



## ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος

«Έλεγχος αποδόμησης βιοπλαστικών στο περιβάλλον»

Διπλωματική Εργασία

Της

Μορφογιάννη Δήμητρας

ΑΜ: 2017050074

*Τριμελής Επιτροπή:*

Βενιέρη Δανάη (Επιβλέπουσα)

Συρανίδου Ευδοκία

Γκίκας Πέτρος

Χανιά, Σεπτέμβριος 2023

"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

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος προπτυχιακών σπουδών της Σχολής Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης και τα πειράματα διεξήχθησαν στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Βενιέρη Δανάη για τη συνεργασία, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα. Γουνάκη Ιωσηφίνα, ΕΔΙΠ για την πολύτιμη συμβολή της και τις γνώσεις που μου μετέφερε κατά τη διεκπεραίωση των πειραμάτων. Είμαι ευγνώμων για τη συνεργασία μας και την εμπειρία μου στο εργαστήριο.

Επιπλέον, ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Γκίκα Πέτρο και κα. Συρανίδου Ευδοκία για τη συμμετοχή και το χρόνο τους.

Ευχαριστώ από καρδιάς τις φίλες μου για το ταξίδι των φοιτητικών χρόνων που ζήσαμε παρέα. Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υποστήριξη τους και που έχουν σταθεί δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συσσώρευση πλαστικών αποβλήτων είναι μια από τις διάφορες προκλήσεις που αντιμετωπίζει ο πλανήτης μας τα τελευταία χρόνια. Ένα μέρος πλαστικών αποβλήτων συσσωρεύεται σε χώρους υγειονομικής ταφής, άλλο μέρος καταλήγει στα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα, όπου και παραμένουν για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, λόγω του ότι τα πλαστικά πετροχημικής βάσης είναι κυρίως μη διασπώμενα. Ένας τρόπος για να ξεπεραστούν, τουλάχιστον μερικώς, τα προβλήματα που σχετίζονται με την παραγωγή πλαστικών αγαθών και το τέλος του κύκλου ζωής τους είναι η ανάπτυξη και παραγωγή βιοδιασπώμενων πλαστικών με βιολογική προέλευση, γνωστά και ως βιοπλαστικά. Τα βιοπλαστικά παράγονται από ανανεώσιμες πηγές βιομάζας και τα περισσότερα από αυτά μπορούν να διασπαστούν από τους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος. Η χρήση βιοπλαστικών κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος, ωστόσο η μελέτη τους είναι ακόμη σε πρωταρχικό στάδιο.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η τύχη και δυνατότητα αποδόμησης των βιοπλαστικών PLA (Polylactic Acid ή Πολυγαλακτικό οξύ) και PBAT (αλειφατικός-αρωματικός συμπολυεστέρας) σε μορφή ECOFLEX, ξεχωριστά και σε συνδυασμό με τα πρόσθετα Coffee Silverskin (CS) και MMT Clays, κατόπιν επίδρασης περιβαλλοντικών συνθηκών σε περιβάλλον θαλασσινού νερού και χώματος. Η πειραματική διαδικασία χωρίστηκε σε τρία χρονικά διαστήματα των 45d και συνολικά διήρκεσε περίπου 4 μήνες. Τα δείγματα βιοπλαστικών παρέμεναν μέσα σε θαλασσινό νερό στο χώρο του εργαστηρίου και σε δοχεία με χώμα σε εξωτερικό χώρο. Ο ρυθμός βιοαποδόμησης προσδιορίστηκε ελέγχοντας το βάρος των βιοπλαστικών, τη συμπεριφορά της βακτηριακής κοινότητας στο θαλασσινό νερό και στο χώμα και την ανάπτυξη μικροοργανισμών στην επιφάνεια των βιοπλαστικών, γνωστή και ως βιοϋμένιο. Κατά τη διενέργεια των πειραμάτων τα βιοπλαστικά αποτελούσαν τη μοναδική πηγή τροφής/ενέργειας για τους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, ελέγχθηκε η συγκέντρωση πρωτεϊνών στο βιοϋμένιο των δειγμάτων για το θαλασσινό νερό και το χώμα.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα που αφορούσαν στην αλλαγή βάρους, τα δείγματα PLA και ECOFLEX δεν εμφάνισαν σημαντική μείωση του βάρους τους μέχρι και το πέρας των 135d ούτε στο νερό ούτε στο έδαφος. Παρ' όλα αυτά παρατηρήθηκε αποχρωματισμός και μεγαλύτερη ευκαμψία των δειγμάτων μετά από 90 και 135d. Τα δείγματα που αποτελούσαν μείγμα με CS και MMT Clays παρουσίασαν μεγαλύτερη μείωση του βάρους τους και ειδικότερα το PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays έχασε το 17,9% μετά από 90d στο νερό και 51,6% μετά από 45d στο χώμα. Τα δείγματα PLA4043D+30%CS και ECOFLEX+30%CS μέχρι το τέλος του πειράματος στο θαλασσινό νερό είχαν χάσει περίπου το 10% του βάρους τους, και ακόμη περισσότερο στο χώμα. Στα αποτελέσματα της μελέτης του βιοϋμενίου, και για τα δύο περιβάλλοντα, μετρήθηκαν περισσότερες αποικίες βακτηρίων στην επιφάνεια των συνδυασμένων υλικών, συγκεκριμένα δύο τάξεις μεγέθους περισσότερες από τα PLA και ECOFLEX. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με τα παραπάνω για την απώλεια του βάρους όσον αφορά στο ρυθμό αποδόμησης. Τέλος, σχετικά με τη μελέτη των πρωτεϊνών στο βιοϋμένιο, για τα δείγματα του θαλασσινού νερού παρατηρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση 3,75  $\mu\text{g/mL}$  στο δείγμα PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays των 90d, το ίδιο που παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης. Όσον αφορά τα δείγματα του χώματος, παρατηρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση στα δείγματα των πρώτων 45d, ενδεικτικά 4,33  $\mu\text{g/mL}$  για το PLA4043D+30%CS. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία.

Συμπερασματικά, τα βιοπλαστικά PLA και ECOFLEX(PBAT) αποδομούνται δύσκολα και σε μεγάλο χρονικό διάστημα από τους μικροοργανισμούς σε υδάτινο και χερσαίο περιβάλλον. Ωστόσο, σε συνδυασμό με CS και MMT Clays, η διάσπαση αυτών των υλικών ξεκινάει νωρίτερα, καθώς λόγω της βιολογικής τους προέλευσης είναι ευκολότερο από τους μικροοργανισμούς να τα αποδημήσουν. Συνεπώς, καθίσταται ευάλωτο το υπόλοιπο πολυμερές και ο ρυθμός αποδόμησης αυξάνεται.

## ABSTRACT

The accumulation of plastic waste is one of the various challenges our planet has faced in recent years. Some plastic waste accumulates in landfills, while others end up in aquatic and terrestrial ecosystems, where they remain for a very long time, due to the fact that petrochemical-based plastics are mainly non-degradable. One way of overcoming, at least in part, the problems associated with the production of plastic goods and their end of life is to develop and produce biodegradable plastics of biological origin, also known as bioplastics. Bioplastics are produced from renewable biomass sources and most of them can be broken down by micro-organisms in the environment. The use of bioplastics is gaining ground, but their study is still at an early stage.

In this thesis, the fate and degradation potential of the bioplastics PLA (Polylactic Acid) and PBAT (aliphatic-aromatic copolyester) in ECOFLEX form, separately and in combination with Coffee Silverskin (CS) and MMT Clays additives, were studied under the influence of environmental conditions in seawater and soil environment. The experimental procedure was divided into three time-intervals of 45 days and in total lasted about 4 months. The bioplastic samples were kept in seawater in the laboratory and in soil containers outdoors. The rate of biodegradation was monitored by studying the weight of the bioplastics, the behaviour of the bacterial community in seawater and soil, and the growth of microorganisms on the surface of the bioplastics, also known as biofilm. During the experiments the bioplastics were the only source of food/energy for the microorganisms. In addition, the protein concentration in the biofilm of the samples was tested in seawater and soil samples.

Regarding the results related to weight change, PLA and ECOFLEX samples did not show significant weight reduction up to the end of 135 days in either water or soil. However, discoloration and greater flexibility of the samples were observed after 90 and 135d. The samples that were a mixture of CS and MMT Clays showed a greater weight reduction. Specifically, PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays lost 17.9% of their weight after 90d in water and 51.6% after 45d in soil. PLA4043D+30%CS and ECOFLEX+30%CS samples had lost about 10% of their weight by the end of the experiment in seawater, and even more in soil. Regarding the biofilm study, in both environments, more bacterial colonies were measured on the surface of the combined materials. The bacterial density was higher by two orders of magnitude on combined bioplastics than PLA and ECOFLEX. These results are consistent with the above results concerning weight loss in terms of degradation rate. Finally, regarding the study of proteins in the biofilm, in the seawater samples, a maximum concentration of 3.75 µg/mL was observed in the PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMT Clays sample of 90d. This sample was the one that showed the highest degradation rate. As for the soil samples, a maximum concentration of proteins was observed in the samples of the first 45d, indicatively 4.33 µg/mL for PLA4043D + 30%CS. This may be due to external environmental factors such as temperature.

In conclusion, PLA and ECOFLEX(PBAT) bioplastics are difficult to be degraded and require a longer time by microorganisms in aquatic and terrestrial environments. However, in combination with CS and MMT Clays, the degradation of these materials starts earlier, as due to their biological origin it is easier for microorganisms to degrade them. Consequently, the remaining polymer becomes vulnerable and the degradation rate increases.

## Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	III
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	IV
ABSTRACT .....	VI
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Περιβαλλοντικό αντίκτυπο πλαστικών αποβλήτων .....	1
1.2. Η έννοια της βιοαποδόμησης.....	2
1.3. Βιοπλαστικά .....	3
1.3.1. PLA (Πολυγαλακτικό οξύ).....	6
1.3.2. PBAT .....	8
1.4. Μικροπλαστικά και αποδόμηση .....	11
1.5. Βιοφίλμ .....	14
1.5.1. Αποδόμηση μικροπλαστικών από το βιοφίλμ .....	16
1.6. Ακτινοβολία UV και αποδόμηση.....	17
1.7. Πρωτεΐνες.....	18
1.7.1. Πρωτεΐνες στο βιοφίλμ.....	19
1.8. Σκοπός της εργασίας .....	20
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	22
2.1. Υλικά .....	22
2.2. Πειραματική Διαδικασία .....	22
2.2.1. Προετοιμασία Δειγμάτων.....	22
2.2.2. Έλεγχος συμπεριφοράς βιοπλαστικών στο θαλασσινό νερό .....	25
2.2.3. Έλεγχος συμπεριφοράς βιοπλαστικών στο χώμα .....	29
2.2.4. Έλεγχος συμπεριφοράς βιοπλαστικών για γήρανση.....	33
2.2.5. Μελέτη πρωτεϊνών στο βιοϋμένιο .....	34
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	36
3.1. Θαλασσινό νερό .....	36
3.1.1. Συμπεριφορά πληθυσμού μικροοργανισμών.....	36
3.1.2. Μελέτη βιοϋμένιου .....	48
3.1.3. Απώλεια βάρους.....	54
3.2. Χώμα.....	55
3.2.1. Συμπεριφορά πληθυσμού μικροοργανισμών.....	56
3.2.2. Μελέτη βιοϋμένιου .....	67
3.2.3. Απώλεια βάρους.....	72
3.3. Γήρανση.....	74
3.3.1. Απώλεια βάρους.....	74
3.4. Μελέτη Πρωτεϊνών .....	75

<b>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>79</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>81</b>
<b>6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ .....</b>	<b>86</b>



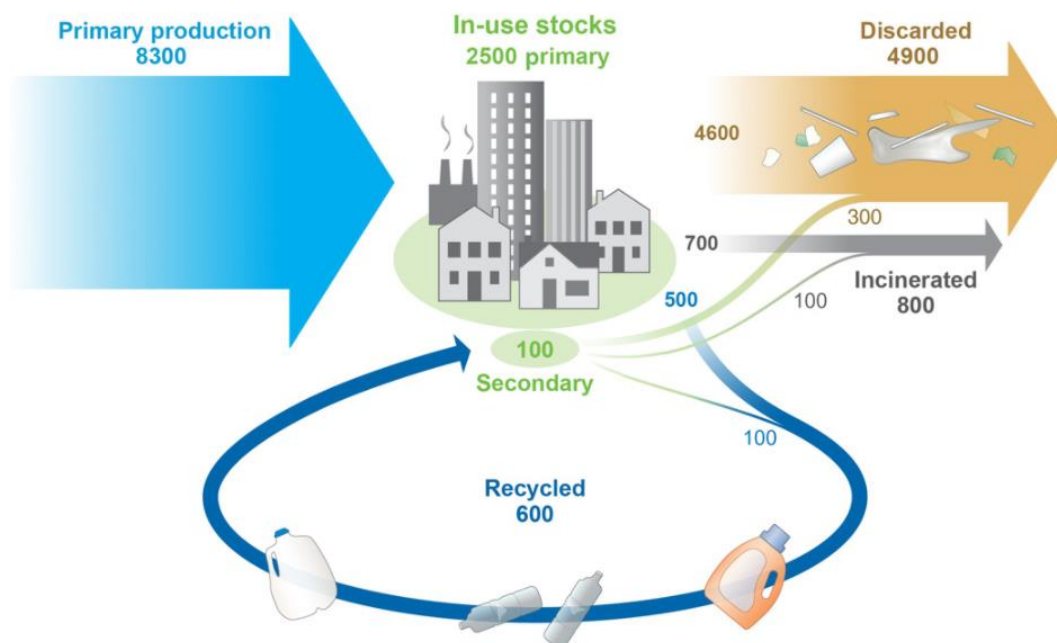
## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Περιβαλλοντικό αντίκτυπο πλαστικών αποβλήτων

Παράλληλα με την παγκόσμια αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού, η Γη αντιμετωπίζει διάφορες προκλήσεις, όπως η υπερθέρμανση του πλανήτη, η διάβρωση και η εξάντληση του εδάφους και η συσσώρευση αποβλήτων. Από αυτές, η συσσώρευση πλαστικών αποβλήτων συνέπεσε με την αύξηση του πληθυσμού και της κατανάλωσης πλαστικών προϊόντων. Ο κόσμος παρήγαγε 390,7 εκατομμύρια τόνους πλαστικού το 2021. Η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (EPA) ανακοίνωσε ότι το 12% των 292,4 εκατομμυρίων τόνων αστικών στερεών αποβλήτων (ΑΣΑ) που παρήχθησαν το 2018 ήταν πλαστικά απόβλητα. Από το σύνολο των ΑΣΑ που παρήχθησαν εκείνο το έτος, 146,1 εκατομμύρια τόνοι συσσωρεύτηκαν σε χώρους υγειονομικής ταφής, εκ των οποίων τα πλαστικά αποτελούσαν το 18,46%. Επιπλέον, 69,1 εκατομμύρια τόνοι από το σύνολο των ΑΣΑ που παρήχθησαν το ίδιο έτος ανακυκλώθηκαν, εκ των οποίων μόνο το 4,47% ήταν πλαστικά. Ο λόγος που συσσωρεύονται τα πλαστικά απόβλητα είναι ότι τα πλαστικά με βάση το πετρέλαιο είναι κυρίως μη διασπώμενα και παραμένουν στο περιβάλλον για πολλά χρόνια. Ως αποτέλεσμα, έχουν αυξηθεί οι ανησυχίες για τις βλαβερές συνέπειες της συσσώρευσης πλαστικών αποβλήτων στο περιβάλλον. Λαμβάνοντας υπόψη τα στατιστικά στοιχεία που περιγράφονται παραπάνω, η μόλυνση του περιβάλλοντος με πλαστικά απόβλητα αποτελεί αυξανόμενη ανησυχία. Με τη συνέχιση των σημερινών ρυθμών παραγωγής πλαστικών και των τάσεων συσσώρευσης αποβλήτων, οι χώροι υγειονομικής ταφής απορριμμάτων και τα περιβάλλοντα, όπως τα εδάφη και οι ωκεανοί, θα συσσωρεύσουν περίπου 12.000 εκατομμύρια τόνους πλαστικών αποβλήτων μέχρι το έτος 2050.<sup>1</sup>



Εικόνα 1: Συσσώρευση πλαστικών αποβλήτων<sup>2</sup>



Εικόνα 2: Παγκόσμια παραγωγή, χρήση και τύχη πολυμερών ρητινών, συνθετικών ινών και προσθέτων (1950-2015, σε εκατομμύρια μετρικούς τόνους)<sup>3</sup>

Είναι προφανές ότι οι βιώσιμες κοινωνίες χαμηλών εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα απαιτούν πλαστικά που προέρχονται από βιομάζα αντί για πετρέλαιο<sup>1</sup>. Για να προλάβουν τις συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες σε υλικά ενός συνεχώς αναπτυσσόμενου παγκόσμιου πληθυσμού, ενώ ταυτόχρονα να διατηρήσουν λειτουργικά οικοσυστήματα, οι κοινωνίες απαιτείται να κάνουν την αλλαγή σε πόρους φυτικής προέλευσης οι οποίοι είναι ανανεώσιμοι σε μικρή χρονική κλίμακα και των οποίων η κατανάλωση είναι «πράσινη».<sup>4</sup> Πιστεύεται ότι ένας τρόπος για να επιτευχθεί η ενεργειακή βιωσιμότητα είναι η παραγωγή βιοδιασπώμενων πολυμερών υλικών με βιολογική βάση, γνωστά και ως βιοπλαστικά.<sup>5</sup>

## 1.2. Η έννοια της βιοαποδόμησης

Η βιοαποδόμηση είναι η αποσύνθεση ή η διάσπαση υλικών που λαμβάνει χώρα, όταν οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν μια οργανική ουσία ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Για παράδειγμα, η ενεργός ιλύς χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των ροών λυμάτων σε μια μονάδα επεξεργασίας λυμάτων για τη βιομετατροπή των οργανικών ενώσεων μέχρι την πλήρη ανοργανοποίησή τους. Τα ανθεκτικά υλικά, τα οποία είναι δύσκολο να διασπαστούν, μπορεί να εισέλθουν στο περιβάλλον ως ρύποι. Αυτό είναι ένα σημαντικό κίνητρο για τη χρήση της βιοαποδόμησης. Οι μικροοργανισμοί χρειάζονται ενέργεια καθώς και άνθρακα, άζωτο, οξυγόνο, φώσφορο, θείο, ασβέστιο, μαγνήσιο και διάφορα μέταλλα για να αναπτυχθούν και να αναπαραχθούν. Η οξείδωση των οργανικών ουσιών σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό είναι μια εξώθερμη (απελευθερώνει θερμότητα) διαδικασία. Για κάθε μόριο οξυγόνου, που χρησιμοποιείται ως δέκτης ηλεκτρονίων (οξειδωτικό), είναι δυνατά διαθέσιμες περίπου 104 Kcal (435 kJ) ενέργειας. Όλοι οι οργανισμοί χρησιμοποιούν μέρος αυτής της ενέργειας. Το υπόλοιπο χάνεται ως θερμότητα. Αυτό μπορεί να παρατηρηθεί κατά την κομποστοποίηση, όταν το κομπόστ θερμαίνεται. Η βιοαποδόμηση μπορεί να συμβεί υπό αερόβιες συνθήκες, όπου το

οξυγόνο είναι ο δέκτης ηλεκτρονίων, και υπό αναερόβιες συνθήκες, όπου τα νιτρικά, τα θειικά ή άλλη ένωση είναι ο δέκτης ηλεκτρονίων.

Τα βακτήρια και οι μύκητες, συμπεριλαμβανομένων των ζυμομυκήτων και των μούχλας, είναι οι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη βιοαποδόμηση. Στο περιβάλλον, η ίδια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία του νερού και του εδάφους, καθώς και για τη συντήρηση τροφίμων, ξύλου και γεωργικών προϊόντων.<sup>6</sup>



Εικόνα 3: Βιοαποδόμηση των αποβλήτων<sup>7</sup>

Η βιοαποδόμηση συνθετικών πολυμερών από μικροοργανισμούς και ένζυμα είναι πολύ πιο συχνή από ό,τι οι περισσότερες προηγούμενες προβλέψεις. Διάφοροι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοαποδόμηση των συνθετικών πολυμερών είναι οι εξής:

1. Τα βιολογικά συστήματα αποδομούν μεγάλα μόρια με υδρόλυση και οξείδωση. Για τη βιοαποδόμηση είναι απαραίτητο να υπάρχουν υδρολύσιμες ή/και οξειδωσιμες (λιγότερο αποτελεσματικές) λειτουργικές ομάδες κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας.
2. Η ενζυμική αποικοδόμηση απαιτεί στενή προσαρμογή της πολυμερικής αλυσίδας στο ενεργό κέντρο του ενζύμου - η διαμορφωτική ευελιξία είναι απαραίτητη για υψηλή αποικοδομησιμότητα.
3. Η μορφολογία των πολυμερών που επιτρέπει την εύκολη πρόσβαση του ενζύμου στην πολυμερική αλυσίδα αυξάνει τον ρυθμό αποικοδόμησης. Τα δείγματα χαμηλής κρυσταλλικότητας αποικοδομούνται ταχύτερα από εκείνα υψηλής κρυσταλλικότητας.
4. Η παρουσία άλλων υλικών επηρεάζει σημαντικά τους ρυθμούς βιοαποικοδόμησης. Μικρά πρόσθετα, όπως οι πλαστικοποιητές, αυξάνουν τον ρυθμό, ενώ οι μεταλλικοί εκκινητές και οι καταλύτες ενδέχεται να δράουν ως μικροκτόνα και να καθυστερούν την αποικοδόμηση.
5. Η οξείδωση και η φωτοοξείδωση είναι δυνητικές οδοί που θα πρέπει να διερευνηθούν.<sup>8</sup>

### 1.3. Βιοπλαστικά

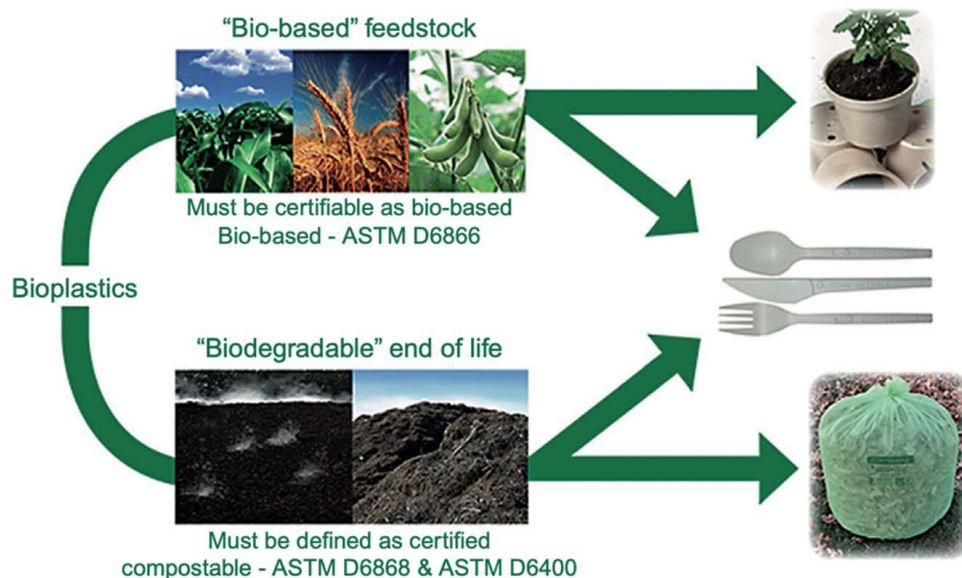
Τα βιοπλαστικά έχουν αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες ως ένα εύλογο υποκατάστατο στα συμβατικά πλαστικά, με σκοπό να ξεπεραστούν, τουλάχιστον μερικώς, τα προβλήματα που σχετίζονται με την παραγωγή πλαστικών αγαθών και το τέλος του κύκλου ζωής τους.<sup>9</sup> Μπορούν να θεωρηθούν ως μία από τις εναλλακτικές για την επίτευξη αυτής της βιώσιμης ανάπτυξης της βιομηχανίας πλαστικών και να προσφέρουν μια σταθερή εναλλακτική λύση στα πετροχημικά πλαστικά στο εγγύς μέλλον, ανακατευθύνοντας μέρος του μεγάλου όγκου πλαστικών σε άλλα συστήματα διαχείρισης αποβλήτων και απορρίπτοντας τα πλαστικά μιας

χρήσης που διαφορετικά είναι δύσκολο να ανακυκλωθούν. Ταυτόχρονα, τα βιοπλαστικά θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως μια πιθανή λύση για τις υπερπλήρεις χωματερές.<sup>10</sup>

Παράγονται από ανανεώσιμες πηγές βιομάζας και μπορούν να είναι βιοδιασπώμενα, επομένως αποτελούν βιώσιμες λύσεις για τη μείωση των μη διασπώμενων πλαστικών αποβλήτων, ελαχιστοποιώντας τους κινδύνους που εγκυμονούν τα πλαστικά με βάση το πετρέλαιο. Κατά συνέπεια, τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για τον τομέα αυτό, όπως αποδεικνύεται από την αύξηση του αριθμού των μελετών για τα βιοπλαστικά. Η αύξηση αυτή αντανακλά πιθανότατα μια αυξανόμενη ανησυχία που εκδηλώνεται από την έρευνα και τις επιστημονικές δημοσιεύσεις στους τομείς των βιοπλαστικών και της βιοδιασπασιμότητας.<sup>1</sup> Αξίζει να σημειωθεί ότι τα βιοδιασπώμενα βιοπλαστικά χρειάζονται 1,5-3,5 χρόνια για να διασπαστούν πλήρως.<sup>11</sup>

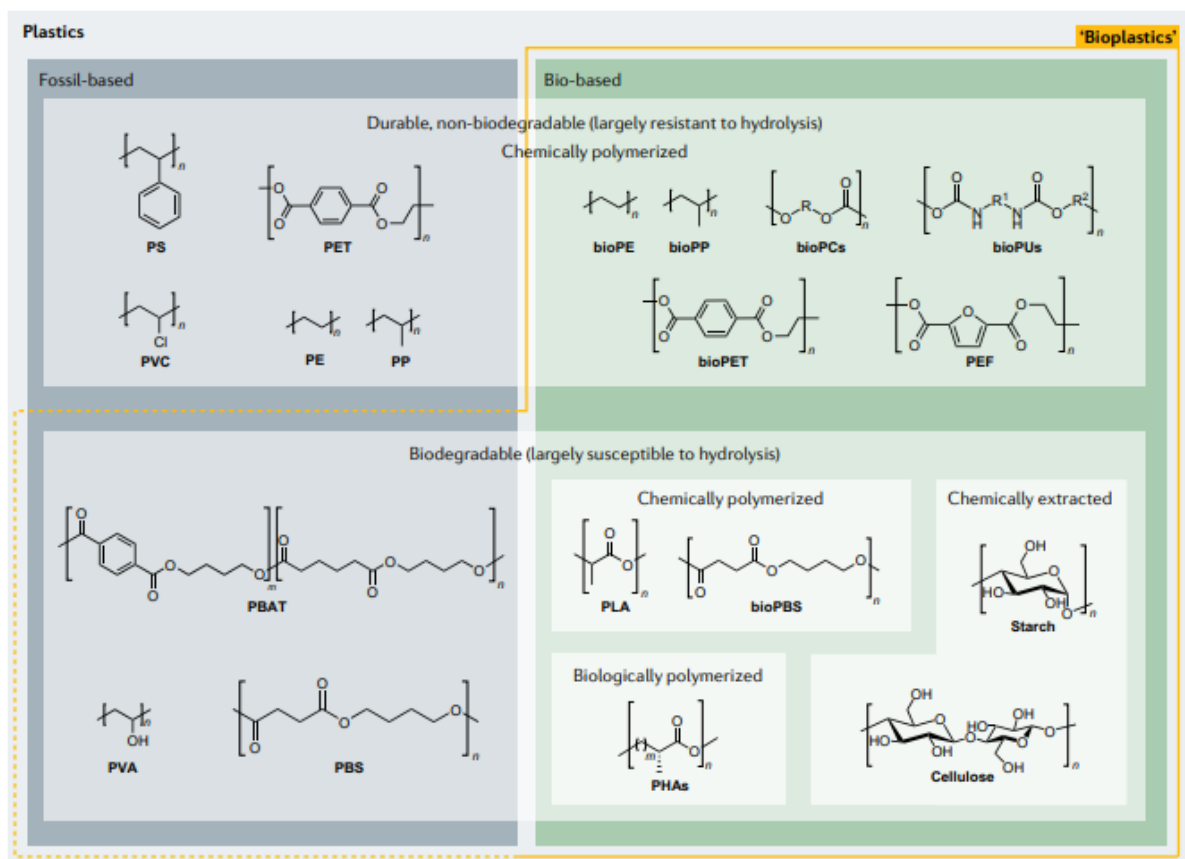
Πληθώρα υλικών ανήκουν στην οικογένεια των βιοπλαστικών. Διαφέρουν κατά πολύ μεταξύ τους, αναλόγως του πολυμερούς από το οποίο συνίστανται καθώς και όσον αφορά τα δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την ανθεκτικότητά τους με την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον.<sup>9</sup> Αν και οι λέξεις-κλειδιά *βιολογικής βάσης* και *βιοδιασπώμενα* πλαστικά χρησιμοποιούνται συχνά ως ισοδύναμες, δεν είναι συνώνυμες. Για την παραγωγή πλαστικών βιολογικής βάσης χρησιμοποιούνται βιολογικοί πόροι που δεν προέρχονται από το πετρέλαιο. Τα βιοδιασπώμενα πλαστικά, τα οποία μπορεί να είναι βιολογικής ή πετρελαϊκής προέλευσης, αποσυντίθενται όταν εκτίθενται σε βακτήρια. Κάποια πλαστικά βιολογικής βάσης είναι και βιοδιασπώμενα. Ο όρος «βιολογική βάση» αναφέρεται σε ένα πολυμερές που παράγεται πλήρως ή εν μέρει από βιομάζα, η οποία περιλαμβάνει κάθε είδος ανανεώσιμου οργανικού υλικού βιολογικής προέλευσης, καθώς και τα οργανικά απόβλητα. Δηλαδή, αναφέρεται αποκλειστικά στη διαδικασία κατασκευής του υλικού και όχι στο τι συμβαίνει σε αυτό στο τέλος της ύπαρξής του. Ο όρος «βιοδιασπώμενο» ή «βιοαποδομήσιμο» αναφέρεται στην ικανότητα ενός υλικού να αποδομείται σε φυσικά συστατικά, όπως διοξείδιο του άνθρακα, νερό και βιομάζα λόγω της δράσης μικροοργανισμών. Με μια πιο συγκεκριμένη έννοια, το βιοδιασπώμενο πλαστικό είναι μια πλαστική ουσία που πληροί ορισμένες επίσημες απαιτήσεις βιοαποικοδομησιμότητας, όπου μια συγκεκριμένη ποσότητα αποικοδόμησης πρέπει να παρατηρείται επιστημονικά μέσα σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Ως αποτέλεσμα, τα βιοπλαστικά χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: εκείνα που είναι τόσο βιολογικής βάσης όσο και βιοδιασπώμενα, εκείνα που είναι αποκλειστικά βιολογικής βάσης και εκείνα που είναι μόνο βιοδιασπώμενα.<sup>10</sup>





Εικόνα 4: Κατηγορίες βιοπλαστικών<sup>4</sup>

Τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά με βάση τα ορυκτά περιλαμβάνουν την πολυκαπρολακτόνη (PCL), την πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), το τερεφθαλικό αδιπικό πολυβουτυλένιο (PBAT) και τα συμπολυμερή πολυβινυλικής αλκοόλης, με την προσθήκη ορισμένης ποσότητας αιθυλενίου στη σύνθεση αυτών των συμπολυμερών αλκοόλης (EVOH). Τα βιολογικής βάσης, μη βιοδιασπώμενα βιοπλαστικά είναι τα πολυαμίδια (bio-PP), το πολυαιθυλένιο τερεφθαλικό εστέρα (bio-PET), το πολυαιθυλένιο (bio-PE), καθώς και το βιο-πολυτριμεθυλενοτερεφθαλικό εστέρα (bio-PTT), και βιο-πολυαμίδιο (bio-PA). Βιολογικής βάσης, βιοδιασπώμενα βιοπλαστικά είναι το πολυγαλακτικό οξύ (PLA), οι πολυϋδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs) και το βιολογικής βάσης succinate πολυβουτυλένιο (bio-PBS), επίσης πλαστικά με βάση την κυτταρίνη, τη λιγνίνη, τη χιτοζάνη και το άμυλο.<sup>5</sup> Τα παραπάνω φαίνονται και σχηματικά στην Εικόνα 5.

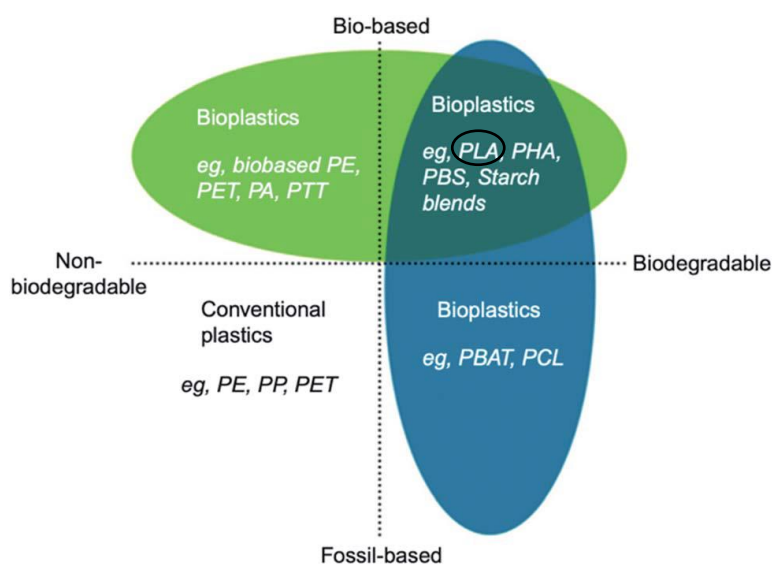


Εικόνα 5: Διάκριση μεταξύ των κατηγοριών βιοπλαστικών και παραδείγματα<sup>12</sup>

### 1.3.1. PLA (Πολυγαλακτικό οξύ)

Το πολυγαλακτικό οξύ (polylactic acid, PLA) είναι ένα από τα κομποστοποιήσιμα θερμοπλαστικά βιοπολυμερή το οποίο έχει βιοαποδομήσιμο και ανανεώσιμο χαρακτήρα.<sup>13</sup> Ως κομποστοποιήσιμο πολυμερές, το PLA θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για τη μείωση του προβλήματος της διάθεσης των αστικών στερεών αποβλήτων (ΑΣΑ), προσφέροντας πρόσθετα σενάρια για το τέλος του κύκλου ζωής του. Το PLA υψηλού μέσου μοριακού βάρους ( $M_w$ ) παράγεται γενικά με πολυσυμπύκνωση και/ή πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου (ROP). Η NatureWorks LLC είναι ο σημαντικότερος παραγωγός PLA, με δυναμικότητα 150.000 μετρικών τόνων ετησίως στις εγκαταστάσεις παραγωγής της στις ΗΠΑ (στο Μπλερ της Νεμπράσκα).<sup>14</sup> Το PLA υψηλού μοριακού βάρους μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ινών, ευλύγιστων, μη-υφαντών, σκληρών και ανθεκτικών υλικών. Ανήκει στην κατηγορία βιοπολυμερών τα οποία είναι χημικά παραγόμενα από πηγές βιολογικής προέλευσης. Κατασκευάζεται κυρίως από ανανεώσιμους πόρους (άμυλο και ζάχαρη).<sup>13</sup> Η χρήση του PLA περιορίστηκε αρχικά σε ιατρικές εφαρμογές λόγω του υψηλού κόστους και της χαμηλής διαθεσιμότητάς του, αλλά το PLA υψηλού  $M_w$  μπορεί τώρα να υποστεί επεξεργασία με χύτευση με έγχυση, εξώθηση φύλλων και ταινιών, χύτευση με εμφύσηση, αεροποίηση, κλώση ινών και θερμοδιαμόρφωση. Επίσης, το PLA παρέχει συγκρίσιμες οπτικές, μηχανικές, θερμικές ιδιότητες και ιδιότητες φραγμού σε σύγκριση με τα εμπορικά διαθέσιμα βασικά πολυμερή, όπως το πολυπροπυλένιο (PP), το τereφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) και το πολυστυρένιο (PS), διευρύνοντας το εμπορικό φάσμα των εφαρμογών του. Στον ιατρικό τομέα, το PLA χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της βιοσυμβατότητάς του με το ανθρώπινο σώμα,

μεταξύ άλλων για εφαρμογές όπως ιατρικά εμφυτεύματα, χειρουργικά ράμματα και ιατρικές συσκευές. Επιπλέον, το PLA έχει χρησιμοποιηθεί για εφαρμογές όπως ίνες, κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα, πλαστικές καλλιέργειες, σκεύη εξυπηρέτησης, δοχεία συσκευασίας (π.χ. συσκευασία τροφίμων για προϊόντα μικρής διάρκειας ζωής) και μεμβράνες περιβαλλοντικής αποκατάστασης. Το PLA θεωρείται γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές υλικό (GRAS) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA). Ωστόσο, έχει ορισμένους περιορισμούς (π.χ. χαμηλή ανθεκτικότητα), οπότε οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται στην απόκτηση προϊόντων PLA με συγκεκριμένες επιθυμητές ιδιότητες μέσω ανάμειξης PLA με άλλες βιοδιασπώμενες και μη βιοδιασπώμενες ρητίνες ή/και μέσω ανάμειξης PLA με πληρωτικά υλικά όπως ίνες ή μικρο- και νανοσωματίδια.<sup>14</sup>



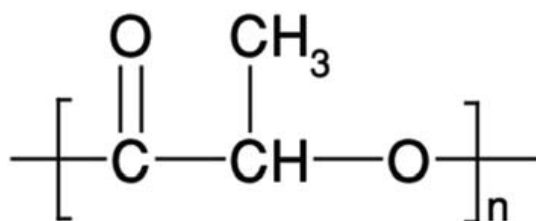
Εικόνα 6: Κατάταξη υλικών<sup>15</sup>

Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο εμπορικές κατηγορίες PLA, το 4043D και το 3251D. Το PLA4043D, που χρησιμοποιείται και στο πείραμα έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος και μικρότερο δείκτη τήξης (MFI) από το 3251D.<sup>15</sup>

Το PLA είναι πιθανότατα το πιο δημοφιλές πολυμερές βιολογικής προέλευσης. Είναι ανακυκλώσιμο και βιοδιασπώμενο σε συνθήκες βιομηχανικής κομποστοποίησης (IC) μέσω μιας αρχικής διαδικασίας υδρόλυσης, και έχει προταθεί να χρησιμοποιηθεί ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου τα πλαστικά μολύνονται σε μεγάλο βαθμό και είναι δύσκολο να ανακτηθούν μέσω της ανακύκλωσης, όπως οι συσκευασίες τροφίμων και οι πλαστικές γεωργικές μεμβράνες. Ενώ το PLA προέρχεται από ανανεώσιμους πόρους και προσφέρει μια εναλλακτική οδό διάθεσης (π.χ. κομποστοποίηση), υπάρχουν περιορισμοί στην εφαρμογή του λόγω της έλλειψης κατάλληλης υποδομής για τη διαλογή, την ανακύκλωση και/ή την κομποστοποίηση των προϊόντων PLA στο τέλος της ζωής τους.<sup>14</sup>



