30%CS



Γράφημα 4: Επίδραση PBAT+30%CS σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*

PBAT



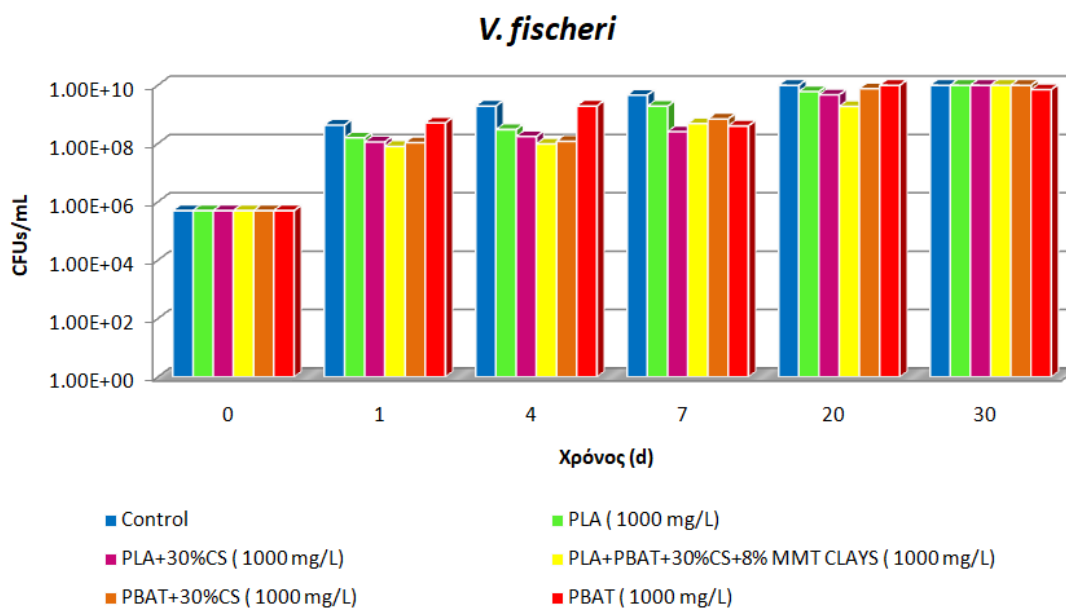
Γράφημα 5: Επίδραση PBAT σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*

Στα γραφήματα 4 & 5 παρουσιάζεται η ανάπτυξη του βακτηρίου κατόπιν προσθήκης των βιοπλαστικών PBAT και PBAT αναμεμιγμένου με 30% CS, δηλαδή Coffee silverskin. Κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών δεν παρατηρείται κάποια σημαντική μείωση στον πληθυσμό όπως και προηγουμένως. Για χρονικές περιόδους 4 και 7 d τα δείγματα που περιείχαν τα βιοπλαστικά εμφάνισαν μια μικρή μείωση. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη δειγματοληψία για τον χρόνο 4 d το control υπολογίστηκε ίσο με $1.95 \cdot 10^9$ CFUs/mL ενώ για τις τρεις συγκεντρώσεις του PBAT+30%CS, δηλαδή 1000mg/L, 500mg/L και 100mg/L οι τιμές κυμάνθηκαν στην τάξη 10^8 . Το ίδιο ισχύει και για τις τιμές όσον αφορά στην προσθήκη του PBAT.

Παρατηρείται ακόμη και για τις δύο περιπτώσεις ότι μετά το πέρας των 7 d δεν υπήρξε κάποια ιδιαίτερα αρνητική επίδραση στο μικροοργανισμό αφού οι τιμές κυμαίνονται στις ίδιες τάξεις μεγέθους όπως και πριν. Όσον αφορά τη μέτρηση για τις 30 d το *V. fischeri* αναπτύσσεται κανονικά χωρίς αλλά και με την παρουσία του βιοπλαστικού. Οι τιμές είναι $1.88 \cdot 10^{10}$ CFUs/mL και $7.10 \cdot 10^9$ CFUs/mL για control και PBAT+30%CS στην συγκέντρωση των 1000mg/L.

Συνολικά σε σύγκριση με τα παραπάνω αποτελέσματα για το PBAT, παρατηρείται ότι στις 30 d εν παρουσία του βιοπλαστικού PLA, μόνο του αλλά και σε συνδυασμό με CS και MMT Clays, το *V. fischeri* αναπτύσσεται καλύτερα.

TOTAL *Vibrio fischeri*



Γράφημα 6: Συγκεντρωτικό διάγραμμα επίδρασης όλων των δειγμάτων (1000mg/L) σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*

Σε πολλές μελέτες αναφέρεται ότι η βιοδοκιμασία αναστολής βιοφωταύγειας *V. fischeri* χρησιμοποιείται ευρέως για αξιολογήσεις τοξικότητας σε δείγματα νερού, εδάφους και ιζημάτων λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων που περιλαμβάνουν μικρότερη διάρκεια δοκιμής, ευαίσθητη, οικονομικά αποδοτική και ευκολία στη λειτουργία (Abbas et al., 2018). Το γένος *Vibrio* είχε χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν σε άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε πολυμερή (Romeo et al., 2015; Gambardella et al., 2018).

Οι Piccardo et al., (2020) σε μελέτη τους έχουν αναφέρει ότι η έκπλυση πλαστικών συσκευασιών και μικροπλαστικών αντιπροσωπεύει μια έμμεση πηγή επιπτώσεων για τα θαλάσσια οικοσυστήματα, καθώς η έκπλυση θα μπορούσε να καθορίσει σημαντικές απελευθερώσεις χημικών ουσιών στο νερό (Rochman et al., 2013; Pedà et al., 2016). Σύμφωνα με εργασίες που μελέτησαν την έκθεση των θαλάσσιων ειδών σε εκπλύσεις τριών διαφορετικών μεγεθών σωματιδίων του PET, επισημάνθηκε πως δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές οξείες επιδράσεις σε βακτήρια και είδη φυκιών αλλά αντίθετα συνέβαλαν στη βιοδιέγερσή τους. Αρκετές μελέτες ανέπτυξαν το θαλάσσιο βακτήριο *V. fischeri* για δοκιμή οικοτοξικότητας μικροπλαστικών, σύμφωνα με τις οποίες σπάνια υπήρχε κάποια επίπτωση (Booth et al., 2015; Gambardella et al., 2018) Σύμφωνα με αυτές επικράτησε η άποψη ότι αυτό το είδος δεν είναι ένα αρκετά ευαίσθητο μοντέλο για εξέταση τοξικότητας πλαστικών. Λόγω μιας σημαντικής χημικής συγγένειας, τα μικροπλαστικά είναι ικανά να απορροφούν περισσότερες οργανικές ενώσεις, αλλά το *V. fischeri* είναι πιο ευαίσθητο στα ιχνοστοιχεία παρά στην οργανική ρύπανση και αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει την ασθενή ευαισθησία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Piccardo et al., 2020).

Αντίστοιχα οι Gambardella et al., (2018), έχουν πραγματοποιήσει μελέτη η οποία στόχευε στον προσδιορισμό των επιπτώσεων των στραγγισμάτων πλαστικής συσκευασίας (16 διαφορετικοί τύποι που δοκιμάστηκαν) σε τρία θαλάσσια είδη, που ανήκουν σε διαφορετικά τροφικά επίπεδα. Οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (από 0.001 to 10 mg/L) δεν μπόρεσαν να επηρεάσουν σημαντικά τα βακτήρια (*V. fischeri*) και τα φύκια (*P. tricornutum*).

Προκειμένου να γίνει εμβάθυνση για τις οικοτοξικολογικές επιδράσεις των MP πολυστυρενίου σε θαλάσσια είδη από διαφορετικά τροφικά επίπεδα, οι Gambardella et al., (2018) αναφέρουν ότι στη μελέτη τους αξιολογήθηκε η τοξικότητα των μικροσφαιριδίων 0.1 μm χρησιμοποιώντας μια μπαταρία που αποτελείται από αποσυνθέτες, πρωτογενείς παραγωγούς και καταναλωτές. Το βακτήριο *Vibrio anguillarum*, το μικροφύκος *Dunaliella tertiolecta*, το στροφέιο *Brachionus plicatilis* και οι προνύμφες του εχινόδερμου *Paracentrotus lividus* επιλέχθηκαν, καθώς αποτελούν καθιερωμένα είδη-μοντέλα σε οικοτοξικολογικές δοκιμές (Rotini et al., 2017a, b; Beiras 2017a, b. et al., 2015· Manzo et al., 2010· Pane et al., 2008· Sha et al., 2015· Sjollem et al., 2016). Το θαλάσσιο βακτήριο *Vibrio anguillarum* εκτέθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις MP (0-0.001-0.01-0.1-1-10 mg/L) σε 0.22 μm FSW (filtered natural seawater) για διάστημα 6 h. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίπτωση στον πληθυσμό του βακτηρίου μεταξύ των συγκεντρώσεων που ελέγχθηκαν με MP και του control ($p>0.05$). Η έκθεση σε MP των βακτηρίων δεν επηρέασε σημαντικά την καλλιέργεια ($p>0.05$). Το υψηλότερο ποσοστό αναστολής της καλλιιεργησιμότητας βρέθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση MPs (15%). Οι συγκεντρώσεις MP κάτω από 10 mg/L εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές ή ακόμη και ελαφρά αύξηση. (Gambardella et al., 2018).

Αυτά τα ευρήματα είναι πολύ παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν σε άλλα θαλάσσια είδη που ανήκουν στα ίδια τροφικά επίπεδα. Για παράδειγμα, οι αποικοδομητές έχουν αποδειχθεί ότι δεν είναι ευαίσθητοι στα μικροσφαιρίδια πολυστυρενίου μετά από 6 h έκθεσης σύμφωνα με τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν από τους Booth και συνεργάτες (2016) για το βακτήριο *V. fischeri*, όπου δεν παρατηρήθηκε αναστολή βιοφωταύγειας υπό έκθεση σε 1000 mg/L από πολυστυρένιο MPs με βάση το μεθυλμεθακρυλικό. Ομοίως, προηγούμενες μελέτες για το *D. tertiolecta* έδειξαν ότι δεν υπήρξε ουσιαστική επίπτωση μετά από έκθεση πολυστυρενίου MP έως 10 mg/L (Bergami et al., 2017; Sjollem et al., 2016).

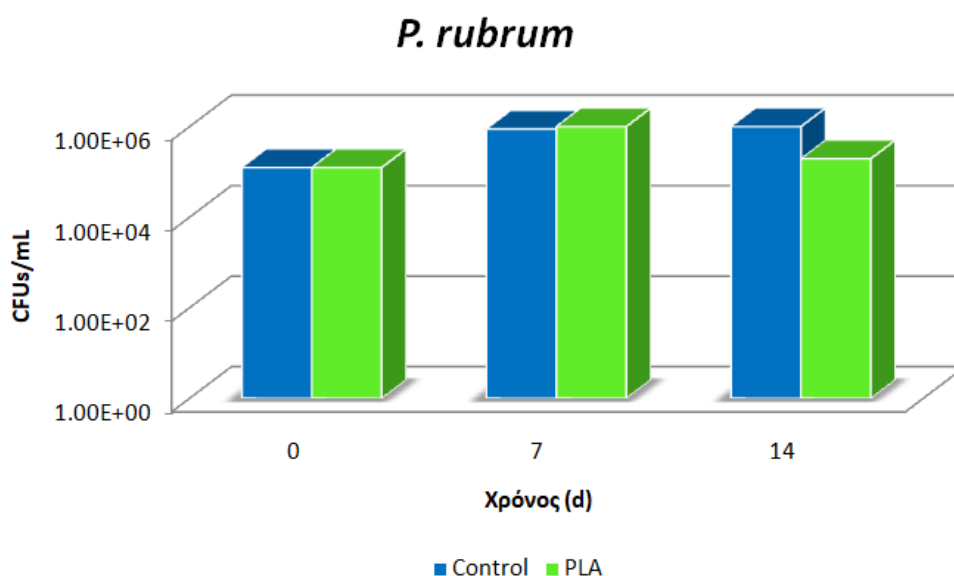
4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΗ ΜΗΤΡΑ ΜΕ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ *Penicillium rubrum*

Το *Penicillium rubrum* είναι ένα είδος μύκητα που υπάγεται στο γένος *Penicillium*. Το *Penicillium* είναι ένα γένος ασκοκυτταρικών μυκήτων που αποτελεί μέρος του μυκοβιώματος πολλών ειδών και έχει μεγάλη σημασία στο φυσικό περιβάλλον, στην καταστροφή των τροφίμων και στην παραγωγή τροφίμων και φαρμάκων.

Ορισμένες μελέτες αναφέρουν την ικανότητα του *Penicillium rubrum* να παράγει τους τοξικούς μεταβολίτες Rubratoxins A και B. (Moss and Hill, 1970).

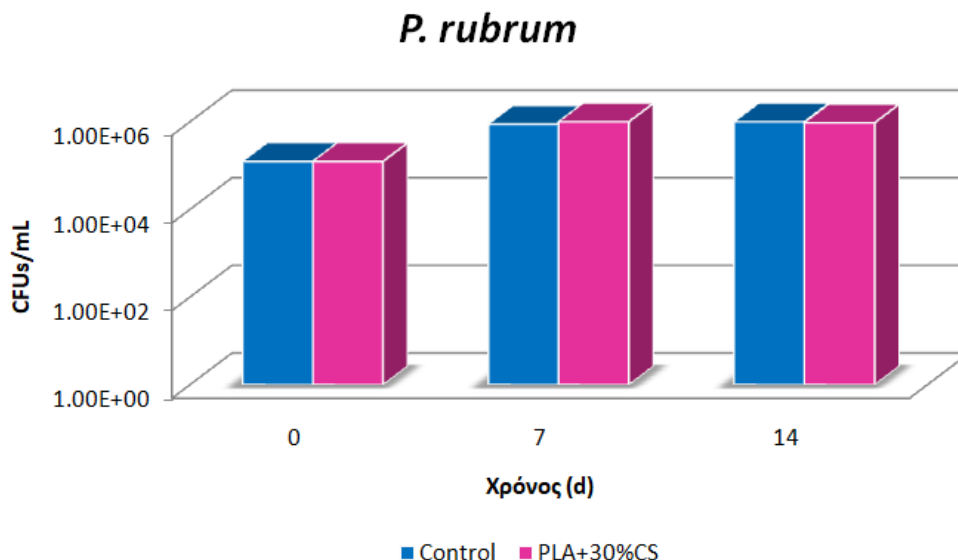
Ο συνολικός χρόνος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν δυο εβδομάδες και οι δειγματοληψίες ελήφθησαν για χρόνους 0, 7 και 14 d. Ο χρόνος 0 d αντιστοιχεί στον χρόνο που δεν έχει υπάρξει επίδραση του βιοπλαστικού στον μύκητα και αποτελεί σημαντική παράμετρο καθώς δείχνει τον αρχικό αριθμό αποικιών ανά mL διαλύματος. Η συγκέντρωση κάθε βιοπλαστικού ήταν ίση με 1000mg/L. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα γραφήματα που ακολουθούν:

PLA



Γράφημα 7: Επίδραση PLA (1000mg/L) σε πληθυσμό *P. rubrum* (CFUs/mL) μετά από επώαση 14 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο τον *P. Rubrum*

PLA+30%CS



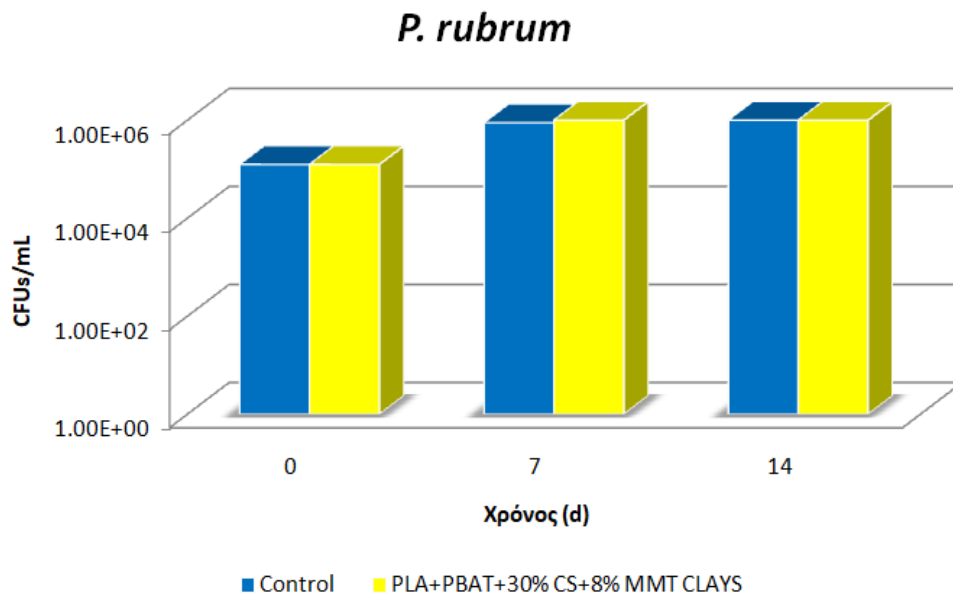
Γράφημα 8: Επίδραση PLA+30%CS (1000mg/L) σε πληθυσμό *P. rubrum* (CFUs/mL) μετά από επώαση 14 d

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο τον *P. rubrum*

Στο γράφημα 7, εξετάζεται η ανάπτυξη του μυκητιακού πληθυσμού *P. rubrum* (CFUs/mL) για διάστημα 14 d μετά την προσθήκη του βιοπλαστικού PLA στο διάλυμα. Κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών δεν παρατηρείται καμία μείωση στον πληθυσμό του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη δειγματοληψία για τον χρόνο 7 d το control υπολογίστηκε ίσο με $8.85 \cdot 10^5$ CFUs/mL ενώ για τη συγκέντρωση του PLA δηλαδή 1000mg/L η τιμή υπολογίστηκε ίση με $1.02 \cdot 10^6$ CFUs/mL. Αυτό δείχνει ότι το βιοπλαστικό PLA μετά το πέρας των 7 d δεν είχε απολύτως καμία αρνητική επίδραση στο μικροοργανισμό. Όπως παρατηρείται ο μικροοργανισμός *P. rubrum* παρουσία του βιοπλαστικού εμφανίζει μια πολύ μικρή αύξηση πληθυσμού, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν υπήρξε κάποια τοξικότητα. Όσον αφορά στη μέτρηση μετά το τέλος των 14 d στο control καταμετρήθηκαν $1.98 \cdot 10^6$ CFUs/mL ενώ για το PLA η τιμή είναι ίση με $1.95 \cdot 10^5$ CFUs/mL. Υπάρχει δηλαδή πολύ μικρή μείωση της μίας τάξης μεγέθους, ωστόσο αυτό πιθανόν να αποτελεί λογικό συμπέρασμα καθώς ο χρόνος ζωής του *P. rubrum* μετά τις 14 d εμφανίζει πτωτική τάση.

Στο γράφημα 8, εμφανίζονται τα αποτελέσματα που αφορούν την προσθήκη του βιοπλαστικού PLA αναμεμειγμένο με 30% CS, δηλαδή Coffee silverskin στο διάλυμα παρουσία του μικροοργανισμού. Οι φλούδες καφέ αποτελούν οργανικό υπόλειμμα. Κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών δεν παρατηρείται καμία μείωση στον πληθυσμό του μύκητα. Κατά τη δειγματοληψία για τον χρόνο 7 d το control υπολογίστηκε ίσο με $8.85 \cdot 10^5$ CFUs/mL ενώ για τη συγκέντρωση του PLA+30%CS 1000mg/L ο πληθυσμός υπολογίστηκε ίσος με $1.04 \cdot 10^6$ CFUs/mL. Οι μετρήσεις μετά τις 14 d για control και PLA+30%CS υπολογίστηκαν $1.98 \cdot 10^6$ και $9.50 \cdot 10^5$ CFUs/mL αντίστοιχα, δηλαδή κυμαίνονται στην ίδια τάξη μεγέθους.

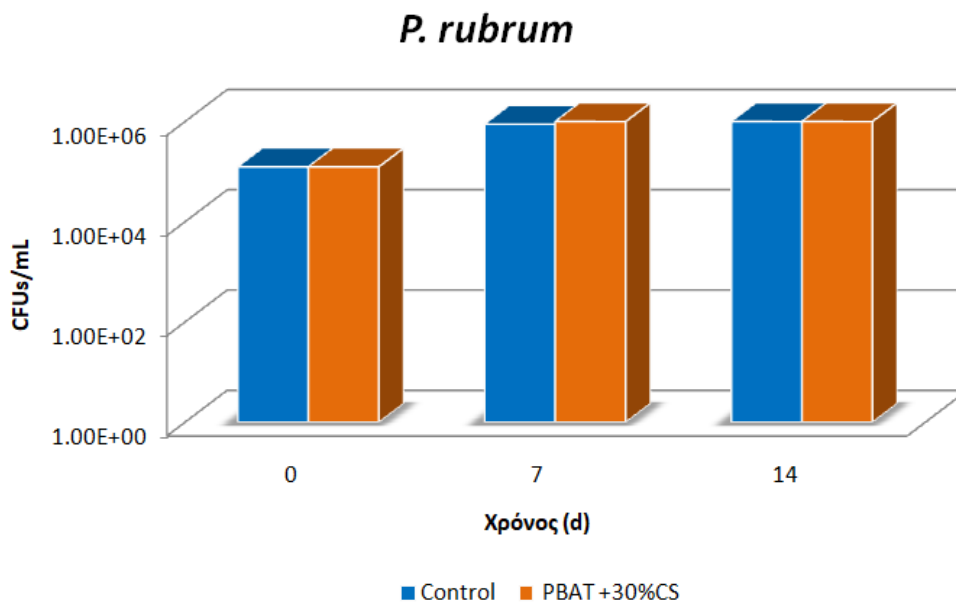
PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays



Γράφημα 9: Επίδραση PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays (1000mg/L) σε πληθυσμό *P. rubrum* (CFUs/mL) μετά από επώαση 14 d

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο τον *P. rubrum*

PBAT+30%CS

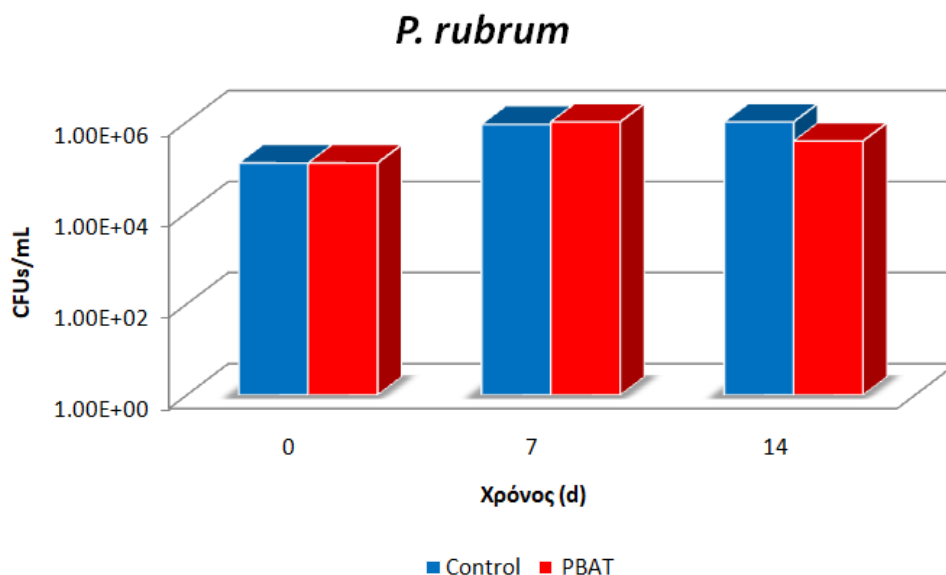


Γράφημα 10: Επίδραση PBAT+30%CS (1000mg/L) σε πληθυσμό *P. rubrum* (CFUs/mL) μετά από επώαση 14 d

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο τον *P. rubrum*

Στα γραφήματα 9 & 10 παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μύκητα παρουσία βιοπλαστικού που αποτελείται από τέσσερα διαφορετικά υλικά το PLA, το PBAT, τις φλούδες καφέ και τους αργίλους μοντμοριλλονίτη, αλλά και παρουσία βιοπλαστικού PBAT+30%CS. Σύμφωνα με αυτά παρατηρείται στις 7 d μια μικρή αύξηση στις αποικίες του *P. rubrum*. Τα υλικά από τα οποία αποτελούνται τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν όπως ήταν αναμενόμενο δεν εμφανίζουν κάποια τοξικότητα έναντι του μύκητα, αλλά αντιθέτως παρατηρείται μια μικρή αύξηση του πληθυσμού. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο *P. rubrum* χρησιμοποιεί το δείγμα ως πηγή άνθρακα συμβάλλοντας έτσι στην πιο γρήγορη ανάπτυξή του. Στις 14 d οι τιμές παραμένουν σχεδόν σταθερές και για τις δύο περιπτώσεις όπως και πριν. Το control αυξάνεται ελάχιστα, δηλαδή $1.98 \cdot 10^6$ CFUs/mL. Επίσης $1.26 \cdot 10^6$ και $1.33 \cdot 10^6$ CFUs/mL είναι οι τιμές του μυκητιακού πληθυσμού για την πρώτη και για την δεύτερη περίπτωση αντίστοιχα. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα είναι λογικά καθώς τα υλικά είναι βιοβασισμένα, κομποστοποιήσιμα ή βιοαποικοδομήσιμα και συνεπώς μη τοξικά για τον μικροοργανισμό.