Εικόνα 7: Πητίνη PLA<sup>16</sup>

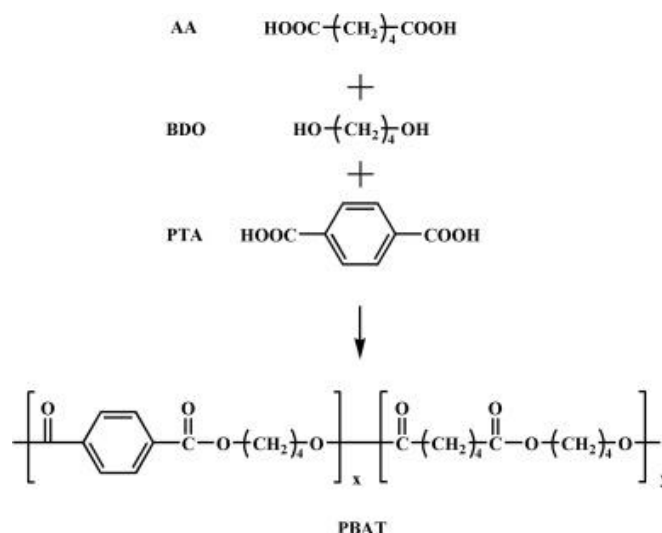


Εικόνα 8: Χημική δομή του PLA<sup>15</sup>

### 1.3.2. PBAT

Κατά την ανάπτυξη βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, οι πολυεστέρες αποτελούν μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ομάδα πολυμερών. Οι αλειφατικοί πολυεστέρες έχουν αποδειχθεί ότι είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμοι λόγω των εστερικών δεσμών τους στη μαλακή αλυσίδα, οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στην υδρόλυση. Προκειμένου να σχεδιαστούν νέοι πολυεστέρες που έχουν τόσο ικανοποιητικές μηχανικές ιδιότητες όσο και επιθυμητή βιοαποικοδομησιμότητα, έχουν συντεθεί και ερευνηθεί ορισμένοι αλειφατικοί-αρωματικοί συμπολυεστέρες που αποτελούνται από αλειφατικές και αρωματικές μονάδες. Μεταξύ πολυάριθμων αλειφατικών-αρωματικών συμπολυεστέρων, ο πιο υποσχόμενος και δημοφιλής με προοπτικές ανάπτυξης σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών είναι το πολυ (αδипικό βουτυλένιο-συν-τερεφθαλικό οξύ) (PBAT), το οποίο λαμβάνεται με πολυ-συμπύκνωση μεταξύ βουτανοδιόλης (BDO), αδιπικού οξέος (AA) και τερεφθαλικού οξέος (PTA). Αποδείχθηκε ότι είναι ο καταλληλότερος συνδυασμός, όσον αφορά εξαιρετικές ιδιότητες και καλή βιοδιασπασιμότητα.<sup>17</sup>



Εικόνα 9: Χημική δομή του PBAT<sup>17</sup>

Δεδομένου ότι οι αρωματικοί πολυεστέρες PET ή PBT διαπιστώθηκε ότι είναι ανθεκτικοί στην υδρόλυση σε ήπιες συνθήκες και σε σημαντική προσβολή από μικροοργανισμούς, έγιναν άμεσα πολλές προσπάθειες να αυξηθεί η υδrolυτική ευαισθησία τους και η βιολογική αποικοδομησιμότητά τους με την εισαγωγή αλειφατικών συστατικών στις αλυσίδες των αρωματικών πολυεστέρων. Το 1995, οι Witt et al. ανέφεραν για πρώτη φορά ότι οι συμπολυεστέρες PBAT αποικοδομήθηκαν σε δοκιμή προσομοίωσης κομπόστ στους 60 °C μέχρι περιεκτικότητας PTA περίπου 50 mol%. Η σημαντική μείωση των μέσων κατά βάρος μοριακών μαζών των υπολειμματικών υλικών σε σύγκριση με τις αρχικές μοριακές μάζες έδειξε ότι η βιολογική αποσύνθεση στην επιφάνεια και η σημαντική χημική υδρόλυση λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό των συμπολυεστέρων. Ως γενικό συμπέρασμα μπορεί να δηλωθεί ότι το υλικό PBAT πληροί τα κριτήρια αξιολόγησης για τα χαρακτηριστικά του υλικού, τη βιοαποικοδόμηση, την αποσύνθεση και την ποιότητα του κομπόστ, τα οποία περιγράφονται στους εν λόγω κανόνες. Συνεπώς, το PBAT μπορεί να συμπεράνει ότι είναι πλήρως κομποστοποιήσιμο. Ταυτόχρονα, το PBAT έχει λάβει έγκυρα πιστοποιητικά κομποστοποιήσιμου υλικού από την Αυστραλία TUV (Βέλγιο), DIN-CERTCO (Γερμανία) και BPI (ΗΠΑ).<sup>17</sup>

Ορισμένα βιοδιασπώμενα υλικά με βάση τα PBAT που είναι κομποστοποιήσιμα διατίθενται στο εμπόριο. Οι συσκευασίες που βασίζονται σε αυτά τα υλικά έχουν επί του παρόντος κερδίσει μεγάλη προσοχή σε πολλούς κλάδους λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους σε σύγκριση με τα συμβατικά πλαστικά υλικά. Υπάρχει ένας αριθμός εμπορικά διαθέσιμων κομποστοποιήσιμων υλικών με βάση τα PBAT, τα οποία θα μπορούσαν να υποστούν περαιτέρω επεξεργασία για την κατασκευή μιας συσκευασίας για τις επιθυμητές εφαρμογές. Ορισμένες από τις αξιοσημείωτες εταιρείες που έχουν αναπτύξει υλικά με βάση τα PBAT είναι οι BASF, Novamont, BIOTECH και KINGFA κ.λπ. Ως ένας από τους παγκόσμιους ηγέτες στα βιοδιασπώμενα πλαστικά, η KINGFA έχει αναπτύξει διάφορα κομποστοποιήσιμα υλικά με βάση PBAT, άμυλο και PLA κ.λπ. Τα υλικά αυτά έχουν βρει αρκετές εφαρμογές στη συσκευασία, ιδίως σε σακούλες για ψώνια, σακούλες κομποστοποίησης κ.λπ. Οι τσάντες για ψώνια που επιβλέπονται από την KINGFA με βάση τα μείγματα αμύλου-PBAT έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε σούπερ μάρκετ υψηλού επιπέδου στην Κίνα, γεγονός που έχει γίνει πρότυπο για την εφαρμογή των βιοδιασπώμενων πλαστικών στην Κίνα. Επιπλέον, η σύγχρονη γεωργία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη χρήση συμβατικών πλαστικών μεμβρανών, επειδή οι μεμβράνες αυτές μπορούν να αυξήσουν τις αποδόσεις των καλλιεργειών μέσω της αύξησης

της θερμοκρασίας του εδάφους, της διατήρησης της εδαφικής υγρασίας, του ελέγχου της ανάπτυξης ζιζανίων και της παροχής προστασίας από δυσμενείς καιρικές συνθήκες και παράσιτα. Οι βιοδιασπώμενες μεμβράνες εδαφοκάλυψης που τοποθετούνται στο έδαφος είναι ευαίσθητες στη γήρανση και την υποβάθμιση κατά τη διάρκεια της ωφέλιμης ζωής τους, επομένως πρέπει να έχουν ορισμένες ειδικές ιδιότητες. Η KINGFA ανέπτυξε μεμβράνες με βάση το PBAT για να καλύψει τις γεωργικές απαιτήσεις. Όταν εφαρμόζονται στο έδαφος, οι μεμβράνες με βάση το PBAT μπορούν να επηρεαστούν ελάχιστα από το νερό, τις υψηλές θερμοκρασίες και την υπεριώδη ακτινοβολία κατά τη διάρκεια της ωφέλιμης ζωής τους και μπορούν να βιοδιασπαστούν πλήρως μετά τη λήξη της ωφέλιμης ζωής τους.<sup>17</sup>



Εικόνα 10: Ορισμένες εφαρμογές προϊόντων με βάση το PBAT<sup>17</sup>

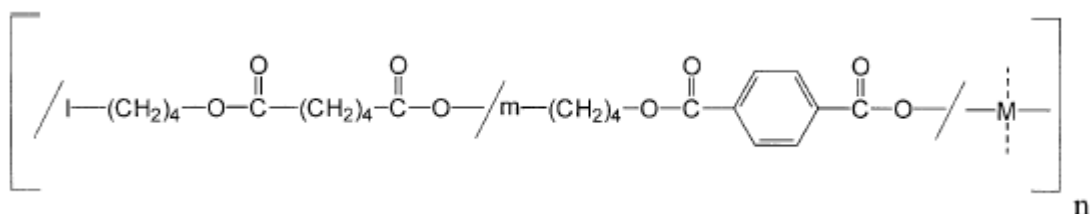
## ECOFLEX

Το 1998, η εταιρία BASF (Germany) εισήγαγε στην αγορά έναν αλειφατικό-αρωματικό πολυεστέρα με το όνομα Ecoflex®. Αυτός ο πολυεστέρας ξεπερνά τα μειονεκτήματα πολλών αλειφατικών υλικών και συνδυάζει τις μηχανικές ιδιότητες των αρωματικών πολυεστέρων με την βιοαποικοδόμηση.<sup>18</sup> Το προϊόν αυτό είναι πιστοποιημένο σύμφωνα με το γερμανικό πρότυπο DIN V 54900 (1998a, b, c) όσον αφορά τη βιοδιασπασσιμότητα και τη δυνατότητα κομποστοποίησής του. Συγκεκριμένα, έχει ερευνηθεί διεξοδικά η τύχη των αρωματικών αλληλουχιών κατά τη βιοαποδόμηση τους όσον αφορά την περιβαλλοντική ασφάλεια του υλικού.<sup>19</sup>

Όπως αναφέρεται παραπάνω, το Ecoflex είναι ένας αλειφατικός-αρωματικός πολυεστέρας ή αλλιώς AAC. Γενικά, οι AAC είναι πλήρως βιοδιασπώμενοι πολυεστέρες και κατασκευάζονται από πρώτες ύλες πετροχημικής προέλευσης. Συχνά αναμιγνύονται με θερμοπλαστικό άμυλο, πολυγαλακτικό οξύ (PLA) και με φυσικές ίνες με σκοπό να μειωθεί το κόστος τους. Η δυνατότητά τους να αναμιγνύονται με ανανεώσιμες πρώτες ύλες περιορίζει την υδρόφιλη συμπεριφορά τους και τα καθιστά πολύ χρήσιμα υλικά. Οι AAC χρησιμοποιούνται κυρίως για συσκευασία τροφίμων, για σακούλες κομποστοποίησης, στον αγροτικό τομέα σε μορφή μεμβρανών και σε είδη υγιεινής μιας χρήσης, αφού έχουν την ικανότητα διάσπασης με κομποστοποίηση.<sup>18</sup>



Εικόνα 11: Πητίνη Ecoflex (PBAT)<sup>20</sup>



Εικόνα 12: Χημική δομή του πολυεστέρα Ecoflex<sup>21</sup>

#### 1.4. Μικροπλαστικά και αποδόμηση

Επειδή τα λεγόμενα "βιοαποικοδομήσιμα" πολυμερή χρειάζονται ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες για να βιοαποικοδομηθούν στους χρόνους που απαιτούνται από τα διεθνή πρότυπα, εάν αυτές οι συνθήκες δεν είναι διαθέσιμες, τότε το υλικό δεν θα αποδομηθεί και θα παραμείνει έτσι στο οικοσύστημα. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά θραύσματα αποσυντίθενται υπό τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας, των υδάτινων διαταραχών, της κυματικής πρόσκρουσης, φυσικής φθοράς και του κύκλου ψύξης-απόψυξης, καθώς και τις γενικές δραστηριότητες του βιολογικού περιβάλλοντος. Ο κατακερματισμός αυτός προκαλεί το σχηματισμό μικρότερων σωματιδίων όλων των σχημάτων και μεγεθών - σωματίδια μικρότερα από 5 mm σε μήκος που ονομάζονται μικροπλαστικά (MPs), ενώ αυτά που είναι μικρότερα από 1 μm είναι τα νανοπλαστικά (NPs). Επειδή η δημιουργία τους μπορεί να προηγείται της τελικής βιοαποικοδόμησης, είναι κρίσιμο να

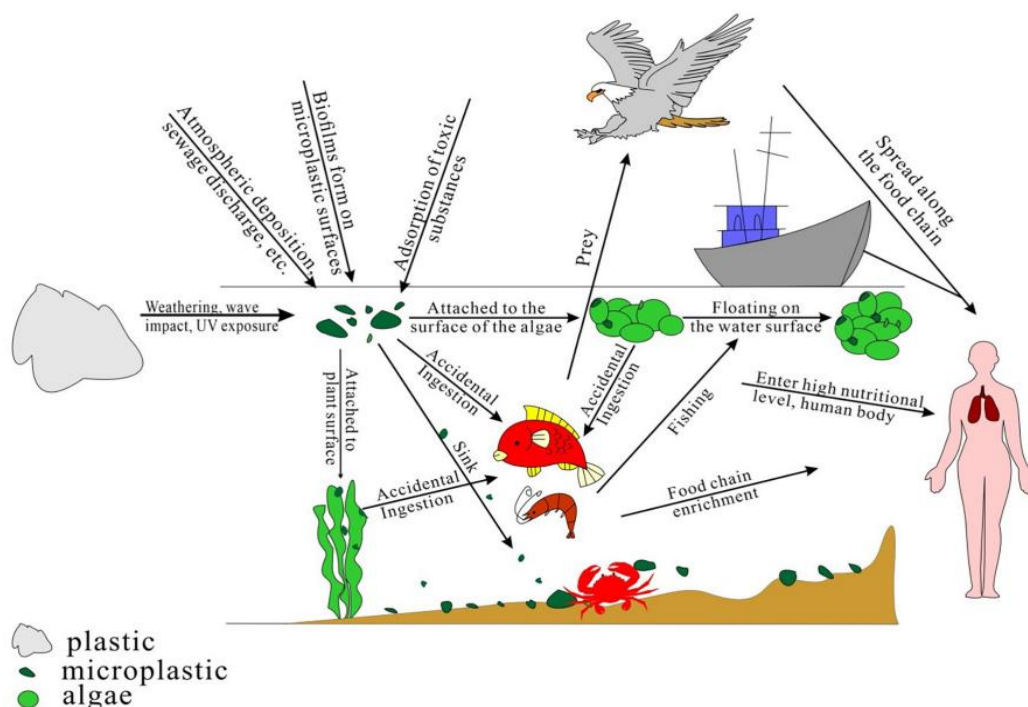
αξιολογηθεί η περίοδος κατά την οποία παραμένουν στο περιβάλλον και τις ζημιές που μπορούν να προκαλέσουν κατά τη διάρκεια αυτού του χρόνου.<sup>22</sup> Τα μικροπλαστικά είναι ευρέως διαδεδομένα και αποτελούν σημαντικό ρύπο στο οικοσύστημά μας. Τα MPs προέρχονται από βιομηχανικά, γεωργικά και οικιακά απόβλητα. Τα πλαστικά σωματίδια είναι πιο ανθεκτικά λόγω της παρουσίας πλαστικοποιητών και χημικών ουσιών ή πρόσθετων. Αυτοί οι πλαστικοί ρύποι είναι πιο ανθεκτικοί στην αποικοδόμηση. Η ανεπαρκής ανακύκλωση και η υπερβολική χρήση των πλαστικών οδηγούν σε μεγάλη ποσότητα αποβλήτων που συσσωρεύονται στο χερσαίο οικοσύστημα, προκαλώντας κίνδυνο για τον άνθρωπο και τα ζώα. Τα μικροπλαστικά έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δύο κύριες κατηγορίες με βάση την προέλευσή τους: πρωτογενή και δευτερογενή μικροπλαστικά. Τα πρωτογενή MPs σχηματίζονται από καλλυντικά, οδοντόκρεμες, ιατρικά προϊόντα και τις ίνες των ρούχων. Τα δευτερογενή MPs σχηματίζονται από τη διάσπαση μεγαλύτερων πλαστικών προϊόντων. Κατηγοριοποιούνται περαιτέρω με βάση την υποβάθμιση, βιοδιασπώμενα και μη βιοδιασπώμενα. Τα βιοδιασπώμενα ή βιοαποικοδομήσιμα MPs είναι φιλικά προς το περιβάλλον και αποικοδομούνται πλήρως από μικρόβια (π.χ. βακτήρια, μύκητες και άλγες) σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό, ενώ τα μη βιοδιασπώμενα MPs δεν μπορούν να αποδομηθούν εύκολα από τα μικρόβια.<sup>23</sup>



Εικόνα 13: Μικροπλαστικά<sup>24</sup>

Μια τεράστια ποσότητα μικροπλαστικών εισέρχεται στο οικοσύστημα μέσω διαφόρων περασμάτων λόγω της κακής διαχείρισης και των πρακτικών απόρριψης. Όσο μικρότερα είναι τα μικροπλαστικά σωματίδια, τόσο μεγαλύτερη είναι η ειδική επιφάνεια, τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα προσρόφησης και τόσο ευκολότερη είναι η αλληλεπίδραση με άλλους ρύπους στο υδάτινο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων των βαρέων μετάλλων, των οργανικών ενώσεων και παθογόνων, μεταξύ άλλων. Ως εκ τούτου, η απομάκρυνση των μικροπλαστικών από υδάτινα περιβάλλοντα αποτελεί επίκαιρη ερευνητική εστίαση.<sup>25</sup>





Εικόνα 14: Τα «μονοπάτια» μετασχηματισμού των μικροπλαστικών στο περιβάλλον<sup>25</sup>

Η ρύπανση από τα MPs μπορεί να ελεγχθεί μέσω διαφορετικών διαδικασιών υποβάθμισης όπως η βιολογική, η θερμική και η φωτοκαταλυτική διαδικασία αποικοδόμησης. Η βιολογική αποικοδόμηση ολοκληρώνεται με τη χρήση διαφορετικών τύπων μικροοργανισμών. Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να αποδομούν διάφορους τύπους οργανικών ρύπων χωρίς να προκαλούν βλάβη στο περιβάλλον. Η διαδικασία της βιοαποδόμησης των MPs λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια:

α) Βιο-επιδείνωση

Σε αυτή τη φάση της αποικοδόμησης, τα ένζυμα δρουν στο μικροπλαστικό και διασπούν το πολυμερές σε μονομερή. Η διάσπαση του μικροπλαστικού πολυμερούς συμβαίνει στο εσωτερικό και στο εξωτερικό του υλικού.

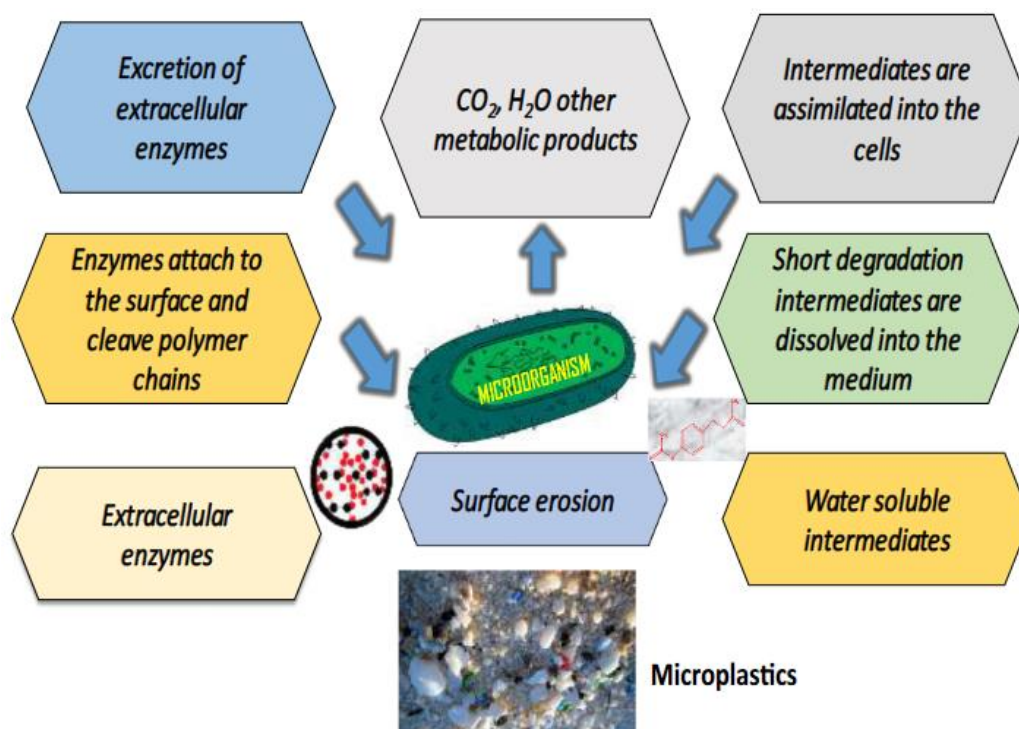
β) Βιο-κατακερματισμός

Ως βιολογικός κατακερματισμός νοείται η βιολογική διάσπαση ή ο κατακερματισμός του μικροπλαστικού πολυμερούς με τη βοήθεια ενζύμων. Σε αυτό το στάδιο, ένζυμα όπως η υδρόλυση και η οξειδοαναγωγή υδrolύουν την πολυμερική δομή των πλαστικών. Ενώ άλλα ένζυμα καταλύουν τις διάφορες αντιδράσεις οξείδωσης με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών.

γ) Απορρόφηση ή Μεταλλοποίηση

Στη φάση αυτή, τα μονομερή που αφομοιώθηκαν από τους μικροοργανισμούς παράγουν τη μικροβιακή βιομάζα,  $\text{CO}_2$  και  $\text{CH}_4$ . Αυτά τα μονομερή χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα για ενεργειακούς σκοπούς και χρησιμοποιούνται από το μικροβιακό κύτταρο για την ανάπτυξή του. Ωστόσο, λόγω της ημιπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών, ορισμένα μονομερή των πλαστικών είναι δύσκολο να αφομοιωθούν. Τα μικροβιακά κύτταρα χρησιμοποιούν τα μη αφομοιωμένα μονομερή μέσω της διαδικασίας βιομετασχηματισμού. Παρ' όλα αυτά, τα μη αφομοιωμένα μονομερή χρησιμοποιούνται

από τους μικροοργανισμούς μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται μετασχηματισμός, δηλαδή οι μικροοργανισμοί εκκρίνουν ένζυμα που προκαλούν το μετασχηματισμό χημικών ενώσεων σε ένα τελικό προϊόν που θα μπορούσε να αφομοιωθεί από παρόμοιους μικροοργανισμούς ή άλλους.<sup>23</sup>



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού βιοαποδόμησης μικροπλαστικών<sup>23</sup>

Η αποτελεσματικότητα της αποικοδόμησης των μικροοργανισμών εξαρτάται από συνθήκες όπως η θερμοκρασία, το pH και η υγρασία. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία και το pH ελέγχουν τον ρυθμό αποικοδόμησης των MPs ρυθμίζοντας το μεταβολισμό των μικροοργανισμών.<sup>23</sup>

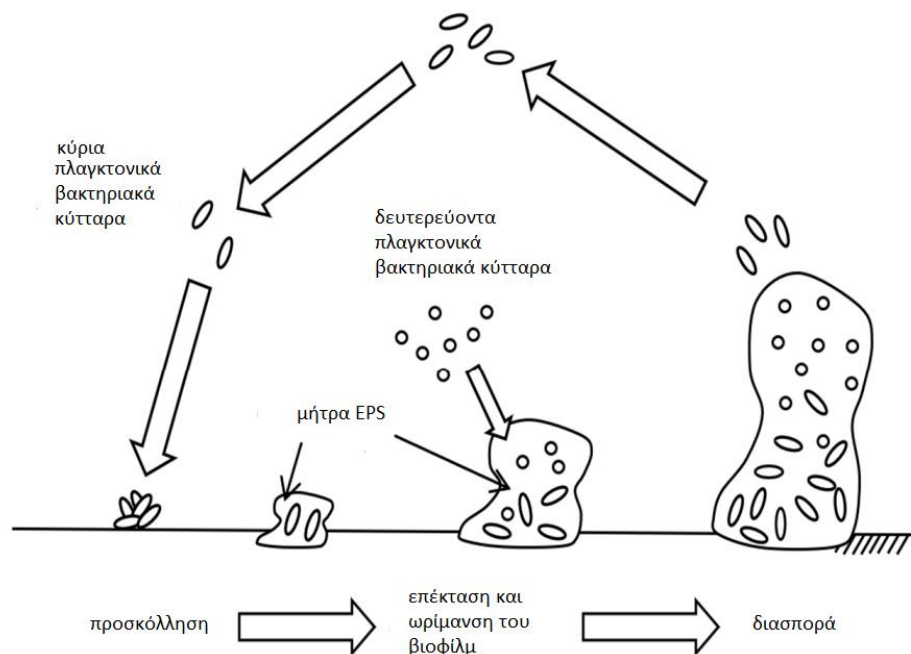
### 1.5. Βιοφίλμ

Ο όρος βιοφίλμ ή βιοϋμένιο χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει μια μικροβιακή κοινότητα από κύτταρα τα οποία συνδέονται μεταξύ τους ή μέσω μιας επιφάνειας-υποστρώματος που βρίσκεται ενσωματωμένη σε μια μήτρα με εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (Extracellular Polymeric Substances, EPS) που έχουν παραχθεί από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς.<sup>26</sup> Πρόκειται για φυλογενετικά και λειτουργικά ποικίλες κοινότητες βακτηρίων, φυκιών, πρωτόζων και μυκήτων, οι οποίες αναφέρονται συλλογικά ως μικροβιακές συγκεντρώσεις, κοινότητες βιοσυσσωμάτωσης ή επίφυτα. Τα βιοϋμένια ή αλλιώς βιοφίλμ σχηματίζονται από εξωκυτταρικά πολυμερή (EPS) που εκκρίνουν οι μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, γλυκοπρωτεϊνών και γλυκολιπιδίων. Η εξωκυτταρική μήτρα αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του βιοφίλμ και αποτελείται κυρίως από εξωπολυσακχαρίτες, με εσωτερικά κανάλια για την κυκλοφορία του νερού, των ενζύμων, θρεπτικών ουσιών και αποβλήτων. Η κοινότητα που σχηματίζει το βιοφίλμ αποτελείται από διάφορα μικροβιακά είδη που απαντώνται σε τοπικά φυσικά υποστρώματα.<sup>27</sup>

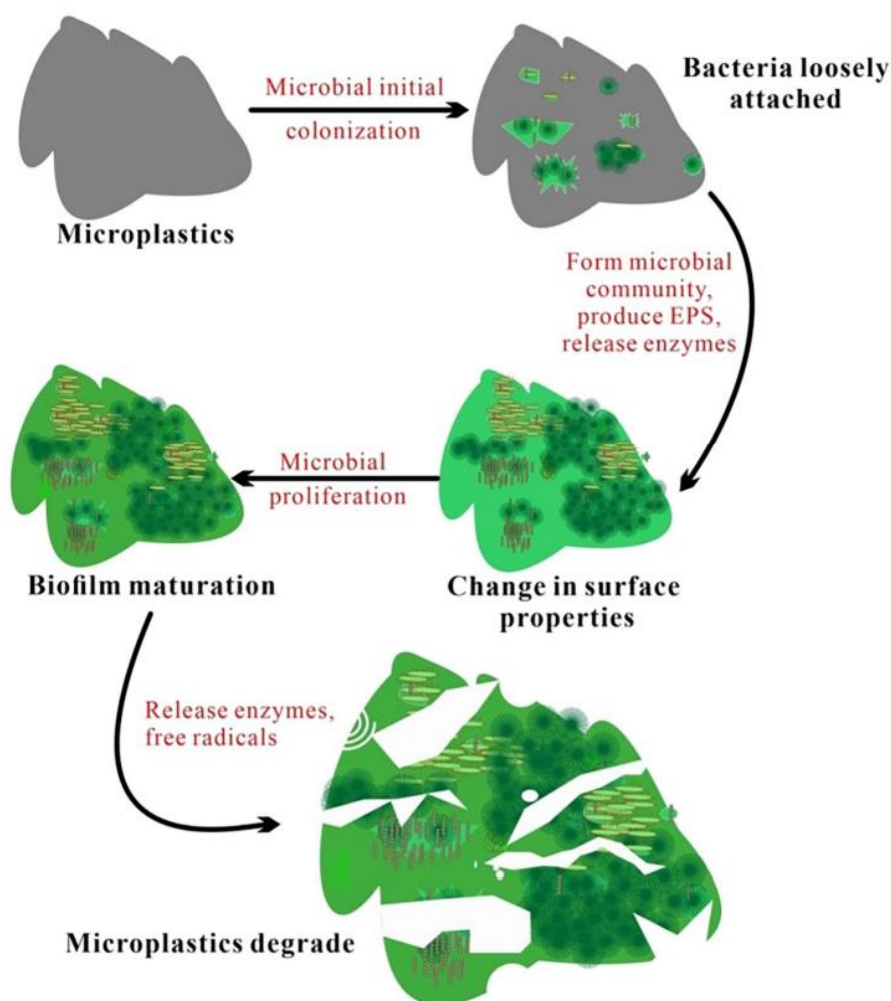
Περιβαλλοντικές παράμετροι επηρεάζουν άμεσα τον αποικισμό και την οικολογική ισορροπία. Το υπόστρωμα επηρεάζει τον επιφανειακό αποικισμό και την οικολογική διαδοχή μέσω της διαθεσιμότητας τοξικών συστατικών και των πρόσθετων ουσιών της πλαστικής μήτρας. Η πλαστική επιφάνεια ρυθμίζει έτσι την επιλεκτικότητα των ειδών μέσω της επίδρασης των λειτουργικών ιδιοτήτων της στο μεταβολισμό των κυττάρων. Για παράδειγμα, υπάρχει αύξηση του μεταβολικού ρυθμού και αλλαγή της βιογεωχημικής δραστηριότητας σε βιοφίλμ συνδεδεμένα με πλαστικά σε σύγκριση με τον τοπικό μικροβιόκοσμο - η συγκέντρωση οξυγόνου αυξάνεται και η έκφραση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έκκριση, τη χημειοταξία, τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και το δεσμευμένο άζωτο τροποποιούνται.<sup>27</sup>

Ο σχηματισμός βιοφίλμ είναι μια δυναμική διαδικασία που περιλαμβάνει μικροβιακή προσκόλληση, έκκριση EPS και μικροβιακό πολλαπλασιασμό. Η διεργασία σχηματισμού βιοφίλμ περιλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια:

1. Προσκόλληση μικροοργανισμών στην επιφάνεια του υποστρώματος στο υδάτινο περιβάλλον
2. Έκκριση των EPS από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι είναι προσκολλημένοι στην επιφάνεια του υποστρώματος
3. Πολλαπλασιασμός αυτών των μικροοργανισμών στην επιφάνεια του υποστρώματος
4. Σχηματισμός βιοφίλμ στην επιφάνεια του υποστρώματος<sup>25</sup>



Εικόνα 16: Στάδια σχηματισμού βιοφίλμ και αποικισμού επιφανειών μικροπλαστικών<sup>27</sup>



Εικόνα 17: Στάδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοφίλμ και στην αποικοδόμηση μικροπλαστικών<sup>25</sup>

Σε μια μελέτη της συμπεριφοράς των μικροπλαστικών στο φυσικό περιβάλλον, διαπιστώθηκε ότι μόλις τα μικροπλαστικά εισέλθουν στο υδάτινο περιβάλλον, μικροοργανισμοί αποικίζουν γρήγορα την επιφάνεια των μικροπλαστικών, σχηματίζοντας έτσι ένα σταθερό βιοφίλμ. Εκτός από την ενίσχυση της προσρόφησης των ρύπων από τα μικροπλαστικά, συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί στα βιοϋμένια μπορούν επίσης να αποδομήσουν τους οργανικούς ρύπους. Το πιο σημαντικό είναι ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ βιοϋμενίων και μικροπλαστικών μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του πολυμερούς, με αποτέλεσμα τη βιοαποικοδόμηση των μικροπλαστικών.<sup>25</sup>

### 1.5.1. Αποδόμηση μικροπλαστικών από το βιοφίλμ

Όπως έχει αναφερθεί, τα βιοφίλμ μπορούν να αποδομήσουν τα μικροπλαστικά αλλάζοντας τις φυσικές, δομικές και λειτουργικές ιδιότητές τους. Οι μέθοδοι για την αξιολόγηση αποικοδόμησης συνοπτικά είναι οι εξής:

- Μέθοδος απώλειας βάρους: περιλαμβάνει τη μέτρηση της απώλειας βάρους των σωματιδίων κατά τη διάρκεια μιας καθορισμένης περιόδου κατά τη διάρκεια κατά την οποία λειτουργούν οι διεργασίες αποικοδόμησης.
- Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier με εξασθενημένη ολική ανάκλαση (FTIR-ATR): η δεύτερη προσέγγιση για την τεκμηρίωση της υποβάθμισης



των πλαστικών είναι η χρήση FTIR-ATR για την αξιολόγηση των δομικών αλλαγών στη δομή του πολυμερούς πριν και μετά από μια δεδομένη διαδικασία αποδόμησης

- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM): η τρίτη προσέγγιση για την αξιολόγηση της αποικοδόμησης των μικροπλαστικών είναι η σύγκριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών της επιφάνειας των μικροπλαστικών πριν και μετά την επεξεργασία με τη χρήση SEM. Η ανάπτυξη ρωγμών, αυλακώσεων, πόρων και άλλων αλλαγών στην επιφανειακή τραχύτητα στις επιφάνειες των επεξεργασμένων σωματιδίων θεωρείται δείκτης διάβρωσης και αποδόμησης από τα βιοϋμένια.
- Χρωματογραφία διαπερατότητας γέλης (GPC): η τέταρτη αναλυτική προσέγγιση χρησιμοποίησε την GPC για τη μέτρηση της αριθμητικής μέσης μοριακής μάζας  $M_n$ , και των μεταβολών της μέσης μοριακής μάζας κατά βάρος  $M_w$  πριν και μετά την αποικοδόμηση.
- Αξιολόγηση της αποικοδόμησης των μικροπλαστικών με φυσικοχημικές μεταβολές: η αποικοδόμηση των μικροπλαστικών μπορεί επίσης να εκτιμηθεί από τις μεταβολές των φυσικών (υδροφοβικότητα, συμπιεστότητα, κρυσταλλικότητα και ακαμψία) και χημικών ιδιοτήτων των επιφανειών των πλαστικών.<sup>25</sup>

Από τις παραπάνω προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της αποικοδόμησης μικροπλαστικών από τα βιοϋμένια, η μέτρηση απώλειας βάρους είναι η απλούστερη και ευκολότερη, για αυτό το λόγο είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη. Αυτή η μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί και στην παρούσα διεργασία.

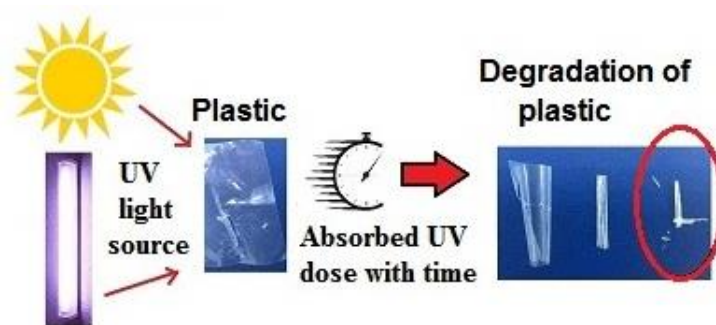
## 1.6. Ακτινοβολία UV και αποδόμηση

Η οπτική ακτινοβολία εντός του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος περιλαμβάνει την υπεριώδη ακτινοβολία (UVR), το ορατό φως και την υπέρυθη ακτινοβολία. Η υπεριώδης ακτινοβολία, ορίζεται ως η ακτινοβολία μήκους μεταξύ 100 και 400 νανομέτρων (nm). Διακρίνεται περαιτέρω ανάλογα με το μήκος κύματος σε υπεριώδη ακτινοβολία A (315-400 nm), B (280-315 nm) και C (100-280 nm).<sup>28</sup>

- UVA. Η πιο συνηθισμένη υπεριώδης ακτίνα του ήλιου και πιο επικίνδυνη, η UVA μπορεί να διεισδύσει στο δέρμα μέχρι τη μεσαία στιβάδα.
- UVB. Ένα μικρότερο μήκος κύματος από την UVA που μπορεί να διαπεράσει το δέρμα μόνο μέχρι την ανώτερη στιβάδα. Ορισμένες ακτίνες UVB σταματούν από το στρώμα όζοντος της γης- μπορούν επίσης να σταματήσουν από επεξεργασμένο γυαλί.
- UVC. Όλες οι ακτίνες UVC από τον ήλιο σταματούν από το στρώμα του όζοντος- επομένως, η μόνη έκθεση των ανθρώπων σε UVC είναι από τεχνητές πηγές όπως τα λέιζερ ή οι φακοί συγκόλλησης.<sup>29</sup>

Στο περιβάλλον, η αποσάθρωση των πολυμερών προκαλείται συνήθως από φωτοοξείδωση, φωτοθερμική οξείδωση, μηχανική τριβή (ΜΑ), υδρόλυση και βιοαποικοδόμηση. Τα περισσότερα συνθετικά πολυμερή με χρωμοφόρα ομάδα υφίστανται φωτοχημική αντίδραση για να απορροφήσουν υπεριώδη (UV) ακτινοβολία. Οι φωτοχημικές αντιδράσεις που προκαλούνται από την απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας προκαλούν οξείδωση, η οποία καθιστά τα πλαστικά ευάλωτα και εύθραυστα λόγω της μειωμένης ελαστικότητας. Μικρά και μεγάλα πλαστικά απορρίμματα που επιπλέουν σε επιφάνειες της θάλασσας ή που ξεβράζονται στην ακτή μπορούν να κατακερματιστούν σε μικροπλαστικά. Μόλις τα πλαστικά απορριφθούν σε αντίξοα περιβάλλοντα, οι επιφάνειές τους γίνονται

αδύναμες λόγω της έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία και την οξείδωση, γεγονός που πιθανώς δημιουργεί μικροπλαστικά μέσω τριβής από τον άνεμο, τα κύματα και την άμμο. Τα κοινά πολυμερή που εκτίθενται στο θαλάσσιο περιβάλλον επηρεάζονται αρνητικά από την ηλιακή ακτινοβολία (κυρίως UV-B), η οποία προκαλεί φωτοοξειδωτική αποικοδόμηση. Η φωτοοξειδωτική και φωτοθερμικά οξειδωτική αποικοδόμηση μπορεί να έχει μεγαλύτερες επιπτώσεις στα πλαστικά στις παραλίες από ό,τι στην επιφάνεια της θάλασσας και στον πυθμένα, λόγω της υψηλότερης διαθεσιμότητας της υπεριώδους ακτινοβολίας και του οξυγόνου σε συνδυασμό με την υψηλότερη θερμοκρασία.<sup>30</sup>



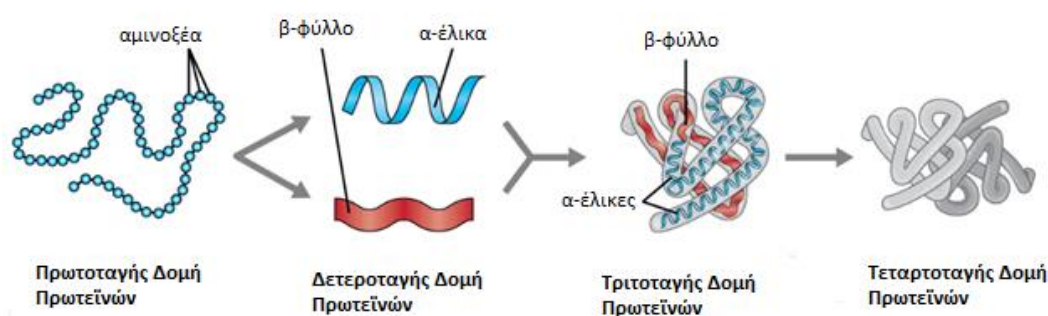
Εικόνα 18: Το υπεριώδες φως επιταχύνει την αποδόμηση των πλαστικών<sup>31</sup>

Η έκταση της διάβρωσης του πλαστικού αντιστοιχεί στις χημικές και φυσικές τροποποιήσεις που υφίσταται το πλαστικό ανάλογα με το χρόνο έκθεσής του στην υπεριώδη ακτινοβολία και τις εξωτερικές συνθήκες διάβρωσης. Δεν αποτελεί απόλυτο κριτήριο ούτε μια δεδομένη τιμή προς προσδιορισμό, αλλά μάλλον ένα σχετικό κριτήριο που επιτρέπει τη σύγκριση του βαθμού γήρανσης διαφορετικών πλαστικών δειγμάτων καθώς μπορεί να οριστεί από μία ή περισσότερες παραμέτρους ανάλογα με τη μελέτη. Επίσης, ανάλογα με το πολυμερές και τις συνθήκες διαβίωσης (ακτινοβολία, θερμοκρασία, διαπερατότητα οξυγόνου κ.λπ.) το πάχος του αποδομημένου στρώματος μπορεί να περιοριστεί σε μερικές δεκάδες μικρόμετρα ή και λιγότερο. Συμπερασματικά, η διάβρωση από υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε κατακερματισμό και σχηματισμό μικρότερων πλαστικών σωματιδίων σε κλίμακα νάνο. Λίγα είναι ακόμη γνωστά για το νανοκλάσμα και τις επιπτώσεις του στο περιβάλλον. Συνεπώς, είναι σημαντικό να διεξαχθούν περισσότερες έρευνες σχετικά με το σχηματισμό και αντίκτυπο αυτού του νανοκλάσματος.<sup>32</sup>

### 1.7. Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από άτομα άνθρακα, υδρογόνου, οξυγόνου, αζώτου και συνήθως θείου. Είναι οι πιο άφθονες οργανικές ενώσεις σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και αποτελούν περίπου το 58% του ξηρού βάρους ενός βακτηριακού κυττάρου. Αυτό το υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών υποδηλώνει τους ουσιαστικούς και ποικίλους ρόλους αυτών των οργανικών ενώσεων.<sup>33</sup> Οι πρωτεΐνες είναι παρούσες σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και περιλαμβάνουν πολλές βασικές βιολογικές ενώσεις, όπως τα ένζυμα, οι ορμόνες και τα αντισώματα. Είναι απαραίτητες για τη ζωή και για ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών δραστηριοτήτων. Τα πρωτεϊνικά ένζυμα καταλύουν τη συντριπτική πλειονότητα των χημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στο κύτταρο. Οι πρωτεΐνες παρέχουν πολλά από τα δομικά στοιχεία ενός κυττάρου και βοηθούν στη σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους σε ιστούς. Επιπλέον, ελέγχουν τη δραστηριότητα των γονιδίων και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση.<sup>34</sup>

Οι πρωτεΐνες είναι μη διακλαδισμένα πολυμερή που δομούνται από μονομερή που περιέχουν άζωτο και ονομάζονται αμινοξέα. Στο κέντρο κάθε αμινοξέος βρίσκεται ένα άτομο άνθρακα συνδεδεμένο με δύο λειτουργικές ομάδες: μια αμινομάδα ( $-\text{NH}_2$ ) και μια καρβοξυλομάδα ( $-\text{COOH}$ ). Στον άνθρακα συνδέεται επίσης μια πλευρική αλυσίδα, που ονομάζεται ομάδα R ( $-R$ ). Κάθε ένα από τα 20 αμινοξέα διαφέρει μόνο ως προς τα άτομα που αποτελούν την ομάδα R. Αυτές οι πλευρικές αλυσίδες, πολλές από τις οποίες είναι λειτουργικές ομάδες, είναι απαραίτητες για τη διαμόρφωση του τελικού σχήματος και της λειτουργίας των πρωτεϊνών.<sup>33</sup> Η δομή των πρωτεϊνών κατηγοριοποιείται σε τέσσερα επίπεδα: πρωτογενές, δευτερογενές, τριτογενές και τεταρτογενές. Η πρωτογενής δομή είναι απλώς η αλληλουχία των αμινοξέων που συνθέτουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η αλυσίδα των αμινοξέων που καθορίζει την πρωταρχική δομή μιας πρωτεΐνης δεν είναι άκαμπτη, αλλά αντίθετα είναι εύκαμπτη λόγω της φύσης των δεσμών που συγκρατούν τα αμινοξέα μεταξύ τους. Όταν η αλυσίδα είναι αρκετά μεγάλη, μπορεί να εμφανιστεί δεσμός υδρογόνου μεταξύ λειτουργικών ομάδων αμινών και καρβονυλίων εντός της πεπτιδικής αλυσίδας (εξαιρουμένης της πλευρικής ομάδας R), με αποτέλεσμα την τοπική αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε έλικες και φύλλα. Τα σχήματα αυτά αποτελούν τη δευτερογενή δομή μιας πρωτεΐνης. Το επόμενο επίπεδο οργάνωσης των πρωτεϊνών είναι η τριτοταγής δομή, η οποία είναι το τρισδιάστατο σχήμα μεγάλης κλίμακας μιας ενιαίας πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η τριτοταγής δομή καθορίζεται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ καταλοίπων αμινοξέων που απέχουν πολύ μεταξύ τους στην αλυσίδα. Μια ποικιλία αλληλεπιδράσεων προκαλεί την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, όπως οι δισουλφιδικές γέφυρες, οι οποίες είναι δεσμοί μεταξύ των λειτουργικών ομάδων σουλφυδρυλίου ( $-\text{SH}$ ) στις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων, οι δεσμοί υδρογόνου, οι ιοντικοί δεσμοί και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μη πολικών πλευρικών αλυσίδων. Όλες αυτές οι αλληλεπιδράσεις, ασθενείς και ισχυρές, συνδυάζονται για να καθορίσουν το τελικό τρισδιάστατο σχήμα της πρωτεΐνης και τη λειτουργία της. Ορισμένες πρωτεΐνες είναι σύνολα από διάφορα ξεχωριστά πολυπεπίδια, γνωστά και ως πρωτεϊνικές υπομονάδες. Αυτές οι πρωτεΐνες λειτουργούν επαρκώς μόνο όταν όλες οι υπομονάδες είναι παρούσες και κατάλληλα διαμορφωμένες. Οι αλληλεπιδράσεις που συγκρατούν αυτές τις υπομονάδες μαζί αποτελούν την τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Η συνολική τεταρτοταγής δομή σταθεροποιείται από σχετικά ασθενείς αλληλεπιδράσεις.<sup>35</sup>



Εικόνα 19: Τέσσερα επίπεδα οργάνωσης της δομής των πρωτεϊνών<sup>35</sup>

### 1.7.1. Πρωτεΐνες στο βιοφίλμ

Όπως έχει αναλυθεί στην ενότητα 1.3, οι μικροοργανισμοί στο φυσικό περιβάλλον συνήθως ζουν πάνω ή σε στενή σχέση με επιφάνειες και κατά κύριο λόγο υπάρχουν ως

βιοϋμένια, μικροβιακές κοινότητες, προσκολλημένες στην επιφάνεια, που αποτελούνται από κύτταρα και εξωκυτταρική μήτρα.<sup>36</sup> Στα βακτήρια, μία από τις επικρατέστερες διεργασίες στις οποίες τα λειτουργικά αμυλοειδή (πολύ σταθερή, μη διακλαδισμένη, ινώδης τεταρτοταγής δομή που περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες μονάδες β-νημάτων από πρωτεϊνικά ή πεπτιδικά μονομερή<sup>37</sup>) έχουν βιολογικό ρόλο είναι στο πλαίσιο της πολυκυτταρικής συμπεριφοράς και του σχηματισμού βιοφίλμ. Τα βιοφίλμ είναι η πιο συνηθισμένη βακτηριακή ανάπτυξη στο φυσικό περιβάλλον, στην ιατρική και στη βιομηχανία.<sup>38</sup> Οι ακριβείς συνθέσεις των βιοφίλμ διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών και των συνθηκών ανάπτυξης υπό τις οποίες σχηματίζονται τα βιοϋμένια, αλλά γενικά αποτελούνται από εξωπολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Τα πρωτεϊνικά συστατικά περιλαμβάνουν τις προσκολλητικές ουσίες της κυτταρικής επιφάνειας, τις πρωτεϊνικές υπομονάδες των μαστίγιων και των βλεφαρίδων, τις εκκρινόμενες εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες των εξωτερικών μεμβρανών.<sup>36</sup> Στα βιοφίλμ, τα βακτήρια ενσωματώνονται σε μια εξωκυτταρική μήτρα που παρέχει δομική ακεραιότητα, προστατεύει τα βακτήρια από τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος και τις αντιμικροβιακές θεραπείες, ευνοεί την προσρόφηση θρεπτικών ουσιών και διατηρεί τα εξωκυτταρικά ένζυμα κοντά στα κύτταρα. Τα αμυλοειδή είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για τη συναρμολόγηση της μήτρας του βιοφίλμ στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, επειδή παρέχουν ένα σταθερό πλαίσιο για την εγγενή αντοχή του έναντι της πέψης και της μετουσίωσης από πρωτεάσες.<sup>38</sup> Οι πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας, οι βλεφαρίδες και τα μαστίγια συμμετέχουν στην αρχική προσκόλληση στις επιφάνειες και, σε ορισμένους μικροοργανισμούς, εμπλέκονται επίσης στη μετανάστευση κατά μήκος των επιφανειών, διευκολύνοντας έτσι τον επιφανειακό αποικισμό.<sup>36</sup>

Τα αμυλοειδή μπορούν επίσης να τροποποιήσουν τις ιδιοελαστικές ιδιότητες των εξωκυτταρικών μητρών βοηθώντας τα βιοφίλμ να προσαρμόζονται και να ανταποκρίνονται στις περιβαλλοντικές διακυμάνσεις. Ως εκ τούτου, πρωτεΐνες με αμυλοειδή ή αμυλοειδούς μορφής διαμόρφωση έχουν αποδειχθεί ευρέως διαδεδομένες στα βιοφίλμ πολλών μη συγγενών βακτηρίων.<sup>38</sup> Οι πρωτεΐνες συμβάλλουν στη δομή και τη σταθερότητα του βιοϋμένιου. Οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίστηκαν κυρίως από μελέτες μετάλλαξης, οι οποίες έδειξαν ότι η απουσία των πρωτεϊνών της μήτρας οδηγεί σε μειωμένο σχηματισμό και σταθερότητα του βιοϋμένιου, καθώς και σε τροποποιημένη αρχιτεκτονική του βιοϋμένιου.<sup>36</sup> Για τον προσδιορισμό της κατάστασης του βιοϋμένιου γίνεται πρωτεϊνική ανάλυση. Σκοπός της ανάλυσης πρωτεϊνών είναι να προσδιοριστεί η ποσότητα ή η συγκέντρωση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης ή μιας σειράς διαφορετικών πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Η απομόνωση και η ανίχνευση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται για πολλές κλινικές και ερευνητικές διαδικασίες. Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι πρωτεϊνικών αναλύσεων και παραλλαγές των κυριότερων τεχνικών.<sup>39</sup>

### 1.8. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετηθεί η τύχη και αποδόμηση κατόπιν επίδρασης περιβαλλοντικών συνθηκών δύο διαφορετικών βιοπλαστικών, των PLA και PBAT ξεχωριστά αλλά και ενισχυμένα. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι κατηγορίες PLA4043D και ECOFLEX αντίστοιχα και συνδυασμένα με φλούδες κόκκων καφέ (CS) και αργίλους μοντμοριλλονίτη (MMT Clays). Στο πλαίσιο αυτό, πραγματοποιήθηκαν τα κάτωθι:

- α) Μελέτη συμπεριφοράς βακτηριακής κοινότητας στο θαλάσσιο περιβάλλον και στο έδαφος

- β) Μελέτη βιοϋμενίου στην επιφάνεια των βιοπλαστικών μετά από επίδραση του θαλασσινού νερού και του χώματος
- γ) Προσδιορισμός ποσοστού αποδόμησης κατόπιν επίδρασης θαλασσινού νερού, χώματος και παλαίωσης
- δ) Μελέτη πρωτεϊνών του βιοϋμενίου στην επιφάνεια των βιοπλαστικών

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1. Υλικά

#### Συσκευές και Όργανα

- Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific)
- Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (K103 Elvem)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- Υδατόλουτρο (GFL)
- Ζυγός ακριβείας (OHAUS)
- Ζυγός KERN 440-21A
- Vortex
- Συσκευή ανάδευσης
- Συσκευή διήθησης υπό κενό (PALL Gelman Laboratory)
- Cooled incubator (VELP Scientific)
- Αναγνώστης microplate EZ Read 400 (Biochrom)

#### Εργαστηριακά Υλικά

- Τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm
- Τρυβλία Petri διαμέτρου 6cm
- Φιάλες διήθησης (Whatman)
- Φίλτρα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,45μm (Whatman)
- Σωληνάρια φυγοκέντρου Falcon 50mL
- Microplate 96 θέσεων

#### Θρεπτικά Υλικά

- Nutrient Agar (NEOGEN)
- Nutrient Broth (NEOGEN)

### 2.2. Πειραματική Διαδικασία

#### 2.2.1. Προετοιμασία Δειγμάτων

Τα βιοπλαστικά που μελετήθηκαν στο πείραμα προέρχονται από το Instituto Italiano di Tecnologia (IIT) και οι ονομασίες τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

*Πίνακας 1: Ονομασίες βιοπλαστικών*

(1) PLA4043D + 30%CS
(2) ECOFLEX + 30%CS
(3) PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays
(4) PLA4043D
(5) ECOFLEX (PBAT)

Όπως είναι προφανές, τα δύο βασικά βιοπλαστικά είναι το PLA4043D και το Ecoflex PBAT. Το CS (Coffee Silverskin ή αλλιώς φλούδες κόκκων καφέ) αποτελεί οργανικό παραπροϊόν που παράγεται κατά το καβούρδισμα των κόκκων καφέ<sup>40</sup>. MMT Clays (Montmorillonite Clays ή



αλλιώς άργιλοι μοντμοριλλονίτη) ονομάζονται μικροσκοπικοί κρύσταλλοι με μαλακή ομάδα φυλλοπυριτικών ορυκτών που σχηματίζονται μέσω κατακρήμνισης διαλύματος νερού. Το MMT χρησιμοποιείται συμπληρωματικά σε υλικά που πρέπει να έχουν χαμηλή διαπερατότητα σε υδρατμούς ή αέρια με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως συσκευασία.<sup>41</sup> Τα CS και MMTClays αναμείχθηκαν με τα βασικά βιοπλαστικά και δημιούργησαν τα πέντε δείγματα που μελετήθηκαν.

Παρακάτω φαίνονται τα δείγματα όπως παραλήφθηκαν από το ινστιτούτο με τις ονομασίες τους και αριθμημένα, για ευκολότερη χρήση κατά τη διάρκεια του πειράματος, με βάση τον Πίνακα 1:



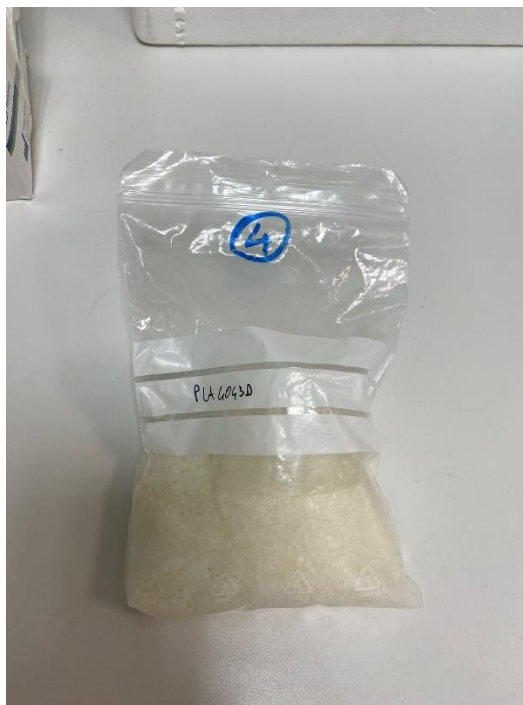
Εικόνα 20: PLA4043D+30%CS



Εικόνα 21: ECOFLEX+30%CS



Εικόνα 23:  
PLA4043D+ECOFLEX+30%CS+8%MMTclays



Εικόνα 22: PLA4043D



Εικόνα 24: ECOFLEX(PBAT)

Για την διεξαγωγή όλων των πειραματικών διαδικασιών (ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας στο νερό, ανάλυση της βακτηριακής κοινότητας στο χώμα και μελέτη παλαίωσης) ήταν απαραίτητη η προετοιμασία των βιοπλαστικών σε τετράγωνα δείγματα με διαστάσεις 1,5cm×1,5cm. Ακολουθεί φωτογραφία των δειγμάτων όπως προετοιμάστηκαν για τα πειράματα, αριθμημένα με βάση τον Πίνακα 1:





Εικόνα 25: Δείγματα βιοπλαστικών

Όλα τα δείγματα βιοπλαστικών που μελετήθηκαν στο πείραμα, είτε στο υδάτινο περιβάλλον είτε στο έδαφος, ζυγίστηκαν πριν από την αρχή του κάθε πειράματος καθώς θα ελεγχθεί και η διαφορά του βάρους τους ως ένας τρόπος μελέτης της βιοαποδόμησής τους.

### **2.2.2. Έλεγχος συμπεριφοράς βιοπλαστικών στο θαλασσινό νερό** **Προετοιμασία πειράματος**

Το θαλασσινό νερό που χρησιμοποιήθηκε ως περιβάλλον των πλαστικών στο πείραμα προέρχεται από την περιοχή της Σούδας του Ν. Χανίων. Το νερό του κόλπου της Σούδας χαρακτηρίζεται από κρυστάλλινη διαύγεια και υψηλή αλατότητα, που αποδίδεται στις υδρολογικές συνθήκες της περιοχής και στην επίδραση του Αιγαίου Πελάγους, όπως αναφέρεται σε επιστημονικές μελέτες που διεξήχθησαν από το Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών. Σε αποστειρωμένες γυάλινες φιάλες των 500mL τοποθετήθηκαν 250mL από το θαλασσινό νερό. Για να ξεκινήσει το πείραμα και να είναι εφικτή η ανάπτυξη μικροοργανισμών ήταν απαραίτητο να γίνει εμβολιασμός των φιαλών με βιομάζα θαλάσσιων μικροοργανισμών. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν 5 διηθήσεις του θαλασσινού νερού με σκοπό να απομονωθούν οι μικροοργανισμοί. Τα φίλτρα διήθησης έχουν διάμετρο πόρων 0,45μm, μικρότερη από αυτή των μικροοργανισμών, έτσι συγκρατούνται πάνω στο φίλτρο μετά τη διήθηση. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και διήθηση απιονισμένου, αποστειρωμένου νερού για να χρησιμοποιηθεί ως control.



Εικόνα 26: Διηθήσεις θαλασσινού νερού

Έπειτα, τα φίλτρα τοποθετήθηκαν προσεκτικά σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υλικό (Nutrient Agar) και ακολούθησε επώαση σε ειδικό θάλαμο για 24h στους 37°C ώστε να αναπτυχθούν αποικίες μικροοργανισμών. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές ώστε να υπάρχει αρκετή βιομάζα για όλες τις φιάλες.

Σε άλλη αποστειρωμένη γυάλινη φιάλη του 1L τοποθετήθηκαν 800mL αποστειρωμένου νερού και πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός της βιομάζας από όλα τα φίλτρα με ειδικούς κρίκους εμβολιασμού και ακολούθησε καλή ανάδευση. Από το συγκεκριμένο διάλυμα συμπληρώθηκαν 50mL στις φιάλες που θα τοποθετηθούν τα πλαστικά και στο control, οπότε συνολικά ο όγκος νερού στις φιάλες ήταν 300mL. Τέλος, τοποθετήθηκε σε κάθε φιάλη ένα δείγμα από κάθε βιοπλαστικό. Συνολικά υπήρχαν 16 φιάλες (5 για κάθε πλαστικό X 3 χρονικά στάδια και 1 control) τα οποία παρέμειναν στο χώρο του εργαστηρίου (περίπου 25°C) για όλη τη διάρκεια του πειράματος, που ήταν 135d χωρισμένες σε 3 στάδια των 45d, ως εξής:

Πίνακας 2: Χρονικά στάδια πειραμάτων

A στάδιο	0-45d
B στάδιο	45-90d
Γ στάδιο	90-135d



Εικόνα 27: Διάταξη των φιαλών στο χώρο του εργαστηρίου

### Πειραματική διαδικασία

Αναφέρεται αναλυτικά η διαδικασία καλλιέργειας βακτηρίων:

- Καλή ανάδευση των φιαλών
- Λήψη 1mL θαλασσινού νερού από τις 5 φιάλες που περιείχαν δείγματα πλαστικών του εκάστοτε χρονικού σταδίου και του control
- Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις για κάθε δείγμα και για το control
- Επίστρωση 100μL με κρίκο εμβολιασμού σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Nutrient Agar για κάθε δείγμα
- Επώαση των τρυβλίων στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 24h
- Μέτρηση των αποικιών βακτηρίων που αναπτύχθηκαν

Με βάση αυτό τον αριθμό αποικιών και με μαθηματικό τύπο, υπολογιζόταν ο αριθμός CFUs/mL (Colony-forming units/mL) για κάθε δείγμα και για το control. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβανόταν δύο φορές την εβδομάδα για το πρώτο στάδιο 45d. Στα επόμενα δύο στάδια οι δειγματοληψίες ελαττώθηκαν σε μία φορά την εβδομάδα καθώς παρατηρήθηκε ότι οι προηγούμενες μετρήσεις έδιναν κοινά μεταξύ τους αποτελέσματα.

Για να διατηρηθούν οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών σε μετρήσιμα επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος χρειαζόνταν επιπλέον τροφοδότηση 10mL από το θρεπτικό υλικό Nutrient Broth σε όλες τις φιάλες (300mL) ανά 30 με 35d.



Εικόνα 28: Καλλιέργεια βακτηρίων από δείγμα θαλασσινού νερού

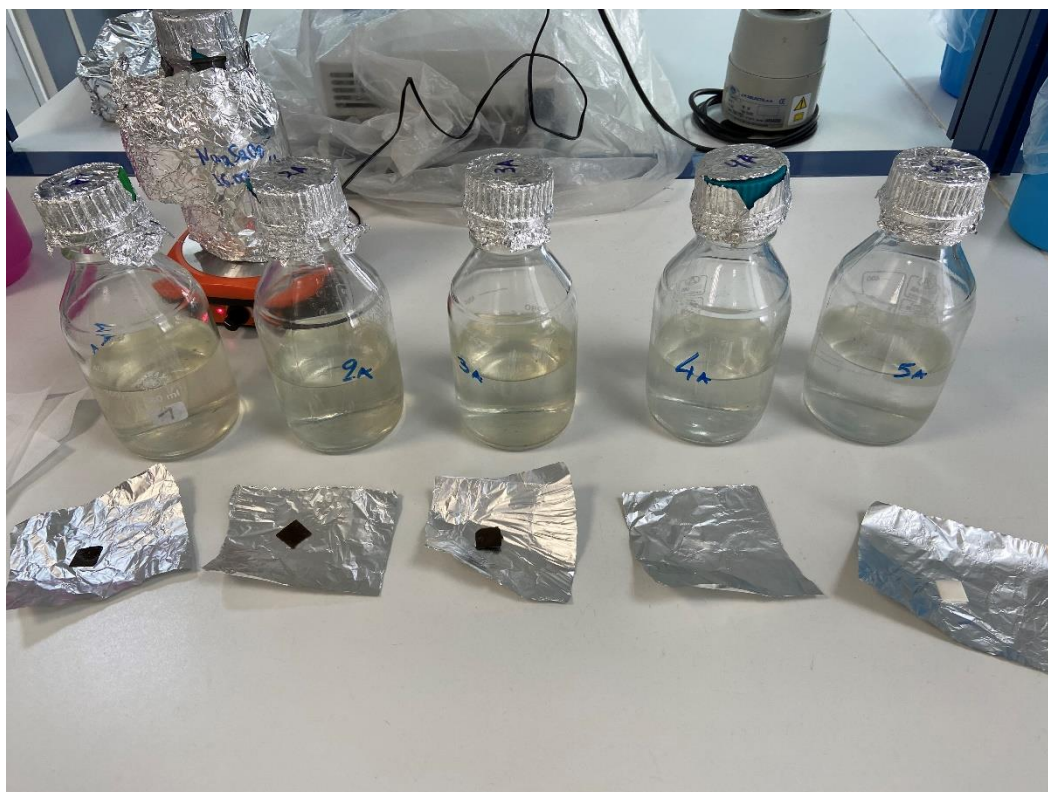
### Μελέτη ανάπτυξης βιοϋμενίου

Μετά το πέρας των 45d της κάθε χρονικής περιόδου πραγματοποιούνταν ζύγισμα των βιοπλαστικών που παρέμεναν στο θαλασσινό νερό και μελέτη του βιοϋμενίου ή βιοφίλμ που αναπτυσσόταν στην επιφάνεια του υλικού. Η διαδικασία περιλάμβανε τα εξής:

- Ανάκτηση των 5 δειγμάτων πλαστικών από τις φιάλες νερού του εκάστοτε σταδίου
- Ανάμειξη των πλαστικών με 50mL αποστειρωμένο νερό σε σωληνάρια ακριβείας Falcon και καλή ανάδευση
- Αφαίρεση από το σωληνάριο και ξήρανση στον κλίβανο στους 40°C για 45min
- Ζύγισμα των βιοπλαστικών μετά την ξήρανση
- Από το διάλυμα που απομένει στο σωληνάριο (έκπλυμα) πραγματοποιούνται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, όπου κρίνεται απαραίτητο
- Επίστρωση 100μL σε τρυβλία Nutrient Agar από το έκπλυμα κάθε δείγματος
- Επώαση στους 37°C για 24h
- Μέτρηση των αποικιών βακτηρίων που αναπτύχθηκαν

Με βάση τον αριθμό αποικιών και την επιφάνεια του πλαστικού, υπολογιζόταν ο αριθμός των CFUs/cm<sup>2</sup> για κάθε δείγμα.





Εικόνα 29: Ανάκτηση των πλαστικών Α' χρονικού σταδίου

### 2.2.3. Έλεγχος συμπεριφοράς βιοπλαστικών στο χώμα

#### Προετοιμασία πειράματος

Το χώμα που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα ως περιβάλλον των βιοπλαστικών συλλέχθηκε από την περιοχή του Πολυτεχνείου Κρήτης στα Κουνουπιδιανά Χανίων. Αρχικά, ήταν σημαντικό να αναμειχθεί όλο το χώμα και να γίνει ανάδευση ώστε να επιτευχθεί ίδια σύσταση. Στη συνέχεια μοιράστηκε σε πλαστικά δοχεία. Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν ήταν απαραίτητο να γίνει εφοδιασμός βιομάζας για την ανάπτυξη μικροοργανισμών όπως στο Κεφάλαιο 2.2.2. Σε κάθε δοχείο τοποθετήθηκαν 1000g χώματος και από ένα δείγμα πλαστικού στα 5cm περίπου από την επιφάνεια του χώματος. Επιπλέον, τοποθετήθηκε και ένα δοχείο Control που περιείχε μόνο το χώμα. Συνολικά υπήρχαν 16 δοχεία (5 για κάθε υλικό X 3 χρονικά στάδια και 1 control). Παρέμειναν σε εξωτερικό χώρο, σε πραγματικές συνθήκες περιβάλλοντος καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.





Εικόνα 30: Διάταξη των δοχείων σε εξωτερικό χώρο

Συνολικά και αυτό το πείραμα διήρκησε 135d χωρισμένες σε τρία στάδια των 45d.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι εξωτερικές συνθήκες περιβάλλοντος στα Χανιά κατά τη διάρκεια του πειράματος:

Πίνακας 3: Καιρικές συνθήκες στα Χανιά κατά την περίοδο του πειράματος

	Πρώτο στάδιο (0-45d)	Δεύτερο στάδιο (45-90d)	Τρίτο στάδιο (90-135d)
Μέση θερμοκρασία (°C)	18	13	12
Ποσοστό υγρασίας (%)	71	75	74
Μέσο ύψος βροχόπτωσης (mm)	54	85	89



Μέση ταχύτητα ανέμου (km/h)	8,2	9,85	12,5
Ηλιακή ακτινοβολία (W/m <sup>2</sup> )	0,1·10 <sup>3</sup>	0,025·10 <sup>3</sup>	0,025·10 <sup>3</sup>

### Πειραματική διαδικασία

Απαραίτητη παράμετρος για τον υπολογισμό της ανάπτυξης μικροοργανισμών στο χώμα ήταν ο συντελεστής βαρομετρικής περιεχόμενης υγρασίας  $\theta_g$ . Για τον υπολογισμό αυτού ελήφθησαν 22g από το αναμειγμένο, ομοιόμορφο νωπό χώμα και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για ξήρανση στους 107°C για 24h. Έπειτα, ζυγίστηκε η πλέον ξηρή ποσότητα χώματος και υπολογίστηκε με μαθηματικό τύπο η βαρομετρική περιεχόμενη υγρασία:

$$\theta_g = 0,0265$$

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η διαδικασία δειγματοληψίας χώματος και καλλιέργειας βακτηρίων:

- Λήψη 10g χώματος από τα 5 δοχεία που περιείχαν δείγματα πλαστικών του εκάστοτε χρονικού σταδίου και του control
- Διάλυση των 10g σε 95mL αποστειρωμένο νερό ώστε να δημιουργηθεί η πρώτη αραιώση 10<sup>-1</sup> και ανάδευση
- Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις για κάθε δείγμα και για το control
- Επίστρωση 100μL με κρίκο εμβολιασμού σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό Nutrient Agar για κάθε δείγμα
- Επώαση των τρυβλίων στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 24h
- Μέτρηση των αποικιών βακτηρίων που αναπτύχθηκαν



Εικόνα 31: Καλλιέργεια βακτηρίων από δείγμα χώματος

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιούταν κάθε 10d και, με μαθηματικό τύπο, υπολογιζόταν ο αριθμός CFUs/ξηρού χώματος για κάθε δείγμα αλλά και για το control.

### Μελέτη ανάπτυξης βιοϋμενίου

Η διαδικασία είναι όμοια με αυτήν που αναφέρθηκε παραπάνω για το θαλασσινό νερό. Η μόνη διαφορά παρουσιάζεται μετά την ανάκτηση των βιοπλαστικών από τα δοχεία, που ήταν σημαντικό να αφαιρεθεί από την επιφάνεια των πλαστικών το προσκολλημένο χώμα, προσεκτικά ώστε να μην επηρεαστεί το βιοφίλμ.

Και εδώ, με βάση τον αριθμό αποικιών και την επιφάνεια του πλαστικού, υπολογιζόταν ο αριθμός των CFUs/cm<sup>2</sup> για κάθε δείγμα.



Εικόνα 32: Ανάκτηση των πλαστικών Α' χρονικού σταδίου



Εικόνα 33: Διαδικασία ελέγχου βιοφίλμ

#### 2.2.4. Έλεγχος συμπεριφοράς βιοπλαστικών για γήρανση

Παράλληλα με τα παραπάνω δύο πειράματα, ένα δείγμα από κάθε πλαστικό τοποθετήθηκε σε θάλαμο παλαίωσης (Cool Incubator). Η θερμοκρασία στο εσωτερικό του θαλάμου ήταν ρυθμισμένη στους 25°C και η ακτινοβολία (προσομοιωμένο ηλιακό φως) από τις λάμπες στο εσωτερικό του μετρήθηκε  $0,027 \cdot 10^3 \text{ W/m}^2$ .



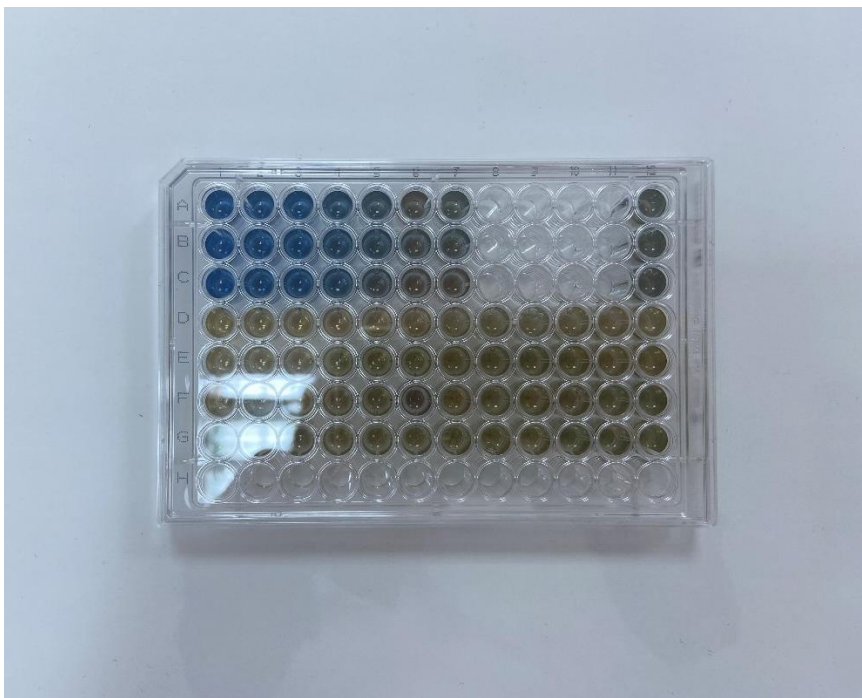
Εικόνα 34: Τοποθέτηση των δειγμάτων στο θάλαμο παλαίωσης

Συνολικά τα δείγματα παρέμειναν εκεί για όλη τη διάρκεια του πειράματος (135d). Κάθε εβδομάδα συγκρινόταν η πρόοδος των πλαστικών με φωτογραφίες, ενώ κάθε 45d πειράματος τα δείγματα επίσης ζυγίζονταν.

### 2.2.5. Μελέτη πρωτεϊνών στο βιοϋμένιο

Επιπρόσθετα, ερευνήθηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του βιοφίλμ στην επιφάνεια των βιοπλαστικών, οπότε ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν τα εκπλύματα βιοπλαστικών από το θαλασσινό νερό και το χώμα. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα θαλασσινού νερού από τις φιάλες μετά την ανάκτηση των υλικών για να προσδιοριστεί αν έχουν μεταφερθεί πρωτεΐνες από το πλαστικό στο υδατικό περιβάλλον. Ακολουθήθηκε η μέθοδος Bradford της εταιρίας BIO-RAD για microplate 96 θέσεων. Η μελέτη πρωτεϊνών Bradford χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Η βασική αρχή αυτής της ανάλυσης είναι ότι η σύνδεση των πρωτεϊνικών μορίων με τη χρωστική Coomassie υπό όξινες συνθήκες έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος από καφέ σε μπλε. Αυτή η μέθοδος στην πραγματικότητα μετρά την παρουσία των βασικών αμινοξικών καταλοίπων, αργινίνης, λυσίνης και ιστιδίνης, τα οποία συμβάλλουν στο σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής. Η χρωματική αλλαγή μετριέται με φασματοφωτόμετρο ή αναγνώστη microplate, συνήθως με τη μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος στα 595 nm.<sup>42</sup>





Εικόνα 35: Microplate δειγμάτων θαλασσινού νερού



Εικόνα 36: Microplate reader

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Υπενθυμίζονται οι ονομασίες των δειγμάτων βιοπλαστικών καθώς και ο χρονικός διαχωρισμός της πειραματικής διαδικασίας:

*Πίνακας 1: Ονομασίες βιοπλαστικών*

(1) PLA4043D + 30%CS
(2) ECOFLEX + 30%CS
(3) PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays
(4) PLA4043D
(5) ECOFLEX (PBAT)

*Πίνακας 2: Χρονικά στάδια πειραμάτων*

A στάδιο	0-45d
B στάδιο	45-90d
Γ στάδιο	90-135d

#### 3.1. Θαλασσινό νερό

Σε σύγκριση με το έδαφος, το θαλάσσιο περιβάλλον χαρακτηρίζεται από χαμηλή θερμοκρασία, υψηλή αλατότητα, υψηλή πίεση, ρεύματα και χαμηλά επίπεδα θρεπτικών συστατικών (π.χ. νιτρικά). Εκτός από τη διακύμανση της θερμοκρασίας μεταξύ διαφορετικών εποχών και διαφορετικών περιοχών, η θερμοκρασία του νερού μεταβάλλεται ανάλογα με το βάθος στην κατακόρυφη διεύθυνση. Η μέση επιφανειακή θερμοκρασία του θαλασσινού νερού είναι 17,4 °C. Το θαλασσινό νερό είναι πλούσιο σε ανόργανα άλατα και η αλατότητα σχετίζεται με την εξάτμιση, τις βροχοπτώσεις, την απορροή ποταμών και τα θαλάσσια ρεύματα. Σε διαφορετικές περιοχές, η αλατότητα ποικίλλει σε διαφορετικά βάθη, ή στην ίδια θαλάσσια περιοχή παρουσιάζει εποχιακές μεταβολές. Η αλατότητα των παράκτιων υδάτων και των εκβολών δεν υπερβαίνει γενικά το 30%, ενώ η αλατότητα της επιφάνειας του ωκεανού κυμαίνεται μεταξύ 32% και 37%, με μέσο όρο 35%. Το θαλασσινό νερό είναι ασθενώς αλκαλικό με τιμές pH≈8,0 και 8,5. Το επιφανειακό θαλασσινό νερό είναι συνήθως σταθερό σε pH=8,1±0,2, ενώ το μεσαίο και βαθύ θαλασσινό νερό κυμαίνεται γενικά μεταξύ 7,8 και 7,5. Η περιεκτικότητα σε διαλυμένο οξυγόνο στο θαλασσινό νερό είναι σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη στο έδαφος, και οι δύο επηρεάζονται από τη θερμοκρασία και συνδέονται στενά με βιολογικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα η παρουσία και η αφθονία ορισμένων θαλάσσιων οργανισμών. Παρόμοια με τους αβιοτικούς παράγοντες (π.χ. αλατότητα, θερμοκρασία, πίεση, υπερώδης ακτινοβολία), το βιολογικό ενδιαίτημα στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι κατακόρυφα δομημένο και παρουσιάζει διαφορετικές θέσεις ειδών ανάλογα με τις ζώνες (π.χ., η επιπελαγική ζώνη (0-200 m), η οποία επηρεάζεται από την υπερώδη ακτινοβολία και τα ρεύματα και η βαθιά ή αβυσσοπελαγική ζώνη, από περίπου 4000 m μέχρι το έδαφος, η οποία είναι εντελώς σκοτεινή, παρουσιάζει υψηλή πίεση και χαμηλές θερμοκρασίες).<sup>43</sup>

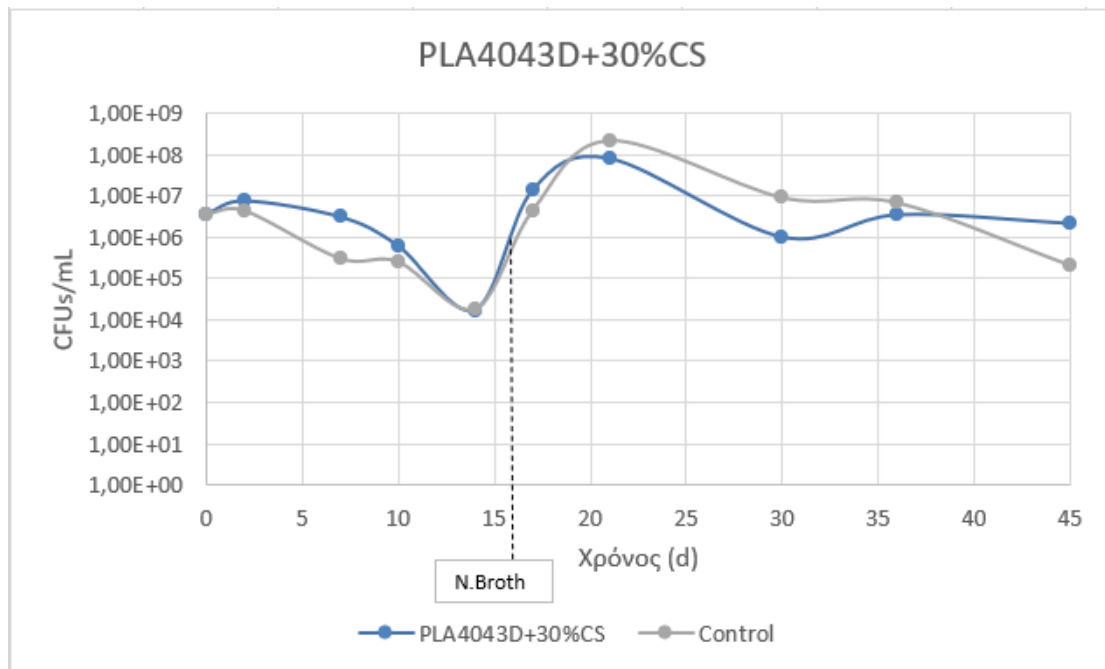
##### 3.1.1. Συμπεριφορά πληθυσμού μικροοργανισμών

Στη συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζονται διαγραμματικά τα αποτελέσματα σχετικά με τη συμπεριφορά των αποικιών βακτηρίων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Όπως έχει αναφερθεί, η χρονική διάρκεια του πειράματος ήταν χωρισμένη σε 3 στάδια των 45 ημερών.