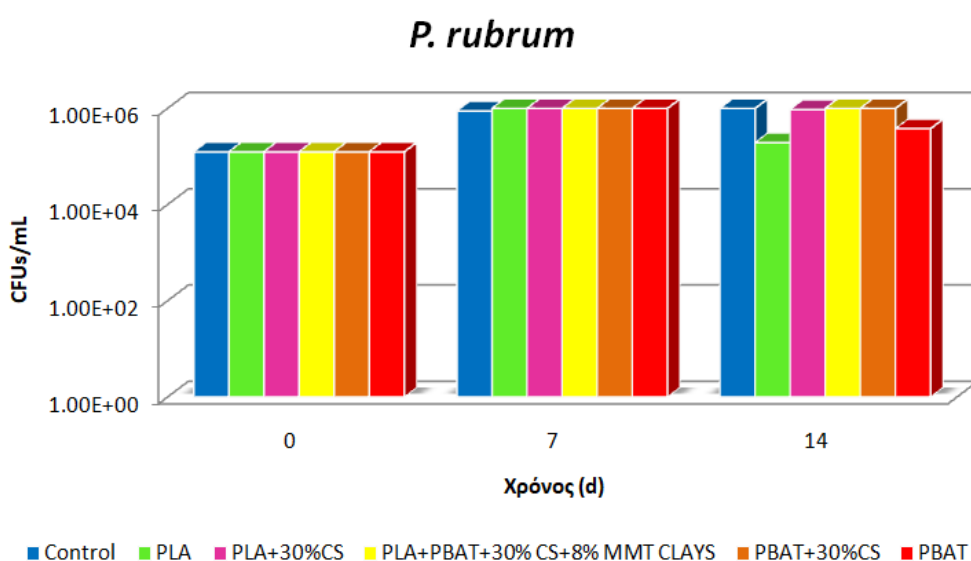
PBAT



Γράφημα 11: Επίδραση PBAT (1000mg/L) σε πληθυσμό *P. rubrum* (CFUs/mL) μετά από επώαση 14 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο τον *P. rubrum*

Στο γράφημα 11, κατά τη δειγματοληψία για τον χρόνο 7 d το control υπολογίστηκε ίσο με $8.85 \cdot 10^5$ CFUs/mL ενώ παρουσία του PBAT σε 1000mg/L ο πληθυσμός υπολογίστηκε ίσος με $1.14 \cdot 10^6$ CFUs/mL. Αυτό δείχνει ότι το βιοπλαστικό PBAT μετά το πέρας των 7 d δεν είχε απολύτως κάποια αρνητική επίδραση στον μικροοργανισμό. Όπως παρατηρείται ο μικροοργανισμός *P. rubrum* παρουσία του βιοπλαστικού εμφανίζει μια πολύ μικρή αύξηση πληθυσμού, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν υπήρξε κάποια τοξικότητα. Όσον αφορά στη μέτρηση μετά το τέλος των 14 d το control ισούται με $1.98 \cdot 10^6$ CFUs/mL ενώ για το PBAT η τιμή είναι ίση με $3.80 \cdot 10^5$ CFUs/mL. Υπάρχει δηλαδή πολύ μικρή μείωση της μίας τάξης μεγέθους.

TOTAL *Penicillium rubrum*



Γράφημα 12: Συγκεντρωτικό διάγραμμα επίδρασης όλων των δειγμάτων (1000mg/L) σε πληθυσμό *P. rubrum* (CFUs/mL) μετά από επώαση 14 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο τον *P. rubrum*

Το *Penicillium* είναι ένας από τους πιο συνηθισμένους μύκητες που ζουν σχεδόν σε όλους τους οικοτόπους, έχοντας τεράστιο οικονομικό αντίκτυπο στην ανθρώπινη ζωή. Έχει ευεργετική, ουδέτερη και επιβλαβή αλληλεπίδραση με τα φυτά και ζει τόσο σε επιφυτική όσο και σε ενδοφυτική σχέση με αυτά. Πολλά είδη *Penicillium* αλληλεπιδρούν θετικά με τις ρίζες των φυτών και ενισχύουν την ανάπτυξη τους παρέχοντας θρεπτικά συστατικά, ιδιαίτερα διαλυτό P, και παρέχοντας φυτικές αυξητικές ορμόνες όπως το ινδολο-3-οξικό οξύ και το γιββερελικό οξύ. Ορισμένα είδη έχουν ανταγωνιστική δράση έναντι των παθογόνων των φυτών παράγοντας αντιβιοτικά και επίσης προστατεύουν τα φυτά προκαλώντας συστηματική αντίσταση και ενεργοποιώντας πολλαπλά αμυντικά σήματα. Πολλά ενδοφυτικά *Penicillium sp.* προσφέρουν ανοχή στα φυτά-ξενιστές έναντι της αλατότητας, της ξηρασίας, του ψυχρού στρες και των καταπονήσεων των βαρέων μετάλλων. Ορισμένα είδη χρησιμοποιούνται επίσης με επιτυχία στη βιοαποκατάσταση εδάφους που έχει υποστεί ρύπανση από βαρέα μέταλλα.

Παίζουν επίσης βασικό ρόλο στην αποσύνθεση της οργανικής ύλης και στον κύκλο των θρεπτικών συστατικών. Ορισμένα είδη προκαλούν επίσης αλλοίωση και τροφιμογενείς ασθένειες, οι οποίες πρέπει να αντιμετωπιστούν σωστά για να αυξηθεί το εισόδημα από τη γεωργική βιομηχανία και για την ασφάλεια των καταναλωτών (Srinivasan et al., 2020).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ο *Penicillium rubrum* είναι ένα είδος μύκητα που υπάγεται στο γένος *Penicillium*. Το *Penicillium* είναι ένα γένος ασκοκυτταρικών μυκήτων που αποτελεί μέρος του μυκοβιώματος πολλών ειδών και έχει μεγάλη σημασία στο φυσικό περιβάλλον, στην καταστροφή των τροφίμων και στην παραγωγή τροφίμων και φαρμάκων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, ο συγκεκριμένος μύκητας δεν επηρεάζεται από την παρουσία των βιοπλαστικών που εξετάστηκαν. Συνεπώς, δεν φαίνεται να επηρεάζεται ο ρυθμός μεταβολισμού του και η όλη δράση του ως αποικοδομητή.

4.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΕΛΑΦΟΣ

Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας συλλέχθηκαν ποσότητες από δύο διαφορετικά είδη χώματος, το ένα από την περιοχή Ακρωτηρίου και πιο συγκεκριμένα από το Πολυτεχνείο Κρήτης και το δεύτερο από την περιοχή της Αγίας Χανίων.

Πίνακας 9: Κατηγοριοποίηση χωμάτων

Περιοχή συλλογής χώματος	Ονομασία
Ακρωτήρι Χανίων, Πολυτεχνείο Κρήτης	Χώμα Α
Αγία Χανίων	Χώμα Β

Οι ποσότητες του πρώτου και του δεύτερου χώματος συλλέχθηκαν στις 13/12/2021 και 5/5/2022 αντίστοιχα.

Τα εδάφη συνήθως ομαδοποιούνται σε έξι κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση, η οποία καθορίζει τον τρόπο διατήρησης του νερού και των θρεπτικών συστατικών και υπαγορεύει ποιες καλλιέργειες είναι πιο κατάλληλες για καλλιέργεια σε αυτά. Η σύνθεση του εδάφους μπορεί να είναι άμμος, άργιλος, κιμωλία, τύρφη ή λάσπη και πολλά εδαφικά συστήματα έχουν διακυμάνσεις σε όλη τους την έκταση με μπαλώματα που έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ενός συστατικού από ένα άλλο (Larum, 2018).

Στο συγκεκριμένο πείραμα τα δύο είδη χώματος που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Αμμώδες έδαφος (περιοχή Ακρωτήρι Χανίων)

Τα αμμώδη εδάφη έχουν πολύ μεγάλη συγκέντρωση σε αμμώδη σωματίδια που δημιουργούν ένα πολύ κοκκώδες αλλά ελαφρύ μέσο ανάπτυξης. Τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν τη γρήγορη αποστράγγιση του νερού και άλλων υγρών, την εύκολη επεξεργασία τους, καθώς και το μαλακό και εύπλαστο υλικό για σκάψιμο. Δεδομένου ότι το νερό αποστραγγίζεται αποτελεσματικά από αυτά τα εδάφη, συχνά διακρίνονται για τη χαμηλότερη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και την τάση να θερμαίνονται και να στεγνώνουν γρήγορα. Τα αμμώδη εδάφη έχουν επίσης συχνά χαμηλότερο μέσο pH, καθιστώντας το πιο κατάλληλο για φυτά που εκτιμούν την ελαφριά οξύτητα στο προφίλ του εδάφους τους (Larum, 2018).

Οι καλλιέργειες που εκτιμούν το καλά στραγγιζόμενο έδαφος και τις ζεστές, ξηρές συνθήκες ευδοκιμούν σε αμμώδη εδάφη. Αυτό περιλαμβάνει βότανα που προέρχονται από περιοχές της Μεσογείου όπως δεντρολίβανο, θυμάρι, ρίγανη καθώς και πολλά είδη δέντρων όπως δάφνη, συκιά και ελιές. Η χαλαρή υφή και η ελαφρότητα του εδάφους διευκολύνουν επίσης την ανάπτυξη και την επέκταση των ριζικών λαχανικών και των φυτών της χαμηλής βλάστησης, δηλαδή θαμνώδη φυτά ύψους 1.5-2 m . Η βλάστηση (που περιλαμβάνει χαμηλούς θάμνους, αιθαλείς πόες και τα περίφημα ξηρανθεκτικά φρύγανα) ονομάζεται “μακκία” και είναι χαρακτηριστική σε παραθαλάσσιες περιοχές και περιοχές με χαμηλό υψόμετρο (Horomidis.gr, 2019).

Αμμοαργιλώδες έδαφος (περιοχή Αγίας Χανίων)

Τα αμμοαργιλώδη εδάφη περιγράφονται ως μια ισορροπία μεταξύ διαφορετικών συνδυασμών των τύπων εδάφους άμμου, αργίλου και λάσπης. Το ποσοστό της αργίλου δεν ξεπερνάει το 15-25%. Αυτός είναι ένας από τους πιο επιθυμητούς και γόνιμους τύπους εδάφους λόγω των χαρακτηριστικών του, δηλαδή περιέχει τα οφέλη και των τριών τύπων εδάφους από τα οποία αποτελείται. Τα αμμοαργιλώδη εδάφη έχουν καλή αποστράγγιση, υψηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, καλά δομημένο προφίλ και αργούν να θερμανθούν και να κρυώσουν δημιουργώντας ένα σχετικά σταθερό στη θερμοκρασία περιβάλλον για καλλιέργειες. Τα αμμοαργιλώδη εδάφη έχουν επίσης συχνά μέσο pH, καθιστώντας το πιο κατάλληλο για φυτά που εκτιμούν την ουδέτερη οξύτητα στο προφίλ του εδάφους τους (Larum, 2018).

Η άμπελος καθώς και τα περισσότερα φρούτα και λαχανικά αναπτύσσονται πολύ καλά σε αργιλώδη εδάφη, ωστόσο δεδομένου ότι η σύνθεση του είναι μια κάπως λεπτή ισορροπία τριών άλλων τύπων εδάφους, πρέπει να διατηρηθεί καλά για μην υπάρξει μεγάλη συγκέντρωση πετρών καθώς μπορεί να επηρεαστεί η ανάπτυξη και η συγκομιδή των καλλιεργειών (Horomidis.gr, 2019).



Εικόνα 29: α)Είδος χώματος, Αμμώδες έδαφος (πηγή: Horomidis.gr, 2019 αριστερά), β) Είδος χώματος, Αμμοαργιλώδες έδαφος (πηγή: Larum, 2018 δεξιά)

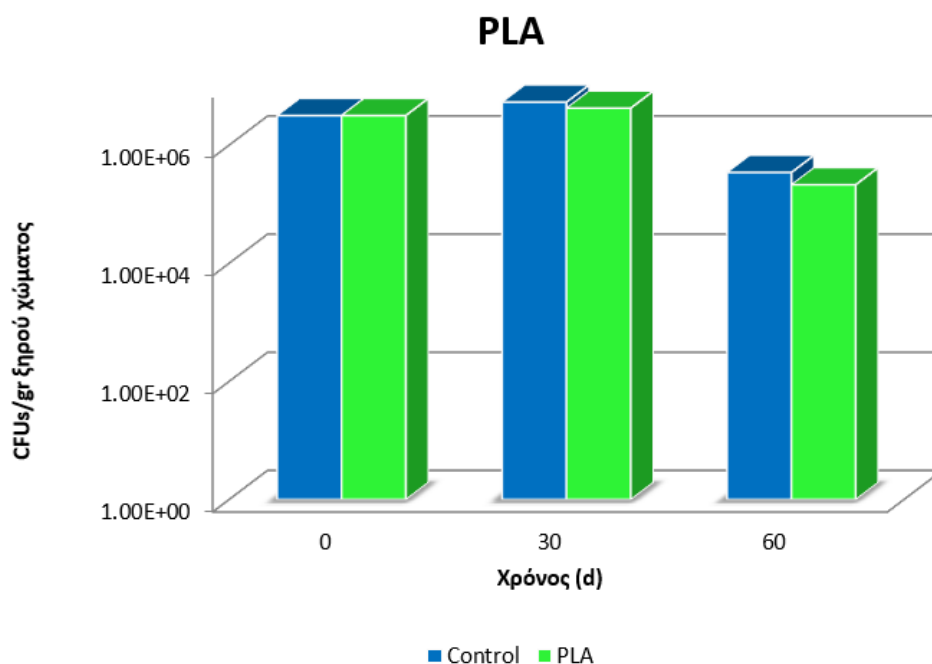
4.3.1. Έλεγχος οικοτοξικότητας σε έδαφος με ποσοτικοποίηση πληθυσμών βακτηρίων και μυκήτων μέσω καλλιεργητικών τεχνικών

Σημαντική παράμετρος στο συγκεκριμένο πείραμα αποτέλεσε η βαρομετρική περιεχόμενη υγρασία με σκοπό τον υπολογισμό των αποικιών βακτηρίων και μυκήτων σε 1 gr ξηρού χώματος. Έτσι, η παράμετρος μετρήθηκε ξεχωριστά και για τα δύο είδη χώματος, με τιμές για το χώμα Α και για το χώμα Β, ίσες με 0.176 και 0.207 αντίστοιχα.

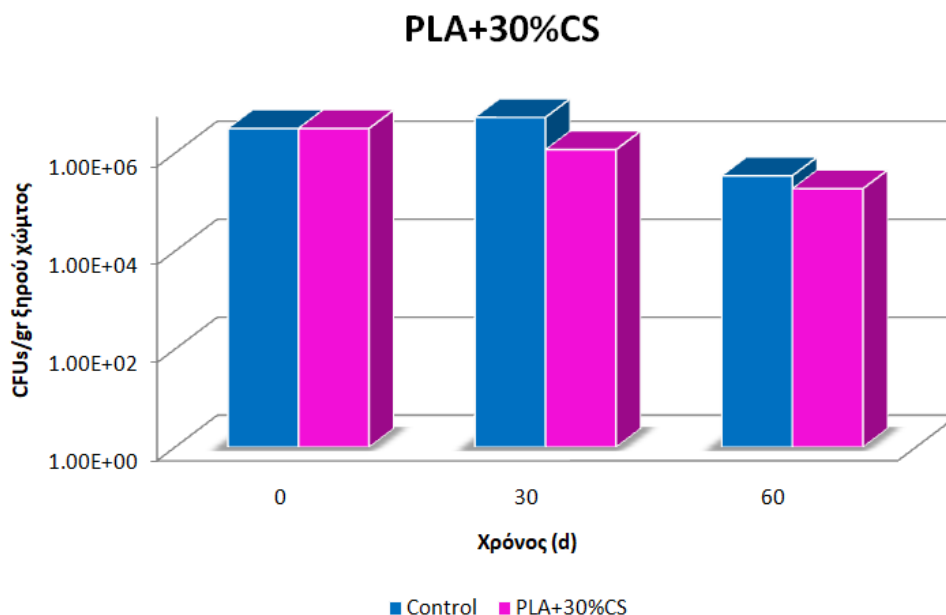
Συνολικά, το πείραμα διήρκεσε 60 d και οι δειγματοληψίες ελήφθησαν για χρόνους 0, 30 και 60 d. Η ποσότητα κάθε δείγματος βιοπλαστικού που προστέθηκε σε κάθε 100 gr χώματος ήταν 2 gr.

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται στα παρακάτω γραφήματα:

ΒΑΚΤΗΡΙΑ (Χώμα Α - περιοχή Ακρωτηρίου)

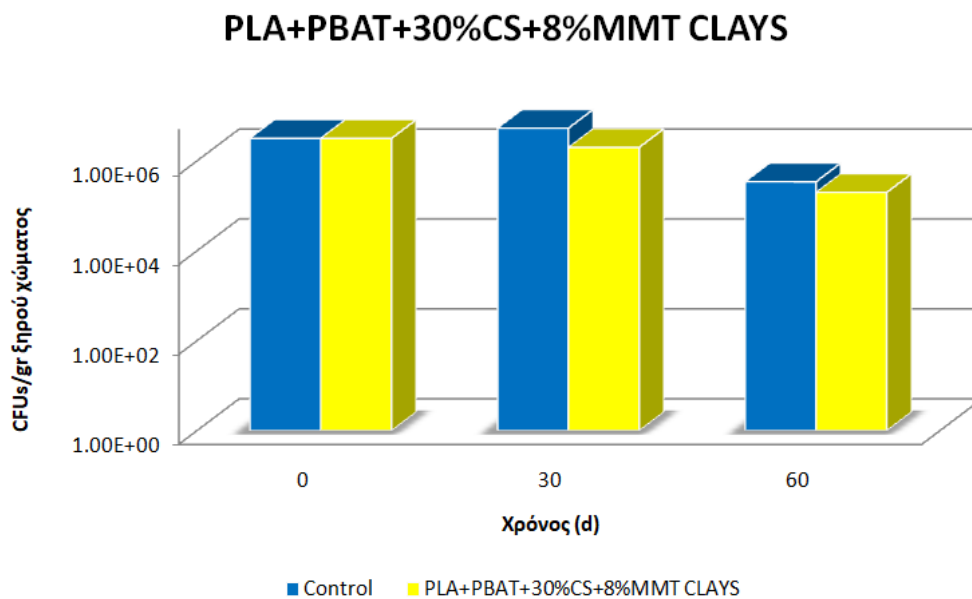


Γράφημα 13: Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA (0.02gr βιοπλαστικού/gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

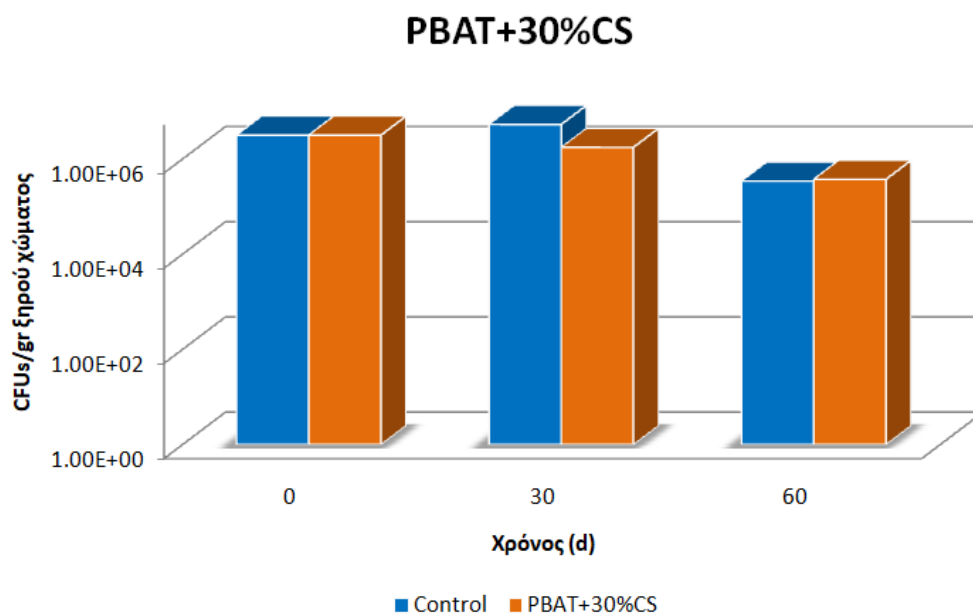


Γράφημα 14: Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA+30%CS (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
 Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

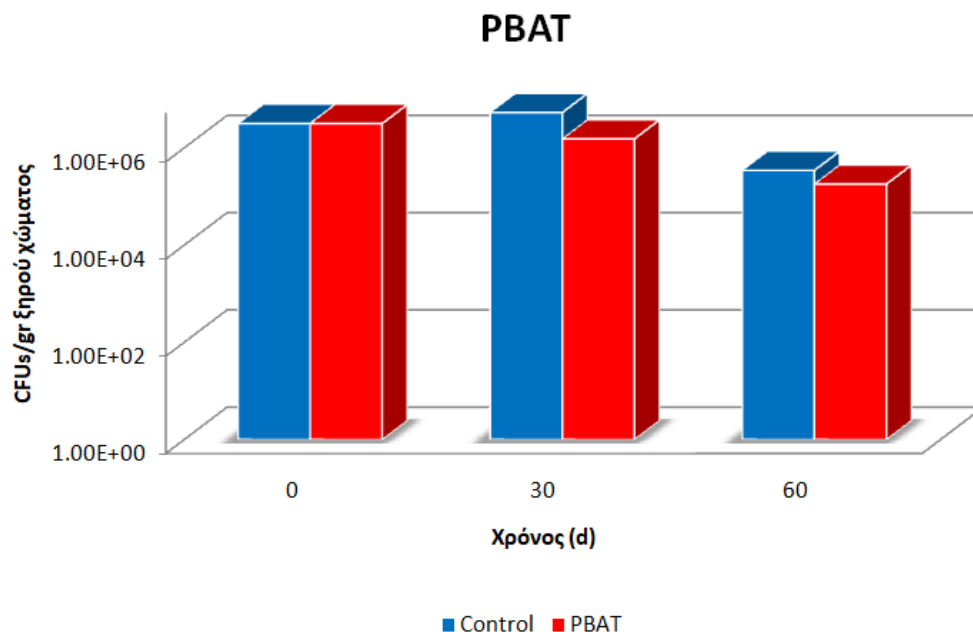
Στα διαγράμματα 13 & 14 παρουσιάζεται η επίδραση των βιοπλαστικών PLA και PLA+30%CS μετά την προσθήκη τους στο δείγμα χώματος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε διαστήματα 30 και 60 d και συνολικά για αυτές τις ημέρες δεν παρουσιάζεται κάποια τοξικότητα έναντι των βακτηρίων του εδάφους. Πιο συγκεκριμένα, στην πρώτη περίπτωση για χρόνο 30 και 60 d το control μετρήθηκε ίσο με $5.35 \cdot 10^6$ και $3.45 \cdot 10^5$ CFUs/gr ξηρού χώματος αντίστοιχα, ενώ για το βιοπλαστικό PLA, $4.23 \cdot 10^6$ στις 30 d και $2.13 \cdot 10^5$ CFUs/gr ξηρού χώματος στις 60 d. Οι μετρήσεις κυμαίνονται στα ίδια ακριβώς επίπεδα και για την περίπτωση προσθήκης του βιοπλαστικού PLA+30%CS με τιμές $1.18 \cdot 10^6$ στις 30 d και $1.88 \cdot 10^5$ CFUs/gr ξηρού χώματος στις 60 d. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι για το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα αλλά και στη συγκεκριμένη συγκέντρωση τα βιοπλαστικά δεν δρουν αρνητικά στον βακτηριακό πληθυσμό του εδάφους και οι μικροοργανισμοί μπορούν και αναπτύσσονται κανονικά με την παρουσία τους.



Γράφημα 15: Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



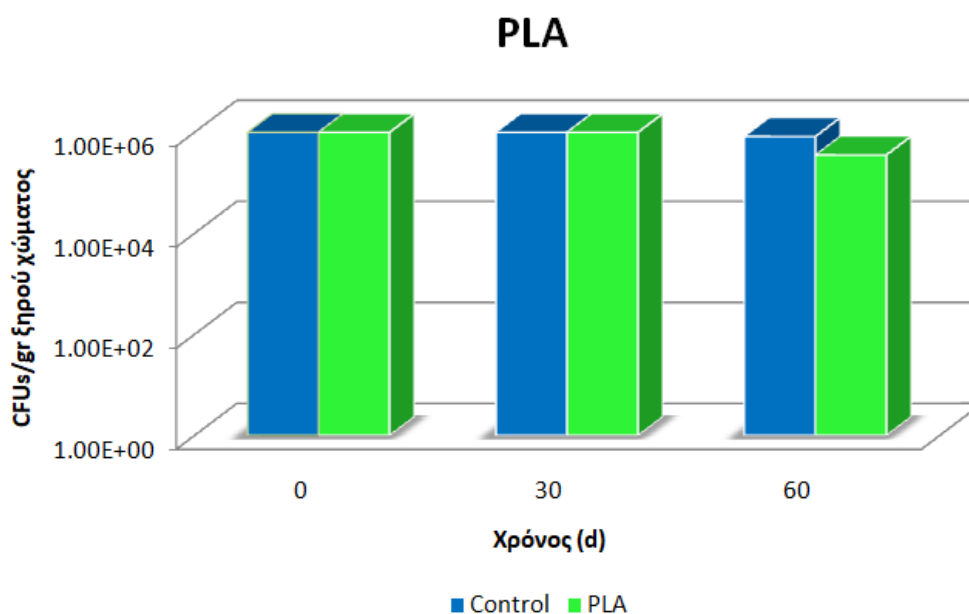
Γράφημα 16: Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PBAT+30%CS (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



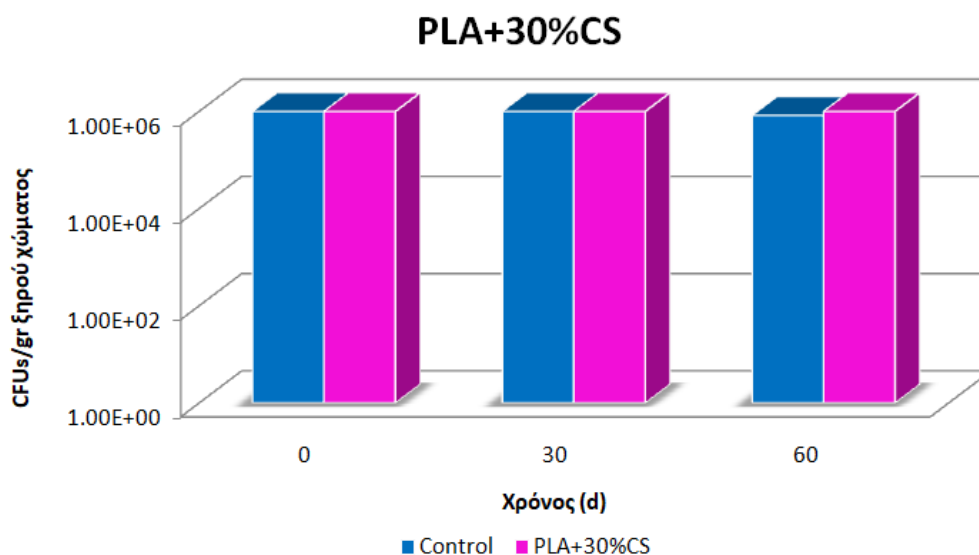
Γράφημα 17: Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PBAT (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

Καμία τοξικότητα έναντι των βακτηρίων του εδάφους για το χρονικό διάστημα μελέτης των 60 d δεν εμφανίζεται ούτε και στα παραπάνω γραφήματα μετά την προσθήκη των βιοπλαστικών PLA, PBAT, CS και MMT Clays σε συνδυασμό αλλά και ξεχωριστά δηλαδή εν παρουσία PBAT+30%CS καθώς και PBAT. Η συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού του εδάφους για το control στις 30 και στις 60 d εμφάνισε μια μικρή μείωση της μίας τάξης μεγέθους, από $5.35 \cdot 10^6$ CFUs/gr ξηρού χώματος σε $3.45 \cdot 10^5$ CFUs/gr ξηρού χώματος αντίστοιχα. Όσον αφορά στα δείγματα, στην περίπτωση συνδυασμού όλων των δειγμάτων βιοπλαστικών η συγκέντρωση των βακτηρίων βρέθηκε ίση με $2.00 \cdot 10^6$ και $2.00 \cdot 10^5$ CFUs/gr ξηρού χώματος για 30 και 60 d αντίστοιχα και ακριβώς στις ίδιες τάξεις μεγέθους μετρήθηκε η συγκέντρωση μετά την προσθήκη του βιοπλαστικού PBAT+30%CS και PBAT. Τα δείγματα συνεπώς δεν εμφάνισαν κάποια τοξικότητα στους μικροοργανισμούς, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα βακτήρια του εδάφους δεν εμφάνισαν κάποια ευαισθησία στο διάστημα των 2 μηνών στα συγκεκριμένα υλικά τα οποία είναι βιοβασισμένα, κομποστοποιήσιμα ή βιοαποικοδομήσιμα.

ΒΑΚΤΗΡΙΑ (Χώμα Β – περιοχή Αγιάς)

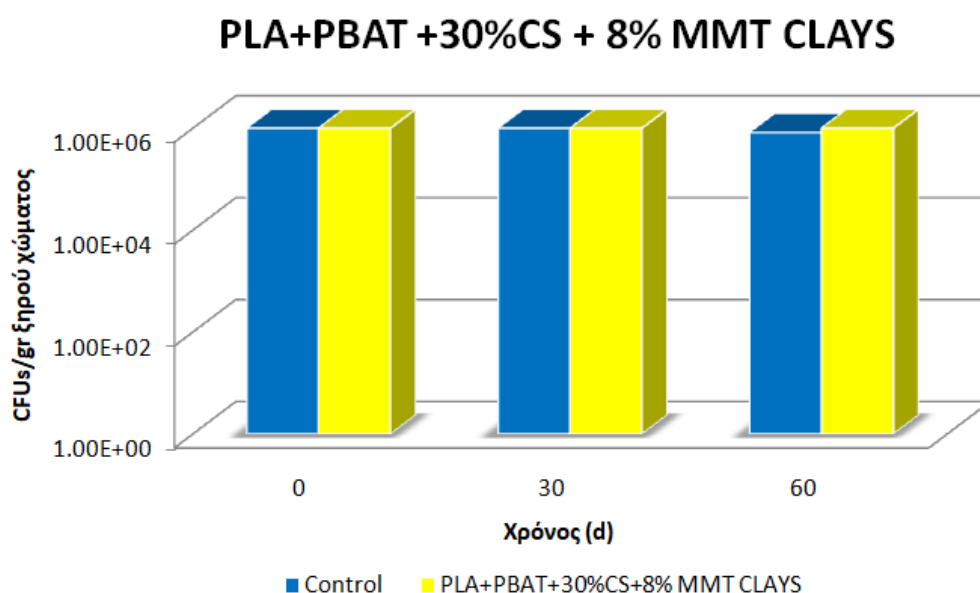


Γράφημα 18: Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

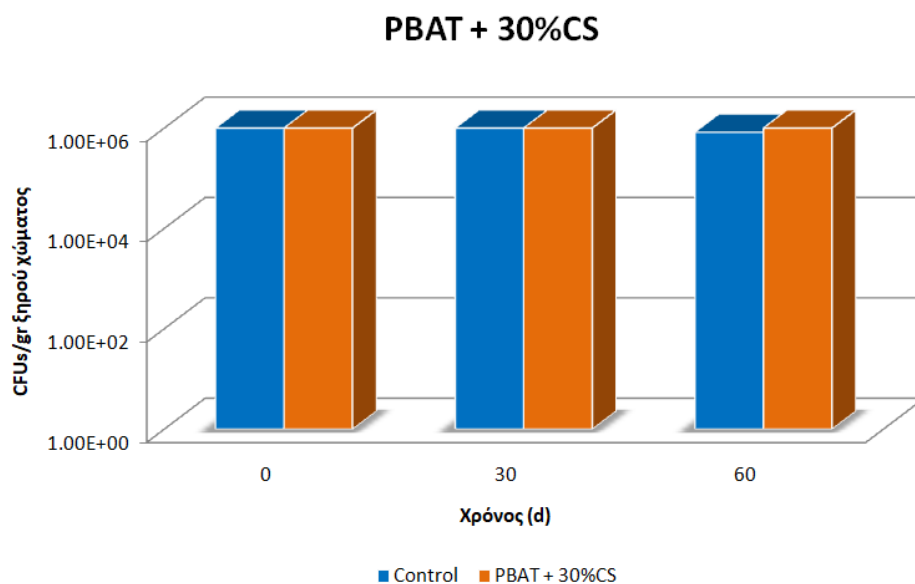


Γράφημα 19: Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA+30%CS (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

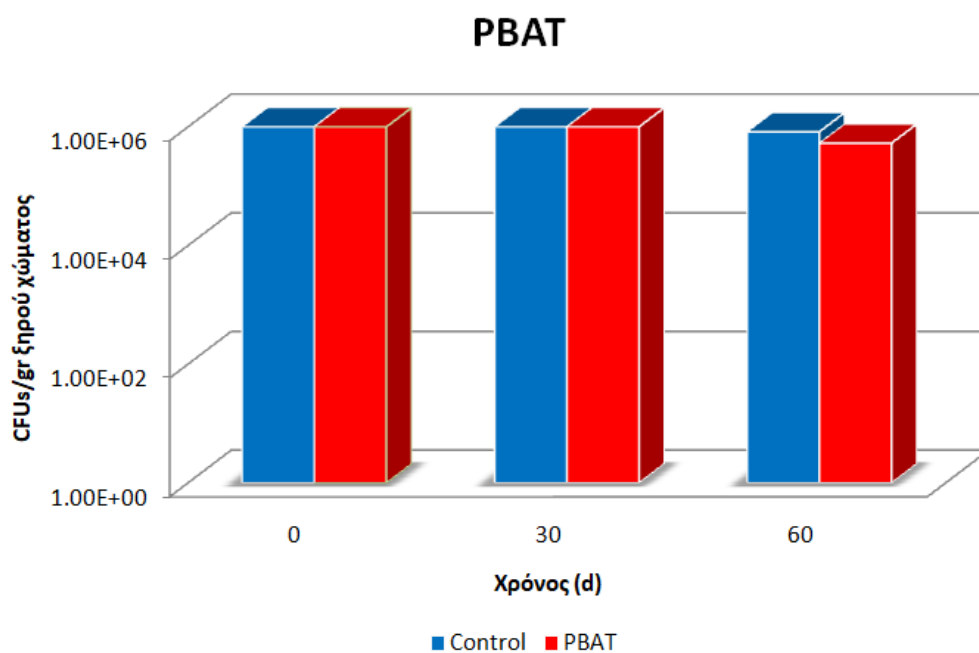
Στην περίπτωση μελέτης της οικοτοξικότητας των βιοπλαστικών σε βακτηριακό πληθυσμό του εδάφους χρησιμοποιώντας ως μέσο ελέγχου το χώμα Β τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν κατά πολύ από αυτά του χώματος Α. Αναλυτικότερα, για το βιοπλαστικό PLA η συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού από τις 30 στις 60 d εμφάνισε μικρή μείωση της μίας τάξης μεγέθους από $4.41 \cdot 10^6$ CFUs/gr ξηρού χώματος σε $3.56 \cdot 10^5$ CFUs/gr ξηρού χώματος αντίστοιχα, ενώ η συγκέντρωση για το control παρέμεινε σχεδόν σταθερή στα 10^6 CFUs/gr ξηρού χώματος. Για την περίπτωση του βιοπλαστικού PLA+30%CS η συγκέντρωση για το control, όπως και προηγουμένως, παρέμεινε σχεδόν σταθερή από $5.79 \cdot 10^6$ CFUs/gr ξηρού χώματος σε $8.27 \cdot 10^5$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Ωστόσο, η συγκέντρωση βακτηριακού πληθυσμού παρουσία του βιοπλαστικού παρέμεινε σταθερή στα 10^6 CFUs/gr ξηρού χώματος, δηλαδή στις 60 d οι μικροοργανισμοί αυξήθηκαν σε σχέση με το control. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι φλούδες καφέ που περιέχονται στο δείγμα αποτελούν οργανικό υπόλειμμα και, εκτός του ότι δεν είναι τοξικές απέναντι στα βακτήρια του εδάφους, ίσως στο σύντομο αυτό χρονικό διάστημα να αποτέλεσαν πηγή άνθρακα για τη δική τους ανάπτυξη.



Γράφημα 20: Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



Γράφημα 21: Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PBAT+30%CS (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



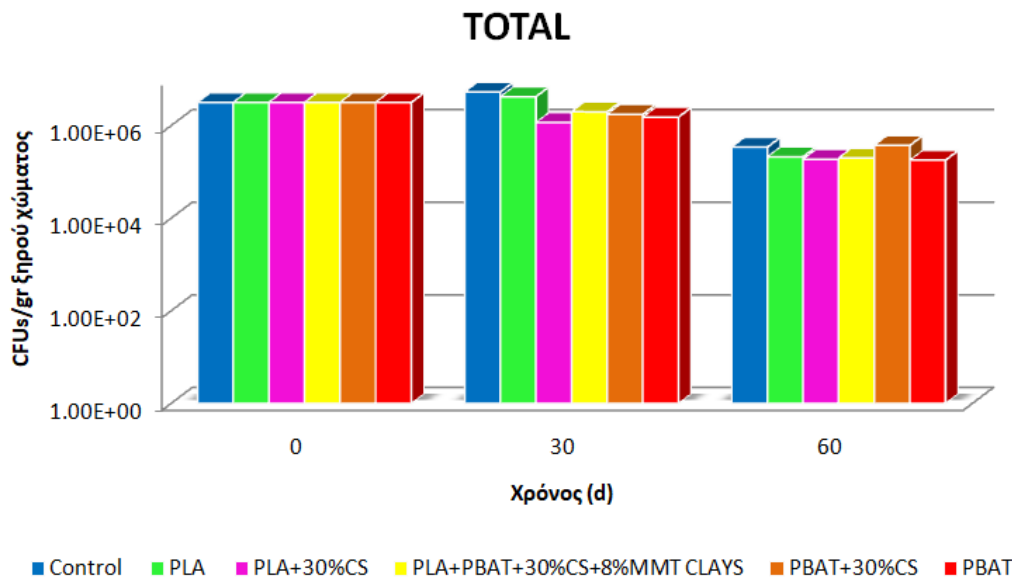
Γράφημα 22: Πληθυσμός βακτηρίων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PBAT (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, στις 30 d μετά την προσθήκη των βιοπλαστικών PLA, PBAT, CS και MMT Clays σε συνδυασμό αλλά και ξεχωριστά δηλαδή εν παρουσία PBAT+30%CS καθώς και PBAT, δεν παρατηρείται μείωση στη συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού στο έδαφος. Η συγκέντρωση για το control είναι $5.79 \cdot 10^6$ CFUs/gr ξηρού χώματος και παρουσία των βιοπλαστικών οι συγκεντρώσεις μετρήθηκαν ίσες με $1.87 \cdot 10^6$, $1.21 \cdot 10^6$ και $6.64 \cdot 10^6$ CFUs/gr ξηρού χώματος αντίστοιχα. Για τη συγκέντρωση των βακτηρίων μετά το πέρας των 2 μηνών, δηλαδή στις 60 d, η συγκέντρωση για το control παρέμεινε σχεδόν σταθερή, $8.27 \cdot 10^5$ CFUs/gr ξηρού χώματος, όπως επίσης και για τα βιοπλαστικά PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays και PBAT+30%CS, η συγκέντρωση παρέμεινε στην ίδια τάξη μεγέθους με τιμές ίσες με $1.50 \cdot 10^6$ και $1.65 \cdot 10^6$ CFUs/gr ξηρού χώματος αντίστοιχα. Ωστόσο, για το βιοπλαστικό PBAT στις 60 d παρουσιάστηκε μικρή μείωση στα $5.31 \cdot 10^5$ CFUs/gr ξηρού χώματος.

Συνολικά, για το χώμα B, στις περιπτώσεις προσθήκης των βιοπλαστικών PLA και PBAT χωρίς τις φλούδες καφέ και τους αργίλους μοντμοριλλονίτη μετά το πέρας των 2 μηνών παρουσιάστηκε μείωση συγκέντρωσης βακτηρίων. Παράλληλα για τα δείγματα με όλα τα υλικά ή μόνο με τα PLA και PBAT με CS, η συγκέντρωση παρέμεινε σταθερή και δεν εμφάνισε κάποια τοξικότητα ακόμη και μετά το τέλος των 60 d. Ωστόσο, καθώς οι διαφορές στις συγκεντρώσεις είναι πολύ μικρές δεν μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι κάποιο από τα βιοπλαστικά είναι τοξικό για τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Σαν συμπέρασμα, που ίσως να δικαιολογεί τις μικρές αυτές διαφορές στις συγκεντρώσεις, πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι φλούδες καφέ που περιέχονται στο δείγμα αποτελούν οργανικό υπόλειμμα και, εκτός του ότι δεν είναι τοξικές απέναντι στα βακτήρια του εδάφους, ίσως στο σύντομο αυτό χρονικό διάστημα να αποτέλεσαν πηγή άνθρακα για τη δική τους ανάπτυξη σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα θρεπτικά συστατικά που προϋπήρχαν στο εδαφικό δείγμα. Επιπλέον, οι άργιλοι μοντμοριλλονίτη αποτελούν ένα νανοσύνθετο πολυμερικό υλικό, μη τοξικό και βιοαποικοδομήσιμο.

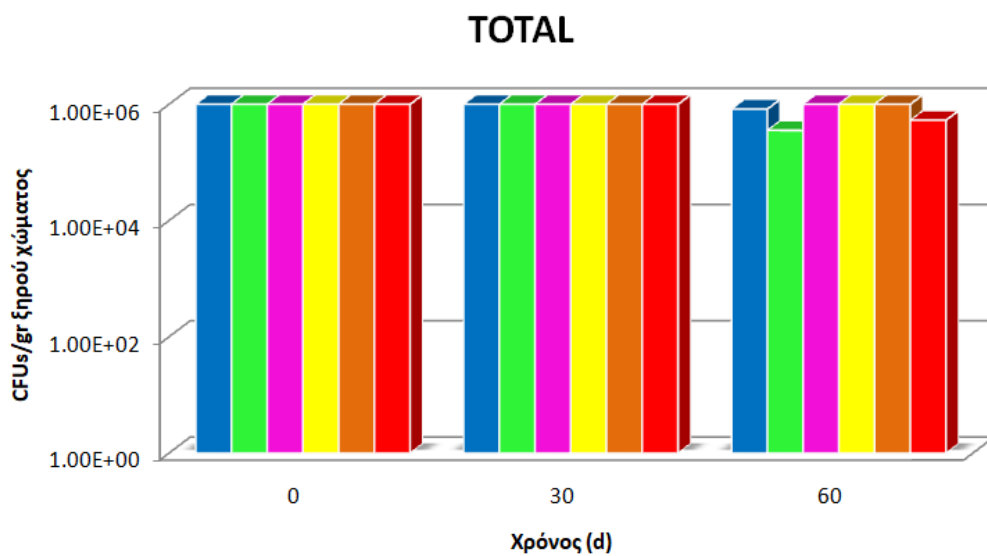
Συμπερασματικά, για τα βακτήρια του εδάφους και για τα δύο διαφορετικά είδη χώματος δεν φαίνεται να υπάρχει κάποιο μοτίβο τοξικότητας από την συμβίωσή τους με τα βιοπλαστικά στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις και στο χρονικό διάστημα που διεξήχθη το πείραμα.