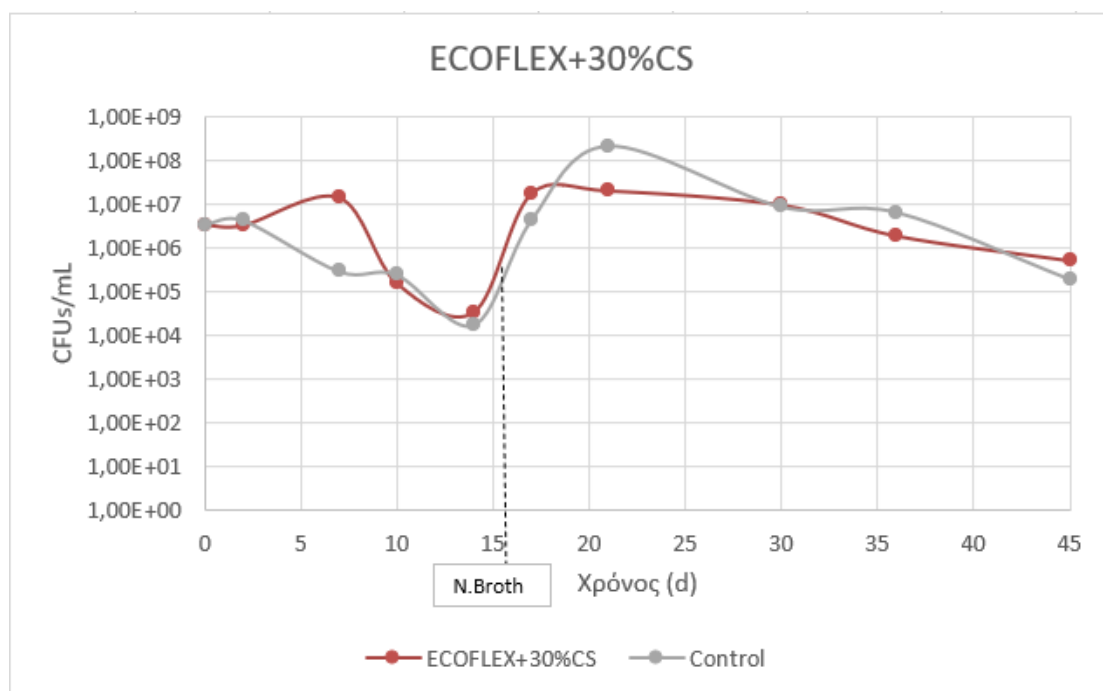
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε CFUs/mL για τα 5 δείγματα βιοπλαστικών και για το Control στα 3 χρονικά στάδια του πειράματος. Επιπλέον πάνω σε κάθε διάγραμμα φαίνονται οι χρονικές στιγμές που προστέθηκαν τα 10mL θρεπτικού υλικού Nutrient Broth, δηλαδή την 17<sup>η</sup>, 53<sup>η</sup>, 81<sup>η</sup> και 116<sup>η</sup> πειραματική ημέρα. Σημειώνεται ότι η αρχική βακτηριακή βιομάζα του θαλασσινού νερού είχε συγκέντρωση  $3,50 \cdot 10^6$  CFUs/mL.

#### Α' Χρονικό στάδιο



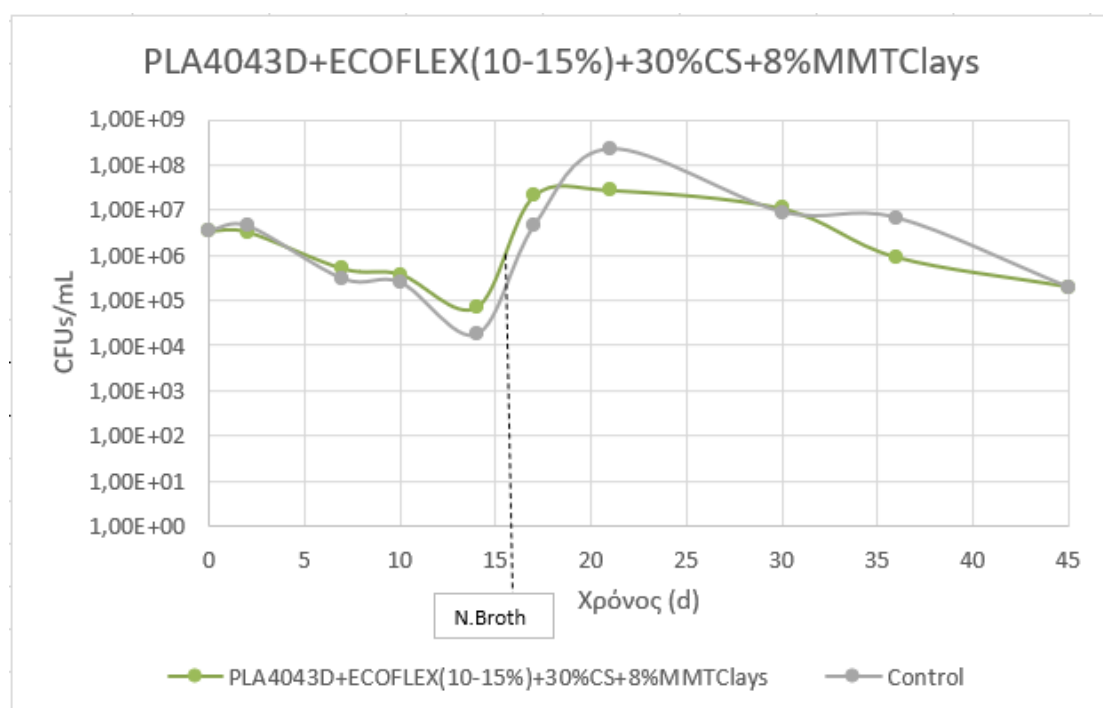
Γράφημα 1: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το PLA4043D+30%CS στο πρώτο στάδιο (0-45d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



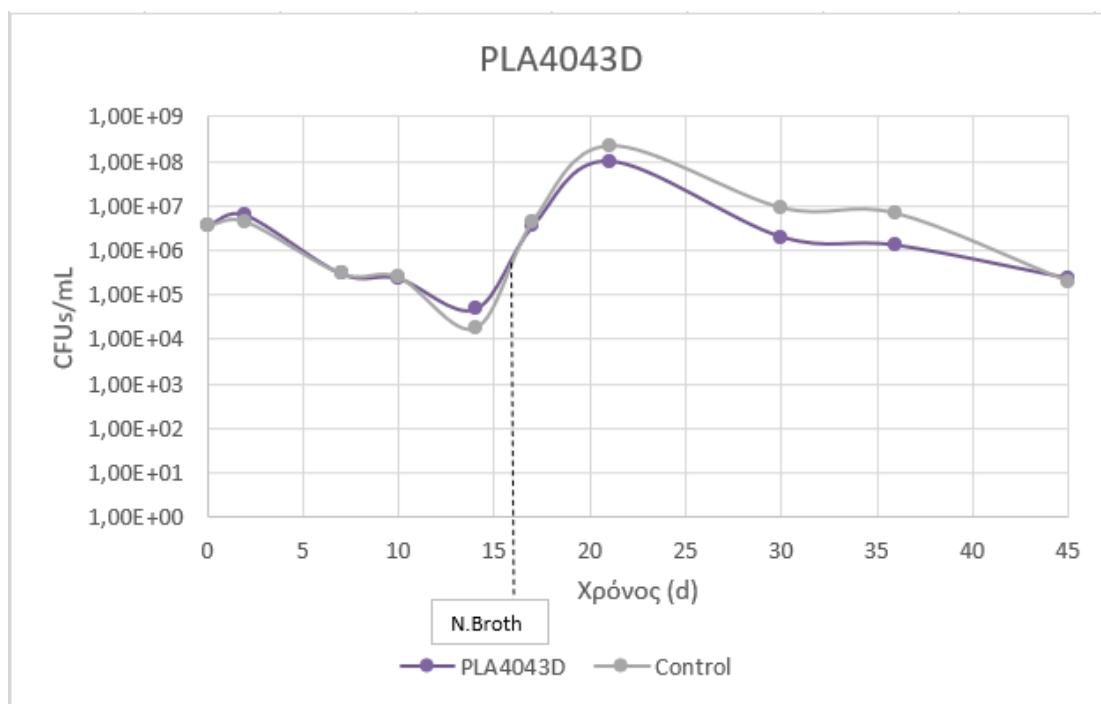
Γράφημα 2: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το ECOFLEX+30%CS στο πρώτο στάδιο (0-45d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



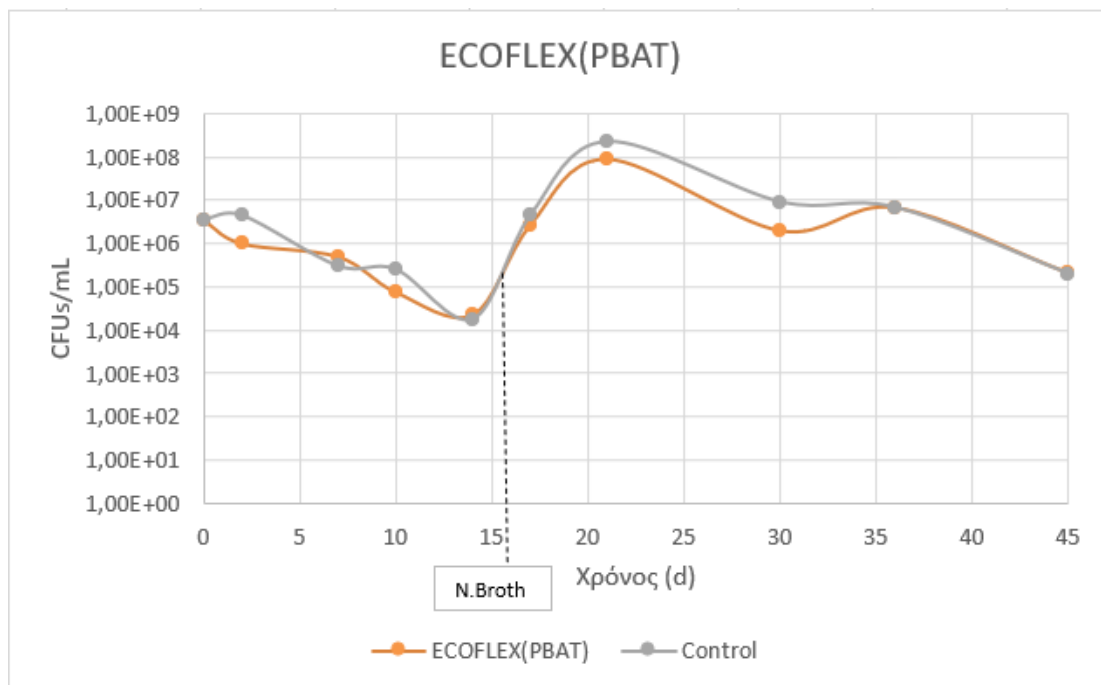
Γράφημα 3: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays στο πρώτο στάδιο (0-45d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



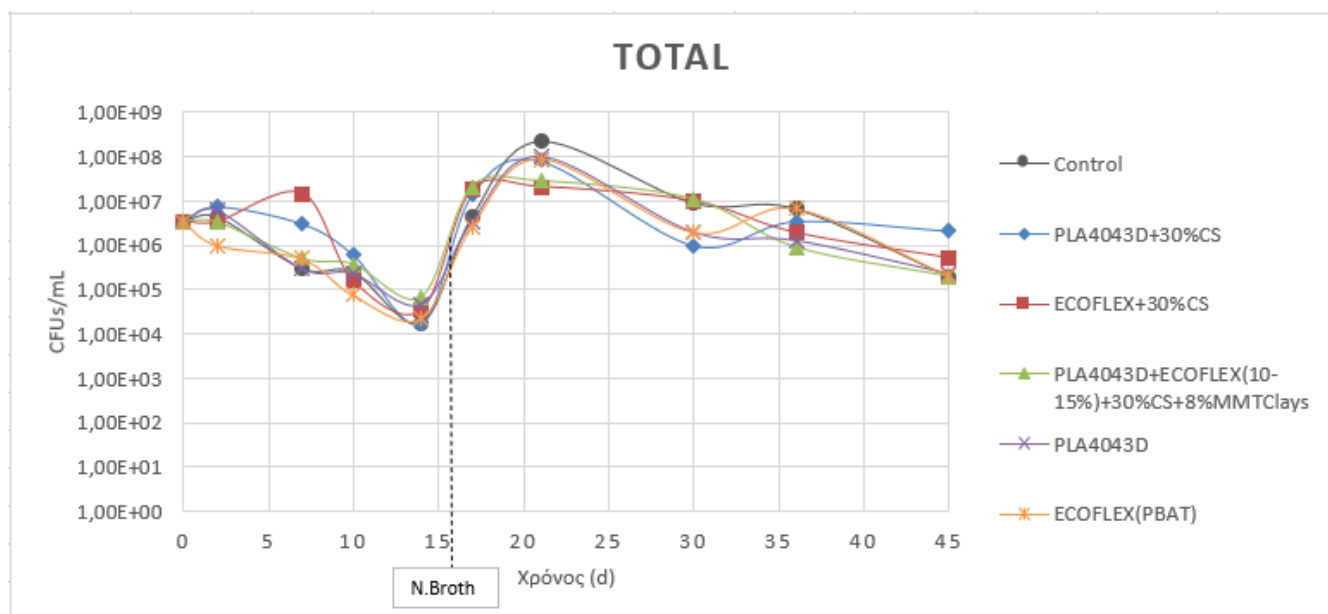
Γράφημα 4: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το PLA4043D στο πρώτο στάδιο (0-45d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



Γράφημα 5: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το ECOFLEX(PBAT) στο πρώτο στάδιο (0-45d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό

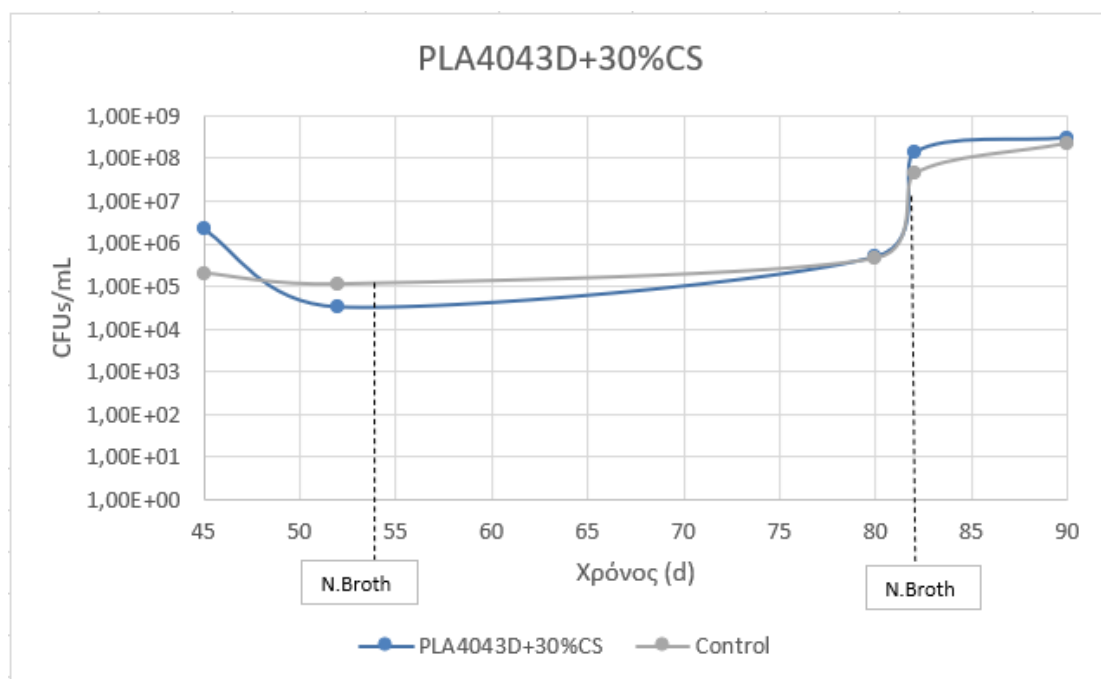


Γράφημα 6: Συγκεντρωτικό διάγραμμα συγκεντρώσεων μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το θαλασσινό νερό στο πρώτο χρονικό στάδιο (0-45d)

*Control:* Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό

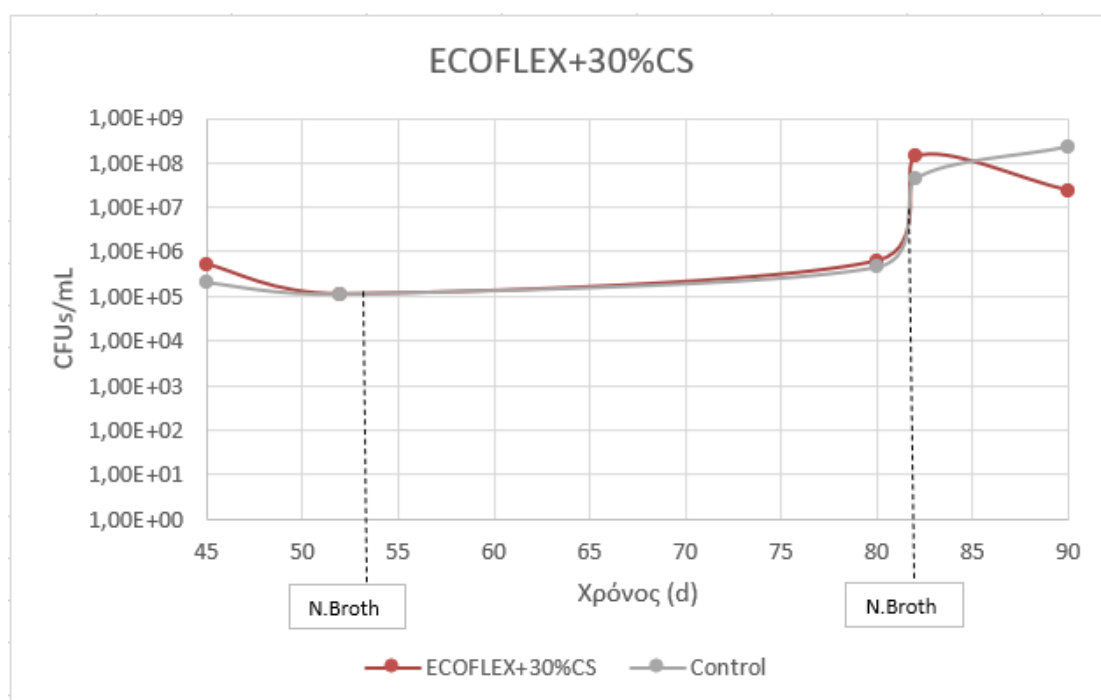
Τα παραπάνω αποτελέσματα αναφέρονται στις πρώτες 45 ημέρες του πειράματος. Από την ημέρα 0 μέχρι την 14<sup>η</sup> μέρα παρατηρούνταν συνεχής ελάττωση του πληθυσμού σε όλα τα δείγματα θαλασσινού νερού με εξαίρεση του ECOFLEX+30%CS, στο οποίο αρχικά αυξάνεται η συγκέντρωση κατά μια τάξη μεγέθους περίπου και στη συνέχεια μειώνεται μετά την 7<sup>η</sup> μέρα. Την 17<sup>η</sup> ημέρα πειράματος πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με θρεπτικό υλικό Nutrient Broth σε όλες τις φιάλες και, όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού μικροοργανισμών στα δείγματα μέχρι την 21<sup>η</sup> μέρα. Στη συνέχεια οι συγκεντρώσεις ελαττώνονται μέχρι και το πέρας του Α' χρονικού σταδίου όμως με αργότερο ρυθμό. Την 45<sup>η</sup> ημέρα πειράματος μετρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση  $2,15 \cdot 10^6$  CFUs/mL στο PLA4043D+30%CS, ενώ ελάχιστη μετρήθηκε  $2,00 \cdot 10^5$  CFUs/mL στο PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTclays και στο Control.

## Β' Χρονικό στάδιο



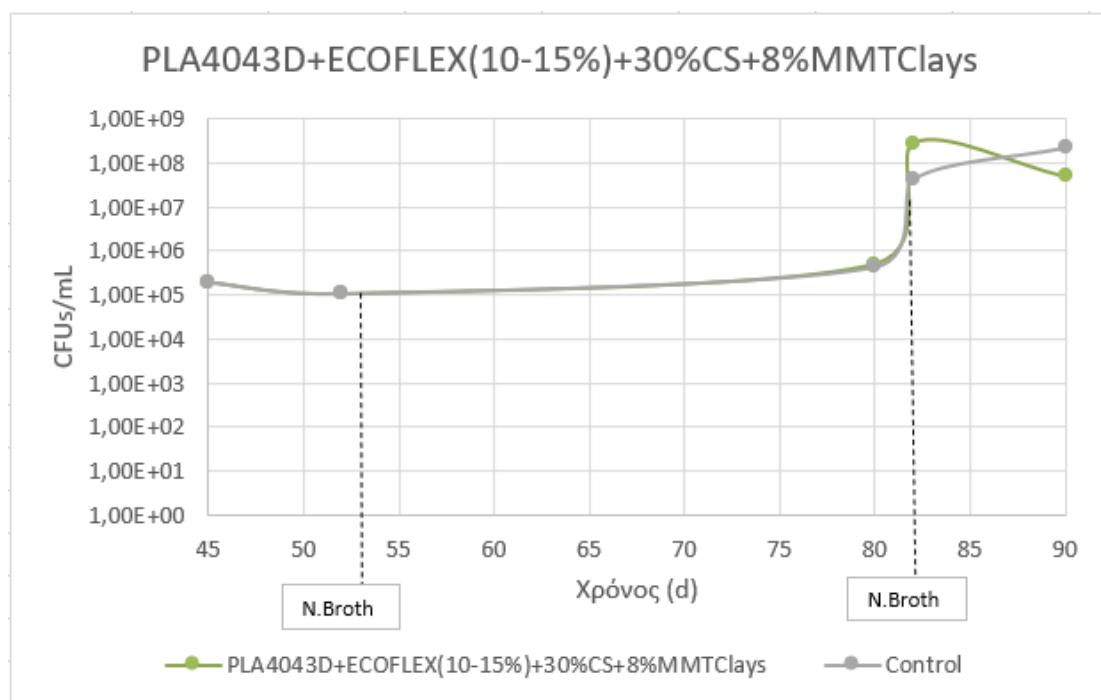
Γράφημα 7: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το PLA4043D+30%CS στο δεύτερο στάδιο (45-90d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



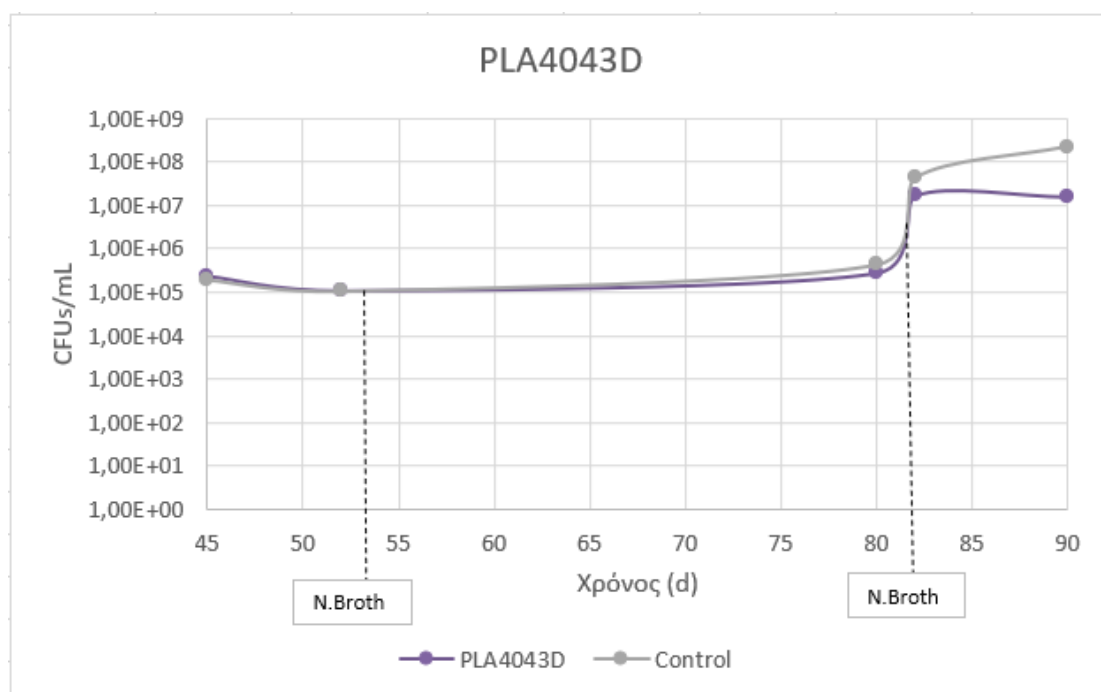
Γράφημα 8: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το ECOFLEX+30%CS στο δεύτερο στάδιο (45-90d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



Γράφημα 9: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays στο δεύτερο στάδιο (45-90d)

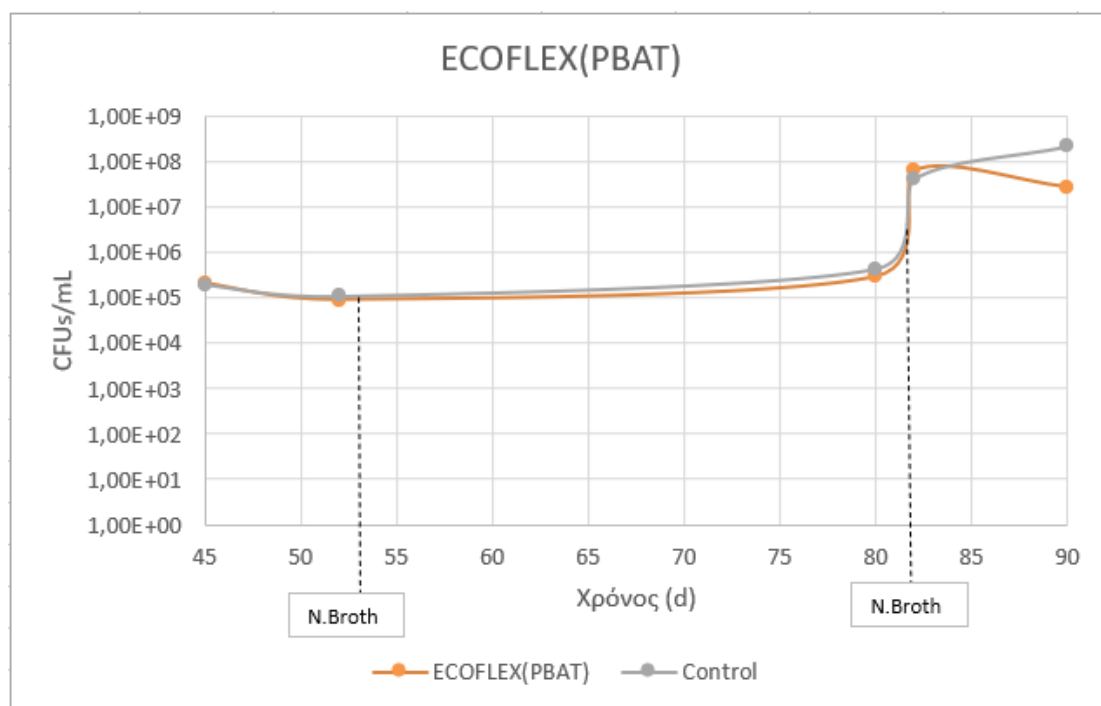
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



Γράφημα 10: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το PLA4043D στο δεύτερο στάδιο (45-90d)

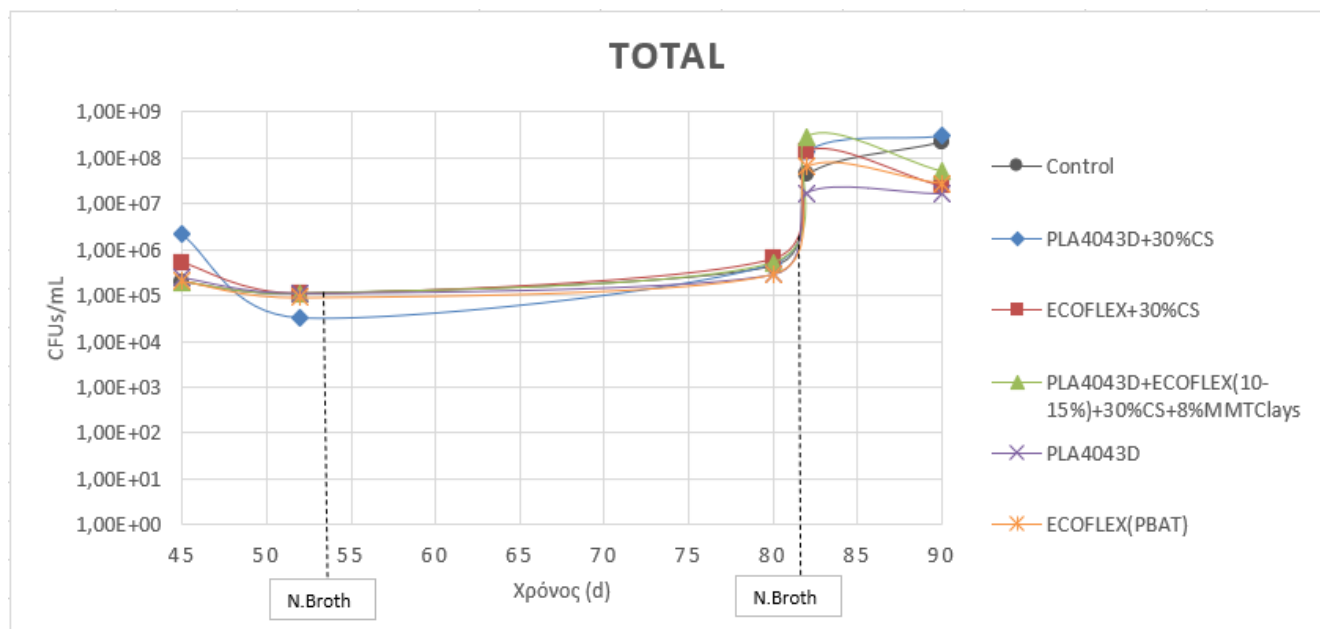
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό





Γράφημα 11: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το ECOFLEX(PBAT) στο δεύτερο στάδιο (45-90d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



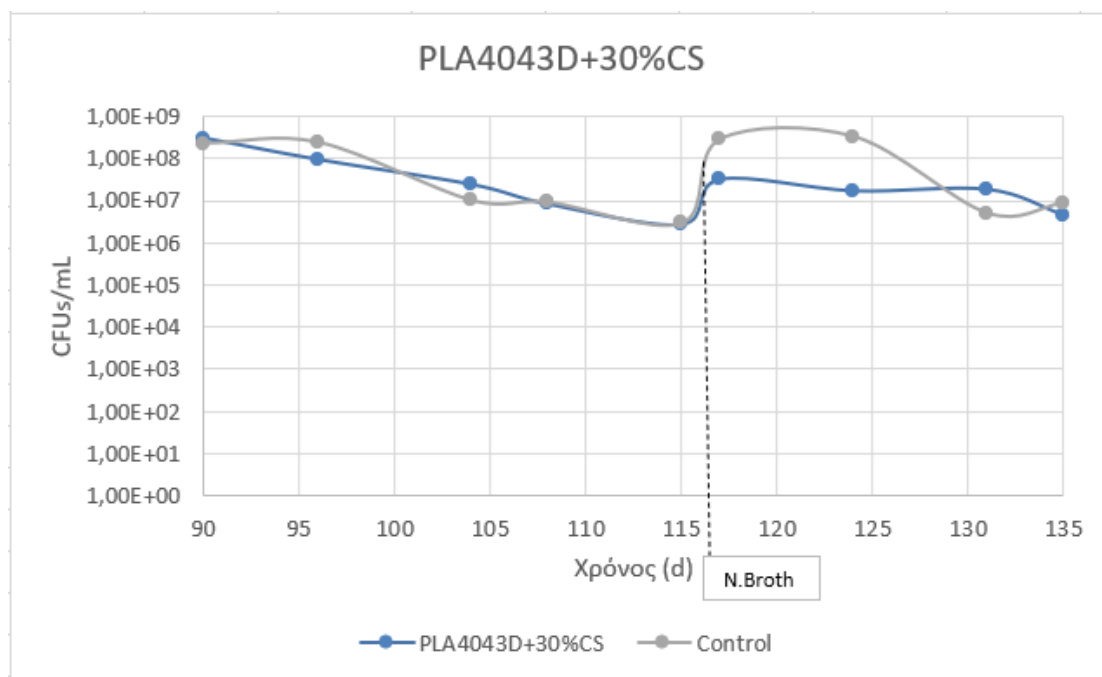
Γράφημα 12: Συγκεντρωτικό διάγραμμα συγκεντρώσεων μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το θαλασσινό νερό στο δεύτερο χρονικό στάδιο (45-90d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό

Ακολούθησε το Β' χρονικό στάδιο από τις 45 μέχρι 90 ημέρες πειράματος. Αρχικά, οι συγκεντρώσεις των μικροοργανισμών στα δείγματα θαλασσινού νερού παραμένουν στην ίδια τάξη μεγέθους με εξαίρεση το PLA4043D+30%CS στο οποίο παρατηρήθηκε αλλαγή δύο

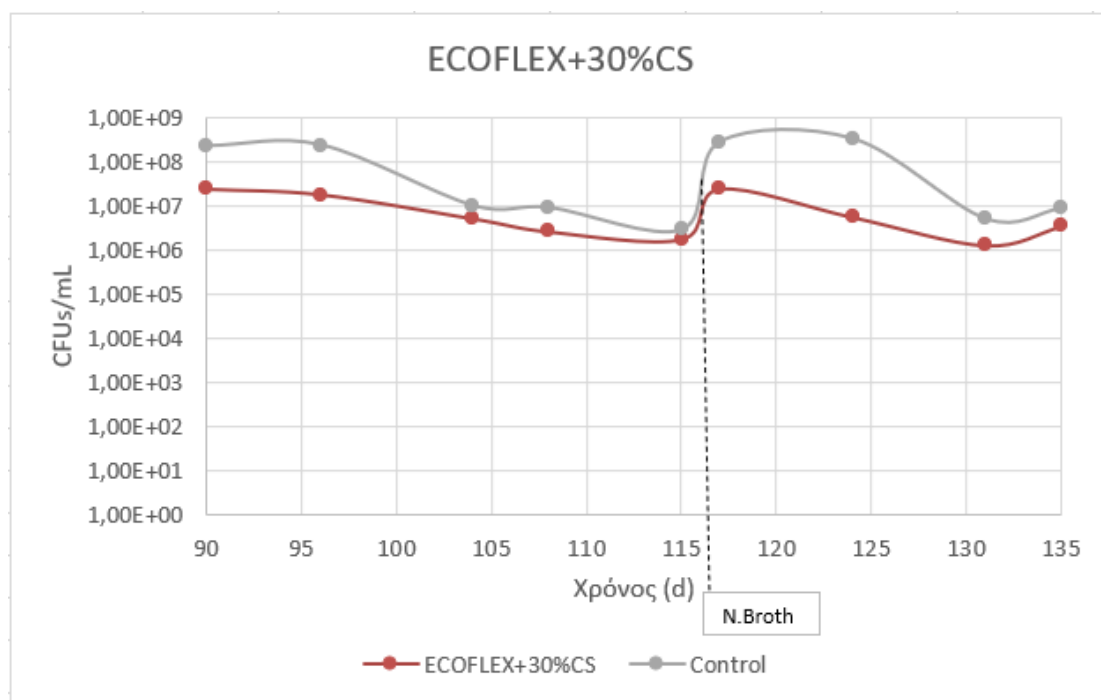
τάξεων μεγέθους. Ακολουθώντας τον τρίτο εφοδιασμό των φιαλών θαλασσινού νερού με θρεπτικό υλικό την 81<sup>η</sup> μέρα παρατηρήθηκε απότομη αύξηση της συγκέντρωσης, συγκεκριμένα τρεις τάξεις μεγέθους στα δείγματα PLA4043D+30%CS, ECOFLEX+30%CS και PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays. Μέχρι το πέρας των 90 ημερών οι πληθυσμοί μικροοργανισμών σε όλα τα δείγματα διατηρούνται σχετικά σταθεροί. Την τελευταία ημέρα του Β' σταδίου μετρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση  $3,05 \cdot 10^8$  CFUs/mL στο PLA4043D+30%CS, ενώ ελάχιστη μετρήθηκε  $1,60 \cdot 10^7$  CFUs/mL στο PLA4043D.