Χώμα Α – περιοχή Ακρωτηρίου



Γράφημα 23: Συγκεντρωτικό διάγραμμα επίδρασης όλων των δειγμάτων (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος) σε πληθυσμό βακτηρίων CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

Χώμα Β – περιοχή Αγιάς



Γράφημα 24: Συγκεντρωτικό διάγραμμα επίδρασης όλων των δειγμάτων (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος) σε πληθυσμό βακτηρίων CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

Συνολικά, συγκρίνοντας τα τελικά αποτελέσματα για τα δύο είδη χώματος, δηλαδή για το χώμα Α (περιοχή Ακρωτηρίου) και για το χώμα Β (περιοχή Αγιάς), δεν παρατηρείται εμφανής διαφορά στις συγκεντρώσεις του βακτηριακού πληθυσμού στο διάστημα των 60 d. Κανένα από τα δείγματα βιοπλαστικού δεν εμφανίζει τοξικότητα έναντι των βακτηρίων του εδάφους σε σχέση με το control και οι τιμές κυμαίνονται στις ίδιες τάξεις μεγέθους και για τα δύο διαστήματα που ελήφθησαν οι δειγματοληψίες.

Οι επιδράσεις της συγκέντρωσης βιοπλαστικών υπολειμμάτων στη μικροβιακή κοινότητα και την ποικιλότητα του εδάφους φαίνεται ότι ποικίλλουν στη βιβλιογραφία, με μελέτες να δείχνουν πιο σημαντικές επιδράσεις για τη συγκέντρωση βιοπλαστικών σε ή πάνω από 1% w/w (Mazzon et al., 2022; Qi et al., 2018; Qi et al., 2020c), σε 0.1 % w/w για PLA MBPs (Boots et al., 2019) ή ακόμη και σε 0.01 % w/w περίπου στην περίπτωση βιοαποδομήσιμων μεμβρανών (Accinelli et al., 2012b; Bandopadhyay et al., 2018· Sander, 2019).

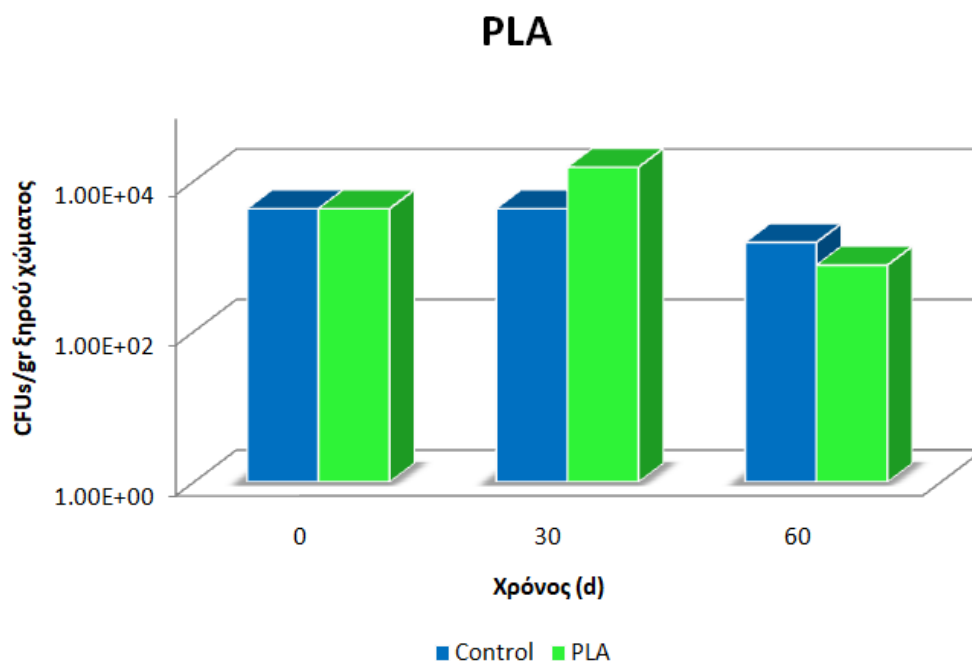
Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που δεν παρατήρησαν σημαντικές επιδράσεις στις μικροβιακές κοινότητες του εδάφους λόγω των βιοπλαστικών (César et al., 2009; Chen et al., 2020; Kapanen et al., 2008; Masui et al., 2011; Sintim et al., 2009. , 2020). Οι Chen et al. (2020) σε ένα πείραμα 70 d δεν παρατήρησαν σημαντικές αλλαγές στις βακτηριακές κοινότητες του εδάφους καθώς και στις ενζυμικές τους δραστηριότητες για περιεκτικότητα σε PLA MBP έως και 2 % w/w. Ομοίως, μια άλλη μελέτη δεν βρήκε σημαντικές αλλαγές στον βακτηριακό πληθυσμό του εδάφους λόγω των βιοπλαστικών PLA και PHB + PLA μετά από 70 d (Rychter et al., 2006). Επίσης, στην επιφάνεια των βιοπλαστικών, διαπιστώθηκε ότι η βακτηριακή χλωρίδα επηρεάστηκε ελάχιστα, ενώ μεγαλύτερη αφθονία βακτηρίων και μυκήτων παρατηρήθηκε στη επιφάνεια των βιοπλαστικών σε σύγκριση με το χώμα (Rychter et al., 2006).

Άλλη έρευνα από τους Judy et al., (2019) αναφέρει ότι η ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την προσθήκη μικροπλαστικών στο έδαφος, αν και τα αποτελέσματα της ανάλυσης της μικροβιακής κοινότητας ήταν εξαιρετικά μεταβλητά.

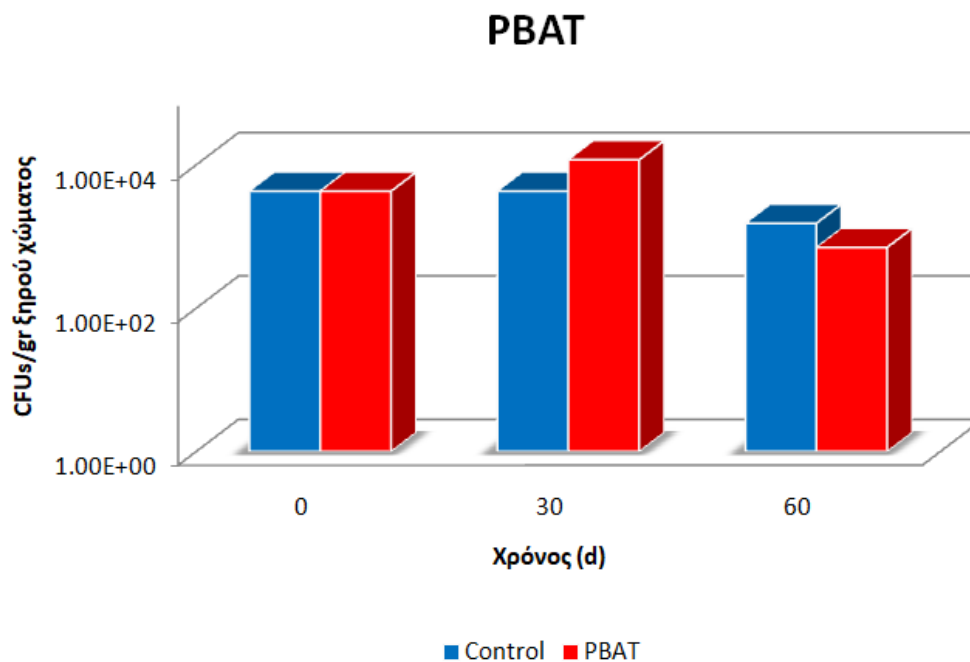
Παράλληλα, πολλοί ερευνητές πειραματίζονται με βακτηριακή αποδόμηση πλαστικών και μικροπλαστικών. Ένα μόνο βακτήριο από μόνο του τείνει να αποικοδομεί μόνο ένα ή λίγα πλαστικά και μικροπλαστικά και δεν είναι τόσο αποτελεσματικό όσο ένα μείγμα βακτηρίων για πλαστικά και μικροπλαστική αποδόμηση. Για μικροπλαστικά μίγματα η απόδοση αποικοδόμησής τους δεν είναι πολύ υψηλή. Επειδή τα μικροπλαστικά είναι εγγενώς πολύπλοκα στη σύστασή τους και επειδή έχουν καταστραφεί από το περιβάλλον, είναι ακόμη πιο δύσκολο να κατανοήσουμε με σαφήνεια τη σύνθεσή τους. Επομένως, η αποδόμηση μόνο από βακτήρια έχει μεγάλους περιορισμούς (Ibrahim et al., 2021).

Η συνδυασμένη βιολογική αποδόμηση ξεπερνά τους περιορισμούς της μεμονωμένης βακτηριακής αποδόμησης σε μεγάλο βαθμό. Ωστόσο, η αποδόμηση και η χρήση πλαστικών και μικροπλαστικών από βακτηριακές κοινότητες είναι μια πολύ περίπλοκη διαδικασία λόγω της αλληλεπίδρασης πολλαπλών μικροοργανισμών και πολλαπλών ενζύμων και δεν είμαστε σε θέση να ελέγξουμε καλά την εμφάνιση αποδόμησης στο παρόν ερευνητικό στάδιο. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να διεξαχθούν πιο εμπεριστατωμένες μελέτες για τους σχετικούς παράγοντες και μηχανισμούς που επηρεάζουν στο μέλλον (Zurier and Goddard, 2020)

ΜΥΚΗΤΕΣ (Χώμα Α – περιοχή Ακρωτηρίου)

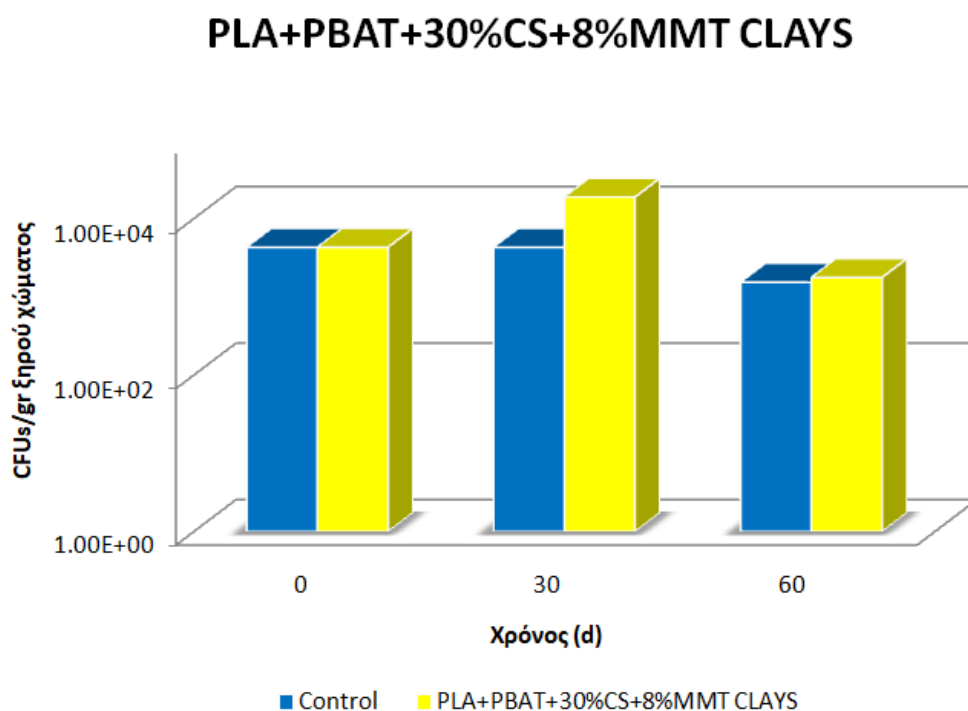


Γράφημα 25: Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

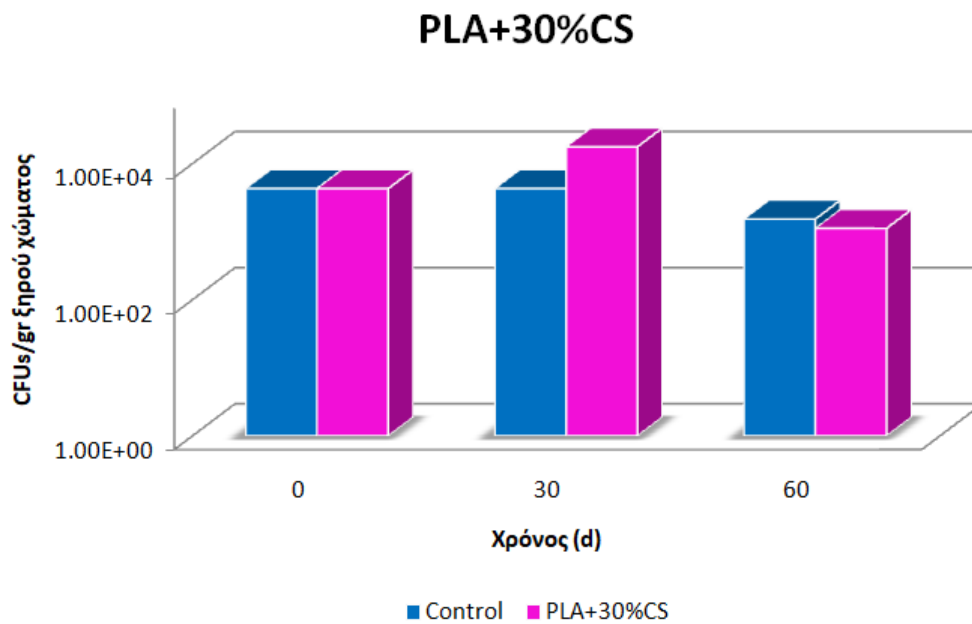


Γράφημα 26: Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PBAT (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

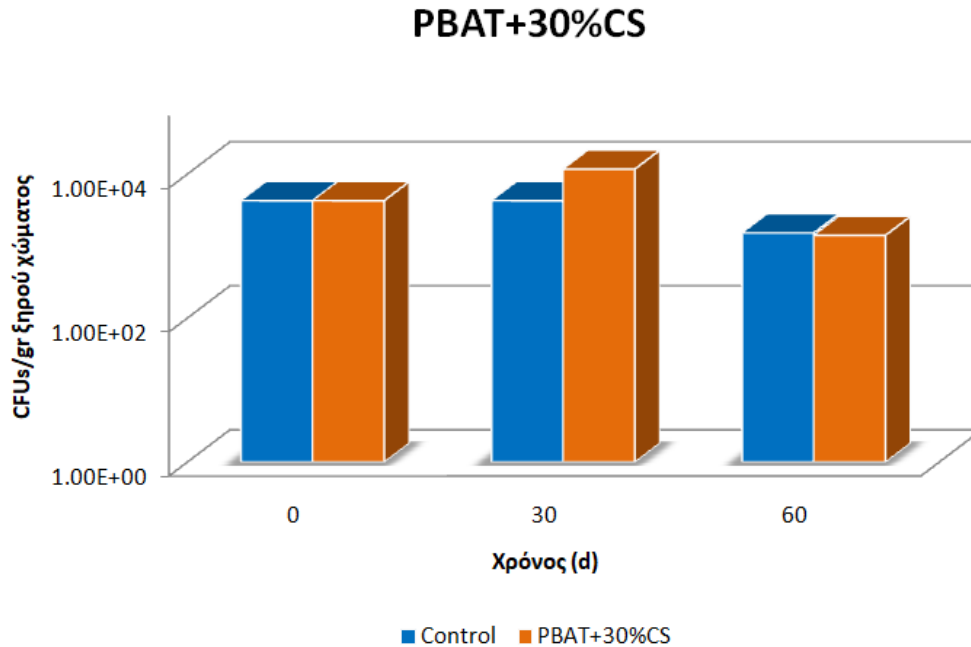
Στα παραπάνω διαγράμματα μελετάται η οικοτοξικότητα των βιοπλαστικών PLA και PBAT έναντι του μυκητιακού πληθυσμού στο έδαφος. Τα αποτελέσματα για τις πρώτες 30 d υποδεικνύουν ότι το control αναπτύσσεται κανονικά από την 1^η έως την 30^η ημέρα, με σταθερή τιμή $4.29 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Παράλληλα, κατά την προσθήκη του PLA μετά το πέρασ των 30 d, ο μυκητιακός πληθυσμός του εδάφους δείχνει να αυξάνεται κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με το control, με τιμή ίση με $1.53 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Στις 60 d το control παραμένει σταθερό στα $1.53 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος ενώ αντιθέτως για PLA παρατηρείται μείωση στα $7.64 \cdot 10^2$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Στο ίδιο μοτίβο ακριβώς κυμαίνονται και οι συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν κατά την προσθήκη του βιοπλαστικού PBAT στις 30 και 60 d, αρχικά δηλαδή με αύξηση του πληθυσμού στα $1.18 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος και τελικά με μείωση στα $7.06 \cdot 10^2$ CFUs/gr ξηρού χώματος.



Γράφημα 27: Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



Γράφημα 28: Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA+30%CS (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

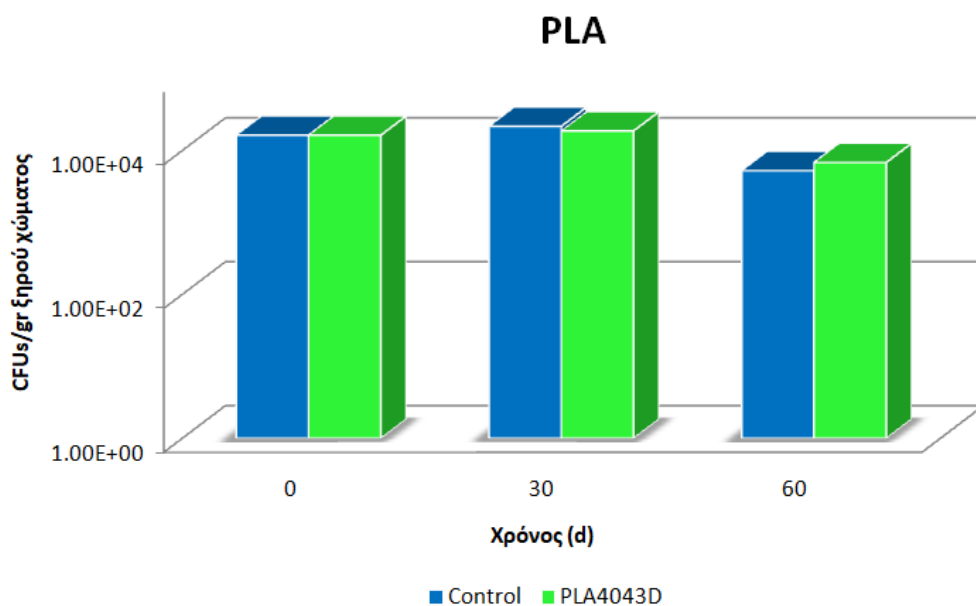


Γράφημα 29: Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PBAT+30%CS (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

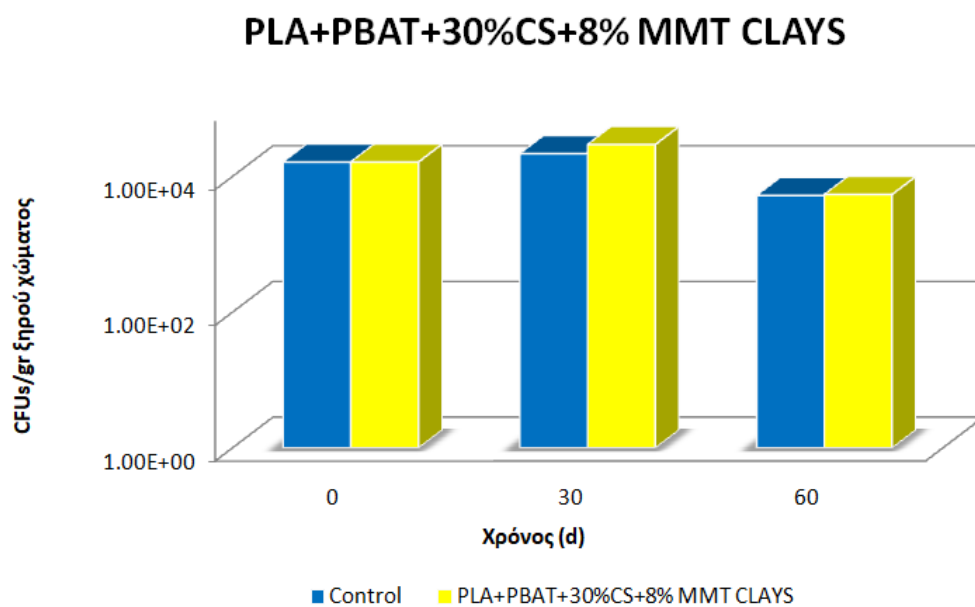
Όπως και πριν, τα αποτελέσματα για τις πρώτες 30 d μετά την προσθήκη των βιοπλαστικών PLA, PBAT, CS και MMT Clays σε συνδυασμό αλλά και ξεχωριστά, δηλαδή παρουσία PBAT+30%CS καθώς και PBAT, υποδεικνύουν ότι το control αναπτύσσεται κανονικά από την 1^η έως την 30^η d, με σταθερή συγκέντρωση $4.29 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Παράλληλα, κατά την προσθήκη του PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays μετά το πέρας των 30 d, ο μυκητιακός πληθυσμός του εδάφους δείχνει να αυξάνεται κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με το control, με συγκέντρωση ίση με $1.88 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Στις 60 d το control παραμένει σταθερό στα $1.53 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος ενώ στην ίδια τάξη μεγέθους μετρήθηκε η συγκέντρωση και για PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays με τιμή στα $1.76 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Στο ίδιο μοτίβο ακριβώς κυμαίνονται και οι συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν κατά την προσθήκη των βιοπλαστικών PLA+30%CS και PBAT+30%CS στις 30 και 60 d, αρχικά δηλαδή με αύξηση του πληθυσμού στα $1.76 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος και $1.18 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος αντίστοιχα και τελικά με μείωση στα $1.12 \cdot 10^3$ και $1.41 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος.

Η αύξηση της συγκέντρωσης μετά το τέλος του πρώτου μήνα σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι μύκητες θεωρούνται καλοί αποικοδομητές της οργανικής ύλης και έτσι, μπορούν και χρησιμοποιούν την οργανική ύλη των υλικών για την περαιτέρω ανάπτυξή τους.