### Γ' Χρονικό στάδιο



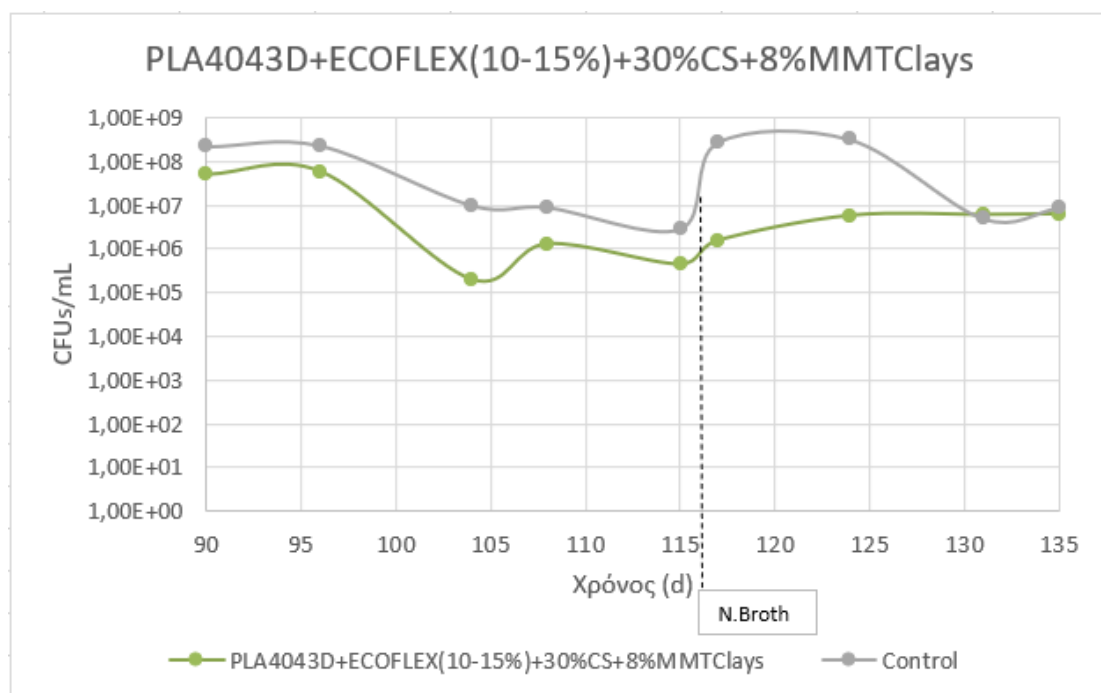
Γράφημα 13: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το PLA4043D+30%CS στο τρίτο στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



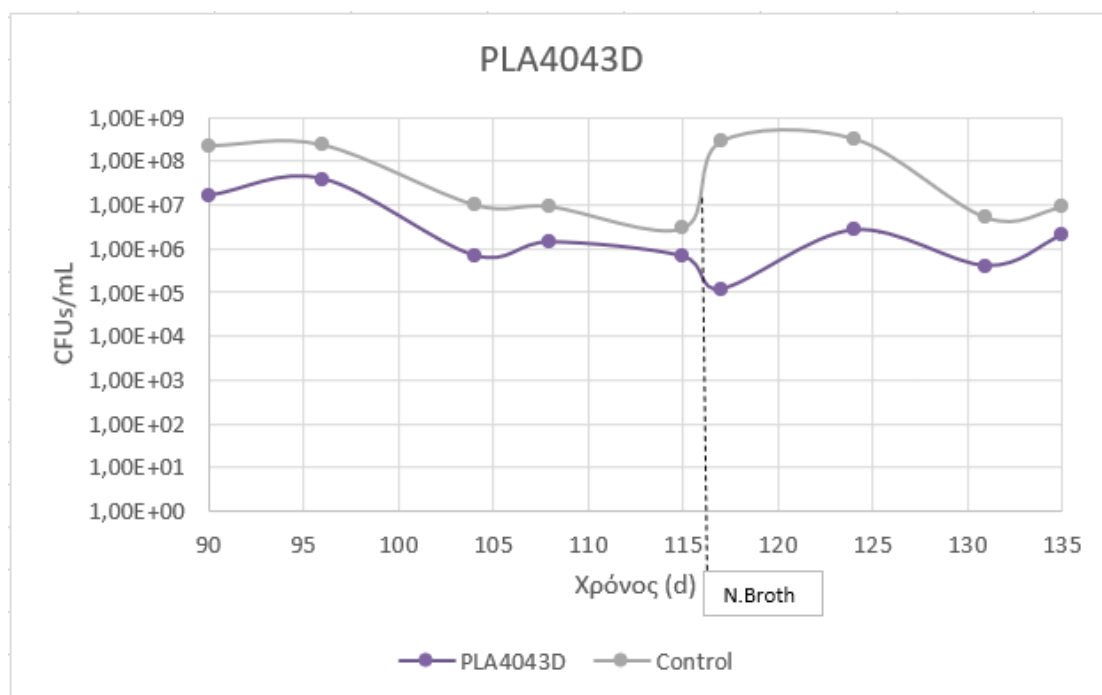
Γράφημα 14: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το ECOFLEX+30%CS στο τρίτο στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



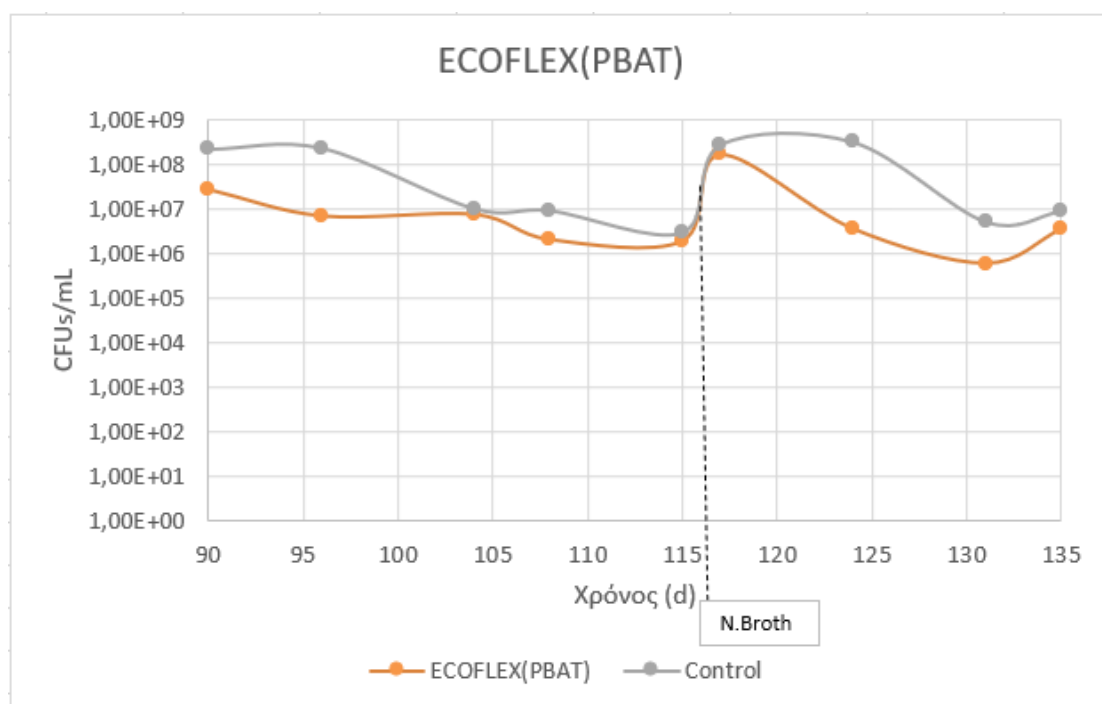
Γράφημα 15: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTclays στο τρίτο στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



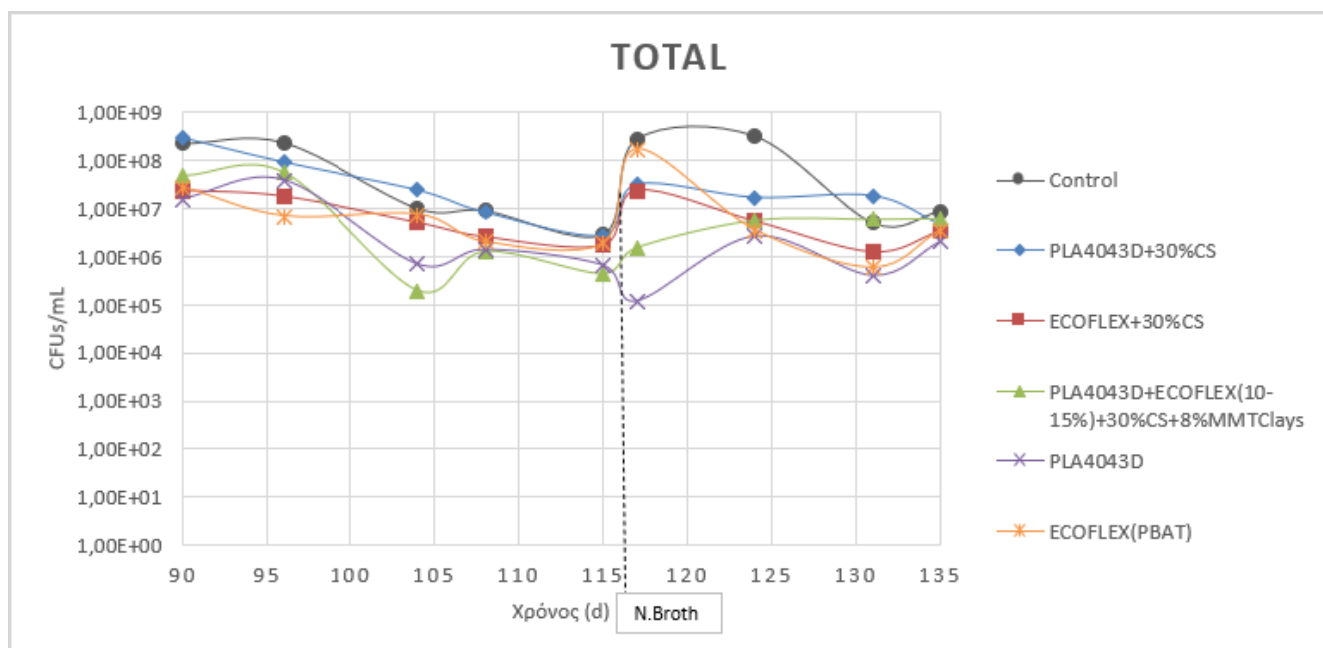
Γράφημα 16: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το PLA4043D στο τρίτο στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



Γράφημα 17: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το ECOFLEX(PBAT) στο τρίτο στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό



Γράφημα 18: Συγκεντρωτικό διάγραμμα συγκεντρώσεων μικροοργανισμών (CFUs/mL) για το θαλασσινό νερό στο τρίτο χρονικό στάδιο (90-135d)

*Control: Δείγμα που περιείχε μόνο θαλασσινό νερό*

Στο τρίτο και τελευταίο χρονικό στάδιο παρατηρούνται μεγαλύτερες αποκλίσεις στις τιμές συγκεντρώσεων μεταξύ των 5 δειγμάτων σε σχέση με τα πρώτα δύο στάδια, δηλαδή οι καμπύλες συμπεριφοράς δε μεταβάλλονται με τον ίδιο τρόπο. Στα δείγματα PLA4043D+30%CS, ECOFLEX+30%CS και ECOFLEX(PBAT) οι συγκεντρώσεις ελαττώνονται ομαλά, ενώ στα άλλα δυο δείγματα παρατηρείται αύξηση μετά την 104<sup>η</sup> ημέρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το δείγμα PLA4043D είχε αναχρονιστική αντίδραση στο Nutrient Broth προστέθηκε την 116<sup>η</sup> μέρα. Την τελευταία ημέρα όλου του πειράματος (135<sup>η</sup>) μετρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση  $8,9 \cdot 10^6$  CFUs/mL στο Control και  $6,3 \cdot 10^6$  CFUs/mL στο PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays, ενώ ελάχιστη μετρήθηκε  $2,07 \cdot 10^6$  CFUs/mL στο PLA4043D.

Η πυκνότητα των ετερότροφων βακτηρίων στο θαλάσσιο νερό αναφέρεται από τους Wang κ.ά. (2020)<sup>43</sup> ότι κυμαίνεται μεταξύ  $10^5 - 10^7$ /mL, γεγονός που επιβεβαιώνεται και στο πείραμα. Οι Tsuji και Suzuyoshi μελέτησαν τις ιδιότητες αποικοδόμησης μεμβρανών PLA (πάχους 0,05 mm) σε θαλασσινό νερό υπό φυσικές συνθήκες και στο εργαστήριο σε συλλεγμένο θαλασσινό νερό, δηλαδή υπό στατικές συνθήκες. Διαπίστωσαν ότι οι συνολικές ιδιότητες των μεμβρανών PLA δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά από 10 εβδομάδες σε εργαστηριακές συνθήκες. Λόγω της διαδικασίας πλαστικοποίησης, η αντοχή σε εφελκυσμό και το μέτρο ελαστικότητας Young αυξήθηκαν ακόμη και ελαφρώς στην αρχή του πειράματος.<sup>44</sup> Σε σύγκριση με το αποσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου, η υψηλή αλατότητα στο θαλασσινό νερό επηρεάζει τη διάχυση του νερού στον πολυεστέρα, καθιστώντας τον ρυθμό αποικοδόμησης στο θαλασσινό νερό ακόμη πιο αργό από αυτόν στο καθαρό νερό. Για την περαιτέρω πρόβλεψη της διάρκειας ζωής των φιλμ PLA (πάχος 2 mm) σε θαλασσινό νερό, οι Wang κ.ά. επέκτειναν το χρόνο αποικοδόμησης σε 1 έτος σε φυσικό θαλασσινό νερό. Το πείραμα επιβεβαίωσε τα προηγούμενα δεδομένα, που έδειξαν ότι το PLA αποικοδομείται ελάχιστα στο θαλασσινό νερό και αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της έλλειψης αποτελεσματικών μικροοργανισμών και μόνο αργή αβιοτική υδρόλυση λαμβάνει χώρα. Γενικά, ο ρυθμός



αποικοδόμησης των πολυμερών αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των μικροοργανισμών. Το PBAT είναι η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυεστέρων στην αγορά. Καθώς η ανάπτυξη και η εφαρμογή των PBAT εμφανίστηκε μόλις τα τελευταία χρόνια, η έρευνα σχετικά με τις ιδιότητες αποικοδόμησης των PBAT στο νερό είναι σπάνια. Οι μικροβιακοί αποικοδομητές του PBAT, όπως και του PLA, είναι επίσης σπάνιοι στα θαλάσσια οικοσυστήματα, έτσι ώστε ο συνολικός ρυθμός αποικοδόμησης να είναι αργός, παρόλο που μπορεί να παρατηρείται διάβρωση στην επιφάνεια.<sup>43</sup>

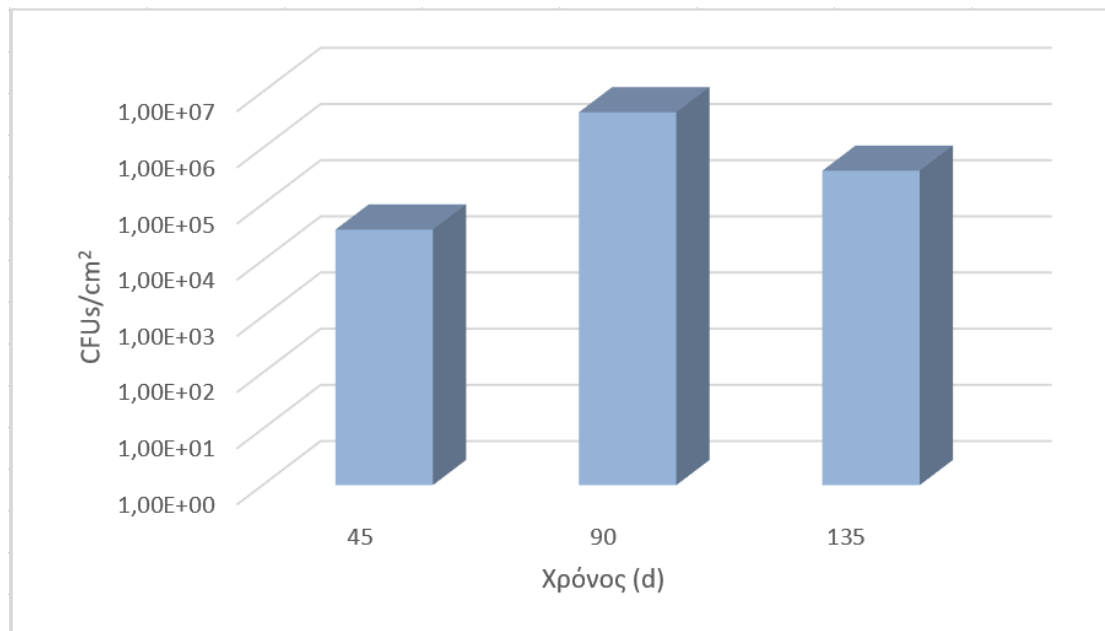
Για την αύξηση των ρυθμών αποικοδόμησης στο θαλασσινό νερό, η προσθήκη εύκολα βιοδιασπώμενων πληρωτικών υλικών μπορεί να συμβάλει στην επιτάχυνση της αποικοδόμησης της πολυμερικής μήτρας.<sup>45</sup> Το άμυλο και η κυτταρίνη (ή παράγωγα) χρησιμοποιούνται συχνά σε αυτή την προσέγγιση, καθώς είναι φθηνά, ευρέως διαθέσιμα, παρουσιάζουν καλή συμβατότητα και μπορούν εύκολα να αποικοδομηθούν από μαγιά, μύκητες και διάφορα βακτήρια. Στην παρούσα πειραματική διεργασία τα πρόσθετα βιοδιασπώμενα υλικά είναι το CS (Coffee Silverskin) και τα MMTClays (Montmorillonite Clays). Οι Alvarez-Zeferino κ.ά. (2015)<sup>46</sup> μελέτησαν τη βιοαποικοδόμηση των κομποστοποιήσιμων μειγμάτων PLA/PBAT σε θαλάσσια περιβάλλοντα μέσω μιας εργαστηριακής δοκιμής για 48 ημέρες με θαλάσσιο εμβόλιο. Τα αποτελέσματά τους υπογραμμίζουν τα χαμηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης, ενώ παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό απώλειας της φυσικής ακεραιότητας. Αυτός ο συνδυασμός φαινομένων θα μπορούσε να οδηγήσει στον κατακερματισμό τους προτού συμβεί σημαντική βιοαποικοδόμηση και θα μπορούσε να προωθήσει τη δημιουργία μικροπλαστικών.

Σύμφωνα με τους Delacuvellerie κ.ά. (2021)<sup>47</sup>, μετά από 82 ημέρες σε φυσικό θαλάσσιο περιβάλλον, η θέση του δείγματος (ίζημα έναντι στήλη νερού) βρέθηκε ότι επηρεάζει όχι μόνο την αβιοτική αποικοδόμηση του πλαστικού αλλά και τη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας που αναπτύχθηκε στα πολυμερή. Συγκεκριμένα, στο ίζημα φάνηκε ότι η ποσότητα των βακτηρίων ήταν υψηλότερη από ό,τι στη στήλη νερού και ότι η βακτηριακή κοινότητα έχει ρόλο στην αποικοδόμηση του πλαστικού. Έτσι και στο συγκεκριμένο πείραμα, τα δείγματα βιοπλαστικών είχαν αφεθεί ελεύθερα μέσα στα μπουκάλια νερού και, λόγω του βάρους τους, παρέμεναν στο κάτω μέρος του μπουκαλιού.

### 3.1.2. Μελέτη βιοϋμενίου

Όπως έχει αναφερθεί στα παραπάνω κεφάλαια, μετά το πέρας κάθε χρονικού σταδίου 45 ημερών, τα κομμάτια πλαστικών αφαιρούνταν από το περιβάλλον τους, είτε μπουκάλι με νερό είτε δοχείο με χώμα, και πραγματοποιούνταν η μελέτη του βιοϋμενίου που ήταν προσκολλημένο στην επιφάνεια του υλικού, με τρόπο που έχει αναλυθεί στο *Κεφάλαιο 2.2*. Τα αποτελέσματα σε αυτή την περίπτωση υπολογίζονται σε CFUs/cm<sup>2</sup> υλικού. Η επιφάνεια όλων των δειγμάτων ήταν 1,5cm×1,5cm. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα διαγραμματικά, ξεχωριστά για κάθε δείγμα βιοπλαστικού.

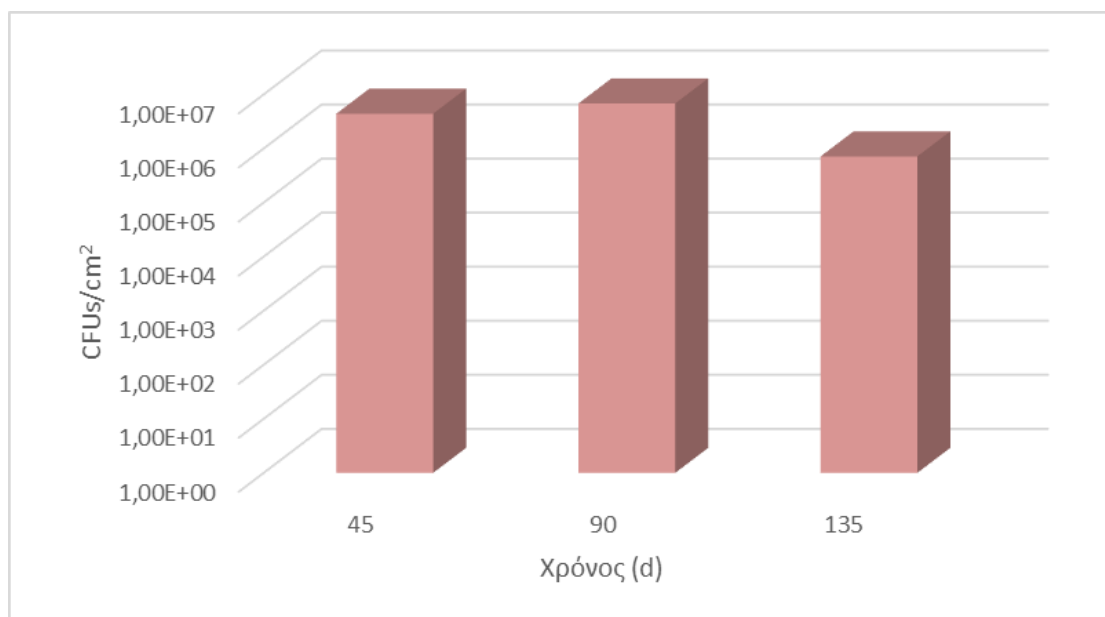
#### PLA4043D + 30%CS



Γράφημα 19: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια του PLA4043D+30%CS

Στο Γράφημα 19 για το PLA4043D+30%CS, παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση βακτηρίων στις 90 πειραματικές μέρες με  $4,36 \cdot 10^6$  CFUs/cm<sup>2</sup> και μικρότερη στις πρώτες 45 ημέρες, όπως είναι λογικό, με  $3,56 \cdot 10^4$  CFUs/cm<sup>2</sup>, δηλαδή παρατηρείται αύξηση δυο τάξεων. Με το πέρας των 135 ημερών η συγκέντρωση μειώνεται κατά μια τάξη μεγέθους στα  $3,97 \cdot 10^5$  CFUs/cm<sup>2</sup>.

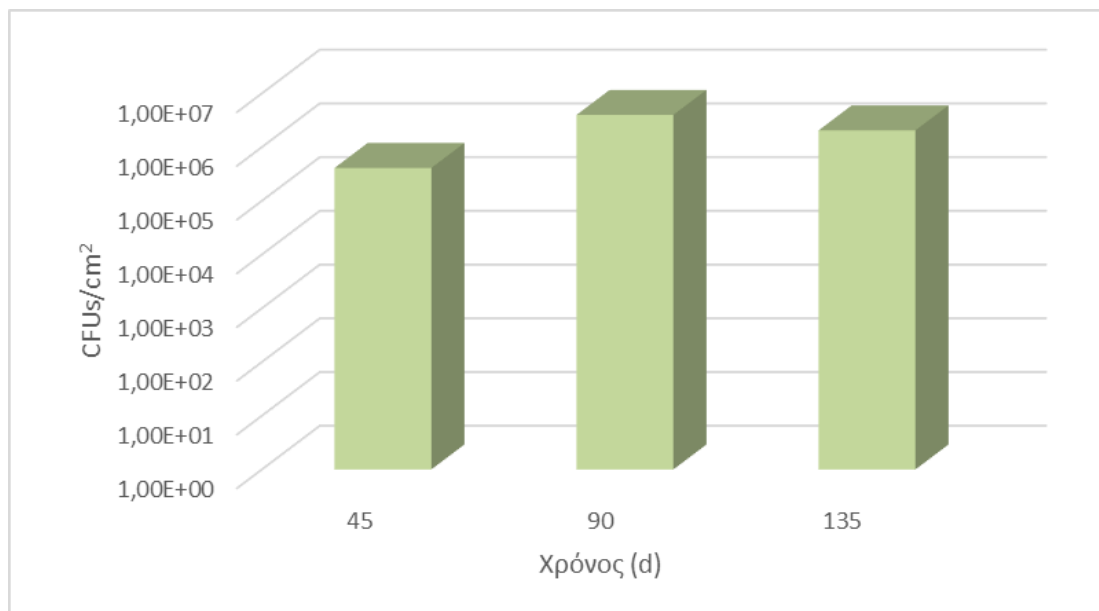
#### ECOFLEX + 30%CS



Γράφημα 20: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια του ECOFLEX+30%CS

Στο *Γράφημα 20* για το ECOFLEX+30%CS παρατηρείται πως στις 45 και 90 μέρες η συγκέντρωση των βακτηρίων είναι της τάξης του  $10^6$  ( $4,40 \cdot 10^6$  και  $6,80 \cdot 10^6$  CFUs/cm<sup>2</sup> αντίστοιχα), ενώ στο τελευταίο στάδιο του πειράματος μειώνεται κατά μια τάξη μεγέθους στα  $7,12 \cdot 10^5$  CFUs/cm<sup>2</sup>.

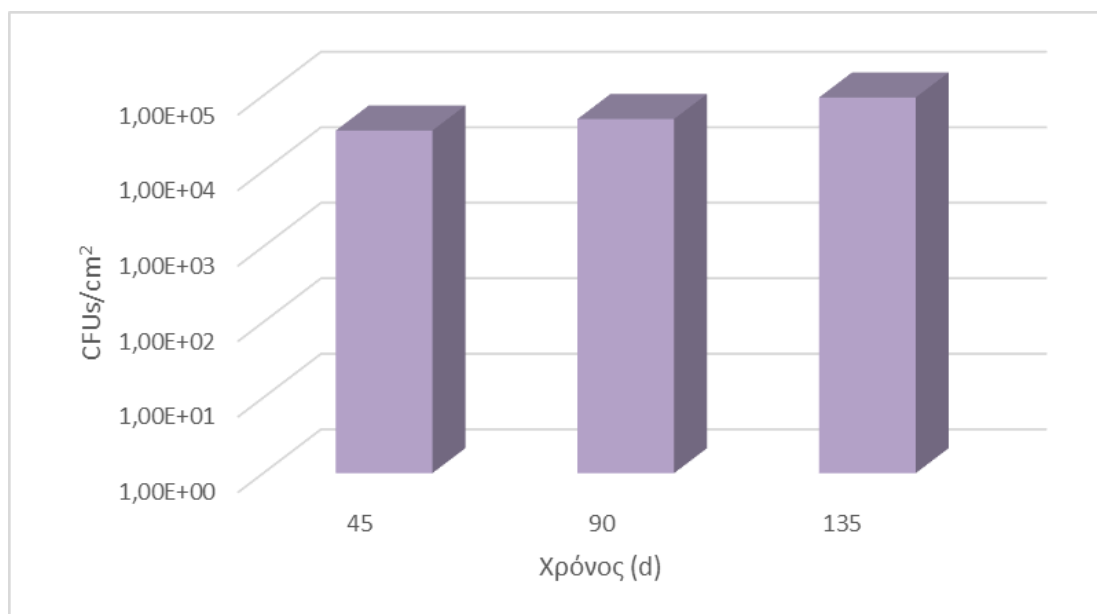
#### PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays



*Γράφημα 21: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια του PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays*

Για το τρίτο δείγμα, στις πρώτες 45 μέρες πειράματος μετρήθηκαν  $4,09 \cdot 10^5$  CFUs/cm<sup>2</sup>. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση αποικιών στο βιοφίλμ εμφανίζεται και πάλι στις 90 ημέρες με  $3,98 \cdot 10^6$  CFUs/cm<sup>2</sup>. Όμως στις 135 μέρες δεν υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις καθώς η συγκέντρωση μετρήθηκε  $2,05 \cdot 10^6$  CFUs/cm<sup>2</sup>.

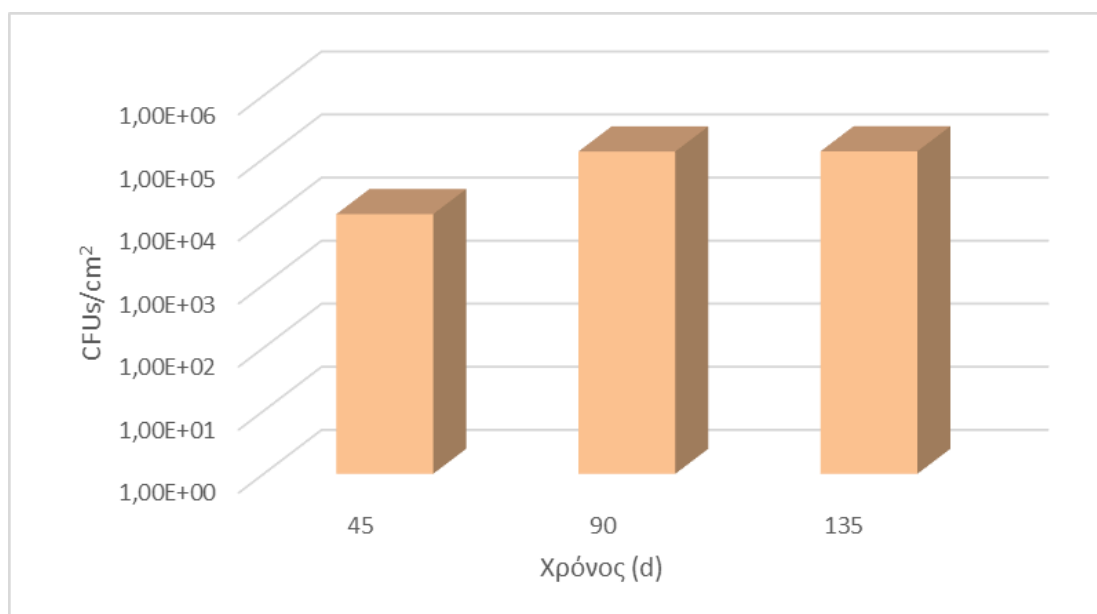
#### PLA4043D



Γράφημα 22: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια του PLA4043D

Στο Γράφημα 22 για το PLA4043D φαίνεται η συγκέντρωση των μικροοργανισμών να αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου. Δηλαδή, μικρότερη μετρήθηκε στις 45 μέρες  $3,44 \cdot 10^4$ , στη συνέχεια  $4,89 \cdot 10^4$  και τέλος μεγαλύτερη στις 135 μέρες  $9,44 \cdot 10^4$  CFUs/cm<sup>2</sup>. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η αύξηση δεν ξεπερνά τη μία τάξη μεγέθους κατά τη διάρκεια όλου του πειράματος και ότι παρατηρούνται γενικά μικρότερες τιμές σχετικά με τα παραπάνω δείγματα.

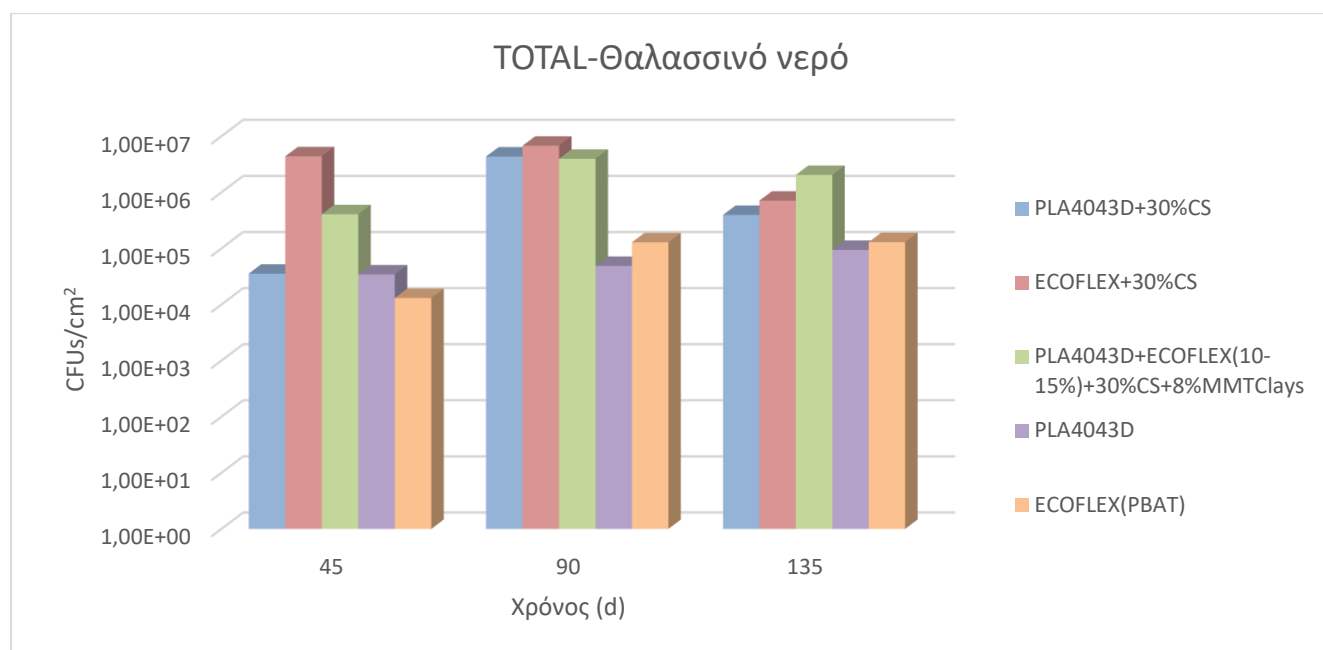
### ECOFLEX(PBAT)



Γράφημα 23: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια του ECOFLEX

Σε αντίστοιχο μοτίβο κυμαίνονται και οι τιμές για το ECOFLEX(PBAT). Δηλαδή η μικρότερη τιμή μετρήθηκε στις 45 μέρες  $1,31 \cdot 10^4$ , ενδιάμεση στις 90 μέρες  $1,29 \cdot 10^5$  και μέγιστη, όχι κατά πολύ, στο τέλος του πειράματος με  $1,30 \cdot 10^5$  CFUs/cm<sup>2</sup>. Όπως στο PLA4043D έτσι και

εδώ, οι τιμές των συγκεντρώσεων είναι κατά περίπου δυο τάξεις μεγέθους χαμηλότερες από τα υπόλοιπα δείγματα.



Γράφημα 24: Συγκεντρωτικό διάγραμμα συγκεντρώσεων μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια των δειγμάτων του θαλασσινού νερού

Η διαδικασία αποικοδόμησης των μικροπλαστικών από το βιοφίλμ επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, κυρίως από δύο απόψεις: τις ιδιότητες του ίδιου του μικροπλαστικού και το ρυθμό και την ποιότητα του σχηματισμού βιοφίλμ στην επιφάνεια του μικροπλαστικού. Τα χαρακτηριστικά των μικροπλαστικών περιλαμβάνουν χημικές και φυσικές ιδιότητες. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό σχηματισμού βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροπλαστικών περιλαμβάνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μικροπλαστικών και περιβαλλοντικούς παράγοντες (θερμοκρασία, pH, υπεριώδης ακτινοβολία και θρεπτικά συστατικά).<sup>25</sup> Στο συγκεκριμένο πείραμα οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ήταν ίδιοι για όλα τα δείγματα πλαστικών. Χρησιμοποιήθηκαν ίδιοι είδους δοχεία, είχαν την ίδια θερμοκρασία (περίπου 25°C, θερμοκρασία δωματίου) καθώς βρίσκονταν στο ίδιο σημείο του εργαστηρίου και τροφοδοτούνταν την ίδια ποσότητα του ίδιου θρεπτικού υλικού (10mL Nutrient Broth). Οπότε οι όποιες διαφοροποιήσεις στο σχηματισμό του βιοφίλμ προκύπτουν από τις ιδιότητες του εκάστοτε πλαστικού. Έχει διερευνηθεί ο σχηματισμός βιοφίλμ σε διάφορα μικροπλαστικά (MPs). Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι το πολυμερές διαφορετικών τύπων MPs επηρεάζει τον σχηματισμό βιοφίλμ και τον αποικισμό μικροβιακών κοινοτήτων (Μίαο κ.ά., 2019)<sup>48</sup>. Σε πρόσφατη μελέτη των Marin κ.ά. (2023)<sup>49</sup> μελετήθηκαν τα θαλάσσια βιοφίλμ που σχηματίστηκαν στις επιφάνειες των PLA και PHBV (βιοδιασπώμενο, μη τοξικό πλαστικό που παράγεται φυσικά από βακτήρια). Συγκεκριμένα, μετά από 1 μήνα, το PLA παρουσίασε βακτηριακή επιφανειακή πυκνότητα 10<sup>3</sup> CFUs/cm<sup>2</sup>, ενώ με το πέρασμα 6 μηνών μετρήθηκαν υψηλότερα μεγέθη πληθυσμού 10<sup>5</sup> CFUs/cm<sup>2</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με τις παραπάνω τιμές της παρούσας πειραματικής διαδικασίας.

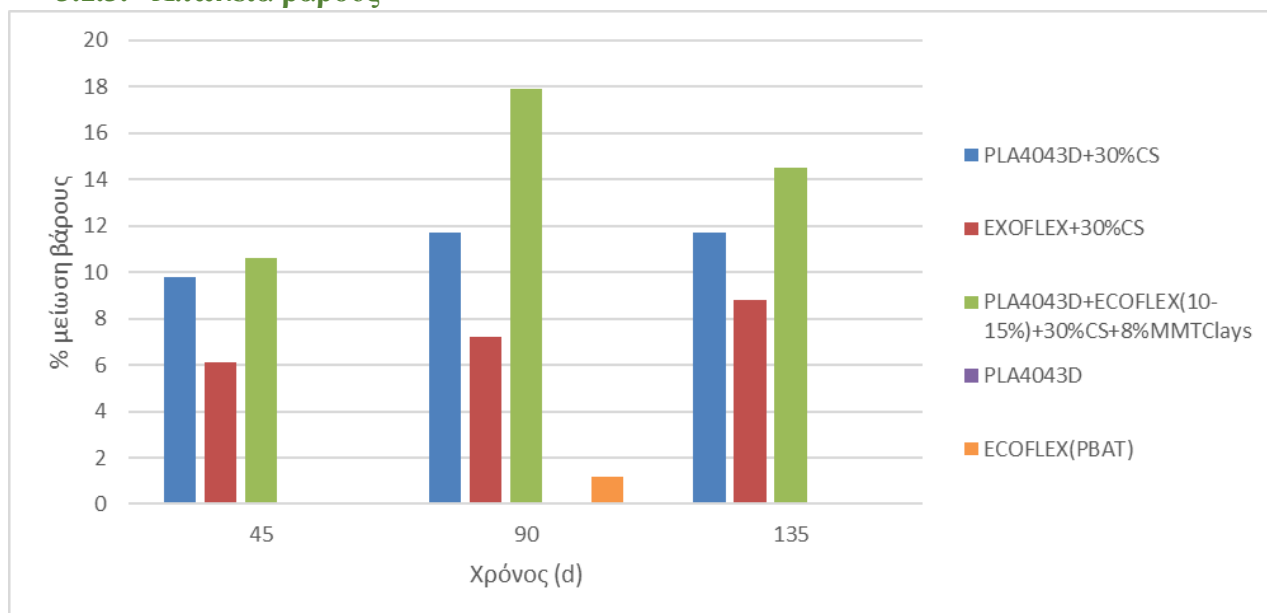
Όπως έχει αναφερθεί, οι τιμές της συγκέντρωσης μικροοργανισμών στο βιοφίλμ των PLA4043D και ECOFLEX(PBAT) κυμαίνονται δύο τάξεις μεγέθους χαμηλότερα από τα



υπόλοιπα δείγματα. Το γεγονός αυτό σχετίζεται αφενός με την τραχύτητα της επιφάνειας των υλικών και αφετέρου με τα ίδια τα υλικά. Συγκεκριμένα, μια πιο τραχιά επιφάνεια ευνοεί το σχηματισμό και το μεταβολισμό των κοινοτήτων βιοφίλμ στα μικροπλαστικά (Miao κ.ά., 2021- Klausen κ.ά., 2003, Conrad, 2012), και η τραχύτητα της επιφάνειας συσχετίζεται θετικά με τον ρυθμό ανάπτυξης των βιοϋμενίων και την πυκνότητα των προσκολλημένων μικροοργανισμών (Bravo κ.ά., 2011- Hirai κ.ά., 2015). Η αύξηση της τραχύτητας της επιφάνειας ενισχύει την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων λόγω της μειωμένης υδραυλικής διατμητικής δύναμης και της μειωμένης δυνατότητας αποξέσεως των κυττάρων στο βιοφίλμ των μικροπλαστικών.<sup>48</sup> Τα υπόλοιπα τρία βιοπλαστικά (PLA4043D + 30%CS, ECOFLEX + 30%CS, PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays) έχουν τραχύτερη επιφάνεια από τα PLA4043D και ECOFLEX(PBAT), τα οποία είναι σχεδόν λεία. Ταυτόχρονα, η διαφορά δυο τάξεων μεγέθους μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός ότι τα δείγματα που προέρχονται από μίξη με κάποια βιοδιασπώμενα πρόσθετα (Coffee Silverskin, MMTClays) αποδομούνται πιο εύκολα. Η ανάμειξη των πολυμερών με πρόσθετα γενικά ενισχύει την αυτοοξείδωση, μειώνει το μοριακό βάρος του πολυμερούς και στη συνέχεια διευκολύνει τους μικροοργανισμούς να αποικοδομήσουν τα υλικά χαμηλού μοριακού βάρους. Τα βιοδιασπώμενα πρόσθετα ενισχύουν τη βιοαποικοδόμηση των πολυμερών επιτρέποντας στους μικροοργανισμούς να χρησιμοποιούν τον άνθρακα εντός της πολυμερικής αλυσίδας ως πηγή ενέργειας. Ως το πιο γνωστό και ευρέως διαδεδομένο πρόσθετο χρησιμοποιείται το άμυλο (Starch).<sup>50</sup>

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μετρήσεις βακτηρίων για τη μελέτη του βιοφίλμ επιλέχθηκε να γίνονται ανά 45 ημέρες καθώς, σύμφωνα με τους Zhang κ.ά. (2023)<sup>51</sup>, η δομή της μικροβιακής κοινότητας του βιοφίλμ της πλαστικής επιφάνειας αρχίζει να αλλάζει σημαντικά την 44η ημέρα μετά την αρχή του πειράματος υποδεικνύοντας ότι η 44η ημέρα μπορεί να είναι ένα χρονικό σημείο-κλειδί για το σχηματισμό βιοφίλμ στην επιφάνεια του πλαστικού. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι μετά τη συμπλήρωση ενός ορισμένου αριθμού ημερών γήρανσης (44 ημέρες), οι μικροοργανισμοί πάνω στο πλαστικό επιτυγχάνουν μια ισορροπία σύμφωνα με τις αλλαγές στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα μια πιο σταθερή μικροβιακή κοινότητα από τότε.

### 3.1.3. Απώλεια βάρους



Γράφημα 25: Ποσοστό μείωσης βάρους των δειγμάτων στο θαλασσινό νερό σε 45, 90 και 135d πειράματος

Στο συγκεκριμένο γράφημα παρουσιάζεται η ποσοστιαία μείωση βάρους όλων των δειγμάτων στις 45, 90 και 135 ημέρες από την αρχή του πειράματος για το υδάτινο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, μεγαλύτερη απώλεια βάρους παρατηρείται στο PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays που φτάνει το 17,9% στις 90d. Το ποσοστό αυτό είναι μεγαλύτερο από το αναμενόμενο και οφείλεται στο γεγονός ότι το δείγμα έσπασε μέσα στο μπουκάλι με αποτέλεσμα να έχει αρκετά μικρότερο βάρος. Σχεδόν μηδενική μείωση βάρους παρατηρείται στο PLA4043D και ελάχιστη στο ECOFLEX(PBAT) με 1,2% στις 90d. Τα PLA4043D+30%CS και EXOFLEX+30%CS παρουσιάζουν σημαντικά ποσοστά μείωσης με μέγιστα 11,7% και 8,8% αντίστοιχα, στις 135d από την αρχή του πειράματος. Επιπλέον, φαίνεται ότι το κλάσμα της απώλειας βάρους τους αυξάνεται σταθερά όσο αυξάνονται οι μέρες καταβύθισης στο νερό. Συνολικά παρατηρείται ότι, σε υδάτινο περιβάλλον, τα βιοπλαστικά που αποτελούν μείγμα υλικών αποδομούνται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα «καθαρά» υλικά, πιθανώς λόγω των βιοδιασπώμενων προσθέτων (CS, MMTClays). Πιθανόν, η αποδυνάμωση και το σπάσιμο του δείγματος PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays να οφείλεται στη γρήγορη αποδόμηση αυτών των προσθέτων.

Το PLA συνήθως βιοδιασπάται στο κομπόστ σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 50 °C, υπό βιομηχανικές συνθήκες, οι οποίες δεν συμβαίνουν στη θάλασσα. Επιπλέον, το PLA συχνά αναμιγνύεται με άμυλο για να αυξηθεί η βιοδιασπαισιμότητά του και να μειωθεί το κόστος, γεγονός που το καθιστά εύθραυστο.<sup>52</sup> Σύμφωνα με τους Wang κ.ά. (2019)<sup>53</sup>, το PBAT έχασε λιγότερο από 2,5% του βάρους του κατά τη διάρκεια 56 εβδομάδων εμβάπτισης σε δεξαμενές με φυσικό θαλασσινό νερό. Οι Guzman-Sielicka κ.ά. (2013)<sup>54</sup> εξέτασαν την αποικοδόμηση του PBAT και των σύνθετων υλικών του που περιέχουν άμυλο. Οι δοκιμαστικές ράβδοι βυθίστηκαν σε στατικό ποτάμιο νερό, στατικό θαλασσινό νερό, φυσικό θαλασσινό νερό, στατικό αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, στατικό αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και στατικό αποστειρωμένο εργαστηριακά παρασκευασμένο θαλασσινό νερό για 56 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα υπογράμμισαν ότι το καθαρό PBAT αποικοδομείται πολύ αργά σε όλα τα δείγματα νερού με μέγιστη απώλεια βάρους μόλις 4,7% μετά από 56 εβδομάδες. Αντίθετα, τα

σύνθετα υλικά PBAT/αμύλου παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη απώλεια βάρους σε ποτάμιο και θαλασσίνο νερό που περιείχε μικρόβια. Ωστόσο, η αποικοδόμηση συνέβη σχεδόν αποκλειστικά στο κλάσμα του αμύλου, ο δε βαθμός αποικοδόμησης εξαρτήθηκε σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο και την αφθονία των μικροοργανισμών στα υδάτινα σώματα. Το ποσοστό απώλειας βάρους στο ποτάμιο νερό με τον υψηλότερο αριθμό βακτηρίων ήταν 32%, ενώ στο θαλασσίνο νερό μόνο 3,3%.

Τα αποτελέσματα από άλλη έρευνα των Wang κ.ά. (2019)<sup>55</sup> υποδεικνύουν βελτιωμένο ρυθμό βιοαποικοδόμησης σε υδάτινο περιβάλλον για όλα τα νανοσύνθετα φιλμ PLA με προσθήκη υβριδίων νανοκρυστάλλων κυτταρίνης-οξειδίου του ψευδαργύρου (CNC-ZnO) σε σύγκριση με το καθαρό PLA. Όσο περισσότερα υβρίδια CNC-ZnO προστέθηκαν τόσο ταχύτερος ρυθμός αποικοδόμησης επιτεύχθηκε. Μετά από 70 ημέρες έκθεσης, η απώλεια βάρους του καθαρού PLA έφτασε μόνο το 9%, ενώ για το νανοσύνθετο φιλμ PLA διαπιστώθηκε απώλεια βάρους περίπου 25% με την προσθήκη υβριδίων CNC-ZnO. Τα αποτελέσματά τους αυτά έδειξαν ότι η αποικοδόμηση των νανοσύνθετων μεμβρανών PLA ήταν σημαντικά υψηλότερη, σε σύγκριση με εκείνη του καθαρού PLA. Η βελτίωση του ρυθμού αποικοδόμησης μπορεί να αποδοθεί στο ότι τα υβρίδια CNC-ZnO περιέχουν περισσότερες υδροξυλομάδες στην επιφάνεια του CNC, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της επιφανειακής υδρόφιλης κατάστασης για τα νανοσύνθετα φιλμ PLA με τη χρήση ελεγχόμενου επιπέδου φόρτωσης των υβριδίων CNC-ZnO, το οποίο μπορεί να ρυθμίσει την αποικοδόμησή του. Ο πιθανός μηχανισμός είναι ότι, λόγω της ύπαρξης αντίδρασης ισορροπίας στην αποικοδόμηση, ο ρυθμός μειώνεται ελαφρώς καθώς η αντίδραση φτάνει σε ισορροπία, αλλά η ύπαρξη ZnO στα νανοσύνθετα φιλμ PLA θα μπορούσε να είναι ο βασικός παράγοντας κατά την υδρολυτική αποικοδόμηση.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα δείγματα των 90 και 135 ημερών ήταν επίσης πολύ ευαίσθητα και μαλακά στην αφή.

### 3.2. Χώμα

Για τη διεξαγωγή αυτής της πειραματικής διεργασίας συλλέχθηκε μια ποσότητα χώματος από την περιοχή του Πολυτεχνείου Κρήτης στα Κουνουπιδιανά Χανίων. Γενικά, το έδαφος σχηματίζεται από διάφορα σωματίδια όπως χαλίκια, πέτρες, άμμο, ιλύ, πηλό, άργιλο και χούμο. Το είδος χώματος που συλλέχθηκε για το συγκεκριμένο πείραμα χαρακτηρίζεται ως αμμοαργιλώδες. Αυτός ο τύπος εδάφους αποτελείται συνήθως από άμμο μαζί με ποικίλες ποσότητες ιλύος και αργίλου. Το μέγεθος των κόκκων της αμμώδους αργίλου ποικίλλει από πολύ λεπτό έως πολύ χοντρό και εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος των σωματιδίων της άμμου που την αποτελούν. Ενδεικτικά, κάποια χαρακτηριστικά του είναι:

- Τα σωματίδια του αμμώδους εδάφους είναι τα μεγαλύτερα σε μέγεθος και μοιάζουν με μικροσκοπικές πέτρες. Όντας κατά κύριο λόγο πλούσια σε άμμο, τα αμμώδη εδάφη έχουν χονδροειδή υφή.
- Τα αμμοαργιλώδη εδάφη είναι κοκκώδη. Δεν έχουν σταθερή υφή και διαλύονται εύκολα.
- Τα αμμοαργιλώδη εδάφη έχουν κοκκινωπό καφέ χρώμα. Είναι λιγότερο όξινα και περισσότερο αλκαλικά.
- Αυτά τα εδάφη παρέχουν καλό αερισμό διευκολύνοντας την καλή ροή του οξυγόνου. Το έδαφος περιέχει μικρούς ζωντανούς οργανισμούς που βοηθούν τα φυτά να απορροφήσουν θρεπτικά συστατικά από το έδαφος για την ανάπτυξή τους. Οι

οργανισμοί αναπτύσσονται καλά λόγω του σωστού αερισμού και με τη σειρά τους συμβάλλουν στην ανάπτυξη των φυτών.

- Το pH του εδάφους είναι βασικός παράγοντας για την ανάπτυξη των φυτών καθώς και για την ύπαρξη βακτηρίων και θρεπτικών ουσιών στο έδαφος, που το καθιστούν πιο γόνιμο. Η τιμή του pH του αμμοαργιλώδους εδάφους κυμαίνεται μεταξύ 4,5 και 5,5.<sup>56</sup>

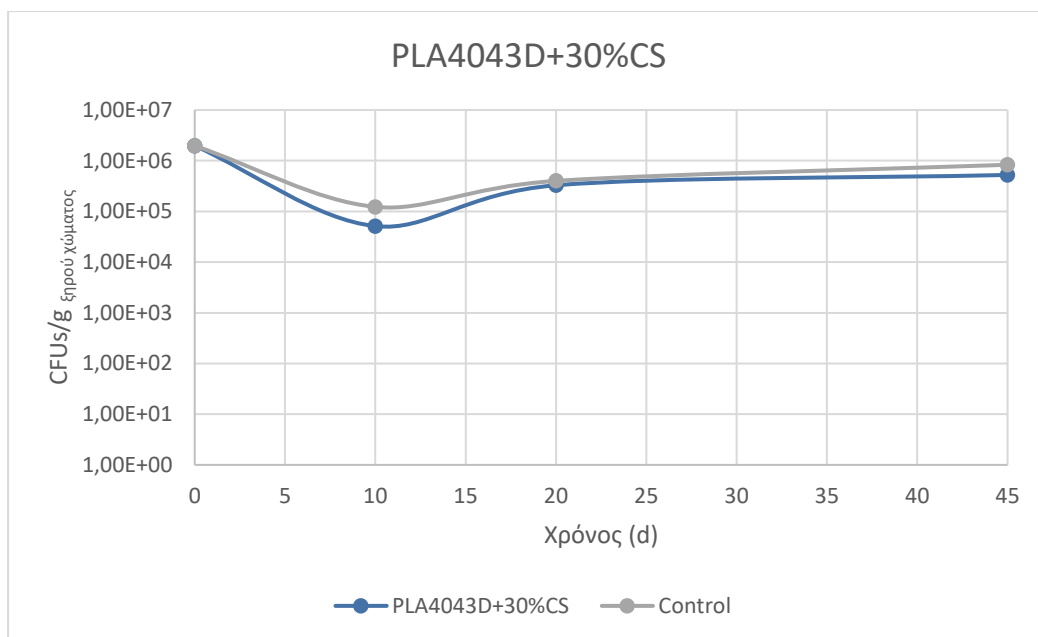


Εικόνα 37: Αμμοαργιλώδες έδαφος<sup>57</sup>

### 3.2.1. Συμπεριφορά πληθυσμού μικροοργανισμών

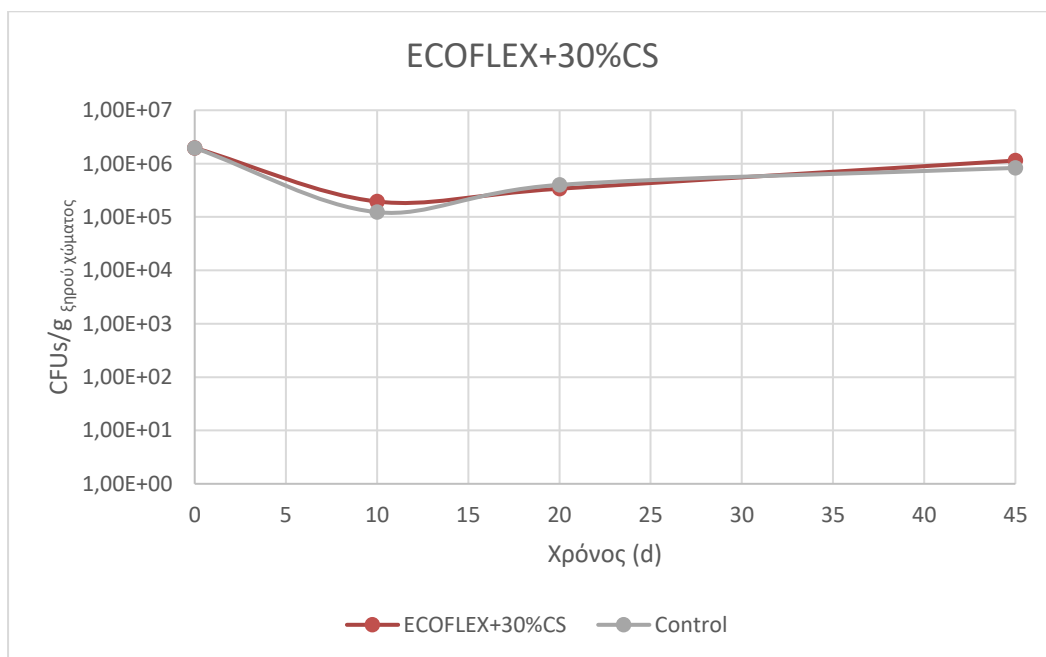
Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις συγκεντρώσεις μικροοργανισμών σε CFUs/γξηρού χώματος για τα 5 δείγματα βιοπλαστικών και για το Control στα 3 χρονικά στάδια του πειράματος. Σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι η αρχική βακτηριακή βιομάζα του εδάφους είχε συγκέντρωση  $1,97 \cdot 10^6$  CFUs/γξηρού χώματος.

#### Α' Χρονικό στάδιο



Γράφημα 26: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χύματος) για το PLA4043D+30%CS στο πρώτο στάδιο (0-45d)

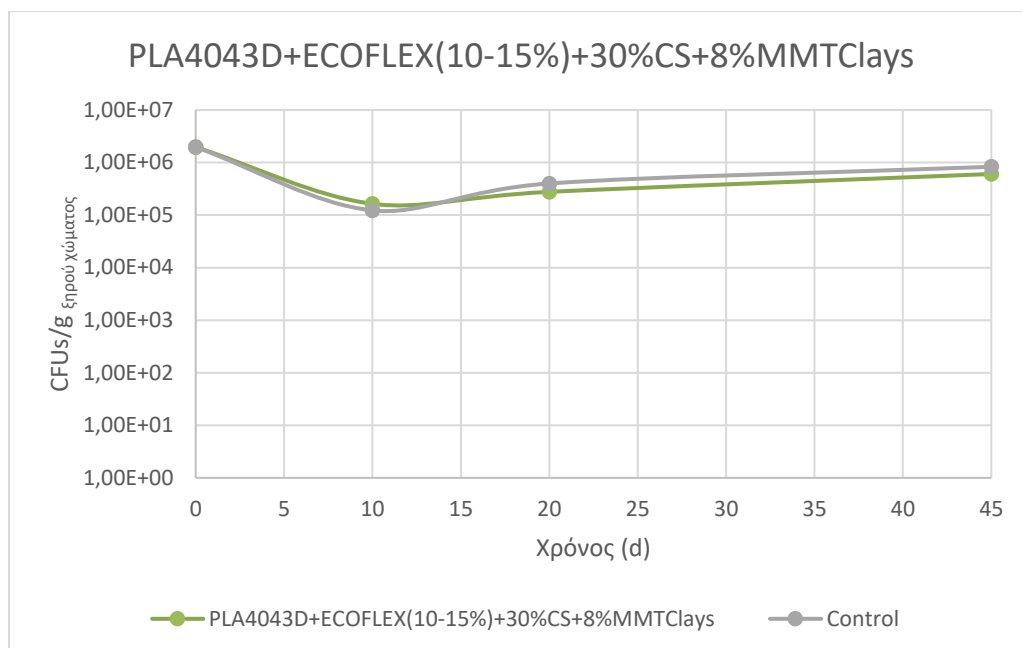
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χόμα



Γράφημα 27: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χύματος) για το ECOFLEX+30%CS στο πρώτο στάδιο (0-45d)

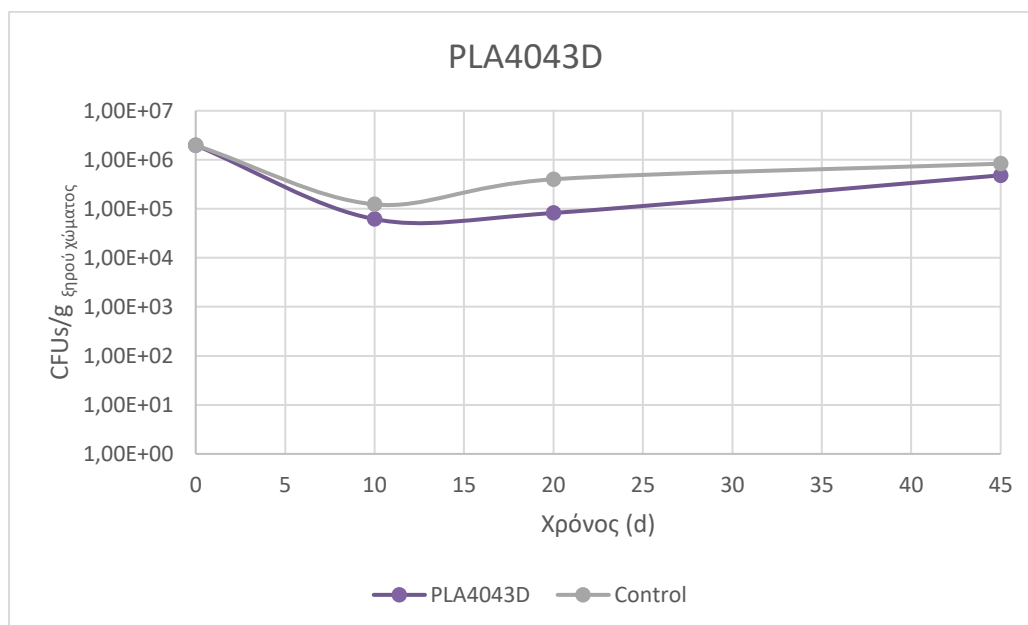
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χόμα





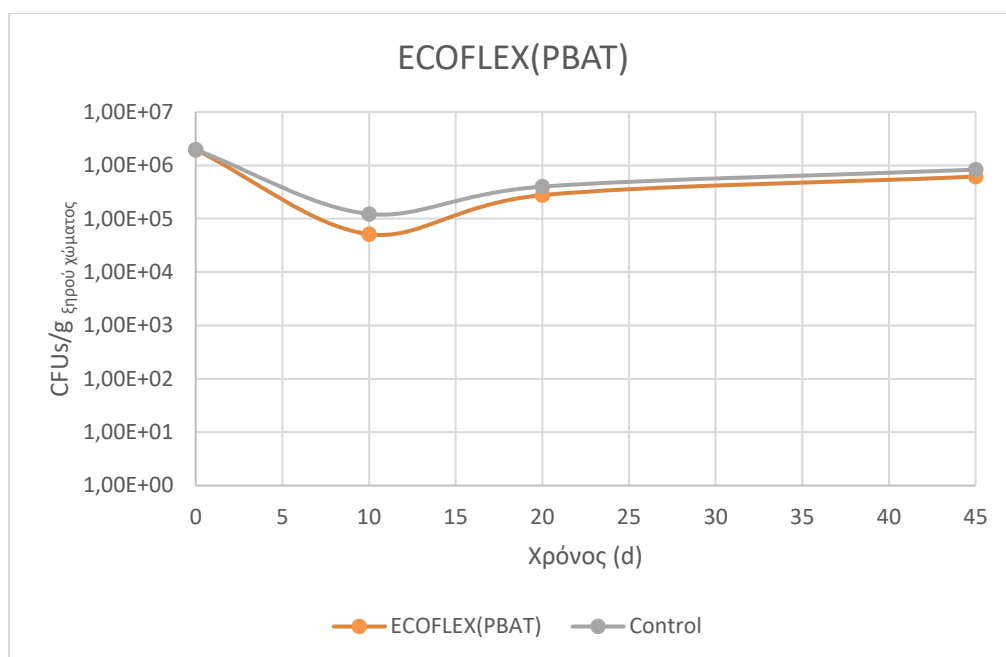
Γράφημα 28: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays στο πρώτο στάδιο (0-45d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



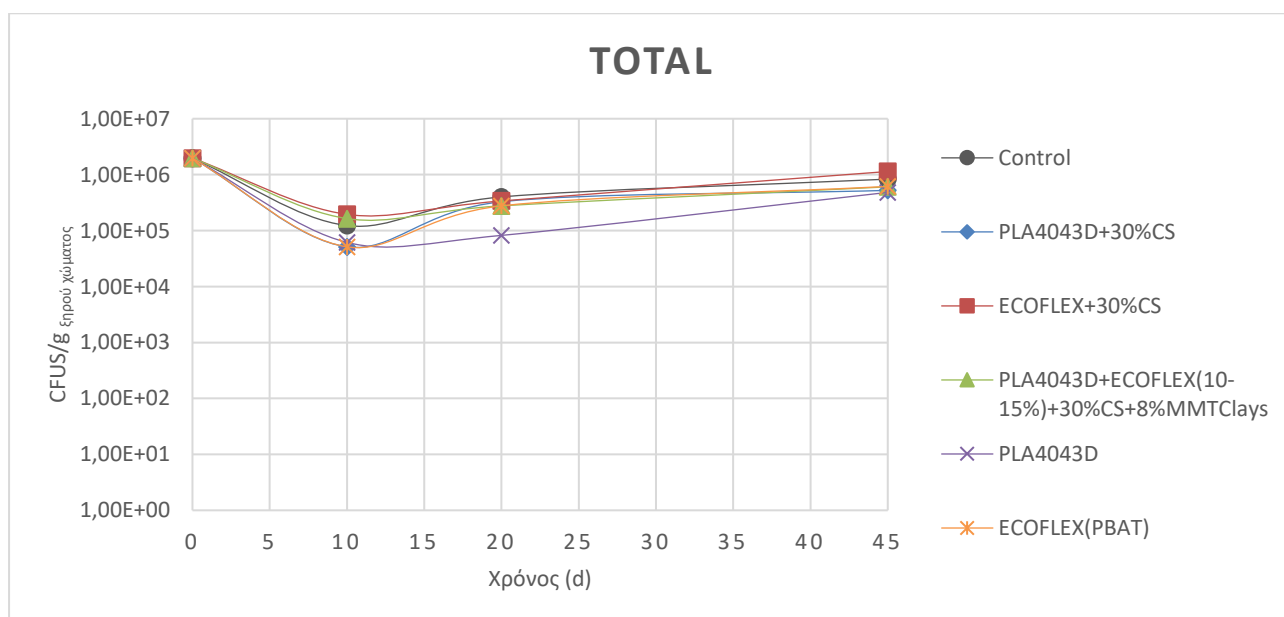
Γράφημα 29: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το PLA4043D στο πρώτο στάδιο (0-45d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



Γράφημα 30: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το ECOFLEX(PBAT) στο πρώτο στάδιο (0-45d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



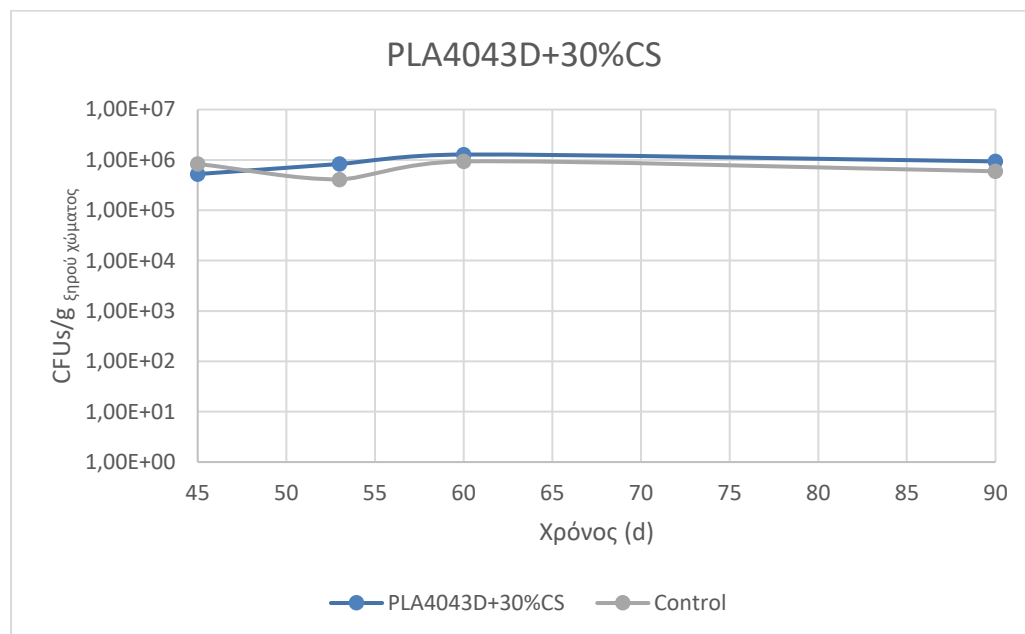
Γράφημα 31: Συγκεντρωτικό διάγραμμα συγκεντρώσεων μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το χώμα στο πρώτο χρονικό στάδιο (0-45d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

Στο Α' χρονικό στάδιο για το χώμα παρατηρούνται πανομοιότυπες καμπύλες συμπεριφοράς σε όλα τα δείγμα που κυμαίνονται από  $10^4$  έως  $10^6$  CFUs/g ξηρού χώματος. Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι τις πρώτες 10 μέρες παρατηρείται ελάττωση δύο τάξεων μεγέθους που πιθανόν να οφείλεται στο ότι χρειάστηκε περισσότερες από 10 μέρες

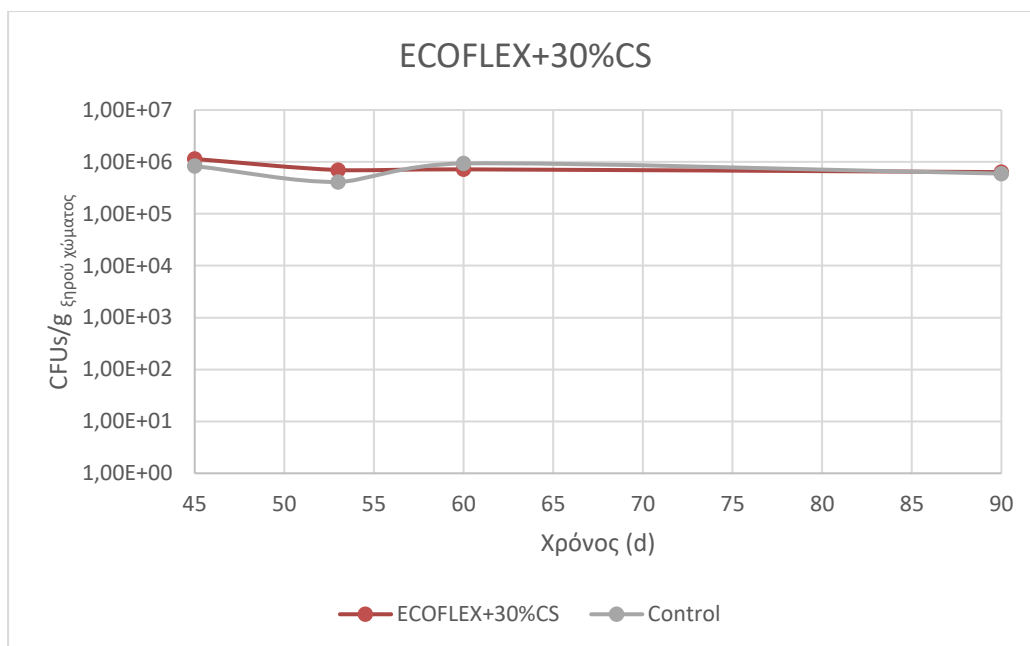
προσαρμογής στο περιβάλλον των δοχείων. Στο πέρας των 45 ημερών μετρήθηκε μέγιστη τιμή συγκέντρωσης  $1,14 \cdot 10^6$  CFUs/g ξηρού χώματος στο δείγμα ECOFLEX+30%CS, ενώ ελάχιστη τιμή  $4,82 \cdot 10^5$  CFUs/g ξηρού χώματος στο PLA4043D.

### Β' Χρονικό στάδιο



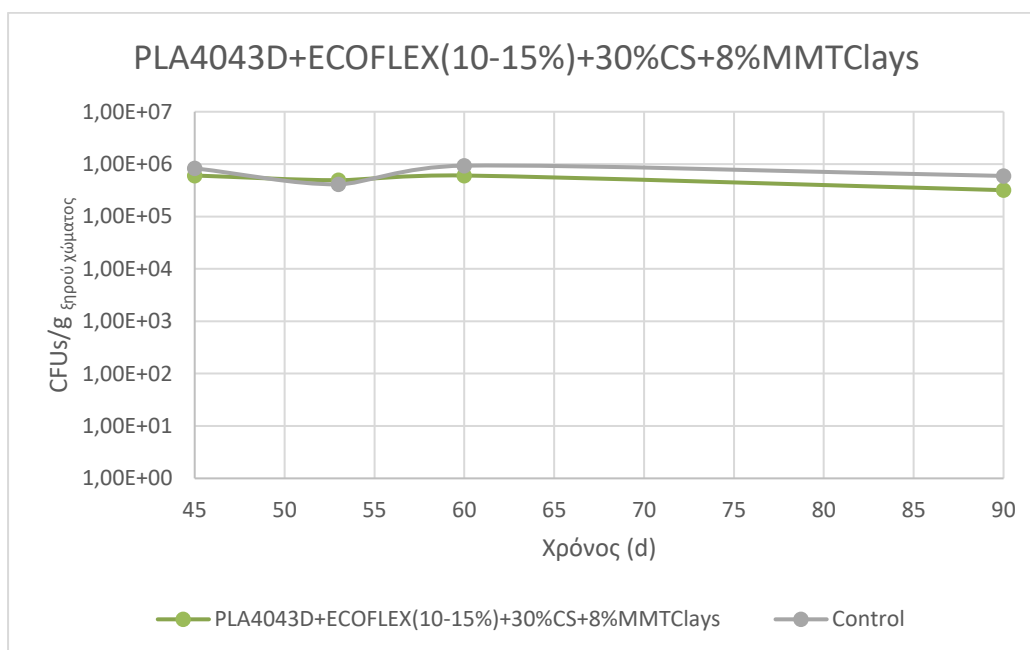
Γράφημα 32: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το PLA4043D+30%CS στο δεύτερο στάδιο (45-90d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



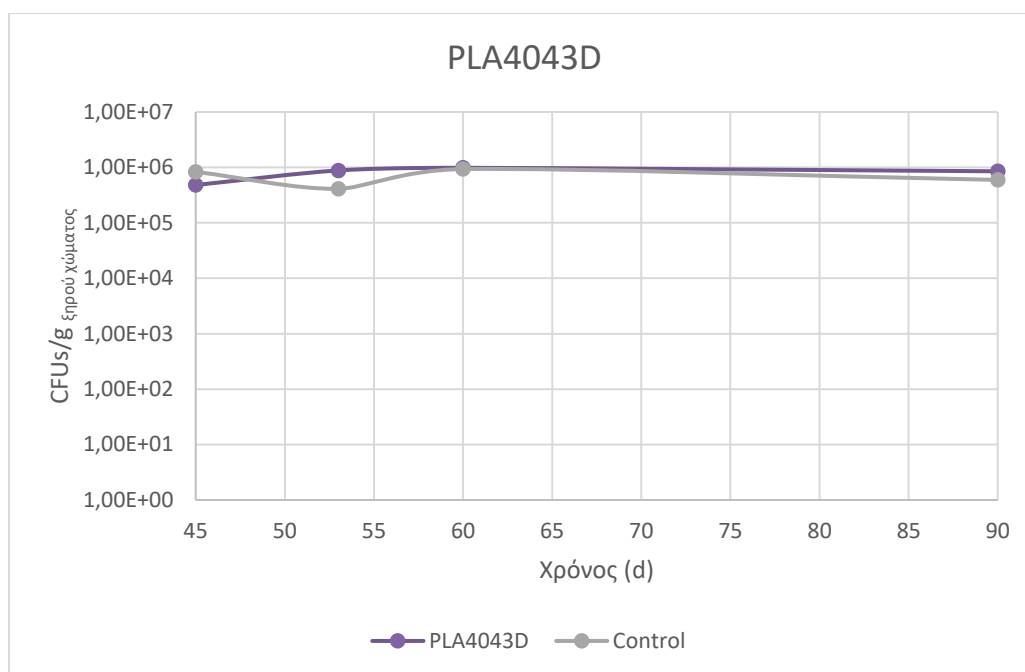
Γράφημα 33: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το ECOFLEX(PBAT)+30%CS στο δεύτερο στάδιο (45-90d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



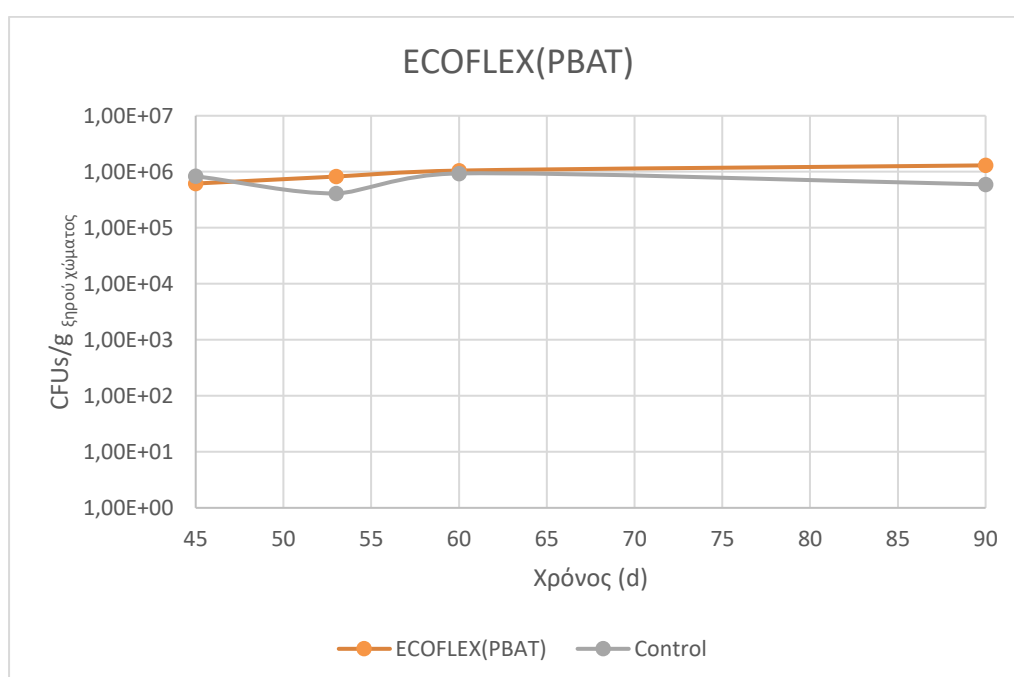
Γράφημα 34: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays στο δεύτερο στάδιο (45-90d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



Γράφημα 35: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το PLA4043D στο δεύτερο στάδιο (45-90d)

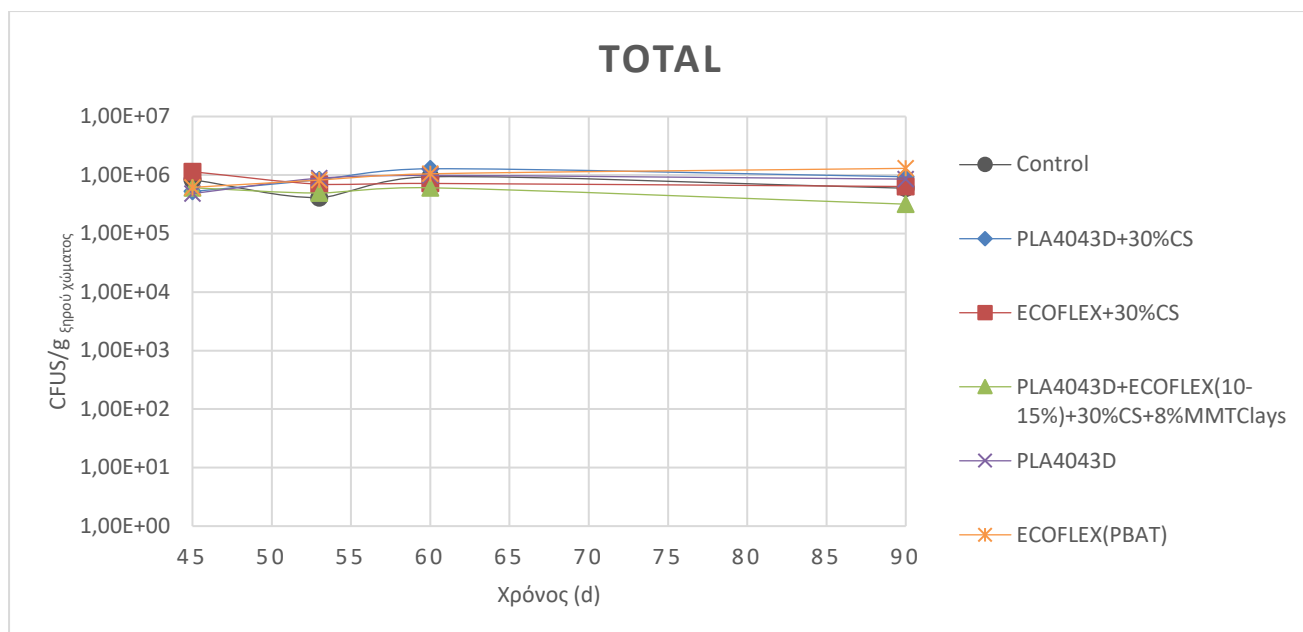
Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



Γράφημα 36: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το ECOFLEX(PBAT) στο δεύτερο στάδιο (45-90d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



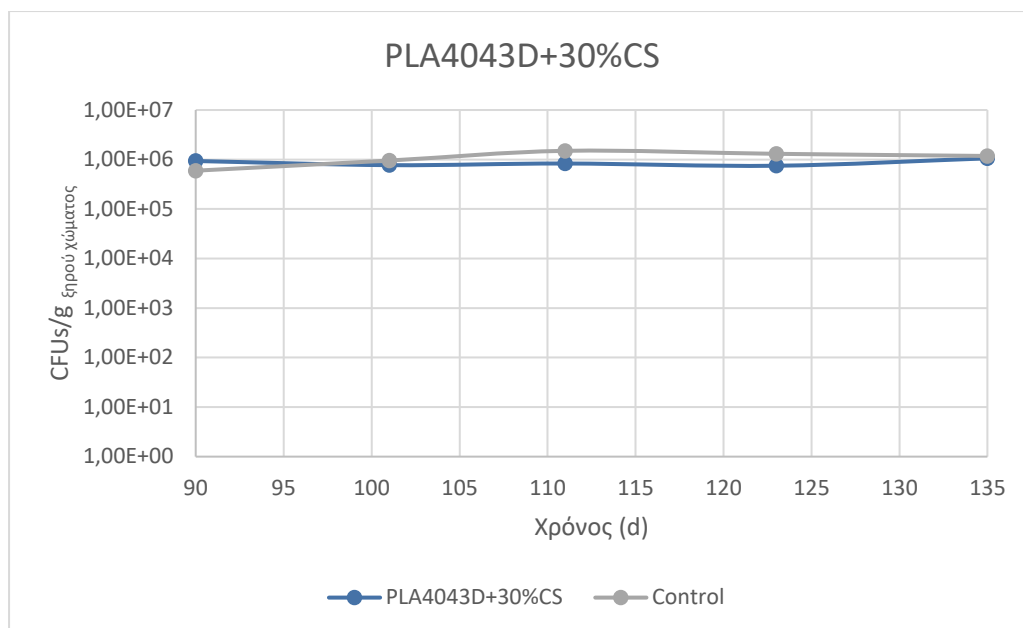


Γράφημα 37: Συγκεντρωτικό διάγραμμα συγκεντρώσεων μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το χώμα στο δεύτερο χρονικό στάδιο (45-90d)

*Control:* Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

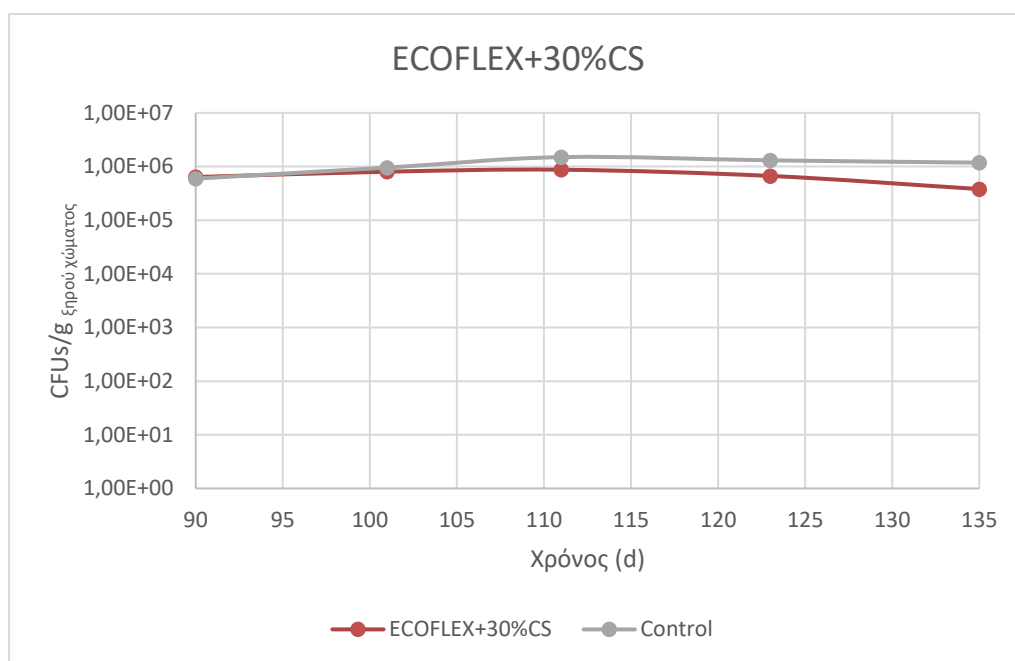
Σε αντίστοιχο πλαίσιο κυμαίνονται και οι τιμές συγκεντρώσεων μικροοργανισμών του Β' χρονικού σταδίου. Εδώ δεν παρατηρούνται διακυμάνσεις στην τάξη μεγέθους, μετρήθηκαν περίπου  $10^6$  CFUs/g ξηρού χώματος για όλα τα δείγματα καθ' όλο το χρονικό στάδιο. Την 90<sup>η</sup> ημέρα μετρήθηκε μέγιστη τιμή συγκέντρωσης  $1,30 \cdot 10^6$  CFUs/g ξηρού χώματος στο δείγμα ECOFLEX(PBAT), ενώ ελάχιστη τιμή  $3,18 \cdot 10^5$  CFUs/g ξηρού χώματος στο δείγμα PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTclays.