ΜΥΚΗΤΕΣ (Χώμα Β – περιοχή Αγιάς)

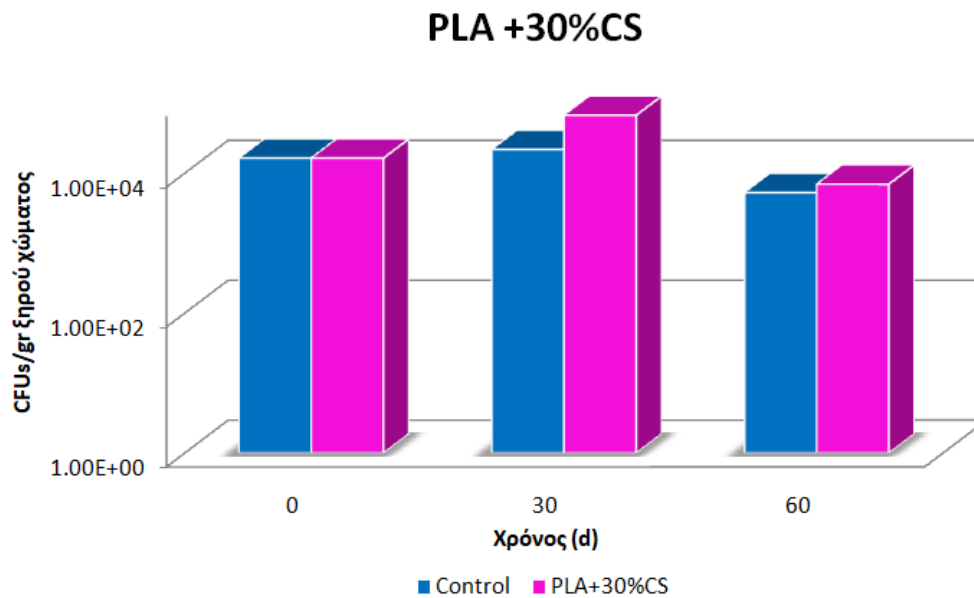


Γράφημα 30: Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

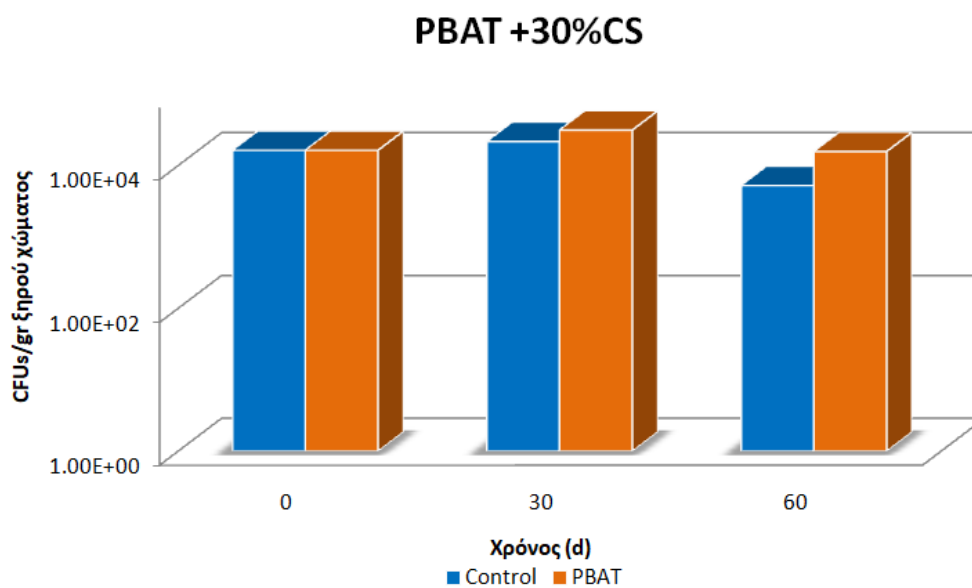


Γράφημα 31: Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

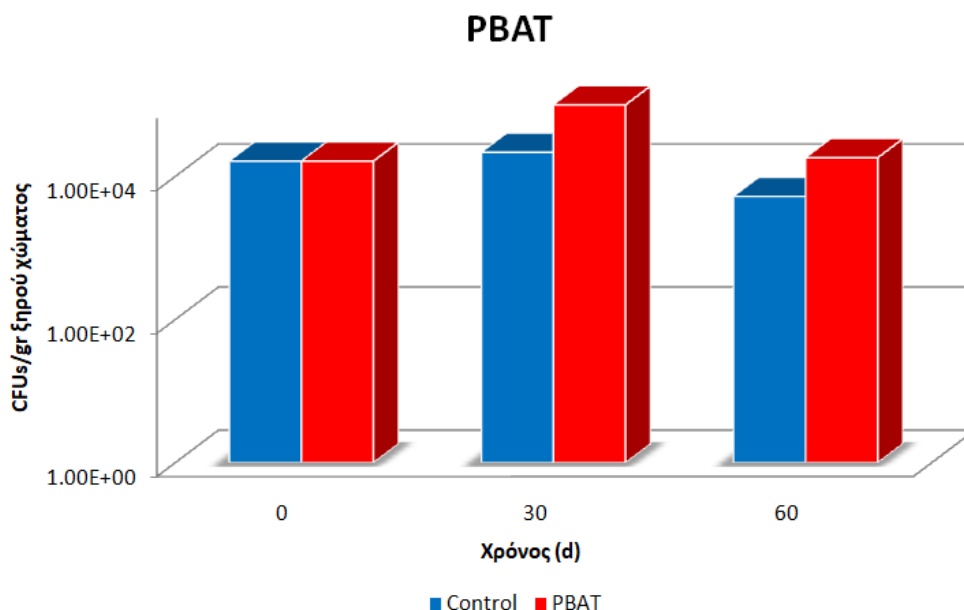
Στην περίπτωση μελέτης της οικοτοξικότητας των βιοπλαστικών σε μυκητιακό πληθυσμό του εδάφους χρησιμοποιώντας ως μέσο ελέγχου το χώμα Β τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν κατά πολύ από αυτά του χώματος Α. Αναλυτικότερα, στα παραπάνω διαγράμματα μελετάται η οικοτοξικότητα των βιοπλαστικών PLA και PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays έναντι του μυκητιακού πληθυσμού στο έδαφος. Τα αποτελέσματα για τις πρώτες 30 d υποδεικνύουν ότι το control αναπτύσσεται κανονικά από την 1^η έως την 30^η ημέρα, με σταθερή τιμή $2.17 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Παράλληλα, κατά την προσθήκη του PLA μετά το πέρας των 30 d, ο μυκητιακός πληθυσμός του εδάφους δείχνει να παραμένει σταθερός σε σχέση με το control, με τιμή ίση με $1.87 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Στις 60 d το control μειώνεται κατά μία τάξη μεγέθους στα $5.25 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος καθώς επίσης και για PLA παρατηρείται μείωση από τις 30 στις 60 d στα $6.82 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Στο ίδιο μοτίβο ακριβώς κυμαίνονται και οι συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν κατά την προσθήκη του βιοπλαστικού PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays στις 30 και 60 d, αρχικά δηλαδή με συγκέντρωση του πληθυσμού στα $2.96 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος και τελικά με μείωση στα $5.43 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Άρα τελικά, οι τιμές των συγκεντρώσεων για control και δείγματα βιοπλαστικών έχουν τις ίδιες τάξεις μεγέθους, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν υπήρξε κάποια τοξικότητα σε αυτό το διάστημα των μετρήσεων έναντι των μικροοργανισμών.



Γράφημα 32: Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PLA+30%CS (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



Γράφημα 33: Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PBAT+30%CS (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

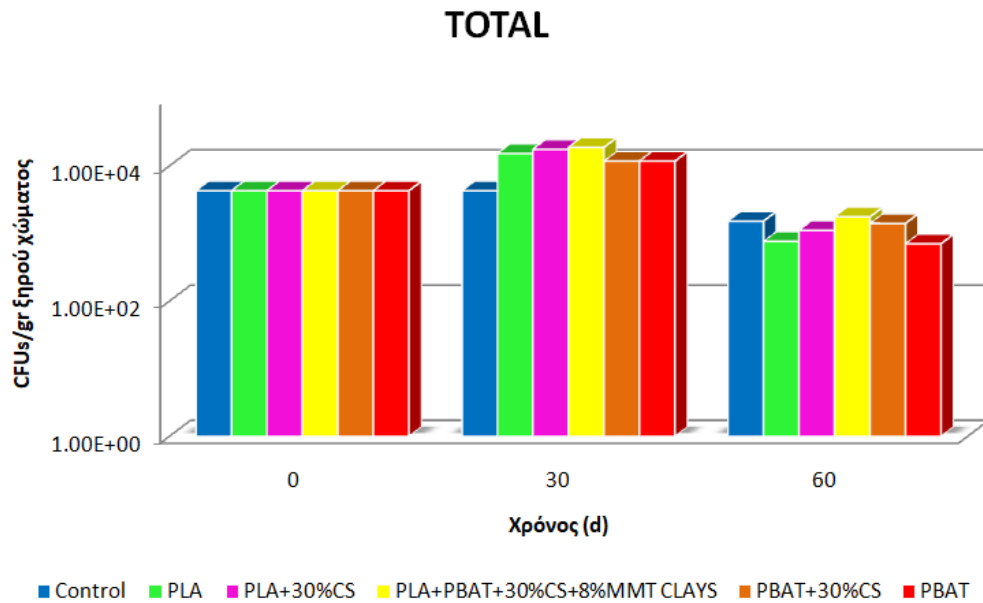


Γράφημα 34: Πληθυσμός μυκήτων σε CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d παρουσία του βιοπλαστικού PBAT (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος)
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

Όπως και πριν, τα αποτελέσματα για τις πρώτες 30 d μετά την προσθήκη των βιοπλαστικών PLA, PBAT, και CS σε συνδυασμό αλλά και ξεχωριστά δηλαδή παρουσία PLA+30%CS, PBAT+30%CS καθώς και PBAT, υποδεικνύουν ότι το control αναπτύσσεται κανονικά από την 1^η έως την 30^η d, με σταθερή τιμή $2.17 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Παράλληλα, κατά την προσθήκη του PLA+30%CS μετά το πέρας των 30 d, ο μυκητιακός πληθυσμός του εδάφους δείχνει να αυξάνεται κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με το control, με τιμή ίση με $6.70 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Στις 60 d το control μειώνεται κατά μία τάξη μεγέθους στα $5.25 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος ενώ στην ίδια τάξη μεγέθους μετρήθηκε η συγκέντρωση και για PLA+30%CS με τιμή στα $6.94 \cdot 10^3$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Στο ίδιο μοτίβο ακριβώς κυμαίνονται και οι συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν κατά την προσθήκη των βιοπλαστικών PBAT+30%CS και PBAT στις 30 και 60 d, αρχικά δηλαδή με αύξηση του πληθυσμού στα $3.14 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος και $1.01 \cdot 10^5$ CFUs/gr ξηρού χώματος αντίστοιχα και τελικά με μείωση στα $1.57 \cdot 10^4$ και $1.82 \cdot 10^4$ CFUs/gr ξηρού χώματος. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η συγκέντρωση μυκητιακού πληθυσμού για το control σε όλες τις περιπτώσεις έχει μικρότερη συγκέντρωση από ότι ο μυκητιακός πληθυσμός παρουσία των βιοπλαστικών.

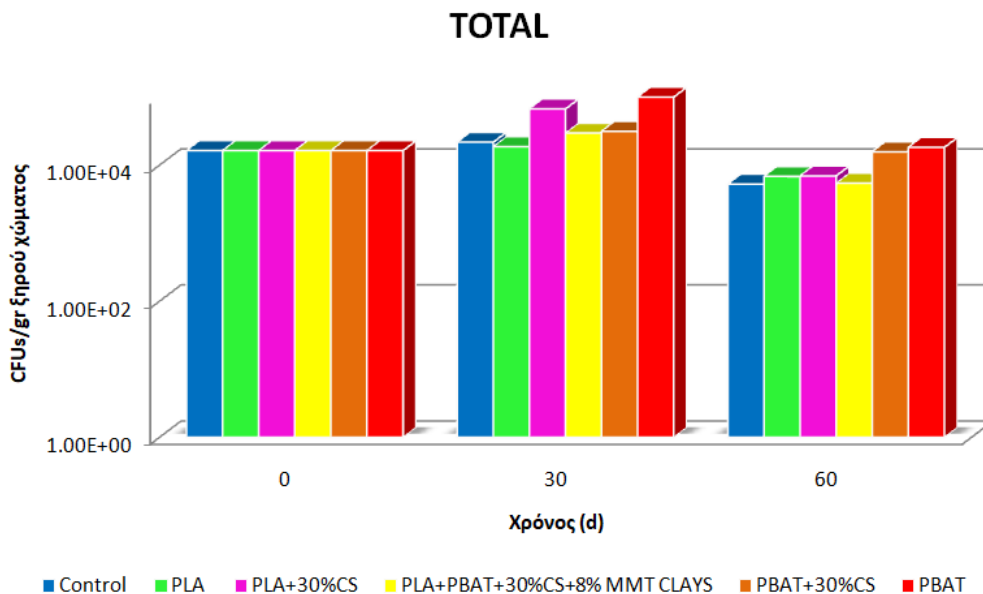
Οι μετρήσεις και με τα δύο διαφορετικά είδη εδάφους ακολουθούν ένα μοτίβο αύξησης της συγκέντρωσης των μυκήτων του εδάφους εν παρουσία βιοπλαστικών. Οι μύκητες θεωρούνται καλοί αποικοδομητές της οργανικής ύλης και έτσι, μπορούν και χρησιμοποιούν την οργανική ύλη των υλικών για την περαιτέρω ανάπτυξή τους. Το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μπορεί να παραχθεί από καλαμπόκι που περιέχει άμυλο ή άλλα γεωργικά απόβλητα και οι φλούδες καφέ είναι οργανικό υπόλειμμα. Όσον αφορά στους αργίλους μοντμοριλλονίτη είναι ένα νανοσύνθετο πολυμερικό υλικό, μη τοξικό και βιοαποικοδομήσιμο. Οι μύκητες έχουν την ικανότητα κατανάλωσης οργανικής ύλης που περιέχει γλυκόζη, άνθρακα και άλλα θρεπτικά συστατικά για την ταχύτερη και καλύτερη ανάπτυξή τους.

Χώμα Α – περιοχή Ακρωτηρίου



Γράφημα 35: Συγκεντρωτικό διάγραμμα επίδρασης όλων των δειγμάτων (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος) σε πληθυσμό μυκήτων CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

Χώμα Β – περιοχή Αγιάς



Γράφημα 36: Συγκεντρωτικό διάγραμμα επίδρασης όλων των δειγμάτων (0.02gr βιοπλαστικού/ gr χώματος) σε πληθυσμό μυκήτων CFUs/gr ξηρού χώματος σε διάστημα 0 έως 60 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

Συνολικά, συγκρίνοντας τα τελικά αποτελέσματα για τα δύο είδη χώματος, δηλαδή για το χώμα Α (περιοχή Ακρωτηρίου) και για το χώμα Β (περιοχή Αγιάς), παρατηρούνται μικρές διαφορές στις συγκεντρώσεις του μυκητιακού πληθυσμού στο διάστημα των 60 d. Κανένα από τα δείγματα βιοπλαστικού δεν εμφανίζει τοξικότητα έναντι των βακτηρίων του εδάφους σε σχέση με το control. Αντιθέτως, η συγκέντρωση των μυκήτων στο έδαφος παρουσία των βιοπλαστικών δείχνει να αυξάνεται και οι τιμές κυμαίνονται περίπου στις ίδιες τάξεις μεγέθους και για τα δύο εδάφη. Για τα δύο διαστήματα που ελήφθησαν οι δειγματοληψίες παρουσιάζεται αύξηση στις 30 d και μετέπειτα μείωση στις 60 d. Ωστόσο, πάντα σε σύγκριση με το control και στα δύο είδη χώματος οι συγκεντρώσεις του μυκητιακού πληθυσμού είτε είναι στην ίδια τάξη μεγέθους ή μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν σημειώθηκε τοξικότητα έναντι των μικροοργανισμών.

Τα περισσότερα βιοπλαστικά λόγω της περιεκτικότητάς τους σε ασταθή άνθρακα μπορεί να είναι πιο αντιδραστικά και βιοδιαθέσιμα σε σύγκριση με τα παραδοσιακά πλαστικά (Fontanazza et al., 2021; Ju et al., 2021b; Qi et al., 2020c; Rüthi et al., 2020; Wang et al., 2021., 2020). Ο αποικισμός από μικροοργανισμούς όπως βακτήρια και μύκητες στην επιφάνεια των βιοπλαστικών που είναι θαμμένα στο έδαφος αναφέρεται συχνά στη βιβλιογραφία (Koitabashi et al., 2012; Muroi et al., 2016; Prudnikova et al., 2021; Sang et al., 2002 Šerá et al., 2016· Zhou et al., 2021). Για παράδειγμα, στη μελέτη των Muroi et al., (2016), η επιφάνεια PBAT είχε μεγαλύτερη αφθονία βακτηρίων και μυκήτων σε σύγκριση με το χώμα και υψηλότερη μικροβιακή δραστηριότητα και βιομάζα στα hotspots, δηλαδή στη διεπιφάνεια εδάφους και πλαστικού (Muroi et al., 2016).

Ομοίως, μια άλλη μελέτη βρήκε ότι λόγω των βιοπλαστικών PLA και PHB + PLA μετά από 70 d σε εδαφικό δείγμα ο πληθυσμός των μυκήτων αυξήθηκε (Rychter et al., 2006).

Επιπροσθέτως, μελέτες μακροσκοπικής και μικροσκοπικής πλαστικής βιοαποδόμησης από μύκητες έχουν δείξει ότι οι μύκητες είναι σε θέση να χρησιμοποιούν πολυμερή ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας για τη δική τους ανάπτυξη (Sánchez, 2019). Οι μύκητες έχουν την ικανότητα να αποτοξινώνουν τους ρύπους και να εισβάλλουν σε υποστρώματα χρησιμοποιώντας ένζυμα που δεν είναι ειδικά για το υπόστρωμα. Οι μύκητες παράγουν υδρόφοβες πρωτεΐνες που μπορούν να προσκολλήσουν το μυκήλιο σε υδρόφοβα υποστρώματα και το μυκήλιο έχει την ικανότητα να διεισδύει σε τρισιδιάστατα υποστρώματα (Zhang et al., 2020b).

Οι μύκητες έχουν μεγαλύτερο πλεονέκτημα έναντι των βακτηρίων που μπορούν να αποικοδομήσουν μόνο συγκεκριμένα μικροπλαστικά λόγω της εξειδίκευσης ενός μόνο ενζύμου που εκκρίνεται από βακτήρια που μπορεί να δράσει σε μη ειδικά υποστρώματα, ξεπερνώντας τους περιορισμούς που υπάρχουν μόνο για τη βακτηριακή αποδόμηση. Υπάρχει μεγάλη δυνατότητα χρήσης μυκήτων για την αποδόμηση πλαστικών και μικροπλαστικών (Zhang et al., 2020b). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει την αύξηση του μυκητιακού πληθυσμού στα εδαφικά δείγματα, συμπίπτοντας έτσι με τα στοιχεία της βιβλιογραφίας.

Επίδραση των βιοπλαστικών σε αβιοτικό μέρος των χερσαίων οικοσυστημάτων

Γενικά, η εμφάνιση βιοπλαστικών στο χερσαίο περιβάλλον αλλάζει τη χημική σύνθεση του εδάφους και οδηγεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του εδάφους και των σωματιδίων βιοπλαστικών καθώς και άλλων χημικών ουσιών που μολύνουν το εδαφικό διαμέρισμα. Τα βιοπλαστικά σωματίδια εμφανίζουν εξαιρετικές διαφορές αφού είναι υλικά που αποτελούνται από πολλά διαφορετικά πολυμερή σε διαφορετικές καιρικές συνθήκες και από διαφορετικά σχήματα και μεγέθη (Browne, 2015; GESAMP, 2015; Koelmans et al., 2019). Οι ίνες θεωρούνται ως η κυρίαρχη μικροπλαστική μορφή (έως περίπου το 92%) και ακολουθούν τα θραύσματα (περίπου το 4.1%) (Zhang and Liu, 2018; Guo et al., 2020).

Τα πλαστικά, ως γνωστόν, είναι βασικές ενώσεις άνθρακα και υπάρχει μια υπόθεση ότι σε μακροπρόθεσμη προοπτική ο άνθρακας από πολυμερή μπορεί να γίνει μια σχετική δεξαμενή άνθρακα στα εδάφη συμβάλλοντας στην επιλεκτική πίεση για τα μικρόβια του εδάφους (Rillig et al., 2019). Εκτός από άτομα άνθρακα, ορισμένοι τύποι βιοπλαστικών περιέχουν στοιχεία όπως άζωτο (πολυακρυλονιτρίλιο) ή φθόριο (πολυτετραφθοροαιθυλένιο) που μπορεί να περιλαμβάνονται στον βιογεωχημικό κύκλο (de Souza Machado et al., 2019). Παρά τις άμεσες αλλαγές της χημικής σύστασης του εδάφους που προκαλούνται από την παρουσία πλαστικών και βιοπλαστικών, υπάρχουν και έμμεσες. Οι Liu et al. (2017) διαπίστωσε ότι το υψηλότερο επίπεδο (28% w/w) μικροσωματιδίων PVC αύξησε σημαντικά τις περιεκτικότητες σε θρεπτικά συστατικά (άνθρακας, άζωτο και φώσφορο) της διαλυμένης οργανικής ύλης. Επιπλέον, διευκόλυνε τη συσσώρευση υψηλού μοριακού βάρους με χουμικά υλικά και φουλβικά οξέα (Liu et al., 2017). Η συσσώρευση φουλβικών οξέων μπορεί να ευνοήσει τους μετασχηματισμούς, τη βιοδιαθεσιμότητα και την κινητικότητα των ρύπων στο έδαφος (Liu et al., 2017; Li et al., 2018a; Guo et al., 2020).

Τα βιοπλαστικά που είναι ευαίσθητα στη μικροβιολογική αποσύνθεση μπορεί να συμβάλλουν στη μείωση της περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά στο έδαφος (Rillig et al., 2019). Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται άζωτο, φώσφορο και άλλα στοιχεία για να προχωρήσουν σε διαδικασίες βιοαποδόμησης και ως αποτέλεσμα αυτών των διεργασιών μπορεί να εμφανιστεί ανεπάρκεια αυτών των ουσιών (Liwerska-Bizukojc, 2021). Οι αλλαγές της χημικής σύστασης του εδάφους που προκαλούνται από την παρουσία (βίο)πλαστικών σωματιδίων επηρεάζουν διάφορες παραμέτρους και διεργασίες του εδάφους όπως, για παράδειγμα, χώρο πόρων, τριχοειδές, διεργασίες διαβροχής, πυκνότητα, υγρασία του εδάφους και εξατμισοδιαπνοή (de Souza Machado et al., 2018; Guo et al., 2020). Η σύνδεση προκύπτει από το γεγονός ότι τα μικρο και νανοπλαστικά σωματίδια μπορούν να ενσωματωθούν χαλαρά ή σφιχτά στη μήτρα του εδάφους (Ng et al., 2018; Guo et al., 2020).

Αποδείχθηκε επίσης, ότι το σχήμα των βιοπλαστικών πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Οι ίνες, ιδιαίτερα οι μικροΐνες επηρεάζουν πιο έντονα τις φυσικές ιδιότητες του εδάφους σε σχέση με τα pellets (χάντρες) (de Souza Machado et al., 2018; Rillig et al., 2019). Zhang et al. (2019). Η παρουσία βιοπλαστικών στο έδαφος επηρέασε τον κορεσμό του νερού και τους μετασχηματισμούς στο έδαφος, και τέλος στον κύκλο του νερού στο χερσαίο διαμέρισμα.

Οι Wan et al., (2019) παρατήρησαν ότι τα πλαστικά αύξησαν τον ρυθμό εξάτμισης του νερού του εδάφους δημιουργώντας κανάλια για την κίνηση του νερού (Liowska-Bizukojc, 2021). Όσον αφορά στην επίδραση των βιοπλαστικών στον κύκλο του νερού στο χειρσαίο διαμέρισμα, θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη ο ρόλος των φυτών. Τα πλαστικά αλληλεπιδρούν με τα φυτά είτε για να αυξήσουν, είτε για να μειώσουν την εξατμισοδιαπνοή (Liowska-Bizukojc, 2021).

Βιοδιασπώμενα πλαστικά όπως το PLA ή υλικά με βάση το άμυλο καλαμποκιού δοκιμάστηκαν επίσης ως προς την επίδρασή τους στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Αυτές οι μελέτες επικεντρώθηκαν κυρίως στη μικροβιακή νιτροποίηση του εδάφους. Οι Satti et al. (2018) παρατήρησαν ότι το αμμώνιο εξαντλήθηκε με τον ίδιο ρυθμό στις δοκιμές νιτροποίησης, ανεξάρτητα από την προσθήκη PLA στο έδαφος (8 g PLA έως 400 g χώματος). Οι ρυθμοί σχηματισμού νιτρικών αλάτων ήταν επίσης παρόμοιοι σε όλα τα εδάφη που δοκιμάστηκαν (με και χωρίς PLA) (Satti et al., 2018). Η ποσότητα του νεοσχηματισμένου N-NO₃ ήταν αρκετά συσχετιζόμενη με την ποσότητα του N-NH₃ που προστέθηκε αρχικά, γεγονός που έδειξε σχεδόν πλήρη ποσοτική μετατροπή του αμμωνίου σε νιτρικό (Satti et al., 2018). Έτσι, εξήχθη το συμπέρασμα ότι η βιοαποδόμηση του PLA δεν επηρέασε τη μικροβιακή νιτροποίηση του εδάφους (Satti et al., 2018).

Τέλος, η χύδην πυκνότητα του εδάφους ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του εδάφους και το βαθμό συμπίεσης (USDA, 2013). Τα αμμώδη εδάφη έχουν συνήθως μεγαλύτερη πυκνότητα (1.3–1.7 gr cm⁻³) από τη λεπτή ιλύ και την άργιλο (1.1–1.6 gr cm⁻³) επειδή έχουν μεγαλύτερα, αλλά λιγότερα, διαστήματα πόρων. Τα εδάφη πλούσια σε οργανικές ενώσεις μπορεί να έχουν πυκνότητες μικρότερες από 1 gr/cm³ (McKenzie et al., 2002; USDA, 2013). Ταυτόχρονα, η χύδην πυκνότητα των βιοπλαστικών ποικίλλει ευρέως από 0.140 έως 2.3 gr cm⁻³ (Omnexus, 2019). Η πυκνότητα του PLA είναι περίπου 1.24 gr cm⁻³ (Yang et al., 2015; Abdullah et al., 2019). Η πυκνότητα των βιοπλαστικών με βάση το άμυλο που παράγονται συνήθως με την προσθήκη PLA κυμαίνεται από 1.2 έως 1.3 gr cm⁻³ (Abdullah et al., 2019). Έτσι, η επίδραση των βιοπλαστικών στην πυκνότητα του εδάφους εξαρτάται από τους τύπους των πλαστικών και τη συγκέντρωσή τους καθώς και από τον τύπο του εδάφους. Οι Zhang et al. (2019) ανέφερε ότι οι πολυεστερικές μικροΐνες αύξησαν σημαντικά τον όγκο των πόρων >30 μm και μείωσαν τον όγκο των πόρων <30 μm. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη χύδην πυκνότητα του εδάφους παρουσία πλαστικών υλικών. Μερικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο πλαίσιο της επίδρασης των βιοπλαστικών μέχρι στιγμής αποκάλυψαν ότι η παρουσία πλαστικών που προέρχονται από πετρέλαιο στο έδαφος είτε μείωσε είτε δεν μετέβαλε τη χύδην πυκνότητα του εδάφους (de Souza Machado et al., 2018, de Souza Machado et al., 2019· Zhang et al., 2019). Οι Zhang et al. (2019) διαπίστωσαν ότι δεν υπήρχαν ανιχνεύσιμες αλλαγές στη χύδην πυκνότητα του εδάφους που περιέχει πολυεστερικές μικροΐνες σε συγκεντρώσεις από 0.01 έως 0.3% w/w.

Επίδραση των βιοπλαστικών σε μικροοργανισμούς του εδάφους

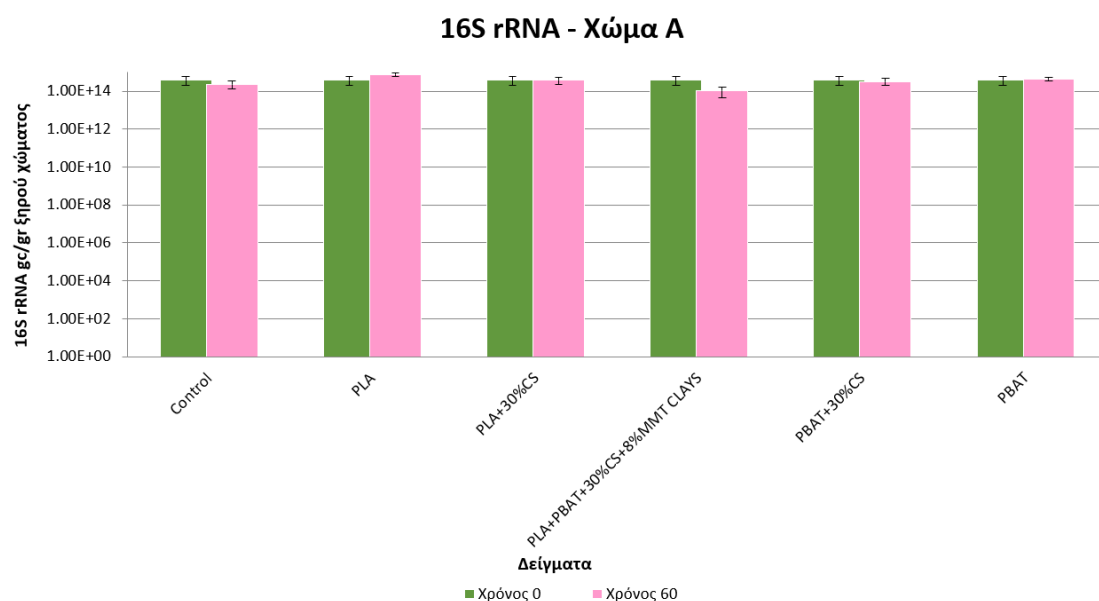
Η βιοχημική δραστηριότητα του εδάφους σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό και τη δραστηριότητα της μικροβιακής χλωρίδας του εδάφους. Ο ασταθής άνθρακας στα βιοπλαστικά επηρεάζει τις μικροβιακές κοινότητες και τις δραστηριότητες του εδάφους καθώς βιοδιασπώνται φυσικά από τους μικροοργανισμούς (Mazzon et al., 2022). Ανάλογα με το ρυθμό βιοαποδόμησης, αυτή η αποσύνθεση πλούσιων σε άνθρακα και φτωχών σε θρεπτικά συστατικά υπολειμμάτων, όπως τα βιοπλαστικά, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ακινητοποίηση του εδαφικού αζώτου (N) και φωσφόρου (P) και να επηρεάσει περαιτέρω τη μικροχλωρίδα του εδάφους και τις δραστηριότητες τους (Zhou et al., 2021). Ο ρυθμός βιοαποδόμησης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του βιοπλαστικού (Rüthi et al., 2020).

Ακόμη, οι μικροοργανισμοί του εδάφους επηρεάζονται από μια σύνθετη αλληλεπίδραση πολλαπλών παραγόντων, όπως η οργανική ύλη, ο τύπος του εδάφους, το pH, η υγρασία του εδάφους, το πορώδες, τα φυτά, η θερμοκρασία και τα πρόσθετα. Τα βιοπλαστικά υπολείμματα στο έδαφος μπορούν περαιτέρω να οδηγήσουν σε μικροβιακές αλλαγές του εδάφους αλλάζοντας τις φυσικές και χημικές ιδιότητές του. Τα βιοπλαστικά που λειτουργούν ως εναλλακτική πηγή τροφής και μικροβιακού άνθρακα επηρεάζουν το μικροβίωμα του εδάφους. Τα περισσότερα βιοπλαστικά λόγω της περιεκτικότητάς τους σε ασταθή άνθρακα μπορεί να είναι πιο αντιδραστικά και βιοδιαθέσιμα σε σύγκριση με τα παραδοσιακά πλαστικά (Fontanazza et al., 2021; Ju et al., 2021b; Qi et al., 2020c; Rüthi et al., 2020; Wang et al., 2021., 2020).

4.3.2. Έλεγχος οικοτοξικότητας με ποσοτικοποίηση βακτηρίων με μοριακή μεθοδολογία (Real Time- qPCR)

Η διεξαγωγή της Real – Time PCR πραγματοποιήθηκε κυρίως για λόγους ελέγχου και επιβεβαίωσης της οικοτοξικότητας των βιοπλαστικών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς η μοριακή ποσοτικοποίηση αποτελεί ακριβέστατη και πιο αποτελεσματική μέθοδο σε σχέση με την μέθοδο ποσοτικοποίησης με καλλιέργεια βακτηρίων. Επίσης, πολλά βακτήρια δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο και για αυτό τον λόγο δεν μπορούν να μελετηθούν οι πιθανές επιπτώσεις των βιοπλαστικών σε αυτά. Με τη Real – Time PCR ποσοτικοποιήθηκαν τα βακτήρια και των δύο ειδών εδάφους για αρχικό και τελικό χρόνο, δηλαδή χρόνο 0 και 60 d και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στα παρακάτω διαγράμματα:

Χώμα Α – περιοχή Ακρωτηρίου

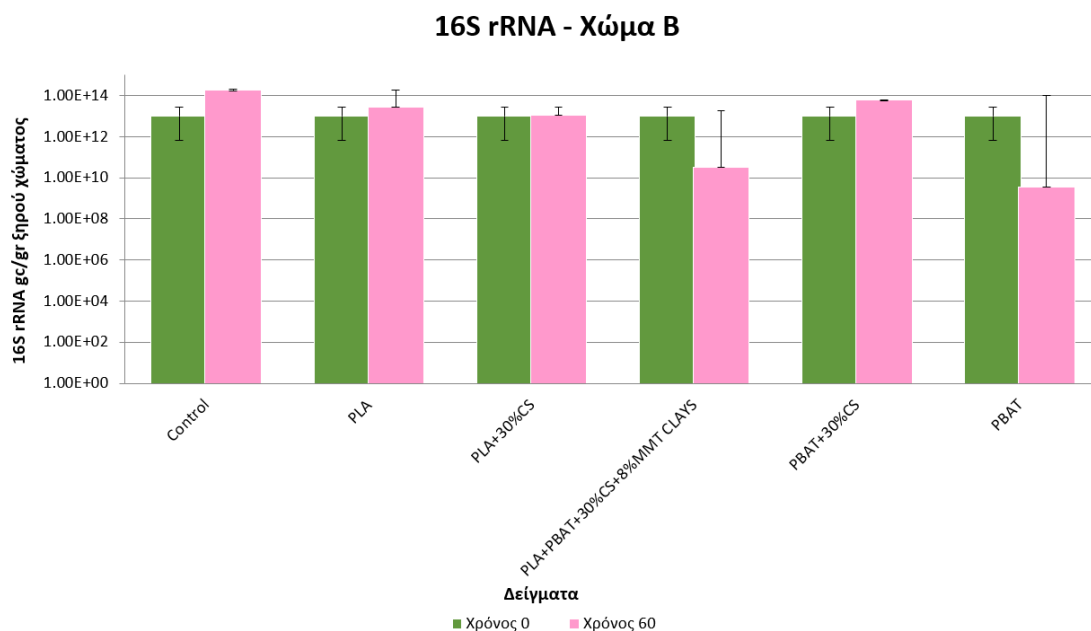


Γράφημα 37: Συγκέντρωση 16S rRNA (gene copies - gc/gr ξηρού χώματος) από δείγμα χώματος με τα βιοπλαστικά σε διάστημα 0 έως 60 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα Α

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα για την περίπτωση του εδαφικού δείγματος από το χώμα Α, παρατηρείται ότι μετά το πέρας των 60 d και στο control καθώς επίσης και σε όλα τα δείγματα η συγκέντρωση του γονιδίου 16S rRNA (gene copies – gc/gr ξηρού χώματος) παραμένει σταθερή. Αναλυτικότερα, για τον χρόνο 0 d η συγκέντρωση ισούται με $3.91 \cdot 10^{14}$ gc/gr ξηρού χώματος. Μετά το πέρας των 60 d η συγκέντρωση του control είναι ίση με $2.32 \cdot 10^{14}$ gc/gr ξηρού χώματος και για τα βιοπλαστικά PLA και PLA+30%CS το 16S ριβοσωμικό RNA βρέθηκε ίσο με $7.38 \cdot 10^{14}$ και $4.02 \cdot 10^{14}$ gc/gr ξηρού χώματος αντίστοιχα. Στο ίδιο μοτίβο τιμών κυμαίνονται και οι συγκεντρώσεις του 16S rRNA για τα υπόλοιπα δείγματα, και πιο συγκεκριμένα για PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays $1.04 \cdot 10^{14}$, για PBAT+30%CS $3.05 \cdot 10^{14}$ και για PBAT $4.17 \cdot 10^{14}$ gc/gr ξηρού χώματος.

Συμπερασματικά, τα βακτήρια που υπήρχαν στο συγκεκριμένο είδος χώματος δεν εμφάνισαν καμία ευαισθησία έναντι των βιοπλαστικών, τουλάχιστον όσον αφορά τη συγκεκριμένη ποσότητα βιοπλαστικού που προστέθηκε και το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα των δύο μηνών που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες.

Χώμα Β – περιοχή Αγιάς



Γράφημα 38: Συγκέντρωση 16S rRNA (gene copies - gc/gr ξηρού χώματος) από δείγμα χώματος με τα βιοπλαστικά σε διάστημα 0 έως 60 d

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα Β

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα για την περίπτωση του εδαφικού δείγματος από το χώμα Β, παρατηρείται ότι μετά το πέρας των 60 d και στο control καθώς επίσης και σε όλα τα δείγματα η συγκέντρωση του 16S rRNA παρουσιάζει διακυμάνσεις. Αναλυτικότερα, για τον χρόνο 0 d η συγκέντρωση ισούται με $1.04 \cdot 10^{13}$ gc/gr ξηρού χώματος. Μετά το πέρας των 60 d η συγκέντρωση του control είναι ίση με $1.81 \cdot 10^{14}$ gc/gr ξηρού χώματος και για τα βιοπλαστικά PLA και PLA+30%CS το 16S ριβοσωμικό RNA βρέθηκε ίσο με $2.75 \cdot 10^{13}$ και $1.13 \cdot 10^{13}$ gc/gr ξηρού χώματος αντίστοιχα, δηλαδή σημειώθηκε μείωση κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με το control. Μεγαλύτερη μείωση εμφάνισαν οι συγκεντρώσεις του 16S rRNA για τα υπόλοιπα δείγματα, και πιο συγκεκριμένα για PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays $3.19 \cdot 10^{10}$, για PBAT+30%CS $6.10 \cdot 10^{13}$ και για PBAT $3.46 \cdot 10^9$ gc/gr ξηρού χώματος.

Συμπερασματικά, τα βακτήρια που υπήρχαν στο συγκεκριμένο είδος χώματος, δηλαδή αυτό που συλλέχθηκε από την περιοχή της Αγιάς, εμφάνισαν ευαισθησία έναντι των βιοπλαστικών PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays και PBAT, τουλάχιστον όσον αφορά τη συγκεκριμένη ποσότητα βιοπλαστικού που προστέθηκε και το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα των δύο μηνών που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε έλλειψη θρεπτικών συστατικών στο έδαφος με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση ανάπτυξης των βακτηρίων.

Πιο συγκεκριμένα, ο ασταθής άνθρακας στα βιοπλαστικά επηρεάζει τις μικροβιακές κοινότητες και τις δραστηριότητες του εδάφους καθώς βιοδιασπώνται φυσικά από τους μικροοργανισμούς (Mazzon et al., 2022). Ανάλογα με το ρυθμό βιοαποδόμησης, αυτή η αποσύνθεση υπολειμμάτων πλούσιων σε άνθρακα και φτωχών σε θρεπτικά συστατικά, όπως τα βιοπλαστικά, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ακινητοποίηση του αζώτου (N) και φωσφόρου (P) και να επηρεάσει περαιτέρω τη μικροχλωρίδα του εδάφους και τις δραστηριότητές της (Zhou et al., 2021). Ο ρυθμός βιοαποδόμησης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του βιοπλαστικού (Rüthi et al., 2020). Για παράδειγμα, τα βιοπλαστικά με βάση το άμυλο μπορούν να βιοδιασπαστούν γρήγορα με μια παροδική αύξηση της μικροβιακής δραστηριότητας και αφθονίας που ακολουθείται από προοδευτική μείωση καθώς εξαντλείται το διαθέσιμο υπόστρωμα άνθρακα (Meng et al., 2019).

Τα αποτελέσματα για το χώμα Β (περιοχή Αγιάς) συμπίπτουν λοιπόν με δεδομένα της βιβλιογραφίας. Όσον αφορά το χώμα Α (περιοχή Ακρωτηρίου) δεν εμφανίστηκε όπως προαναφέρθηκε κάποια μείωση στον βακτηριακό πληθυσμό γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές παραμέτρους που παρουσιάζουν τα δύο εδαφικά δείγματα, όπως πυκνότητα εδάφους, υγρασία, θρεπτικά συστατικά και οργανικές ενώσεις.

Κεφάλαιο 5^ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι γνωστό ότι στις μέρες μας τα πλαστικά αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της καθημερινότητας του ανθρώπου, καθώς προσφέρουν πολλά οφέλη στην κοινωνία και εκσυγχρονίζουν τη καθημερινή ζωή μεταβάλλοντας σημαντικά την ποιότητας ζωής. Χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες, στις κατασκευές, σε συσκευασίες φαγητού αλλά και σε πολλά καθημερινά προϊόντα χρήσης, Ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή πλαστικών που προέρχονται από την πετροχημεία οδήγησε στην ανάγκη παραγωγής των βιοπλαστικών, βιοβασισμένων ή βιοαποικοδομήσιμων με σκοπό την προστασία του περιβάλλοντος της χλωρίδας, της πανίδας αλλά κατ' επέκταση και του άνθρωπου. Στο χερσαίο περιβάλλον, τα βιοπλαστικά αποικίζονται από διάφορα μικροβιακά είδη και έχει αποδειχθεί επιστημονικά πως οι μικροοργανισμοί του εδάφους μπορούν να βιοαποδομήσουν πολυμερή χρησιμοποιώντας ως μοναδική πηγή άνθρακα τα ίδια τα βιοπλαστικά. Ωστόσο, είναι ένα σχετικά καινούργιο ερευνητικό πεδίο καθώς οι κριτικές που έχουν δημοσιευτεί μέχρι στιγμής δεν περιελάμβαναν κατά κύριο λόγο βιοπλαστικά και δεν έκαναν διαφοροποίηση μεταξύ πλαστικών που προέρχονται από πετρέλαιο και βιοπλαστικών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η οικοτοξικότητα των βιοπλαστικών PLA και PBAT, που αποτελούν δύο από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα βιοπλαστικά, σε συνδυασμό με CS και MMT Clays σε βιοδείκτες, όπως το βακτήριο *V. fischeri* και ο μύκητας *P. Rubrum*. Παράλληλα, ελέγχθηκε η επίδραση των βιοπλαστικών σε μικροοργανισμούς εδάφους (βακτήρια και μύκητες), πραγματοποιώντας πειράματα με δύο είδη χώματος.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα, εξήχθησαν τα εξής αποτελέσματα:

1. Όσον αφορά, στον έλεγχο τοξικότητας των βιοπλαστικών έναντι του *V. fischeri* σε υδατικό διάλυμα μετά την πάροδο των 30 d, δεν παρατηρήθηκε κάποια μείωση του βακτηριακού πληθυσμού καθώς οι τιμές σε σύγκριση με το control παρέμεναν σχεδόν σταθερές ή εμφανίζαν μικρές διαφορές οι οποίες όμως δεν υποδηλώνουν κάποια τοξικότητα έναντι του βακτηρίου. Το *V. fischeri* δεν εμφάνισε κάποια ευαισθησία στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες και με τη χρήση των συγκεκριμένων δειγμάτων βιοπλαστικών.
2. Για τον έλεγχο τοξικότητας των βιοπλαστικών στον μύκητα *P. Rubrum* σε υδατικό διάλυμα που διήρκεσε 14 d, αντιστοίχως δεν σημειώθηκε ευαισθησία του μικροοργανισμού. Τα υλικά από τα οποία αποτελούνται τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν δεν εμφανίζουν κάποια τοξικότητα έναντι του μύκητα, αλλά αντιθέτως υποδεικνύεται μια μικρή αύξηση του πληθυσμού. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο *P. rubrum* μπορεί να χρησιμοποιεί το δείγμα βιοπλαστικού ως πηγή άνθρακα, συμβάλλοντας έτσι στην πιο γρήγορη ανάπτυξή του.
3. Στα αποτελέσματα που αφορούσαν το βακτηριακό πληθυσμό του εδάφους για τα δύο είδη χώματος, δηλαδή για το χώμα Α (περιοχή Ακρωτηρίου) και για το χώμα Β (περιοχή Αγιάς), δεν παρατηρείται εμφανής διαφορά στις συγκεντρώσεις στο διάστημα των 60 d. Κανένα από τα δείγματα βιοπλαστικού δεν εμφανίζει τοξικότητα έναντι των βακτηρίων του εδάφους σε σχέση με το control και οι τιμές κυμαίνονται στις ίδιες τάξεις μεγέθους και για τα δύο διαστήματα που ελήφθησαν οι δειγματοληψίες. Τα βιοπλαστικά είναι εγγενώς πολύπλοκα στη σύστασή τους και τα βακτήρια δεν έχουν μεγάλες αποδόσεις βιοαποδόμησης επομένως, διεξάγεται το συμπέρασμα ότι η αποδόμηση μόνο από βακτήρια έχει μεγάλους περιορισμούς, χωρίς όμως αυτά να είναι τοξικά στους μικροοργανισμούς.
4. Στα τελικά αποτελέσματα για τα δύο είδη χώματος, δηλαδή για το χώμα Α (περιοχή Ακρωτηρίου) και για το χώμα Β (περιοχή Αγιάς), παρατηρούνται μικρές διαφορές στις

συγκεντρώσεις του μυκητιακού πληθυσμού στο διάστημα των 60 d. Κανένα από τα δείγματα βιοπλαστικού δεν εμφανίζει τοξικότητα έναντι των μυκήτων του εδάφους σε σχέση με το control, αλλά αντιθέτως η συγκέντρωση των μυκήτων στο έδαφος παρουσία των βιοπλαστικών δείχνει να αυξάνεται και οι τιμές κυμαίνονται περίπου στις ίδιες τάξεις μεγέθους και για τα δύο εδάφη. Οι μύκητες έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν ένζυμα αλλά και τον άνθρακα των πολυμερών για ανάπτυξη και για αυτό το λόγο εμφανίζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον για την αποδόμηση των βιοπλαστικών.

5. Με βάση την ποσοτικοποίηση του γονιδίου 16S rRNA στα δείγματα εδάφους κατόπιν προσθήκης των βιοπλαστικών, φαίνεται ότι τα βακτήρια που υπήρχαν στο εδαφικό δείγμα που συλλέχθηκε από την περιοχή της Αγιάς, εμφάνισαν ευαισθησία έναντι των βιοπλαστικών PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays και PBAT, υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες (συγκέντρωση βιοπλαστικού στο δείγμα χώματος & χρονικό διάστημα διεξαγωγής του ελέγχου). Ωστόσο, η ευαισθησία που παρατηρήθηκε στον πληθυσμό των βακτηρίων ενδέχεται να οφείλεται και σε έλλειψη θρεπτικών συστατικών στο έδαφος με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση ανάπτυξής τους. Όσον αφορά στο εδαφικό δείγμα από την περιοχή Ακρωτηρίου δεν εμφανίστηκε όπως προαναφέρθηκε κάποια μείωση στον βακτηριακό πληθυσμό γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές παραμέτρους που παρουσιάζουν τα δύο εδαφικά δείγματα, όπως πυκνότητα εδάφους, υγρασία, θρεπτικά συστατικά και οργανικές ενώσεις.