### Γ' Χρονικό στάδιο



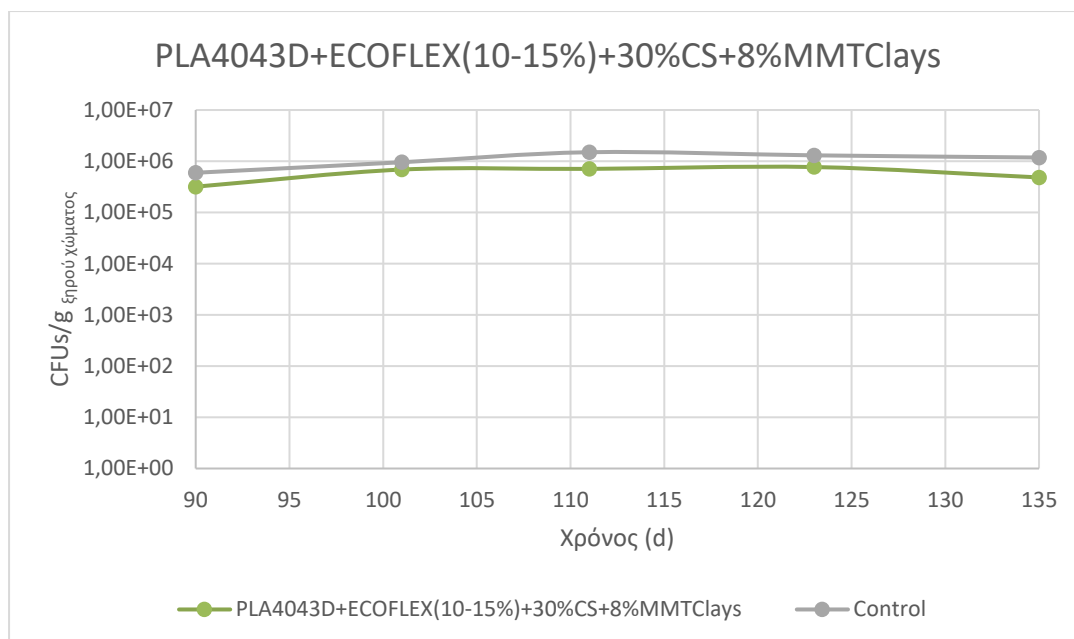
Γράφημα 38: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χόματος) για το PLA4043D+30%CS στο τρίτο στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



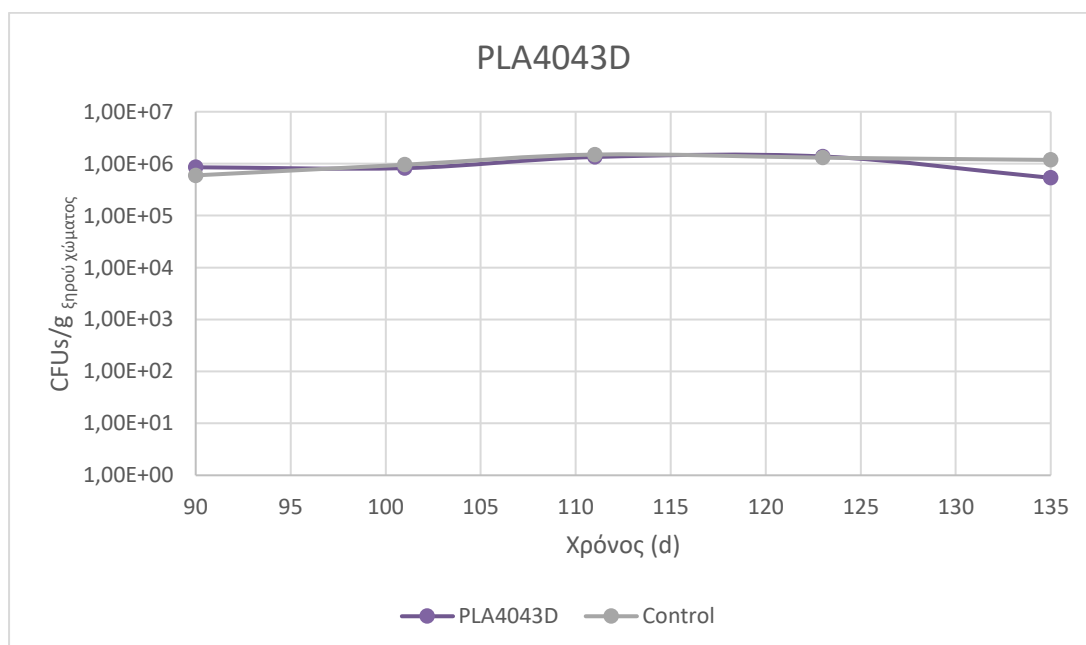
Γράφημα 39: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χόματος) για το ECOFLEX+30%CS στο τρίτο στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



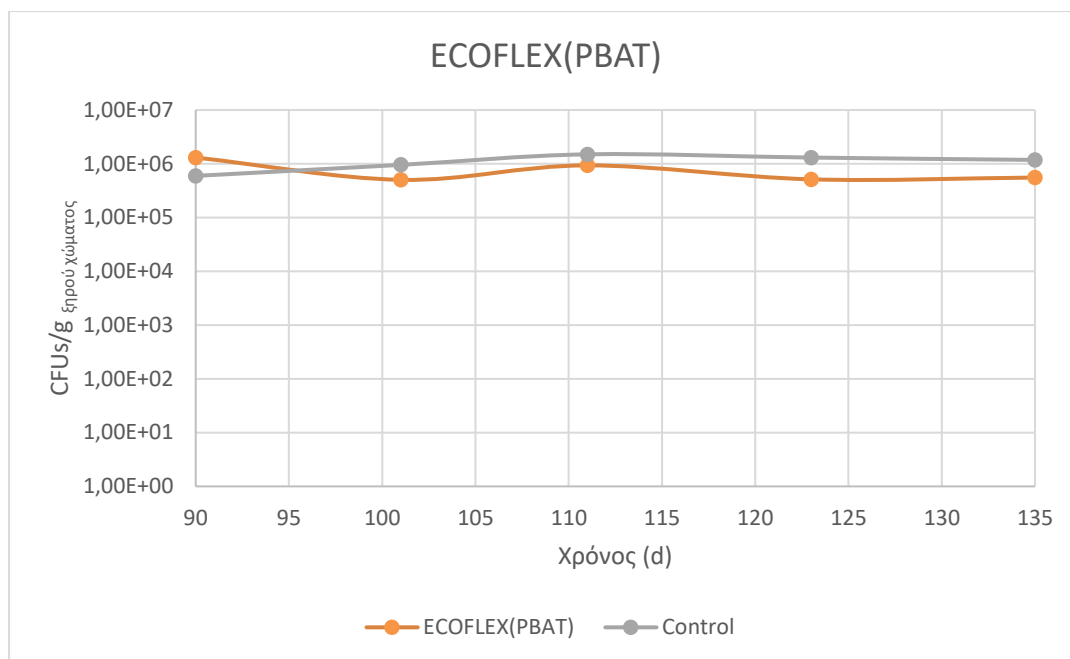
Γράφημα 40: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTclays στο τρίτο στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



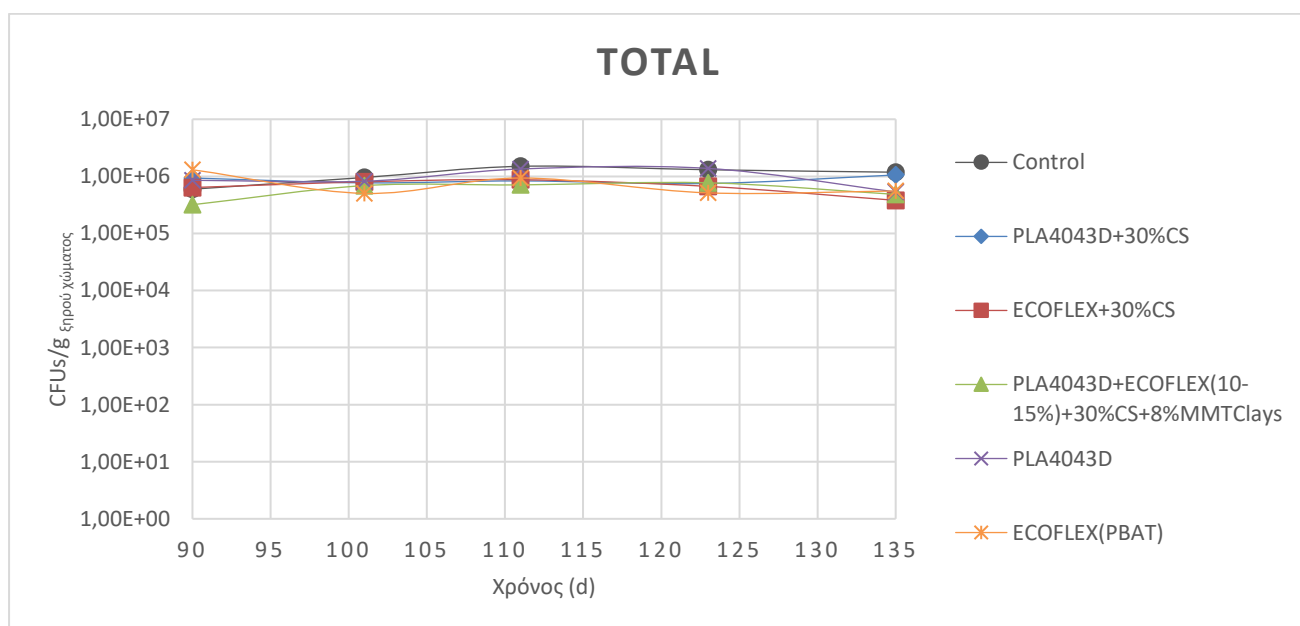
Γράφημα 41: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το PLA4043D στο τρίτο στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



Γράφημα 42: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το ECOFLEX(PBAT) στο τρίτο στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα



Γράφημα 43: Συγκεντρωτικό διάγραμμα συγκεντρώσεων μικροοργανισμών (CFUs/g ξηρού χώματος) για το χώμα στο τρίτο χρονικό στάδιο (90-135d)

Control: Δείγμα που περιείχε μόνο χώμα

Στο τρίτο και τελευταίο χρονικό στάδιο παρατηρούνται πανομοιότυπες καμπύλες συμπεριφοράς του πληθυσμού μικροοργανισμών στο χώμα. Όλα τα δείγματα παρουσιάζουν σχετικά σταθερές τιμές χωρίς διακυμάνσεις στην τάξη μεγέθους. Την 135<sup>η</sup> ημέρα, που αποτελεί και την τελευταία μέρα του πειράματος μετρήθηκε μέγιστη τιμή συγκέντρωσης 1,18·

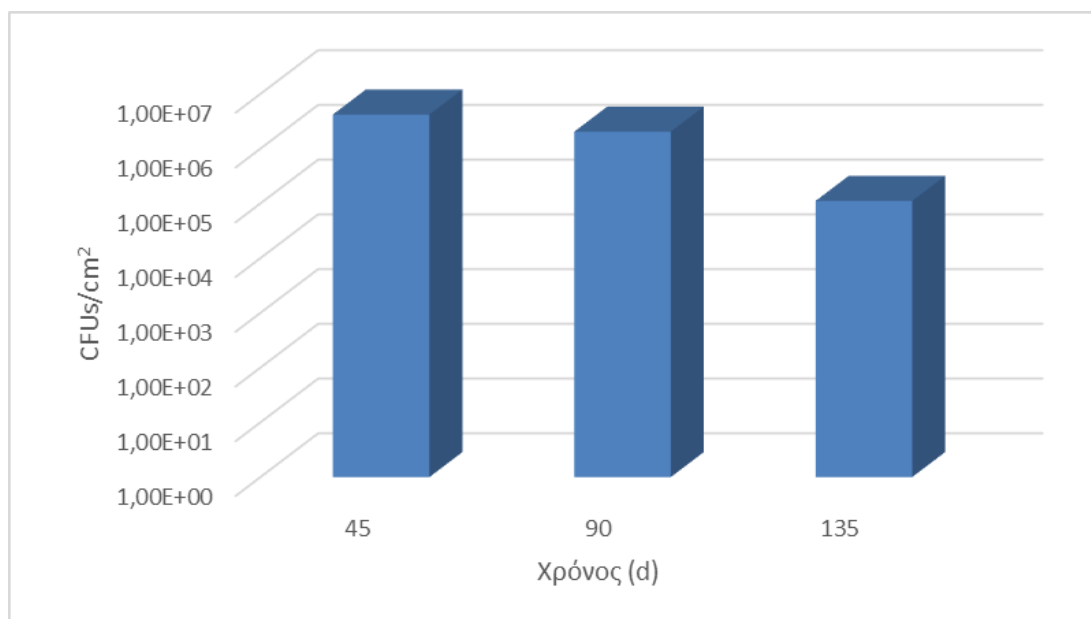
$10^6$  CFUs/ξηρού χώματος στο Control και  $1,06 \cdot 10^6$  CFUs/ξηρού χώματος στο δείγμα PLA4043D+30%CS, ενώ ελάχιστη τιμή  $3,80 \cdot 10^5$  CFUs/ξηρού χώματος στο δείγμα ECOFLEX+30%CS.

Οι Adhikari κ.ά. (2016)<sup>58</sup> πραγματοποίησαν μελέτη για την ανάλυση της βιοαποικοδομησιμότητας 3 ειδών εμπορικών βιοπλαστικών (PBS, PBS-άμυλο και PLA) και ενός μη βιοαποικοδομήσιμου πετροχημικού πλαστικού (PA66), τα οποία θάφτηκαν σε γεωργικό έδαφος με αρχική βακτηριακή βιομάζα  $10^9$  CFUs/g<sub>soil</sub>. Το βιοπλαστικό PBS ανήκει στην ίδια κατηγορία με το PBAT (βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά με βάση τα ορυκτά) και έχουν παραπλήσιες ιδιότητες. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η βακτηριακή βιομάζα στα εδαφικά δείγματα δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια των 28 ημερών. Συγκεκριμένα, το Control (χωρίς πλαστικό), το PLA και το PBS κυμάνθηκαν από  $1,0 \cdot 10^9$  έως  $1,6 \cdot 10^9$  CFUs/g<sub>soil</sub>, ενώ το PBS-άμυλο από  $0,7 \cdot 10^9$  έως  $1,7 \cdot 10^9$  CFUs/g<sub>soil</sub>. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν περαιτέρω τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον, το πείραμα των Adhikari κ.ά. υποδεικνύει ότι τα βιοπλαστικά θα συνεχίσουν να αποικοδομούνται σε μια πιο μακροπρόθεσμη δοκιμή, όπως φαίνεται και στην παρούσα εργασία.

Σημαντική παράμετρος στο πείραμα αποτέλεσε και η τοποθέτηση των βιοπλαστικών στο δοχείο χώματος. Σχετική έρευνα των Mostafa κ.ά. (2010)<sup>59</sup> συνέκρινε δείγματα βιοπλαστικών θαμμένα στην επιφάνεια του χώματος και στα 10cm βάθος αλλά και σε διαφορετικά είδη εδάφους (αμμώδες, αργιλώδες, αμμοαργιλώδες). Τα αποτελέσματά τους αποκάλυψαν ότι η βιοαποικοδόμηση των βιοπλαστικών υλικών ήταν ταχύτερη στο υπέδαφος από ό,τι στην επιφάνεια του εδάφους καθώς και ότι τα αμμώδη εδάφη έχουν καλύτερες επιδόσεις από τα αργιλώδη και αμμοαργιλώδη εδάφη όσον αφορά τη μακροχρόνια βιοαποικοδόμηση. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία τα δείγματα βιοπλαστικών ήταν θαμμένα στα 5cm χώματος περίπου μέσα στο δοχείο, όχι στην επιφάνεια και το χόμα στα δοχεία χαρακτηρίζεται ως αμμοαργιλώδες.

### **3.2.2. Μελέτη βιοϋμενίου PLA4043D + 30%CS**

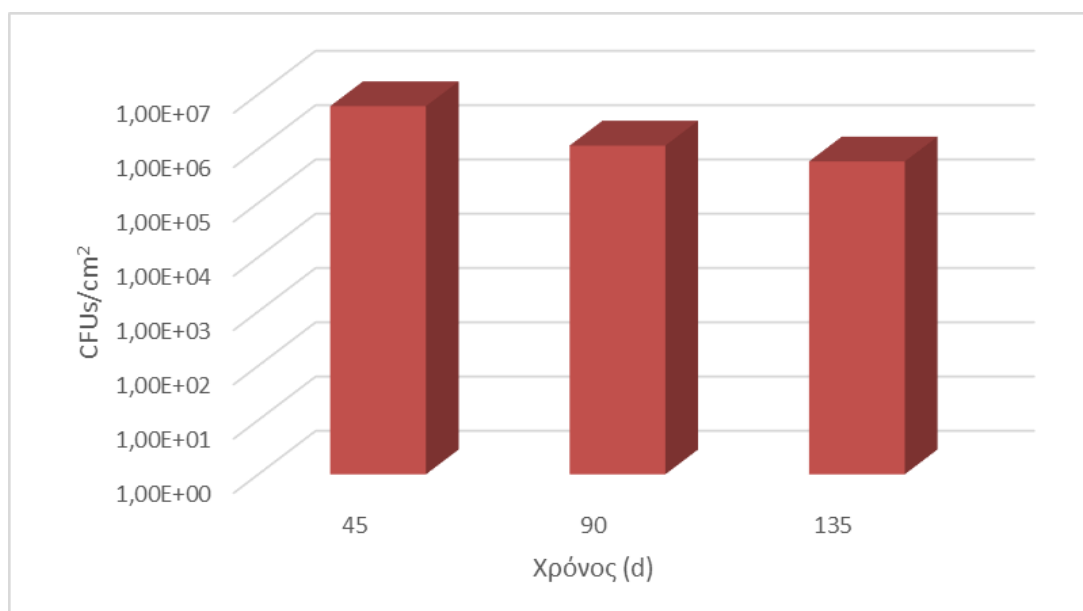




Γράφημα 44: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια του PLA4043D+30%CS

Στο Γράφημα 43 φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις των αποικιών στο βιοφίλμ για το πρώτο δείγμα μειώνονται με την πάροδο του χρόνου καθώς μεγαλύτερη τιμή παρατηρείται στις πρώτες 45 ημέρες  $4,20 \cdot 10^6$  CFUs/cm<sup>2</sup>, αμέσως επόμενη  $2,04 \cdot 10^6$  CFUs/cm<sup>2</sup> στις 90 μέρες και μικρότερη  $1,11 \cdot 10^5$  CFUs/cm<sup>2</sup> στις 135 μέρες από την αρχή του πειράματος. Παρατηρείται ότι η τάξη μεγέθους πέφτει από το  $10^6$  στο  $10^5$  στο τρίτο χρονικό στάδιο.

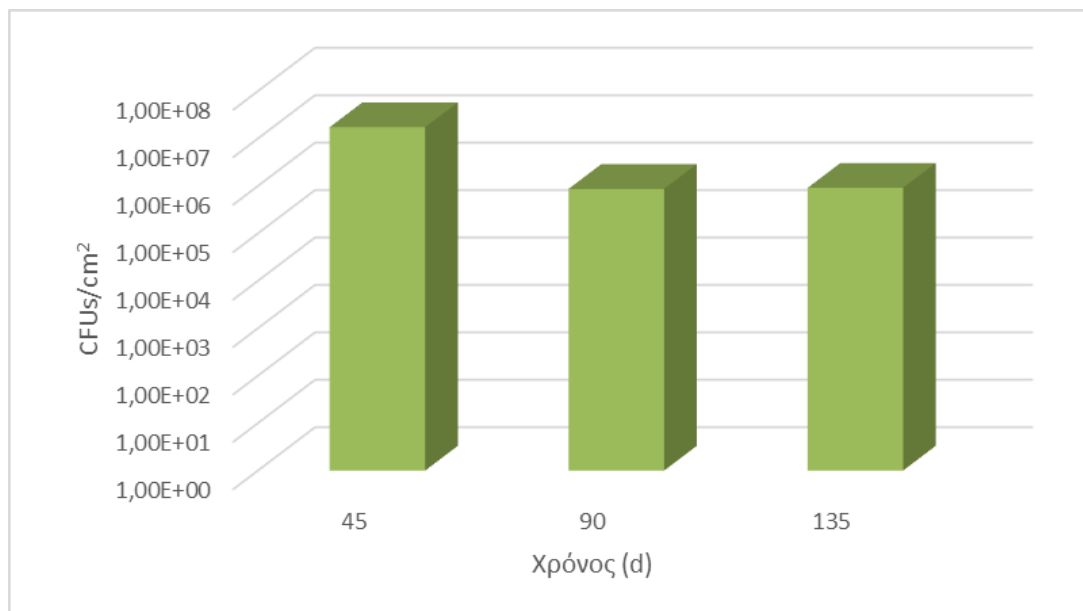
#### ECOFLEX + 30%CS



Γράφημα 45: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια του ECOFLEX+30%CS

Σε συνάρτηση με τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά και στο *Γράφημα 44* με τις τιμές της συγκέντρωσης να χαμηλώνουν από την αρχή του πειράματος. Δηλαδή στις 45 ημέρες μετρήθηκαν  $6,02 \cdot 10^6$  CFUs/cm<sup>2</sup>, στις 90 μετρήθηκαν  $1,16 \cdot 10^6$  και στο τέλος του πειράματος  $5,78 \cdot 10^5$ . Παρατηρείται η ίδια πτώση της τάξης μεγέθους.

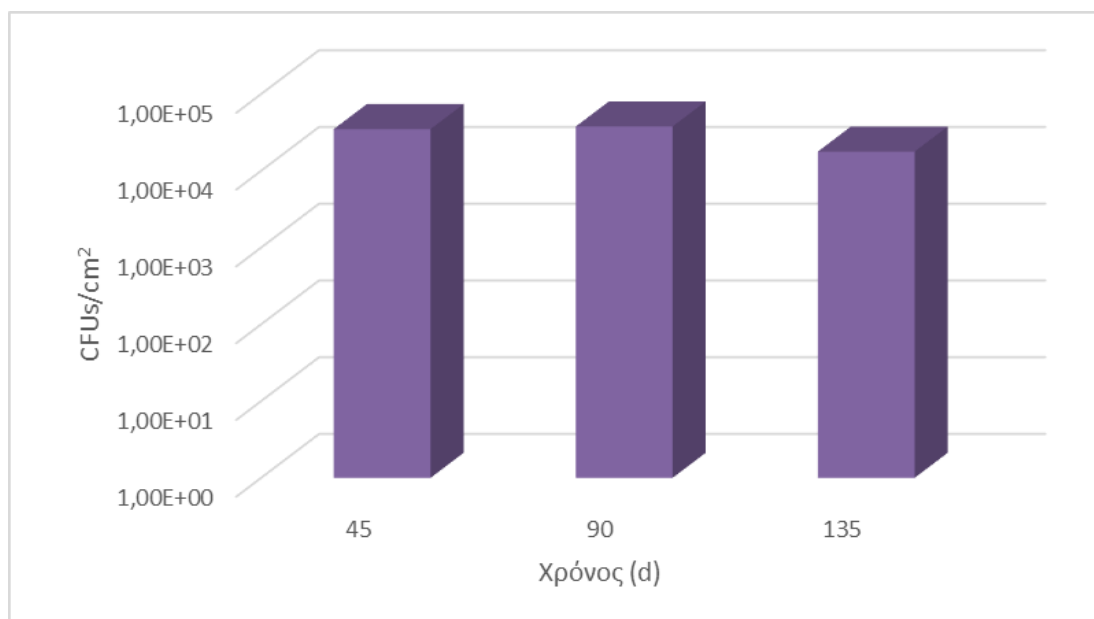
#### **PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays**



*Γράφημα 46: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια του PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays*

Παρόμοιο μοτίβο φαίνεται και στο *Γράφημα 45* με υψηλότερη τιμή  $1,73 \cdot 10^7$  CFUs/cm<sup>2</sup> στις 45 ημέρες, και πολύ κοντινές τιμές στις 90 και 135 με  $8,67 \cdot 10^5$  και  $9,11 \cdot 10^5$  αντίστοιχα. Και πάλι παρατηρείται πτώση κατά μια τάξη μεγέθους περίπου.

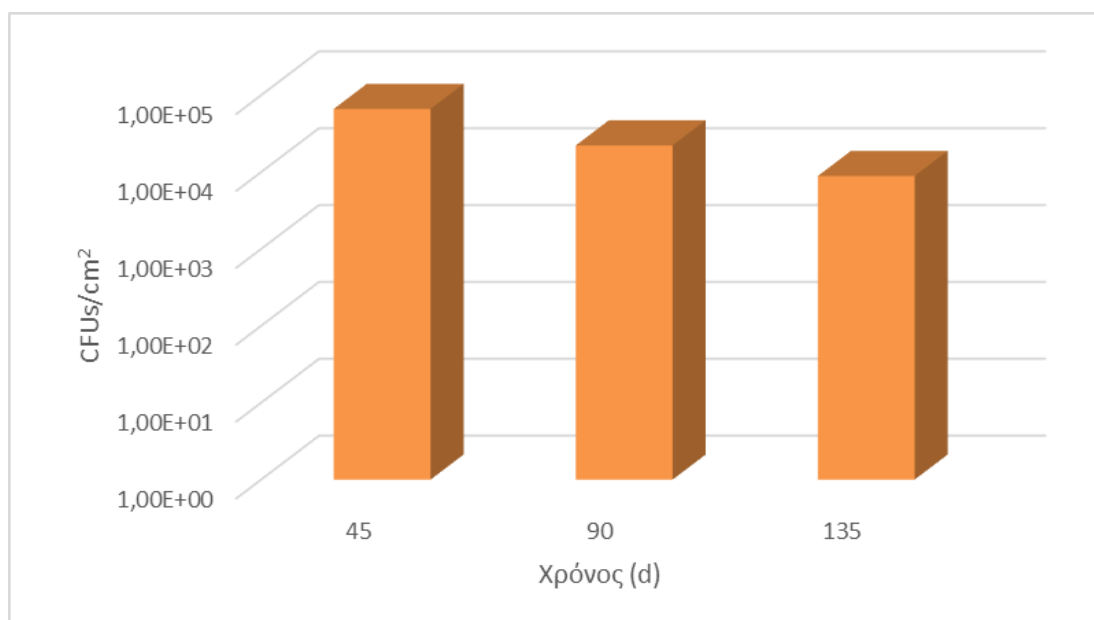
#### **PLA4043D**



Γράφημα 47: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια του PLA4043D

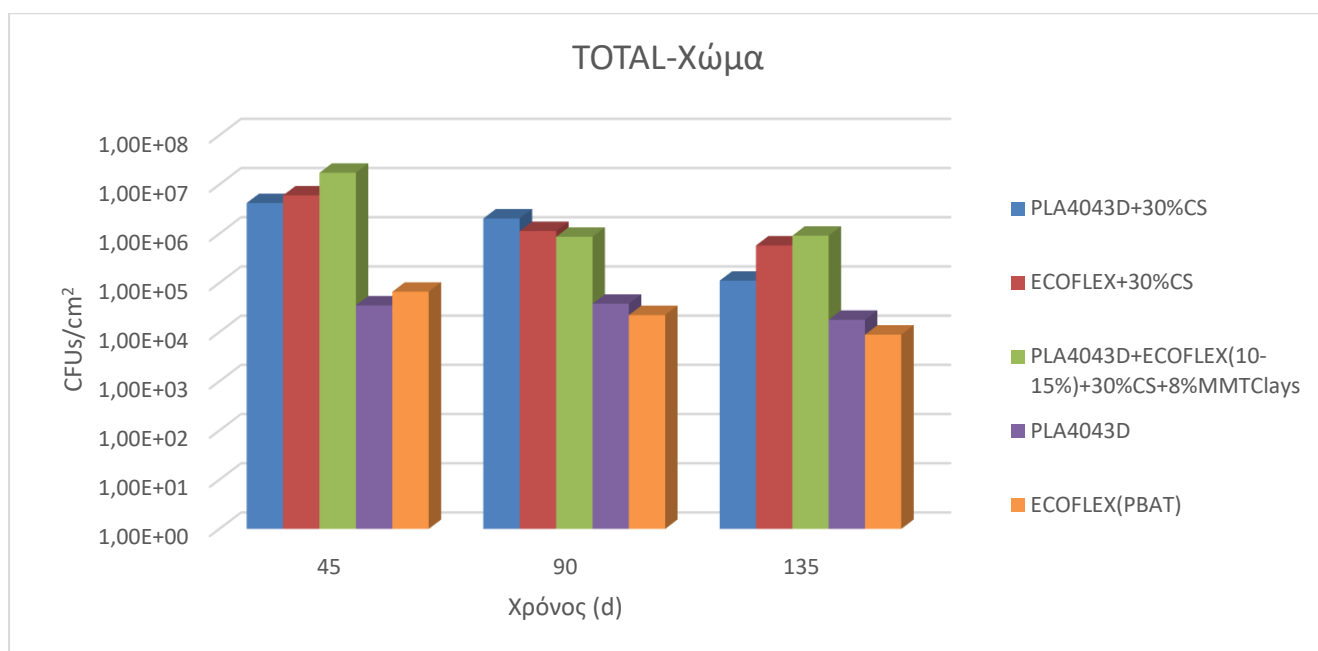
Για το PLA4043D παρατηρούνται σχεδόν ίδιες τιμές στις 45 και 90 ημέρες, δηλαδή  $3,49 \cdot 10^4$  και  $3,78 \cdot 10^4$  CFUs/cm<sup>2</sup> αντίστοιχα. Στις 135 μέρες παρατηρείται μικρή πτώση στα  $1,78 \cdot 10^4$  CFUs/cm<sup>2</sup>. Συγκριτικά με τα τρία παραπάνω δείγματα οι τιμές των συγκεντρώσεων κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα κατά δύο τάξεις μεγέθους περίπου.

### ECOFLEX(PBAT)



Γράφημα 48: Συγκεντρώσεις μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια του ECOFLEX(PBAT)

Παρόμοιο μοτίβο ακολουθούν οι τιμές του δείγματος ECOFLEX(PBAT) αλλά σε χαμηλότερη τάξη μεγέθους. Δηλαδή, στις 45 ημέρες μετρήθηκαν  $6,62 \cdot 10^4$  CFUs/cm<sup>2</sup>, στις 90 μετρήθηκαν  $2,22 \cdot 10^4$  και στο τέλος του πειράματος  $8,89 \cdot 10^3$ .



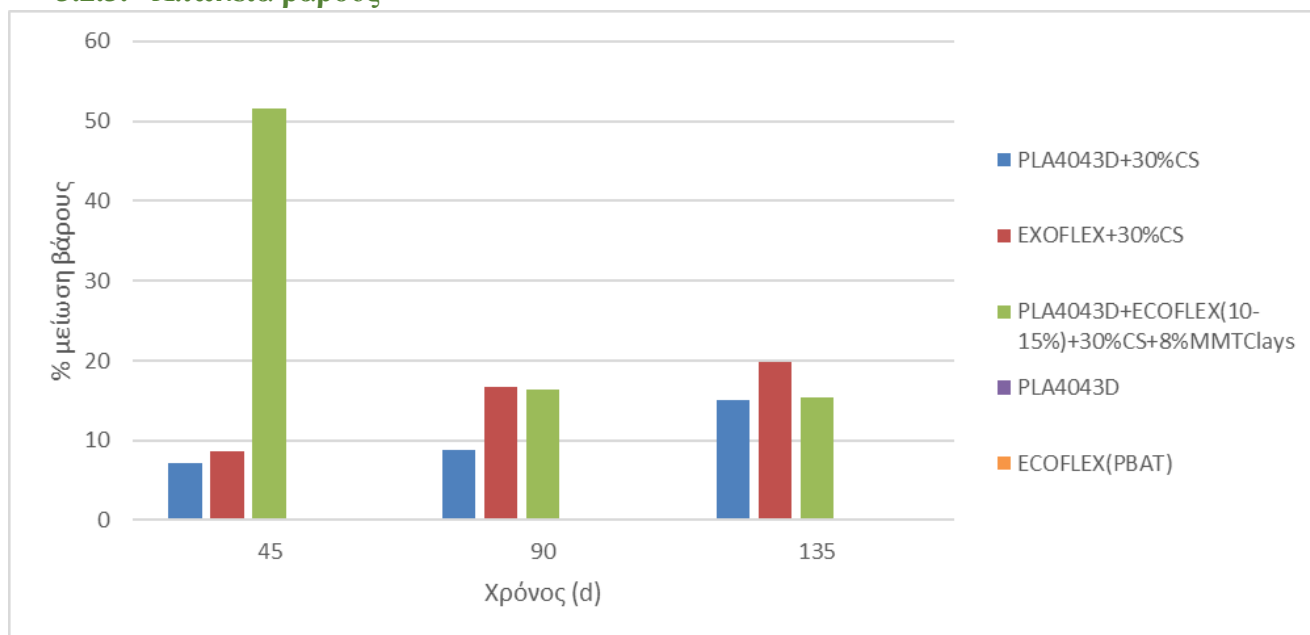
Γράφημα 49: Συγκεντρωτικό διάγραμμα συγκεντρώσεων μικροοργανισμών (CFUs/cm<sup>2</sup>) στην επιφάνεια των δειγμάτων του χώματος

Όπως έχει προαναφερθεί, η αποικοδόμηση των μικροπλαστικών από το βιοφίλμ επηρεάζεται τόσο από τις ιδιότητες του ίδιου του μικροπλαστικού όσο από το ρυθμό και την ποιότητα του σχηματισμού βιοφίλμ στην επιφάνεια του μικροπλαστικού, καθώς και από την ποιότητα του χώματος. Στο συγκεκριμένο πείραμα τα δείγματα πλαστικών ήταν τοποθετημένα σε πλαστικά δοχεία σε εξωτερικό χώρο, εκτεθειμένα στις καιρικές συνθήκες. Παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά με τη μελέτη βιοφίλμ στο θαλασσινό νερό, όπου στα πρώτα τρία δείγματα (PLA4043D+30%CS, ECOFLEX+30%CS και PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays) οι τιμές των συγκεντρώσεων κυμαίνονται δύο τάξεις μεγέθους πάνω από τα PLA4043D και ECOFLEX(PBAT). Δηλαδή, τα βιοδιασπώμενα πρόσθετα προώθησαν το σχηματισμό βακτηριακών βιοϋμενίων στην επιφάνεια, ανεξαρτήτως του περιβάλλοντος. Η τραχύτητα της επιφάνειας είναι και εδώ σημαντικός παράγοντας στο σχηματισμό βιοφίλμ. Στην ενότητα 3.1.2. αναφέρεται ότι η τραχύτητα της επιφάνειας συσχετίζεται θετικά με τον ρυθμό ανάπτυξης των βιοϋμενίων και την πυκνότητα των προσκολλημένων μικροοργανισμών και τα PLA4043D και ECOFLEX(PBAT) είχαν λεία επιφάνεια.

Όπως συμπεραίνεται από τη μελέτη των Adhikari κ.ά. (2016)<sup>58</sup> για μακροπρόθεσμη αποδόμηση, οι δομές του PBS και του PBS/αμύλου αποικοδομήθηκαν σημαντικά περισσότερο από αυτές του PLA. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι ο ρυθμός αποικοδόμησης του PBS και του PBS/αμύλου στο περιβάλλον είναι ταχύτερος από αυτόν του PLA. Σημειώνεται ότι το PBS λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο με το PBAT και το άμυλο με το CS.

Και σε αυτή την περίπτωση οι μετρήσεις βακτηρίων για τη μελέτη του βιοφίλμ επιλέχθηκε να γίνονται ανά 45 ημέρες. Μελέτη των Zhang κ.ά. (2023)<sup>51</sup> υποδεικνύει ότι η 44η ημέρα αποτελεί ένα σημαντικό χρονικό σημείο για το σχηματισμό βιοφίλμ στην επιφάνεια του πλαστικού καθώς οι μικροοργανισμοί επιτυγχάνουν μια ισορροπία σύμφωνα με τις αλλαγές στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα μια πιο σταθερή μικροβιακή κοινότητα.

### 3.2.3. Απώλεια βάρους



Γράφημα 50: Ποσοστό μείωσης βάρους των δειγμάτων στο χώμα σε 45, 90 και 135d πειράματος

Στο Γράφημα 48 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ποσοστιαίας μείωσης βάρους όλων των δειγμάτων στις 45, 90 και 135 ημέρες πειράματος για το έδαφος. Παρατηρείται απότομη μείωση βάρους στις 45d για το PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays (51,6%) καθώς το δείγμα έσπασε μέσα στο δοχείο με το χώμα και δεν ήταν δυνατό να ανακτηθεί πλήρως. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι τα βιοδιασπώμενα CS και MMTClays αποδομήθηκαν γρηγορότερα και δημιούργησαν ρωγμές. Στους χρόνους 90 και 135d για το ίδιο υλικό, το ποσοστό είναι σχεδόν όμοιο (16,4% και 15,4% αντίστοιχα). Επιπλέον, σε συμφωνία με το Γράφημα 24 για το υδάτινο περιβάλλον, τα PLA4043D+30%CS και ECOFLEX+30%CS παρουσιάζουν συνεχή αύξηση απώλειας βάρους με το πέρασμα των ημερών, με μέγιστο 15,1% και 19,8% αντίστοιχα στις 135d. Τέλος, τα δείγματα PLA4043D και ECOFLEX(PBAT) δεν παρουσίασαν σημαντική απώλεια βάρους, σχεδόν μηδενική. Και εδώ παρατηρείται ότι τα υλικά που δεν προέρχονται από ανάμειξη φαίνεται να διαθέτουν υψηλότερη αντοχή στη διάσπαση. Τα αποτελέσματα από το Γράφημα 48 αποκαλύπτουν ότι τα PLA4043D και ECOFLEX(PBAT) έχουν βραδύτερο ρυθμό αποικοδόμησης στο αμμοαργιλώδες έδαφος σε σύγκριση με άλλα υλικά. Η υδροφοβικότητα του PLA θα μπορούσε να είναι ο κύριος λόγος για την αντοχή του στα μικροβιακά ενζυμικά συστήματα στους διάφορους τύπους εδάφους. Για τον ίδιο λόγο παρατηρείται ότι το PLA4043D+30%CS είχε κάποια αντίσταση αλλά μικρότερη από το καθαρό PLA λόγω κάποιων βιοδιασπώμενων προσθέτων (Coffee Silverskin). Το ECOFLEX(PBAT) είχε αντίστοιχη αντοχή, επειδή η περιεκτικότητα σε τερεφθαλικό οξύ τείνει να μειώνει το ρυθμό αποικοδόμησης.<sup>59</sup>

Οι Mostafa κ.ά. (2010)<sup>59</sup> μετά από 3 μήνες ενταφιασμού σε χώμα, ανακάλυψαν τα εξής:

- Δείγμα Ecoflex παρουσίασε απώλεια βάρους 3,8%
- Δείγμα Bi-OPL (βιοδιασπώμενη μεμβράνη που παράγεται από PLA) παρουσίασε απώλεια 3,4%
- Δείγμα Bioflex (καινοτόμο μείγμα PLA/συμπολυεστέρα) είχε μείωση βάρους 7,7%

Είναι όμως σημαντικό να αναφερθεί ότι στη συγκεκριμένη έρευνα τα δείγματα βρίσκονταν σε ειδικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 25°C και σχετική υγρασία 70%. Όπως είναι γνωστό οι υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν την αποδόμηση. Στο εξεταζόμενο πείραμα τα δείγματα ήταν τοποθετημένα σε εξωτερικό χώρο, δηλαδή σε πραγματικές συνθήκες περιβάλλοντος όπου η θερμοκρασία κυμαινόταν σε χαμηλότερες τιμές.