Συνοψίζοντας, το PLA και το PBAT είναι βιοπλαστικά που δεν προκαλούν τοξικότητα στο περιβάλλον και στους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Η αύξηση των μυκήτων οφείλεται στο ότι μπορούν να βιοαποδομήσουν τα βιοπλαστικά, σε χερσαίο περιβάλλον, καθώς αποτελούν πηγή άνθρακα γι' αυτούς. Ωστόσο η βιοαποδόμηση των πλαστικών στο φυσικό περιβάλλον είναι μια πολύ αργή διαδικασία και σίγουρα το χρονικό διάστημα δεν είναι αρκετό για να διεξαχθούν περαιτέρω συμπεράσματα.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Το θέμα της ρύπανσης από τα πλαστικά που απορρίπτονται καθημερινά σε χερσαία και θαλάσσια περιβάλλοντα είναι εξέχουσας σημασίας για την χλωρίδα και την πανίδα που κατοικούν σε αυτά. Αποτελεί διασυννοριακό πρόβλημα που μας αφορά όλους ανεξαιρέτως. Η αντικατάσταση των συμβατικών πλαστικών με τα βιοπλαστικά αποτελεί μία λύση πιο φιλική προς το περιβάλλον, ωστόσο οι μελέτες που αφορούν στην τοξικότητα τους ή την επίδρασή τους είτε στις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους είτε στους ζωντανούς οργανισμούς του εδάφους είναι αρκετά περιορισμένες. Λαμβάνοντας υπόψη την αυξανόμενη συμβολή των βιοαποικοδομήσιμων πλαστικών στην παγκόσμια αγορά πλαστικών, είναι ανάγκη να συμπεριληφθούν στην ανασκόπηση των δεδομένων της βιβλιογραφίας σχετικά με τους οικολογικούς κινδύνους των πλαστικών στο περιβάλλον. Θα εξεταστούν έτσι, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιοπλαστικών και περιβάλλοντος και κατά συνέπεια θα εντοπισθούν τα ερευνητικά κενά και ίσως να αντιμετωπιστούν όσον το δυνατόν γρηγορότερα και με αποτελεσματικούς τρόπους οι δυσμενείς επιδράσεις που προκύπτουν από τη χρήση τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Aversa, C., Barletta, M., Cappiello, G. and Gisario, A. (2022). Compatibilization strategies and analysis of morphological features of Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) (PBAT)/Poly(Lactic Acid) PLA blends: a-state-of-artreview. *European Polymer Journal* doi:10.1016/j.eurpolymj.2022.111304.
- Avidano, L., Gamalero, E., Cossa, G.P. and Carraro, E. (2005). Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. *Applied Soil Ecology*, 30(1), pp.21–33. doi:10.1016/j.apsoil.2005.01.003.
- Bátori, V., Åkesson, D., Zamani, A., Taherzadeh, M.J. and Sárvári Horváth, I. (2018). Anaerobic degradation of bioplastics: A review. *Waste Management*, 80, pp.406–413. doi:10.1016/j.wasman.2018.09
- Bhagwat, G., Gray, K., Wilson, S.P., Muniyasamy, S., Vincent, S.G.T., Bush, R. and Palanisami, T. (2020). Benchmarking Bioplastics: A Natural Step Towards a Sustainable Future. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(12), pp.3055–3075. doi:10.1007/s10924-020-01830-8.
- Biological Markers in Environmental Health Research. (1987). *Environmental Health Perspectives*, 74, p.3. doi:10.2307/3430428.
- Bishop, G., Styles, D. and Lens, P.N.L. (2021). Environmental performance comparison of bioplastics and petrochemical plastics: A review of life cycle assessment (LCA) methodological decisions. *Resources, Conservation and Recycling*, 168, p.105451. doi:10.1016/j.resconrec.2021.105451.
- Chah, C.N., Banerjee, A., Gadi, V.K., Sekharan, S. and Katiyar, V. (2022a). A systematic review on bioplastic-soil interaction: Exploring the effects of residual bioplastics on the soil geoenvironment. *Science of The Total Environment*, 851, p.158311. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.158311.
- Chah, C.N., Banerjee, A., Gadi, V.K., Sekharan, S. and Katiyar, V. (2022b). A systematic review on bioplastic-soil interaction: Exploring the effects of residual bioplastics on the soil geoenvironment. *Science of The Total Environment*, 851, p.158311. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.158311.
- Chah, C.N., Banerjee, A., Gadi, V.K., Sekharan, S. and Katiyar, V. (2022c). A systematic review on bioplastic-soil interaction: Exploring the effects of residual bioplastics on the soil geoenvironment. *Science of The Total Environment*, 851, p.158311. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.158311.
- Chen, X., Wang, Y., Chen, S., Sun, Y., Tan, Q., Ding, Z., Lu, Y. and Yu, Y. (2021). Microplastics as carbon-nutrient sources and shaper for microbial communities in stagnant water. *Journal of Hazardous Materials*, 420, p.126662. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126662.

- De Souza Machado, A.A., Lau, C.W., Till, J., Kloas, W., Lehmann, A., Becker, R. and Rillig, M.C. (2018). Impacts of Microplastics on the Soil Biophysical Environment. *Environmental Science & Technology*, 52(17), pp.9656–9665. doi:10.1021/acs.est.8b02212.
- Deshoules, Q., Gall, M.L., Benali, S., Raquez, J-M., Dreanno, C., Arhant, M., Priour, D., Cerantola, S., Stoclet, G. and Gac, P.Y.L. (2022). Hydrolytic degradation of biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) - Towards an understanding of microplastics fragmentation. *Polymer Degradation and Stability*, 205, p.110122. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2022.110122.
- Dunn, A.K. (2012). *Vibrio fischeri* Metabolism. *Advances in Microbial Physiology*, pp.37–68. doi:10.1016/b978-0-12-394423-8.00002-0.
- Dupont, S., Carré-Mlouka, A., Descarrega, F., Ereskovsky, A., Longeon, A., Mouray, E., Florent, I. and Bourguet-Kondracki, M.L. (2013). Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbas tenacior* (Porifera, Demospongiae). *Letters in Applied Microbiology*, 58(1), pp.42–52. doi:10.1111/lam.12154.
- Emeh, C.O. and Marth, E.H. (1977). Synthesis of macromolecules and rubratoxin by *Penicillium rubrum*. *Archives of Microbiology*, 115(2), pp.157–162. doi:10.1007/bf00406369.
- Gambardella, C., Morgana, S., Bramini, M., Rotini, A., Manfra, L., Migliore, L., Piazza, V., Garaventa, F. and Faimali, M. (2018). Ecotoxicological effects of polystyrene microbeads in a battery of marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research*, 141, pp.313–321. doi:10.1016/j.marenvres.2018.09.023.
- Guo, R., Ren, Z., Xu, M. and Cai, L. (2022). Preparation and properties of the PLA-based conductive biocomposites with the addition of rGO nanoplatelets. *Materials Today Communications*, 32, p.104115. doi:10.1016/j.mtcomm.2022.104115.
- Kim, M. and Chun, J. (2014). 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. *Methods in Microbiology*, [online] 41, pp.61–74. doi:10.1016/bs.mim.2014.08.001.
- Liu, L., Xu, M., Ye, Y. and Zhang, B. (2021). On the degradation of (micro)plastics: Degradation methods, influencing factors, environmental impacts. *Science of The Total Environment*, p.151312. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151312.
- Liwarska-Bizukojc, E. (2021). Effect of (bio)plastics on soil environment: A review. *Science of The Total Environment*, 795, p.148889. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148889.
- Moradihamedani, P. (2022). Recent development in polymer/montmorillonite clay mixed matrix membranes for gas separation: a short review. *Polymer Bulletin*. doi:10.1007/s00289-022-04266-3.

- Moss, M.O. and Hill, I.W. (1970). Strain variation in the production of Rubratoxins by *penicillium rubrum* stoll. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 40(2), pp.81–88. [doi:10.1007/bf02051985](https://doi.org/10.1007/bf02051985).
- P. Bond, G. and Martin, J. (2005). Microtox. *www.sciencedirect.com*, [online] pp.110–111. [doi:10.1016/B0-12-369400-0/00630-X](https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00630-X).
- Piccardo, M., Provenza, F., Grazioli, E., Anselmi, S., Terlizzi, A. and Renzi, M. (2021). Impacts of Plastic-Made Packaging on Marine Key Species: Effects Following Water Acidification and Ecological Implications. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(4), p.432. [doi:10.3390/jmse9040432](https://doi.org/10.3390/jmse9040432).
- Piccardo, M., Provenza, F., Grazioli, E., Cavallo, A., Terlizzi, A. and Renzi, M. (2020). PET microplastics toxicity on marine key species is influenced by pH, particle size and food variations. *Science of The Total Environment*, [online] 715, p.136947. [doi:10.1016/j.scitotenv.2020.136947](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136947).
- Qin, M., Chen, C., Song, B., Shen, M., Cao, W., Yang, H., Zeng, G. and Gong, J. (2021). A review of biodegradable plastics to biodegradable microplastics: Another ecological threat to soil environments? *Journal of Cleaner Production*, 312, p.127816. [doi:10.1016/j.jclepro.2021.127816](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127816).
- Rai, P.K., Lee, J., Brown, R.J.C. and Kim, K.-H. (2021). Micro- and nano-plastic pollution: Behavior, microbial ecology, and remediation technologies. *Journal of Cleaner Production*, 291, p.125240. [doi:10.1016/j.jclepro.2020.125240](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125240).
- Rajpoot, K., Desai, N., Koppiseti, H., Tekade, M., Sharma, M.C., Behera, S.K. and Tekade, R.K. (2022). In silico methods for the prediction of drug toxicity. *Pharmacokinetics and Toxicokinetic Considerations*, pp.357–383. [doi:10.1016/b978-0-323-98367-9.00012-3](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-98367-9.00012-3).
- Ruby, E.G., Urbanowski, M., Campbell, J., Dunn, A., Faini, M., Gunsalus, R., Lostroh, P., Lupp, C., McCann, J., Millikan, D., Schaefer, A., Stabb, E., Stevens, A., Visick, K., Whistler, C. and Greenberg, E.P. (2005). Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [online] 102(8), pp.3004–3009. [doi:10.1073/pnas.0409900102](https://doi.org/10.1073/pnas.0409900102).
- Srinivasan, R., Prabhu, G., Prasad, M., Mishra, M., Chaudhary, M. and Srivastava, R. (2020). *Penicillium*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, [online] pp.651–667. [doi:10.1016/B978-0-12-823414-3.00032-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00032-0).
- Tong, H., Zhong, X., Duan, Z., Yi, X., Cheng, F., Xu, W. and Yang, X. (2022). Micro- and nanoplastics released from biodegradable and conventional plastics during degradation: Formation, aging factors, and toxicity. *Science of The Total Environment*, 833, p.155275. [doi:10.1016/j.scitotenv.2022.155275](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155275).
- Vaid, R., Yildirim, E., Pasquinnelli, M.A. and King, M.W. (2021). Hydrolytic Degradation of Polylactic Acid Fibers as a Function of pH and Exposure Time. *Molecules*, 26(24), p.7554. [doi:10.3390/molecules26247554](https://doi.org/10.3390/molecules26247554).

- Wang, J., Tian, Q., Cui, L., Cheng, J., Zhou, H., Zhang, Y., Peng, A. and Shen, L. (2022). Synergism and mutualistic interactions between microalgae and fungi in fungi-microalgae symbiotic system. *Bioresource Technology*, 361, p.127728. [doi:10.1016/j.biortech.2022.127728](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127728).
- Wong, M.L. and Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA Quantitation. *BioTechniques*, 39(1), pp.75–85. [doi:10.2144/05391rv01](https://doi.org/10.2144/05391rv01).
- Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyaya, Y., Saiganji, A. and Tani, Y. (2001). Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degradation and Stability*, 72(2), pp.323–327. [doi:10.1016/s0141-3910\(01\)00027-1](https://doi.org/10.1016/s0141-3910(01)00027-1).
- Zaghoul, A., Saber, M., Gadow, S. and Awad, F. (2020). Biological indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1). [doi:10.1186/s42269-020-00385-x](https://doi.org/10.1186/s42269-020-00385-x).
- Zeenat, Elahi, A., Bukhari, D.A., Shamim, S. and Rehman, A. (2021a). Plastics degradation by microbes: A sustainable approach. *Journal of King Saud University - Science*, 33(6), p.101538. [doi:10.1016/j.jksus.2021.101538](https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101538).
- Zeenat, Elahi, A., Bukhari, D.A., Shamim, S. and Rehman, A. (2021b). Plastics degradation by microbes: A sustainable approach. *Journal of King Saud University - Science*, 33(6), p.101538. [doi:10.1016/j.jksus.2021.101538](https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101538).
- Zhou, Y., Sun, Y., Liu, J., Ren, X., Zhang, Z. and Wang, Q. (2022). Effects of microplastics on humification and fungal community during cow manure composting. *Science of The Total Environment*, 803, p.150029. [doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150029](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150029).
- Νικολαΐδης, Α. (2012). Σύνθεση, κινητική μελέτη και χαρακτηρισμός νανοςύνθετων υλικών πολυμεθακρυλικής μήτρας. [doi:10.12681/eadd/28384](https://doi.org/10.12681/eadd/28384).
- Rai, P.K., Lee, J., Brown, R.J.C. and Kim, K.-H. (2021a). Environmental fate, ecotoxicity biomarkers, and potential health effects of micro- and nano-scale plastic contamination. *Journal of Hazardous Materials*, 403, p.123910. [doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123910](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123910).
- Luo, H., Liu, C., He, D., Sun, J., Li, J. and Pan, X. (2022). Effects of aging on environmental behavior of plastic additives: Migration, leaching, and ecotoxicity. *Science of The Total Environment*, 849, p.157951. [doi:10.1016/j.scitotenv.2022.157951](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157951).
- Viegas, C.A. (2021). Microbial bioassays in environmental toxicity testing. *Advances in Applied Microbiology*, pp.115–158. [doi:10.1016/bs.aambs.2021.03.002](https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2021.03.002).
- Yao, Z., Seong, H.J. and Jang, Y.-S. (2022). Environmental toxicity and decomposition of polyethylene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [online] 242, p.113933. [doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113933](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113933).

BIBΛΙΑ

- Boll Stiftung, H. (2021), Plastic atlas.
- Newman, M.C. (2001). Fundamentals of ecotoxicology. Boca Raton, (Fla.): Lewis Publishers.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- appliedsoilab.web.auth.gr. (2017). Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Εδαφολογίας. [online] Available at: <http://appliedsoilab.web.auth.gr/>
- Horomidis.gr. (2019). Φυτά της μεσογειακής χλωρίδας στον κήπο μας! | Γεωπονικές Επιχειρήσεις Χορομίδης. [online] Available at: <https://horomidis.gr/fyta-tis-mesogeiakis-chloridas-ston-kipo-mas/>
- Παπαθεοδώρου, Ε.Μ. and Στάμου, Γ.Π. (2013). ΕΔΑΦΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΔΑΦΩΝ. Τομές Οικολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΑΠΘ.
- www.zougla.gr. (2020). Μικροπλαστικά βρέθηκαν για πρώτη φορά στο αίμα του ανθρώπου. [online] <https://www.zougla.gr/ygeia/article/mikroplastika-vre8ikan-gia-proti-fora-sto-ema-tou-an8ropou>
- Βλαχογιάννη, Θ. and Βαλαβανίδης, Αθ. (2015). Επιστημονικά Θέματα Χημείας. [online] 195.134.76.37. Available at: http://195.134.76.37/scinews/episthmonika_themata_temp.htm
- Η τροφή μας το φάρμακό μας (2019). Πλαστικά σκεύη και συσκευασίες: Τα σήματα που προστατεύουν την υγεία μας - Προϊόντα της Φύσης. [online] Προϊόντα της Φύσης. Available at: <https://www.proionta-tis-fisis.com/plastika-skevi-kai-syskevasies-ta-simata-prostatevoun-tin-ygieia-mas/>
- ebooks.edu.gr. (2019). 2.1 Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΟΥ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ. [online] Available at: http://ebooks.edu.gr/ebooks/v/html/8547/2724/Biologia_G-Lykeiou_html-apli/index2_1.html

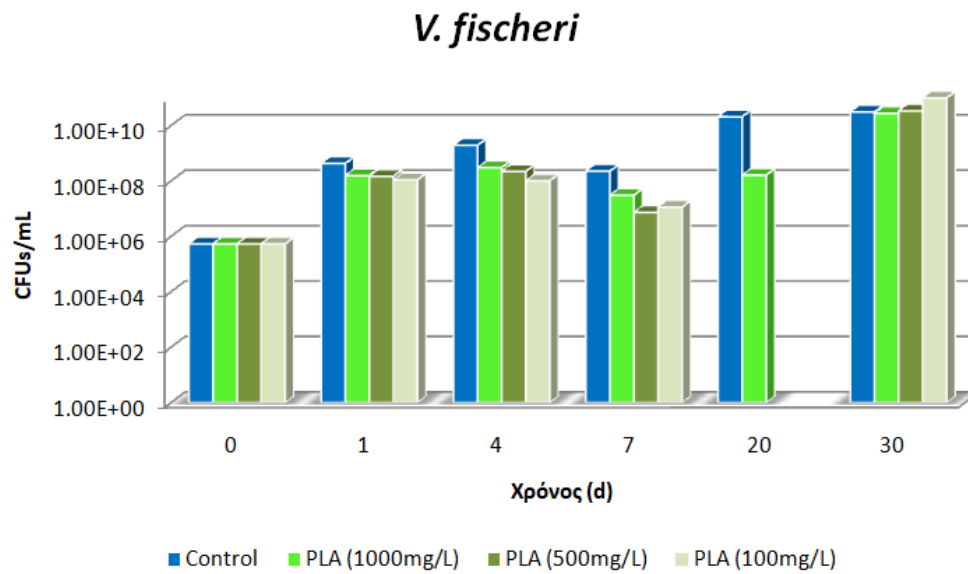
ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

- 1,4-Butanediol | Polytetramethylene Ether Glycol | Gamma Butyrolactone | N-Methylpyrrolidone | Tetrahydrofuran | Poly Butylene Adipate-Co-Terephthalate | Welinks Petrochemicals and Relevant Chemicals Manufacturer and Supplier in China. (2022). PBAT | Poly butylene adipate-co-terephthalate|WelinksSupplier.[online] <https://www.welinkschem.com/pbat-poly-butylene-adipate-co-terephthalate-2/>
- Anon, (2021). PLA, Biodegradable and Decomposable Plastics | ILUCKU Tech In 2022. [online] <https://ilucku.com/pla-biodegradable-and-decomposable-plastics/>
- Biodegradable Food Pack. (2019). BIODEGRADABLE. [online] Available at: <http://www.biodegradablefoodpack.com/biodegradable/>
- Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. (1987). Environmental Health Perspectives, [online] 74, pp.3–9. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1474499/>.
- Bio-Rad Laboratories. (n.d.). What is Real-Time PCR (qPCR)? [online] Available at: <https://www.bio-rad.com/en-gr/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>
- Engineer, C., Parikh, J. and Raval, A. (2011). Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. [online] www.semanticscholar.org. Available at: <https://www.semanticscholar.org/paper/Hydrolytic-Degradation-Behavior-of-Biodegradable-Engineer-Parikh/39ea1d01f91eaf7d48a273d2e1b7f97243e617d9>.
- Essense Coffee. (2019). COFFEE: THE JOURNEY FROM THE SEED TO YOUR CUP. [online] Available at: <https://essense.coffee/en/coffee-the-journey-from-the-seed-to-your-cup/>.
- EUBIO_Admin (2020). Bioplastics. [online] European Bioplastics e.V Available at: <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>
- Kamena, K. (2011). 新葡的京集团350vip8888-首页. [online] www.rockwoodadditives.com. Available at: <http://www.rockwoodadditives.com>
- Lakna (2019). What is the Difference Between Biodegradation and Bioremediation. [online] [Pediaa.com](https://pediaa.com).: <https://pediaa.com/what-is-the-difference-between-biodegradation-and-bioremediation/>.
- Larum, D. (2018). What Is Loam Soil: What Is The Difference Between Loam And Topsoil. <https://www.gardeningknowhow.com/garden-how-to/soil-fertilizers/what-is-loam-soil.htm>.
- LIBRARY, D.K.M.P. (2020). *Vibrio fischeri*, symbiotic bacterium, SEM - Stock Image - C032/1743. [online] <https://www.sciencephoto.com/media/798562/view/vibrio-fischeri-symbiotic-bacterium-sem>

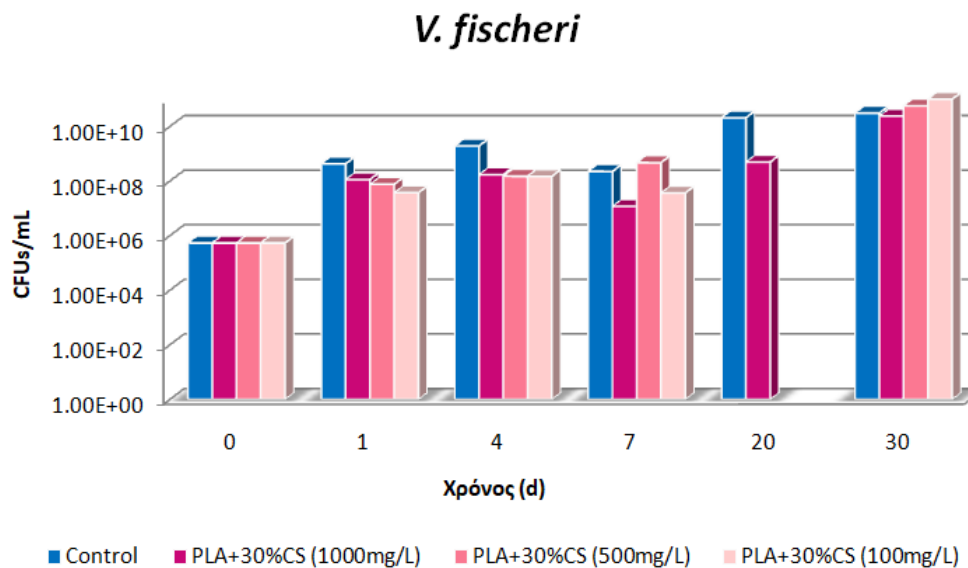
- mary250606 (2021). What are types of soils and their characteristics. [online] GeoPard Agriculture. Available at: <https://geopard.tech/blog/soil-types-how-to-make-the-most-of/>.
- Omnexus (2019). Density of Plastics Material: Technical Properties Table. [online] Specialchem.com. Available: <https://omnexus.specialchem.com/polymer-properties/properties/density>
- Plastics Europe. (2021). Plastics the Facts 2021 • Plastics Europe. [online] Available at: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>.
- Polanco, I.S. (2020). *Vibrio fischeri*. [online] Microbiologia Italia. Available at: <https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/vibrio-fischeri-scheda-batteriologia-e-approfondimenti/>
- Polymerdatabase.com. (2011). PBAT Suppliers. [online] Available at: <https://polymerdatabase.com/Polymer%20Brands/PBAT.html>.
- Polymerdatabase.com. (2015). Degradation of Polymers. [online] Available at: <https://polymerdatabase.com/polymer%20chemistry/Thermal%20Degradation.html>.
- Polymerdatabase.com. (2021). Photo Oxidation. [online] Available at: <https://polymerdatabase.com/polymer%20chemistry/Photo%20Oxidation.html>.
- Tsianta, S. (2022). Microplastics: An environmental havoc. [online] OffLine Post. Available at: <https://www.offlinepost.gr/2022/02/02/microplastics-an-environmental-havoc/>
- Plastics Europe. (2020). Plastics - the Facts 2020 Plastics Europe. [online] Available at: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2020/>
- World Population Review (2021). Plastic Pollution by Country 2020. [online] worldpopulationreview.com. <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/plastic-pollution-by-country>.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

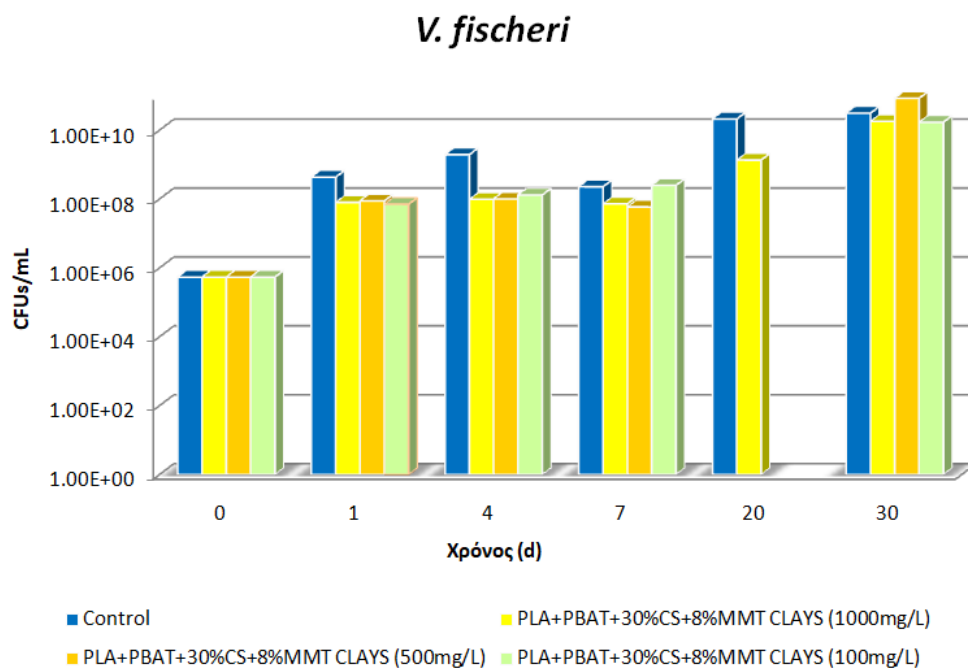
Vibrio fischeri 1^η δοκιμή



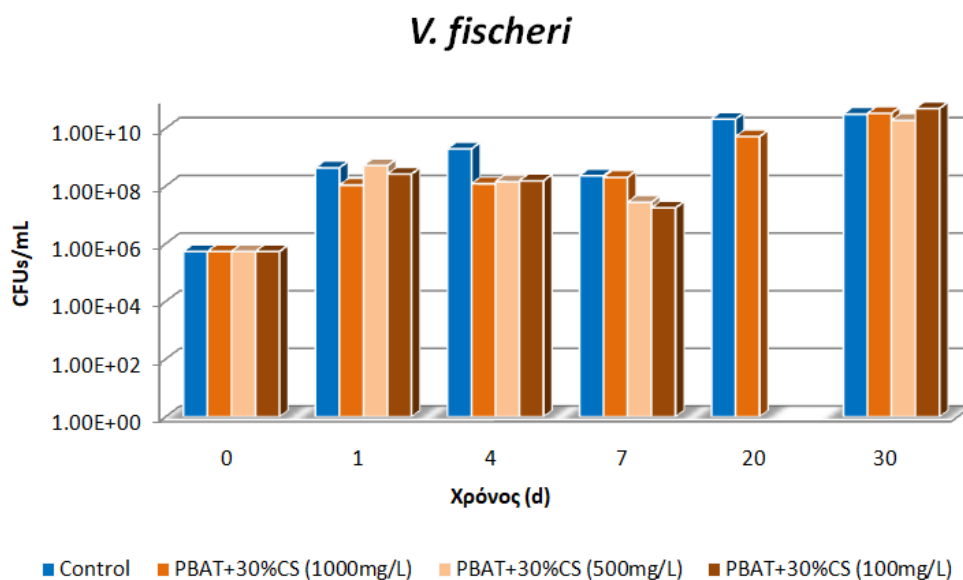
Γράφημα 39: Επίδραση PLA σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*



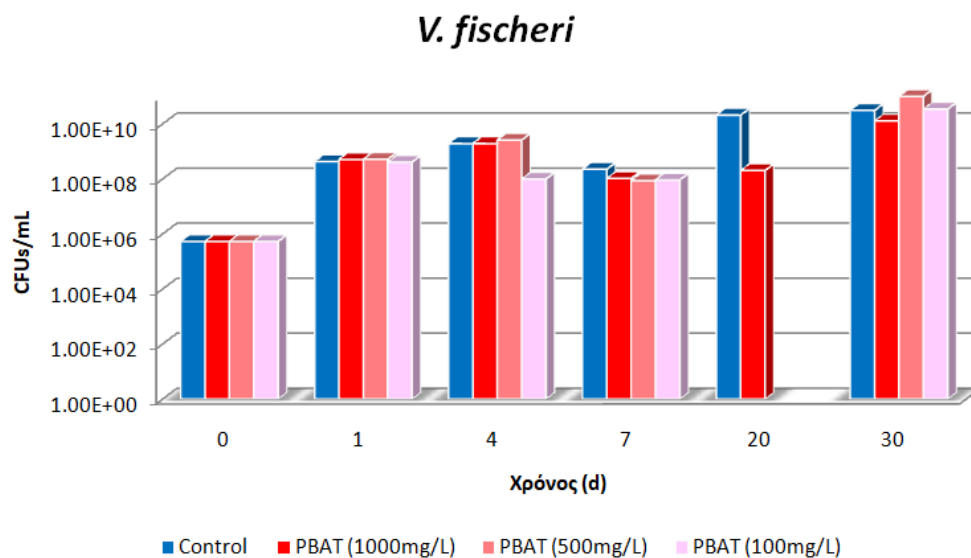
Γράφημα 40: Επίδραση PLA+30%CS σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*



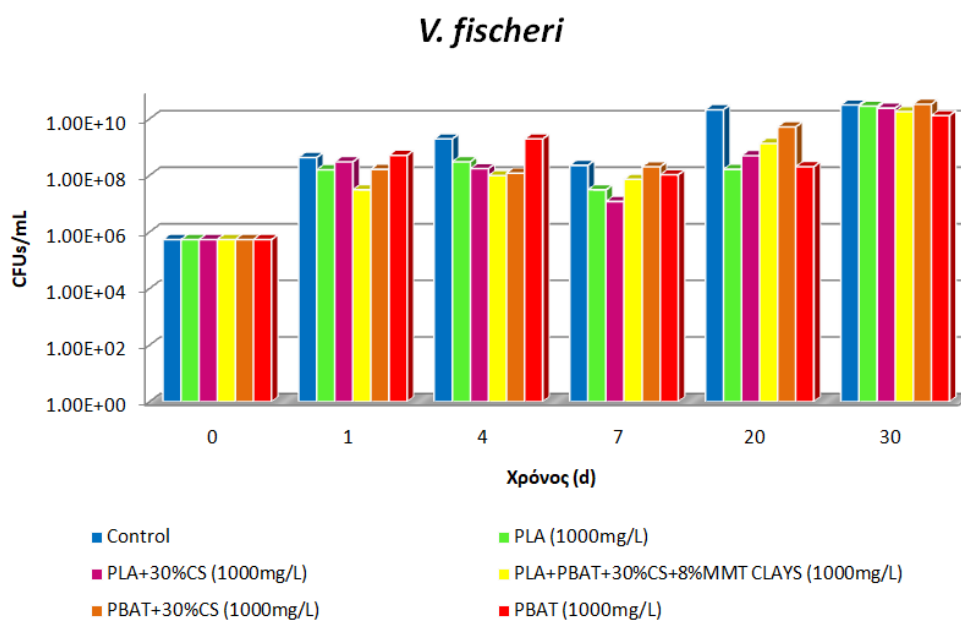
Γράφημα 41: Επίδραση PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
 Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*



Γράφημα 42: Επίδραση PBAT+30%CS σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
 Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*

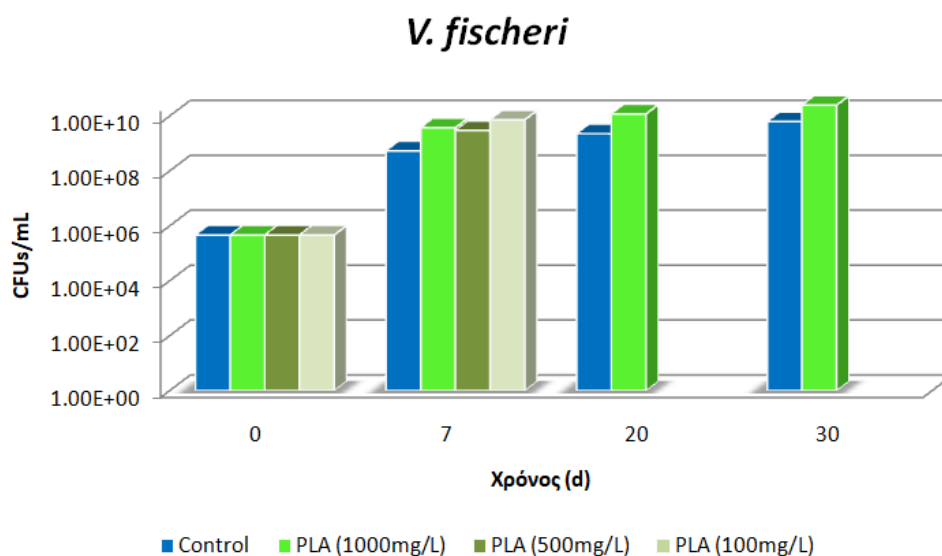


Γράφημα 43: Επίδραση PBAT σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*

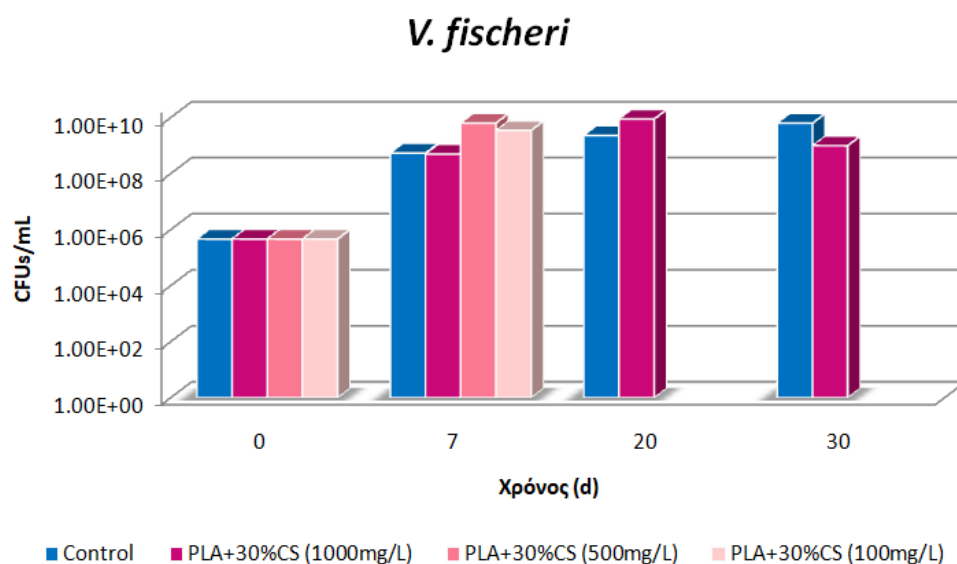


Γράφημα 44: Συγκεντρωτικό διάγραμμα επίδρασης όλων των δειγμάτων (1000mg/L) σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*

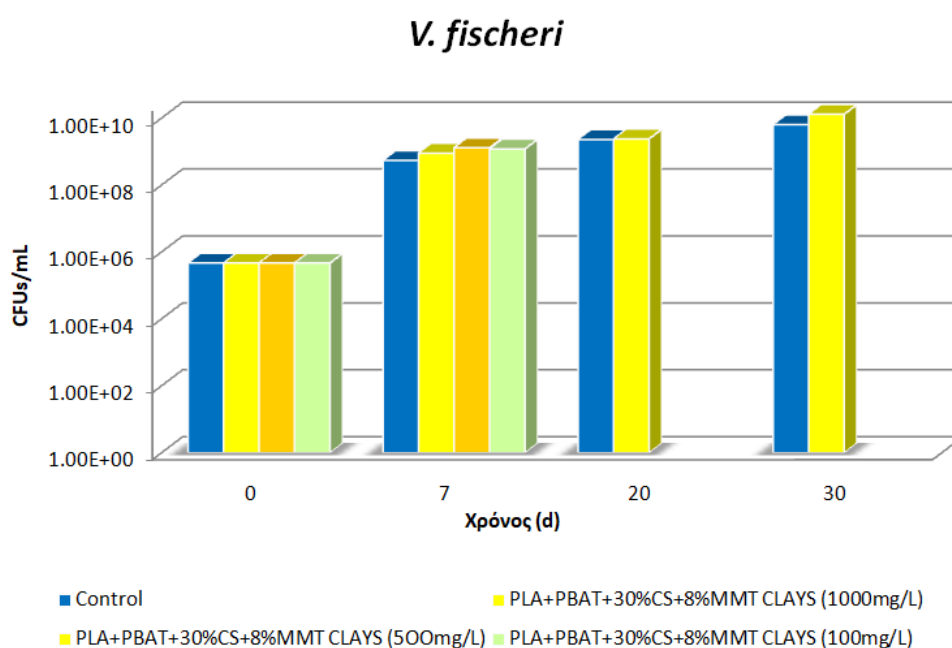
Vibrio fischeri 2^η δοκιμή



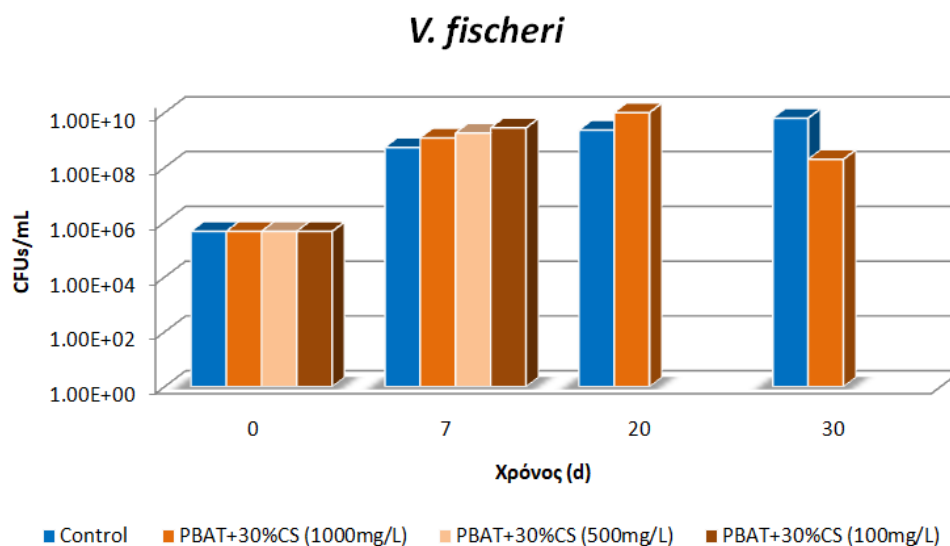
Γράφημα 45: Επίδραση PLA σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*



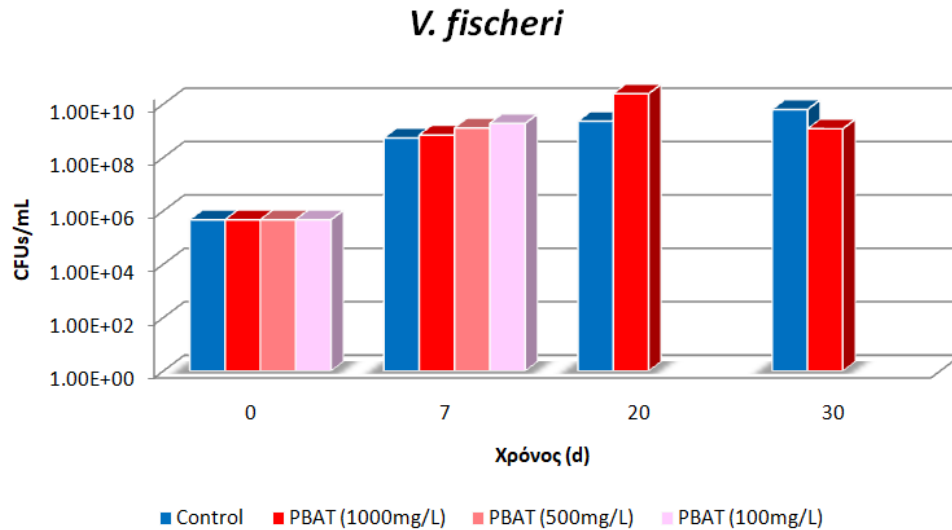
Γράφημα 46: Επίδραση PLA+30%CS σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*



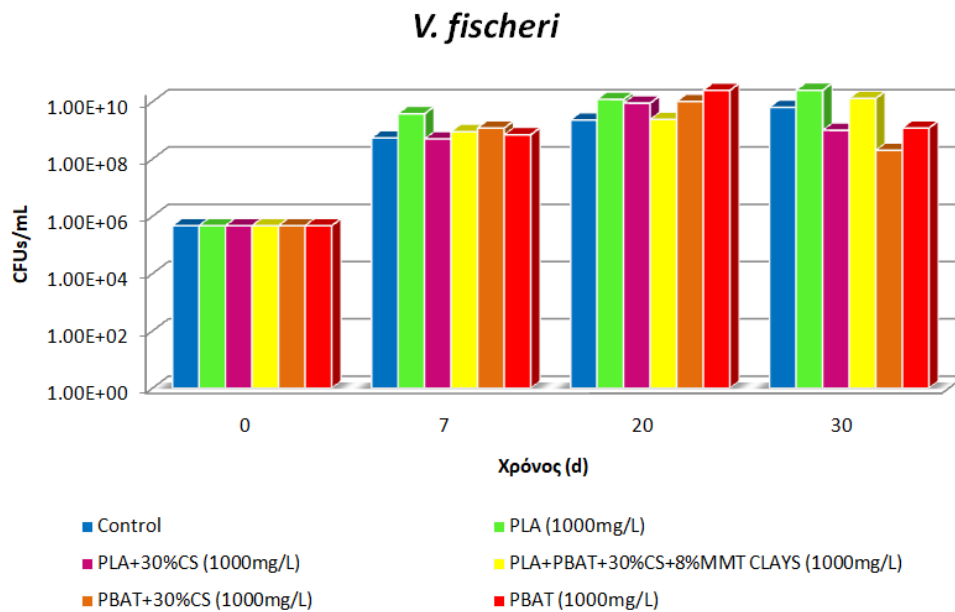
Γράφημα 47: Επίδραση PLA+PBAT+30%CS+8%MMT Clays σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*



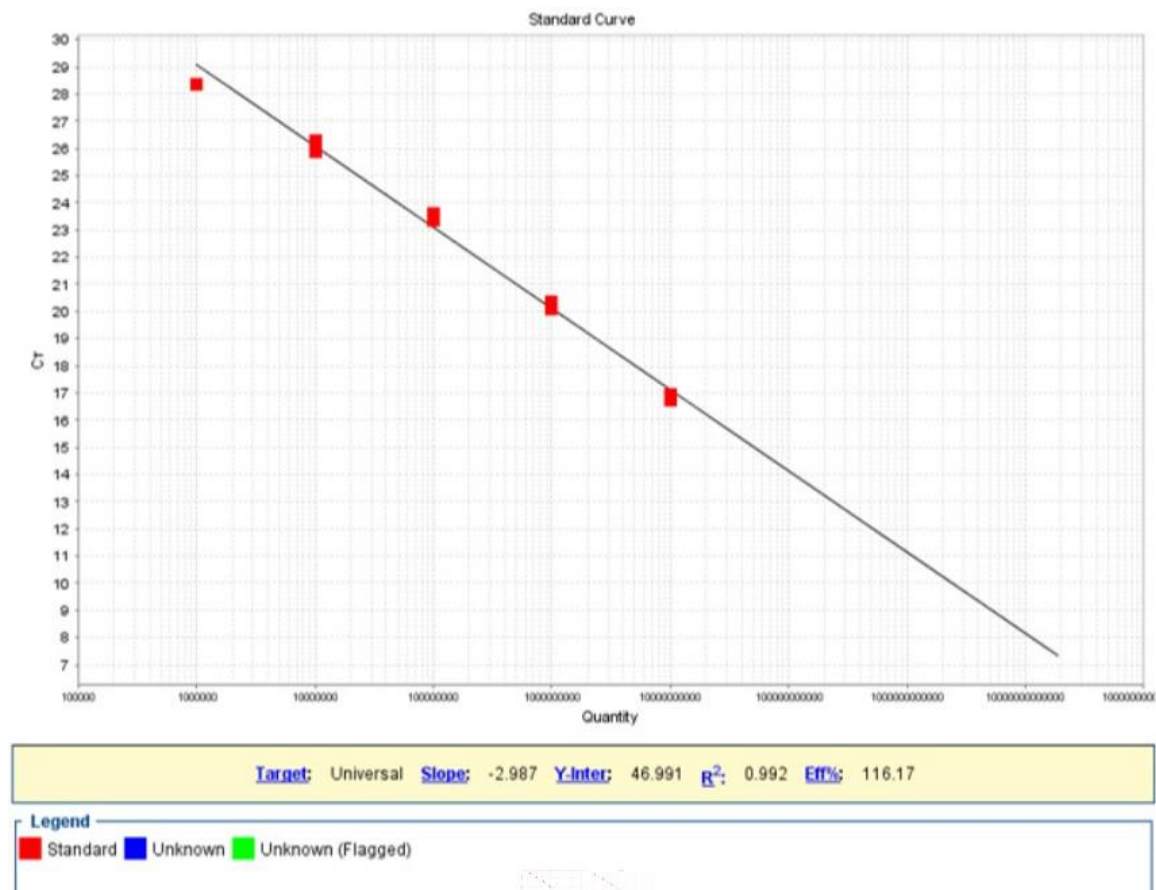
Γράφημα 48: Επίδραση PBAT+30%CS σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*



Γράφημα 49: Επίδραση PBAT σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*



Γράφημα 50: Συγκεντρωτικό διάγραμμα επίδρασης όλων των δειγμάτων (1000mg/L) σε πληθυσμό *V. fischeri* (CFUs/mL) μετά από επώαση 30 d
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο το *V. fischeri*



Εικόνα 30: Πρότυπη καμπύλη για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου 16S rRNA (slope: -2,987 & R²: 0.992)