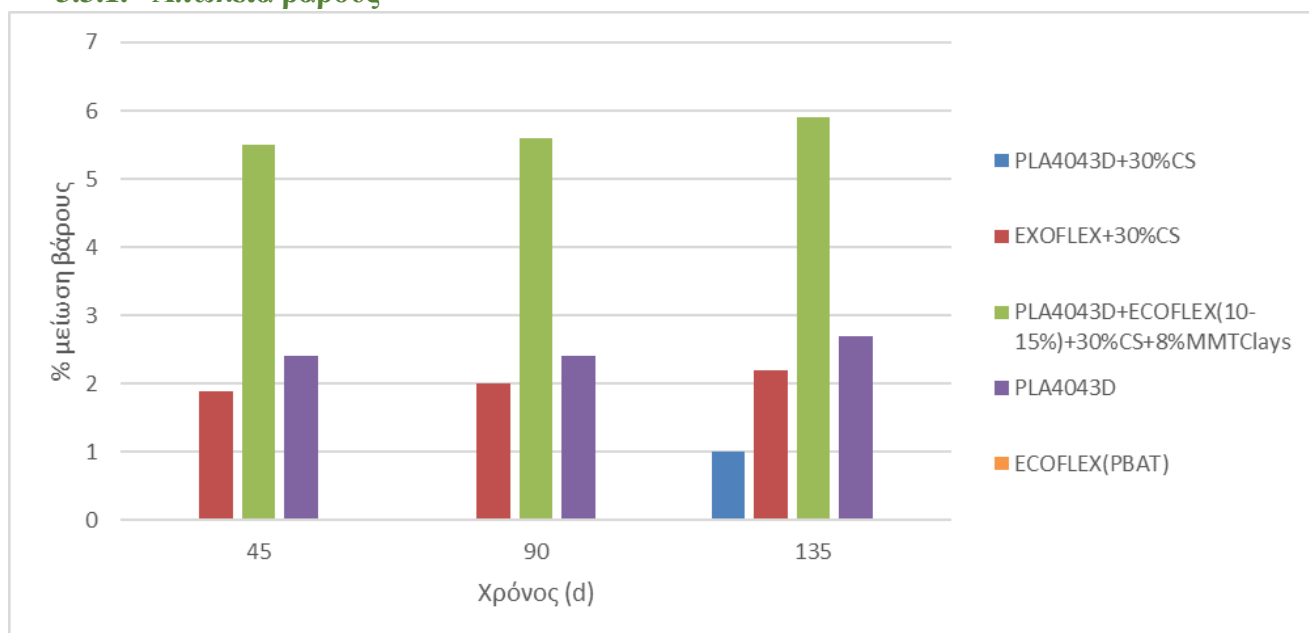
Συμπληρωματικά, μια έρευνα των Wang κ.ά. (2019)<sup>55</sup> αποκάλυψε ότι με την προσθήκη υβριδίων CNC-ZnO (νανοκρύσταλλοι κυτταρίνης-οξειδίου ψευδαργύρου), η νανοσύνθετη μεμβράνη PLA αποικοδομήθηκε κατά περίπου 28% μετά από 110 ημέρες. Αυτό σημαίνει ότι οι νανοσύνθετες μεμβράνες που έχουν παρασκευαστεί θα αποικοδομηθούν πλήρως εντός ενός έτους, γεγονός που αναμένεται να λύσει το πρόβλημα της αποικοδόμησης με βάση το πλαστικό στο μέλλον. Ωστόσο, το καθαρό PLA παρουσίασε το μικρότερο ποσοστό αποικοδόμησης μόνο περίπου 8% απώλεια βάρους μετά από 110 ημέρες, όταν συγκρίθηκε με άλλα νανοσύνθετα PLA. Δηλαδή, με την προσθήκη υδρόφιλων υβριδίων CNC-ZnO, ο ρυθμός αποικοδόμησης αυξήθηκε υψηλότερα από το καθαρό PLA. Ο ρυθμός αποικοδόμησης του εδάφους αυξήθηκε σταδιακά με την αύξηση της περιεκτικότητας σε CNC-ZnO. Ως εκ τούτου, συμπεράναν ότι κατά τη διάρκεια της δοκιμής αποικοδόμησης με ταφή στο έδαφος, οι γραμμικές αλυσίδες θα διασπαστούν στον εστερικό δεσμό και στη συνέχεια θα μειωθεί το μοριακό βάρος και η απώλεια μάζας των νανοσύνθετων φιλμ μέσω της αλληλεπίδρασης του καθαρού PLA και των υβριδίων CNC-ZnO.

Τέλος, τα δείγματα των βιοπλαστικών που ανασύρθηκαν στις 90 και 135d ήταν πιο μαλακά στην αφή και είχαν αρχίσει να αποχρωματίζονται. Η δοκιμή βιοδιασπασιμότητας από τους Skvorcinskiene κ.ά. (2023)<sup>60</sup> αποκάλυψε ότι μόνο τα βιοπλαστικά από άμυλο καλαμποκιού αποικοδομούνται πλήρως κατά τη διάρκεια της βραχυπρόθεσμης αποικοδόμησης στο έδαφος, ενώ άλλα πλαστικά βιολογικής προέλευσης (πχ. PLA) και με βάση το πετρέλαιο (πχ. PBAT) άλλαξαν μόνο το χρώμα τους και έγιναν πιο μαλακά, γεγονός που επιβεβαιώνεται και στο συγκεκριμένο πείραμα.



### 3.3. Γήρανση

#### 3.3.1. Απώλεια βάρους



Γράφημα 51: Ποσοστό μείωσης βάρους των δειγμάτων για γήρανση σε 45, 90 και 135d πειράματος

Στο Γράφημα 49 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ποσοστιαίας μείωσης βάρους στις 45, 90 και 135 ημέρες πειράματος για τα δείγματα που παρέμειναν στο θάλαμο γήρανσης. Σύμφωνα με το γράφημα φαίνεται ελάχιστη μείωση βάρους σε σχέση με τα παραπάνω πειράματα, όπως είναι λογικό καθώς δεν υπήρχε περιβάλλον με μικροοργανισμούς να τραφούν από αυτά και ως αποτέλεσμα να τα αποδομήσουν. Και σε αυτό το γράφημα μεγαλύτερο ποσοστό απώλειας βάρους παρουσιάζει το PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays, συγκεκριμένα 5,9% στις 135d. Μηδενικό ποσοστό μείωσης παρατηρείται άλλη μια φορά για το ECOFLEX(PBAT), όμως η μείωση του PLA4043D φτάνει μέχρι και το 2,7% στις 135d. Στο δείγμα EXOFLEX+30%CS μειώνεται το βάρος με το πέρασμα των ημερών μέχρι το 2,2% στις 135d. Αξίζει να σημειωθεί ότι το δείγμα PLA4043D+30%CS δεν παρουσιάζει αλλαγή στο βάρος του μέχρι τις 135d που έχει μειωθεί κατά 1%.

Ο μόνος παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τα βιοπλαστικά είναι η ακτινοβολία που εκπέμπουν λάμπες του θαλάμου ( $0,027 \cdot 10^3 \text{ W/m}^2$ ). Όταν τα πλαστικά σωματίδια εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία, μπορούν να αναπτύξουν μικρορωγμές και να γίνουν εύθραυστα, γεγονός που θα διευκολύνει την αποικοδόμηση και τη διαθεσιμότητά τους, καθώς και την έκκριση μικρότερων και χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων.<sup>61</sup> Σε μελέτη των Ceccarini κ.ά. (2018)<sup>62</sup> βρέθηκε ότι πολυμερή που μελετήθηκαν μετά από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία παρουσίασαν μείωση της κατανομής του μοριακού τους βάρους προς την πλευρά του χαμηλού μοριακού βάρους λόγω μηχανισμού διάσπασης της αλυσίδας. Σύμφωνα με έρευνα των Zhang κ.ά. (2013)<sup>63</sup> το υπεριώδες φως μειώνει σημαντικά το χρόνο αποικοδόμησης του PLA. Συγκεκριμένα, μετά από 90 λεπτά επεξεργασίας τεμαχισμένα κομμάτια PLA έχασαν το 3,95% της αρχικής τους μάζας. Επιπλέον, συμπέραναν ότι η μάζα μειώθηκε γραμμικά καθώς αυξανόταν ο χρόνος επεξεργασίας με υπεριώδη ακτινοβολία. Παρ' όλα αυτά, δεν αναφέρεται η τιμή της έντασης ακτινοβολίας που πιθανόν να ήταν μεγαλύτερη από το εξεταζόμενο πείραμα. Σε μια άλλη έρευνα, όταν τα φιλμ PLA εκτέθηκαν σε υπεριώδες φως για 8 εβδομάδες

υπό χαμηλή σχετική υγρασία (10%, η οποία περιορίζει τον ρυθμό υδρόλυσης του PLA), το υπεριώδες φως μείωσε τη φυσική ακεραιότητα και ενίσχυσε την αποικοδόμηση του PLA.<sup>64</sup>

### 3.4. Μελέτη Πρωτεϊνών

Όπως έχει προαναφερθεί, μετά το πέρας των παραπάνω πειραμάτων, ερευνήθηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών από το βιοϋμένιο στην επιφάνεια των βιοπλαστικών με τη μέθοδο ανάλυσης πρωτεϊνών Bradford (BIO-RAD). Ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν τα εκπλύματα βιοπλαστικών από το θαλασσινό νερό και το χώμα. Ταυτόχρονα μελετήθηκαν και δείγματα θαλασσινού νερού από τις φιάλες για να προσδιοριστεί αν έχουν μεταφερθεί πρωτεΐνες από το πλαστικό στο υδατικό περιβάλλον. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ως standard το αντιδραστήριο BSA (Bovine Serum Albumin).

#### Στο βιοϋμένιο των βιοπλαστικών στο θαλασσινό νερό

Πίνακας 4: Συγκέντρωση πρωτεϊνών ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) στα δείγματα βιοπλαστικών θαλασσινού νερού

Δείγμα	Συγκέντρωση ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Α' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	43,08
ECOFLEX+30%CS	52,66
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	48,12
PLA4043D	26,96
ECOFLEX(PBAT)	26,96
Β' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	39,56
ECOFLEX+30%CS	60,22
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	83,40
PLA4043D	23,43
ECOFLEX(PBAT)	39,05
Γ' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	20,91
ECOFLEX+30%CS	25,45
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	40,06
PLA4043D	32,00
ECOFLEX(PBAT)	39,05

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάθε υπό μελέτη δείγμα υπολογίστηκε συγκρίνοντας τις τιμές απορρόφησης με μια πρότυπη καμπύλη του standard BSA, σε  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης/mL εκπλύματος. Στη συνέχεια βρέθηκε, με μετατροπή, η συγκέντρωση σε  $\mu\text{g}$  πρωτεΐνης/ $\text{cm}^2$  δείγματος πλαστικού. Όπως φαίνεται στον πίνακα, το δείγμα PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays του δεύτερου χρονικού σταδίου εμφάνισε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών με  $83,40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Γενικότερα, το ίδιο δείγμα παρουσιάζει τις μέγιστες τιμές σε κάθε στάδιο. Τα

υπόλοιπα δείγματα φαίνεται ότι περιέχουν πολύ κοντινές και σχετικά χαμηλές τιμές πρωτεϊνών στο έκπλυμα. Συγκεκριμένα, η χαμηλότερη συγκέντρωση υπολογίστηκε  $20,91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  για το δείγμα PLA4043D+30%CS του τρίτου χρονικού σταδίου.

Το κύριο μέρος της αποικοδόμησης λαμβάνει χώρα με τη βοήθεια ενζύμων που υπάρχουν σε μικροβιακά κύτταρα (εξωκυτταρικά/ενδοκυτταρικά), τα οποία προκαλούν τη διάσπαση των πολυμερικών αλυσίδων μέσω της αφομοίωσης εντός του κυττάρου τους και της απελευθέρωσης μεταβολικών προϊόντων όπως  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_4$  και  $\text{N}_2$ .<sup>65</sup> Τα ένζυμα που είναι γνωστό ότι αποικοδομούν τα πλαστικά πολυμερή ονομάζονται υδρολυτικά ένζυμα ή υδρολάσες. Οι υδρολάσες εμπλέκονται σε μια καταλυτική αντίδραση που προκαλεί διάσπαση των χημικών δεσμών των υποστρώματος παρουσία νερού.<sup>66</sup> Τα ένζυμα αυτά δρουν στο πλαστικό πολυμερές με παρόμοιο τρόπο, προκαλώντας υδρολυτική διάσπαση των μακρών ανθρακικών αλυσίδων και στη συνέχεια αφομοιώνουν αυτές τις μικρότερες υπομονάδες στο μικροβιακό κύτταρο για περαιτέρω ενζυματική αποικοδόμηση και απελευθέρωση μεταβολικών προϊόντων.<sup>67</sup> Συνεπώς, οι περισσότεροι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα υδρολυτικά ένζυμα είναι κυρίως υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του πλαστικού πολυμερούς. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται στο συγκεκριμένο πείραμα καθώς η μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών βρέθηκε στο δείγμα που παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό αποικοδόμησης (17,9%) σύμφωνα με το *Γράφημα 24*.

Αξίζει να αναφερθεί ότι το δείγμα που παρουσίασε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία ήταν μείγμα PLA/PBAT ενισχυμένο με 30% CS και 8% MMTClays. Σε μια μελέτη των Stepczynska κ.ά. (2018)<sup>68</sup> διερευνήθηκε η επίδραση τεσσάρων διαφορετικών ενζύμων (πρωτεΐνάση K, πρωτεάση, εστεράση και λιπάση) στην αποικοδόμηση του PLA ενισχυμένου με ίνες λιναριού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ένζυμο πρωτεΐνάση K άσκησε τη μέγιστη επίδραση στην αποικοδομησιμότητα των πολυμερών καθώς παρατηρήθηκε απώλεια μάζας 52% περίπου για PLA ενισχυμένο με ίνες λιναριού, και μόνο 21% στην περίπτωση του απλού πολυμερούς.

### Στο βιοϋμένιο των βιοπλαστικών στο χώμα

Πίνακας 5: Συγκέντρωση πρωτεϊνών ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) στα δείγματα βιοπλαστικών χώματος

Δείγμα	Συγκέντρωση ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Α' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	96,13
ECOFLEX+30%CS	94,47
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	75,68
PLA4043D	82,86
ECOFLEX(PBAT)	-
Β' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	7,68
ECOFLEX+30%CS	13,21
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	-
PLA4043D	-
ECOFLEX(PBAT)	6,58
Γ' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	-
ECOFLEX+30%CS	12,66
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	12,11
PLA4043D	6,03
ECOFLEX(PBAT)	7,13

Στον Πίνακα 5 φαίνεται ότι σχεδόν όλα τα δείγματα του Α σταδίου (0-45d) κυμαίνονται σε πολύ κοντινές τιμές συγκέντρωσης πρωτεϊνών και είναι μεγαλύτερες σε σχέση με των υπολοίπων σταδίων. Συγκεκριμένα, το δείγμα PLA4043D+30%CS του πρώτου χρονικού σταδίου εμφάνισε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών με  $96,13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , το ECOFLEX+30%CS με  $94,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , το PLA4043D με  $82,86 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  και το PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays με  $75,68 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Παράλληλα, η χαμηλότερη συγκέντρωση υπολογίστηκε  $6,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  για το δείγμα PLA4043D του τρίτου χρονικού σταδίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι για ορισμένα δείγματα η συγκέντρωση μετρήθηκε από το φασματοφωτόμετρο μικρότερη του μηδενός και δεν συμπεριλαμβάνεται στα αποτελέσματα καθώς δεν υφίσταται. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι, από τα εκπλύματα που διατηρήθηκαν από τη μελέτη βιοϋμενίου για το χώμα, τα δείγματα του αρχικού σταδίου περιείχαν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών.

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες τείνει να μειώνεται με την αυξανόμενη διαταραχή του εδάφους και γενικά να επηρεάζεται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος.<sup>69</sup> Σημαντικός παράγοντας στη μελέτη των πρωτεϊνών αποτελεί και η περιεκτικότητά τους σε άζωτο (N), καθώς το άζωτο συνιστά το θεμελιώδες συστατικό των αμινοξέων, τα οποία είναι δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τους Wild κ.ά. (2018)<sup>70</sup> η άνοδος της θερμοκρασίας έχει βρεθεί ότι υποκινεί την παραγωγικότητα του εδάφους και την πρόσληψη N. Μια επιταχυνόμενη διάσπαση των πολυμερών που περιέχουν N μπορεί να συνδέεται με υψηλότερη

μικροβιακή αποικοδομητική δραστηριότητα σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Ορισμένες μελέτες υποδηλώνουν ακόμη ότι οι παρατηρούμενες αυξήσεις στην παραγωγικότητα των φυτών με την αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να είναι κυρίως έμμεσες επιδράσεις που μεσολαβούνται από αυξημένη διαθεσιμότητα εδαφικού N.<sup>71</sup> Τα ευρήματα αυτά δικαιολογούν τα παραπάνω αποτελέσματα καθώς οι θερμοκρασίες που επικρατούσαν στο δεύτερο και τρίτο στάδιο του πειράματος ήταν 13°C και 12 °C αντίστοιχα, ενώ η μέση θερμοκρασία του πρώτου σταδίου ήταν 18°C, σύμφωνα με τον πίνακα στο *Κεφάλαιο 2.2.3*. Συμπληρωματικά, καθώς τα Β και Γ στάδια έλαβαν χώρα τους χειμερινούς μήνες, επικρατούσαν εντονότερα καιρικά φαινόμενα. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το μέσο ύψος βροχόπτωσης ήταν 85 και 89mm αντίστοιχα, σε σχέση με το Α στάδιο που μετρήθηκε 54mm. Επίσης η μέση ταχύτητα ανέμου στην αρχή του πειράματος ήταν 8,2 km/h και αυξήθηκε τους επόμενους μήνες έως και τα 12,5 km/h.

### Στο θαλασσινό νερό

Στην περίπτωση των δειγμάτων του εναπομείναντος θαλασσινού νερού στις φιάλες, ήταν αναμενόμενο να εντοπιστεί μικρότερη συγκέντρωση πρωτεϊνών σε σχέση με αυτές στο βιοϋμένιο των βιοπλαστικών καθώς, γενικά, τα βακτήρια και οι μικροοργανισμοί τείνουν να προσκολλώνται στις επιφάνειες. Το 1936 οι ερευνητές ZoBell και Anderson χρησιμοποίησαν ακατέργαστο θαλασσινό νερό και αξιολόγησαν την επίδραση του όγκου του υγρού, του οξυγόνου και της επιφάνειας ανά μονάδα όγκου στον αριθμό των βακτηρίων. Οι ερευνητές παρατήρησαν έναν δραματικά υψηλότερο αριθμό βακτηρίων στις επιφάνειες σε σύγκριση με το θαλασσινό νερό και αναγνώρισαν τη σημασία των στερεών επιφανειών για την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των κυττάρων.<sup>72</sup> Άλλες προηγούμενες μελέτες διαπίστωσαν ότι η ικανότητα προσρόφησης των μικροπλαστικών για οργανική ρύπανση στον ωκεανό είναι περίπου έξι τάξεις μεγέθους υψηλότερες από εκείνη του περιβάλλοντος θαλασσινού νερού.<sup>73</sup> Στη συγκεκριμένη περίπτωση, αφού έγινε κατάλληλη προετοιμασία των δειγμάτων, οι μετρήσεις του φασματοφωτόμετρου για απορρόφηση στα 595nm έδωσαν πολύ χαμηλές τιμές, έτσι οι τιμές των συγκεντρώσεων που προέκυψαν ήταν μη μετρήσιμες, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες, πιθανόν και τα EPS, του βιοφίλμ δεν μεταφέρθηκαν στο περιβάλλον τους.

Διαπιστώθηκε από τους Stanley κ.ά. (2004)<sup>74</sup> ότι τα χαμηλά επίπεδα θρεπτικών ουσιών στο περικλείον θαλασσινό νερό προκαλούν την προσκόλληση πολλών ειδών βακτηρίων στην επιφάνεια του υποστρώματος, ενώ σε υψηλά επίπεδα θρεπτικών ουσιών, η ικανότητα προσκόλλησης πολλών μικροοργανισμών μειώνεται, γεγονός που δεν ευνοεί τον εξειδικευμένο σχηματισμό βιοφίλμ. Υψηλά επίπεδα θρεπτικών ουσιών στο θαλασσινό νερό έχουν ως αποτέλεσμα σχετικά χαμηλό επίπεδο θρεπτικών ουσιών που παρέχονται από τα πλαστικά, μειώνοντας έτσι την εξειδίκευση του υποστρώματος του πλαστικού.

Τέλος, σε πρόσφατη έρευνα των Marin κ.ά. (2023)<sup>49</sup> μελετήθηκαν τα θαλάσσια βιοφίλμ που σχηματίστηκαν στις επιφάνειες των PLA και PHBV. Μετά από σύγκριση των πρωτεϊνών στα βιοφίλμ των δύο πλαστικών και στο θαλασσινό νερό, εντοπίστηκαν διαφορές στις λειτουργίες του μεταγονιδιώματος, αποκαλύπτοντας μεγαλύτερη παρουσία πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη βιοαποικοδόμηση του PHBV στα βιοϋμένια του PHBV. Είναι λογικό να εντοπίζονται περισσότερες πρωτεΐνες στο βιοϋμένιο του PHBV, σε σχέση με το PLA, καθώς είναι εξ' ολοκλήρου βιολογικά παραγόμενο.

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η καθημερινή χρήση των πλαστικών δεν μπορεί να εξαλειφθεί από τη ζωή μας, παρ' όλα αυτά, δεν μπορεί να αγνοηθεί η συσσώρευση και ρύπανση που προκαλείται από αυτά στο περιβάλλον. Ειδικότερα τα θραύσματα μικροπλαστικών σε θαλάσσια και χερσαία οικοσυστήματα απαιτούν εξειδικευμένη επεξεργασία και διαχείριση. Για το λόγο αυτό, η ανάπτυξη βιοπλαστικών που αποδομούνται από το περιβάλλον τους πιθανότατα να δώσει εν μέρη λύση στο πρόβλημα των πλαστικών αποβλήτων. Ως βιοπλαστικά χαρακτηρίζονται τα πολυμερή τα οποία αποδομούνται παρουσία μικροοργανισμών και μπορεί να προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες ή από πετροχημικές πρώτες ύλες. Η εν λόγω αποικοδόμηση ξεκινάει στην επιφάνεια των πλαστικών από τους μικροοργανισμούς που προσκολλώνται επάνω της. Η υδρόφοβη ιδιότητα των πλαστικών επιφανειών επιταχύνει την ανάπτυξη μικροοργανισμών και τον επακόλουθο σχηματισμό βιοϋμενίων. Ο τύπος του πολυμερούς, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της θρεπτικής κατάστασης, της θερμοκρασίας, της αλατότητας και του pH, επηρεάζουν τη μικροβιακή σύνθεση των βιοϋμενίων. Ωστόσο, η διάσπαση βιοπλαστικών από μικροοργανισμούς συνιστά μια πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα, καθώς τα βιοπλαστικά αποτελούν ένα νέο ερευνητικό πεδίο και η μελέτη τους βρίσκεται σε πρωταρχικό στάδιο. Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων (θαλασσινό νερό και χώμα) σε πέντε δείγματα βιοπλαστικών για χρονικό διάστημα 135 ημερών. Αναλύοντας τα αποτελέσματα, εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Η χρήση της βιοενίσχυσης των πλαστικών με πρόσθετα βιοδιασπώμενα υλικά όπως το CS, το άμυλο και η κυτταρίνη, τα οποία αναμειγνύονται με πολυεστερικές μήτρες, μπορεί να αποτελέσει μια μέθοδο για την βελτίωση του ρυθμού αποικοδόμησης των βιοπλαστικών.
- Το PLA και το PBAT διασπώνται δύσκολα στο θαλάσσιο περιβάλλον χωρίς βιοενίσχυση, πιθανόν σε διάστημα μεγαλύτερο του ενός χρόνου.
- Ο ρυθμός βιοαποδόμησης στο χώμα για τα καθαρά υλικά ήταν επίσης χαμηλός. Πιστεύεται ότι για την περίπτωση τους μπορεί να απαιτείται μια διαδικασία κομποστοποίησης κάτω από υψηλές θερμοκρασίες.
- Τα βιοενυσχυμένα δείγματα παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό αποικοδόμησης στο θαλάσσιο περιβάλλον και στο έδαφος. Η διάσπαση αυτών των πρόσθετων υλικών ξεκινάει νωρίτερα από τη διάσπαση του πολυμερούς και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ρωγμών στο δείγμα. Ειδικότερα, το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης παρουσιάστηκε στο βιοπλαστικό που αποτελείται από μείγμα PLA/PBAT με φλούδες κόκκων καφέ και αργίλους μοντοριλλονίτη.
- Οι συνθήκες περιβάλλοντος επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το σχηματισμό βιοϋμενίου και κατ' επέκταση το ρυθμό αποδόμησης των βιοπλαστικών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, προτείνονται υψηλή θερμοκρασία, υψηλό ποσοστό υγρασίας και ελεγχόμενες σταθερές συνθήκες.
- Σε διάστημα 4 μηνών κατόπιν επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων μπορούν να παρατηρηθούν κάποιες αλλαγές στην εμφάνιση όλων των βιοπλαστικών, όπως αποχρωματισμός και ευκαμψία, ενώ στα βιοπλαστικά ενισχυμένα με πρόσθετα ακόμη και ρωγμές που προκάλεσαν σπάσιμο.
- Στο θαλάσσιο περιβάλλον παρατηρείται σχετική αλληλεπίδραση του ρυθμού διασπασιμότητας με την ύπαρξη πρωτεϊνών στο βιοϋμένιο, γεγονός που επιβεβαιώνεται από την αυξημένη συγκέντρωσή τους στο δείγμα που παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης.



- Δεν παρατηρείται σημαντική συγκέντρωση πρωτεϊνών στο υπολειπόμενο θαλασσινό νερό γεγονός που υποδεικνύει ότι τα EPS και οι πρωτεΐνες είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια του βιοπλαστικού και δεν μεταφέρονται στο περιβάλλον του.

### **Προτάσεις για μελλοντική έρευνα**

Η παρούσα μελέτη καθώς και άλλες, έχουν δείξει ότι οι μικροβιακές κοινότητες σε βιοφίλμ μπορούν να αποδομήσουν μικροπλαστικά. Προτείνεται σε μελλοντικές έρευνες να απομονωθούν και να μελετηθούν συγκεκριμένα στελέχη βακτηρίων με ισχυρά αποτελέσματα αποδόμησης από βιοϋμένια που καλλιεργούνται με μικροπλαστικά ως υποστρώματα. Λόγω της εξειδίκευσης των στελεχών αυτών, μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά η αποτελεσματικότητα της αποδόμησης των μικροπλαστικών. Επίσης, σε μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να επινοηθούν μέθοδοι για τη βελτίωση της ταχύτητας και της ποιότητας του σχηματισμού βιοφίλμ. Το βιοφίλμ απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα για να σχηματιστεί (1-3 μήνες) και οι ρυθμοί σχηματισμού διαφέρουν υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των περιβαλλοντικών συνθηκών, αλλαγές στη φύση του υποστρώματος και διαφορές στις μεθόδους καλλιέργειας. Γενικότερα, η συσσώρευση των πλαστικών απορριμμάτων αποτελεί ένα σύγχρονο παγκόσμιο πρόβλημα και είναι επιτακτικό χρέος των κυβερνήσεων αλλά και προσωπική ευθύνη του καθενός η προστασία του περιβάλλοντος από τη ρύπανση των πλαστικών αποβλήτων.

## 5. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Al-Khairi, D. ; *et al.* Closing the Gap between Bio-Based and Petroleum-Based Plastic through Bioengineering. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 2320 **10**, 2320 (2022).
2. Plastic waste | Feature | RSC Education. <https://edu.rsc.org/feature/plastic-waste/3009361.article>.
3. Geyer, R., Jambeck, J. R. & Law, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv* **3**, (2017).
4. Naser, A. Z., Deiab, I. & Darras, B. M. Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. *RSC Adv* **11**, 17151–17196 (2021).
5. Skvorčinskienė, R., Kiminaitė, I., Vorotinskienė, L., Jančauskas, A. & Paulauskas, R. Complex study of bioplastics: Degradation in soil and characterization by FTIR-ATR and FTIR-TGA methods. *Energy* **274**, 127320 (2023).
6. Poznyak, T. I., Chairez Oria, I. & Poznyak, A. S. Biodegradation. *Ozonation and Biodegradation in Environmental Engineering* 353–388 (2019) doi:10.1016/B978-0-12-812847-3.00023-8.
7. Biodegradation of Waste - Lifeasible. <https://www.lifeasible.com/custom-solutions/environmental/waste-testing/waste-management/biodegradation-of-waste/>.
8. Huang, S. J. Biodegradation. *Comprehensive Polymer Science and Supplements* 597–606 (1989) doi:10.1016/B978-0-08-096701-1.00201-9.
9. Folino, A., Pangallo, D. & Calabrò, P. S. Assessing bioplastics biodegradability by standard and research methods: Current trends and open issues. *J Environ Chem Eng* **11**, 109424 (2023).
10. Moshood, T. D. *et al.* Sustainability of biodegradable plastics: New problem or solution to solve the global plastic pollution? *Current Research in Green and Sustainable Chemistry* **5**, (2022).
11. Dilkes-Hoffman, L. S., Lant, P. A., Laycock, B. & Pratt, S. The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study. (2019) doi:10.1016/j.marpolbul.2019.03.020.
12. Rosenboom, J., Langer, R., Materials, G. T.-N. R. & 2022, undefined. Bioplastics for a circular economy. *nature.com*.
13. Τριανταφυλλοπούλου, Σ. Μ. Βιοαποικοδομήσιμα Πολυμερικά Υλικά. (Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2020).
14. Castro-Aguirre, E., Iñiguez-Franco, F., Samsudin, H., Fang, X. & Auras, R. Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Adv Drug Deliv Rev* **107**, 333–366 (2016).
15. Swetha, T. A. *et al.* A comprehensive review on polylactic acid (PLA) – Synthesis, processing and application in food packaging. *Int J Biol Macromol* **234**, 123715 (2023).

16. European Bioplastics e.V. <https://www.european-bioplastics.org/>.
17. Jian, J., Xiangbin, Z. & Xianbo, H. An overview on synthesis, properties and applications of poly(butylene-adipate-co-terephthalate)–PBAT. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* **3**, 19–26 (2020).
18. Physical and mechanical properties of biobased materials - starch, polylactate and polyhydroxybutyrate | Semantic Scholar. <https://www.semanticscholar.org/paper/Physical-and-mechanical-properties-of-biobased-and-Petersen-Nielsen/d8889ba37310309ec254ec58526a38554a372ba0>.
19. Promnil, S., Numpaisal, P.-O. & Ruksakulpiwat, Y. Effect of molecular weight on mechanical properties of electrospun poly (lactic acid) fibers for meniscus tissue engineering scaffold. doi:10.1016/j.matpr.2021.03.504.
20. Ecoflex® (PBAT). [https://plastics-rubber.basf.com/global/en/performance\\_polymers/products/ecoflex.html](https://plastics-rubber.basf.com/global/en/performance_polymers/products/ecoflex.html).
21. Jiang, T., Duan, Q., Zhu, J., Liu, H. & Yu, L. Starch-based biodegradable materials: Challenges and opportunities. (2019) doi:10.1016/j.aiepr.2019.11.003.
22. Ribba, L. *et al.* Biodegradable plastics in aquatic ecosystems: latest findings, research gaps, and recommendations. *Environmental Research Letters* **17**, 033003 (2022).
23. Thakur, B., Singh, J., Singh, J., Angmo, D. & Vig, A. P. Biodegradation of different types of microplastics: Molecular mechanism and degradation efficiency. *Science of The Total Environment* **877**, 162912 (2023).
24. What Are Microplastics and How Did They Get Into Our Food? <https://www.livekindly.com/what-are-microplastics/>.
25. Sun, X. L., Xiang, H., Xiong, H. Q., Fang, Y. C. & Wang, Y. Bioremediation of microplastics in freshwater environments: A systematic review of biofilm culture, degradation mechanisms, and analytical methods. *Science of The Total Environment* **863**, 160953 (2023).
26. Ecile Rollet, C. ', Gal, L. & Guzzo, J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. (2008) doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x.
27. Gaylarde, C. C., Almeida, M. P. de, Neves, C. V., Neto, J. A. B. & Fonseca, E. M. da. The Importance of Biofilms on Microplastic Particles in Their Sinking Behavior and the Transfer of Invasive Organisms between Ecosystems. *Micro 2023, Vol. 3, Pages 320-337* **3**, 320–337 (2023).
28. Gallagher, R. P. & Lee, T. K. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. *Prog Biophys Mol Biol* **92**, 119–131 (2006).
29. Differences Between UVA, UVB & UVC Rays | UPMC HealthBeat. <https://share.upmc.com/2014/07/difference-between-uva-uvb-uvb/>.

30. Kyoung Song, Y. *et al.* Combined Effects of UV Exposure Duration and Mechanical Abrasion on Microplastic Fragmentation by Polymer Type. (2017) doi:10.1021/acs.est.6b06155.
31. Doğan, M. Ultraviolet light accelerates the degradation of polyethylene plastics. *Microsc Res Tech* **84**, 2774–2783 (2021).
32. Masry, M. *et al.* Characteristics, fate, and impact of marine plastic debris exposed to sunlight: A review. *Mar Pollut Bull* **171**, 112701 (2021).
33. Proteins: Definition, Roles, Functions and Structure - Microbiology Notes. <https://microbiologynotes.org/proteins-definition-roles-functions-and-structure/>.
34. Protein | Definition, Structure, & Classification | Britannica. <https://www.britannica.com/science/protein>.
35. 7.4 Proteins - Microbiology | OpenStax. <https://openstax.org/books/microbiology/pages/7-4-proteins>.
36. Fong, J. N. C. & Yildiz, F. H. Biofilm Matrix Proteins. *Microbiol Spectr* **3**, (2015).
37. Wetzel, R. Amyloid. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* 100–104 (2013) doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00167-5.
38. Taglialegna, A. *et al.* The biofilm-associated surface protein Esp of *Enterococcus faecalis* forms amyloid-like fibers. *npj Biofilms and Microbiomes* 2020 6:1 **6**, 1–12 (2020).
39. Protein assay. <https://www.sepmag.eu/blog/protein-assay>.
40. Narita, Y. & Inouye, K. Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Research International* **61**, 16–22 (2014).
41. Yaghmaeiyan, N., Mirzaei, M. & Delghavi, R. Montmorillonite clay: Introduction and evaluation of its applications in different organic syntheses as catalyst: A review. *Results Chem* **4**, 100549 (2022).
42. He, F. Bradford Protein Assay.
43. Wang, G. X., Huang, D., Ji, J. H., Völker, C. & Wurm, F. R. Seawater-Degradable Polymers—Fighting the Marine Plastic Pollution. *Advanced Science* **8**, (2020).
44. Tsuji, H. & Suzuyoshi, K. Environmental degradation of biodegradable polyesters 2. Poly( $\epsilon$ -caprolactone), poly[(R)-3-hydroxybutyrate], and poly(L-lactide) films in natural dynamic seawater. *Polym Degrad Stab* **75**, 357–365 (2002).
45. Guzman, A., Janik, H., Mastalerz, M. & Kosakowska, A. Pilot study of the influence of thermoplastic starch based polymer packaging material on the growth of diatom population in sea water environment. *Polish Journal of Chemical Technology* **13**, 57–61 (2011).
46. Alvarez-Zeferino, J. C. *et al.* Degradation of Plastics in Seawater in Laboratory. *Open Journal of Polymer Chemistry* **5**, 55–62 (2015).

47. Delacuvellerie, A. *et al.* Microbial biofilm composition and polymer degradation of compostable and non-compostable plastics immersed in the marine environment. (2021) doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126526.
48. Sooriyakumar, P. *et al.* Biofilm formation and its implications on the properties and fate of microplastics in aquatic environments: A review. *Journal of Hazardous Materials Advances* **6**, 100077 (2022).
49. Marín, A. *et al.* Microbiological Characterization of the Biofilms Colonizing Bioplastics in Natural Marine Conditions: A Comparison between PHBV and PLA. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 1461 **11**, 1461 (2023).
50. Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U. & Aiba, S. Biodegradability of Plastics. *Int J Mol Sci* **10**, 3722 (2009).
51. Zhang, L. *et al.* Surface structures changes and biofilm communities development of degradable plastics during aging in coastal seawater. *Mar Pollut Bull* **193**, 114996 (2023).
52. Birnstiel, S., Sebastián, M. & Romera-Castillo, C. Structure and activity of marine bacterial communities responding to plastic leachates. *Science of The Total Environment* **834**, 155264 (2022).
53. Wang, X. W. *et al.* Degradability comparison of poly(butylene adipate terephthalate) and its composites filled with starch and calcium carbonate in different aquatic environments. *J Appl Polym Sci* **136**, 46916 (2019).
54. Guzman-Sielicka, A., Janik, H. & Sielicki, P. Proposal of New Starch-Blends Composition Quickly Degradable in Marine Environment. *J Polym Environ* **21**, 802–806 (2013).
55. Wang, Y. Y., Yu, H. Y., Yang, L., Abdalkarim, S. Y. H. & Chen, W. L. Enhancing long-term biodegradability and UV-shielding performances of transparent polylactic acid nanocomposite films by adding cellulose nanocrystal-zinc oxide hybrids. *Int J Biol Macromol* **141**, 893–905 (2019).
56. Sandy Loam Soil Characteristics Every Gardening Lover Must Know - Gardenerdy. <https://gardenerdy.com/sandy-loam-soil-characteristics/>.
57. How to know your type of garden soil - pH, chalky, sandy or loamy. <https://www.nature-and-garden.com/gardening/identifying-garden-soil-type.html>.
58. Adhikari, D. *et al.* Degradation of Bioplastics in Soil and Their Degradation Effects on Environmental Microorganisms. *J Agric Chem Environ* **05**, 23–34 (2016).
59. Mostafa, H. M., Sourell, H. & Bockisch, F. J. Mechanical properties of some bioplastics under different soil types used as biodegradable drip tubes. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal* **12**, (2010).
60. Skvorčinskienė E, R., Kiminaitė A, I., Vorotinskienė E, L., Jančauskas, A. & Paulauskas, R. Complex study of bioplastics: Degradation in soil and characterization by FTIR-ATR and FTIR-TGA methods. *Energy* **274**, 127320 (2023).

61. Gewert, B., Plassmann, M., Sandblom, O. & Macleod, M. Identification of Chain Scission Products Released to Water by Plastic Exposed to Ultraviolet Light. *Environ Sci Technol Lett* **5**, 272–276 (2018).
62. Ceccarini, A. *et al.* The Hidden Microplastics: New Insights and Figures from the Thorough Separation and Characterization of Microplastics and of Their Degradation Byproducts in Coastal Sediments. *Environ Sci Technol* **52**, 5634–5643 (2018).
63. Zhang, C., Sahas, R., Goddard, J., Constantine, K. & Collins, P. The Effect of UV Treatment on the Degradation of Compostable Polylactic Acid. (2013).
64. Ho, K. L. G. & Pometto, A. L. Effects of electron-beam irradiation and ultraviolet light (365 nm) on polylactic acid plastic films. *J Environ Polym Degrad* **7**, 93–100 (1999).
65. Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S. & Pillai, S. Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. *Science of The Total Environment* **759**, 143536 (2021).
66. Tokiwa, Y., T. A. & T. S. Degradation of Polycaprolactone by a Fungus. (1976).
67. Tokiwa, Y. & Suzuki, T. Purification and Some Properties of Polyethylene Adipate-degrading Enzyme Produced by *Penicillium* sp. Strain 14–3. <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1977.10862486> **41**, 265–274 (2014).
68. Stepczyńska, M. & Rytlewski, P. Enzymatic degradation of flax-fibers reinforced polylactide. *Int Biodeterior Biodegradation* **126**, 160–166 (2018).
69. Edu, C. C. Soil and Crop Sciences Section Comprehensive Assessment of Soil Health-soilhealth.
70. Wild, B., Ambus, P., Reinsch, S. & Richter, A. Resistance of soil protein depolymerization rates to eight years of elevated CO<sub>2</sub>, warming, and summer drought in a temperate heathland. *Biogeochemistry* **140**, 255–267 (2018).
71. Melillo, J. M. *et al.* Soil warming, carbon-nitrogen interactions, and forest carbon budgets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9508–9512 (2011).
72. ZoBell, C. E. & Anderson, D. Q. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biol Bull* **71**, 324–342 (1936).
73. Fu, L., Li, J., Wang, G., Luan, Y. & Dai, W. Adsorption behavior of organic pollutants on microplastics. *Ecotoxicol Environ Saf* **217**, 112207 (2021).
74. Stanley, N. R. & Lazazzera, B. A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* **52**, 917–924 (2004).



## 6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Πίνακας 6: Ονομασίες βιοπλαστικών

(1) PLA4043D + 30%CS
(2) ECOFLEX + 30%CS
(3) PLA4043D + ECOFLEX(10-15%) + 30%CS + 8%MMTClays
(4) PLA4043D
(5) ECOFLEX (PBAT)

Πίνακας 7: Χρονικά στάδια πειραμάτων

A στάδιο	0-45d
B στάδιο	45-90d
Γ στάδιο	90-135d

Πίνακας 8: Καιρικές συνθήκες στα Χανιά κατά την περίοδο του πειράματος

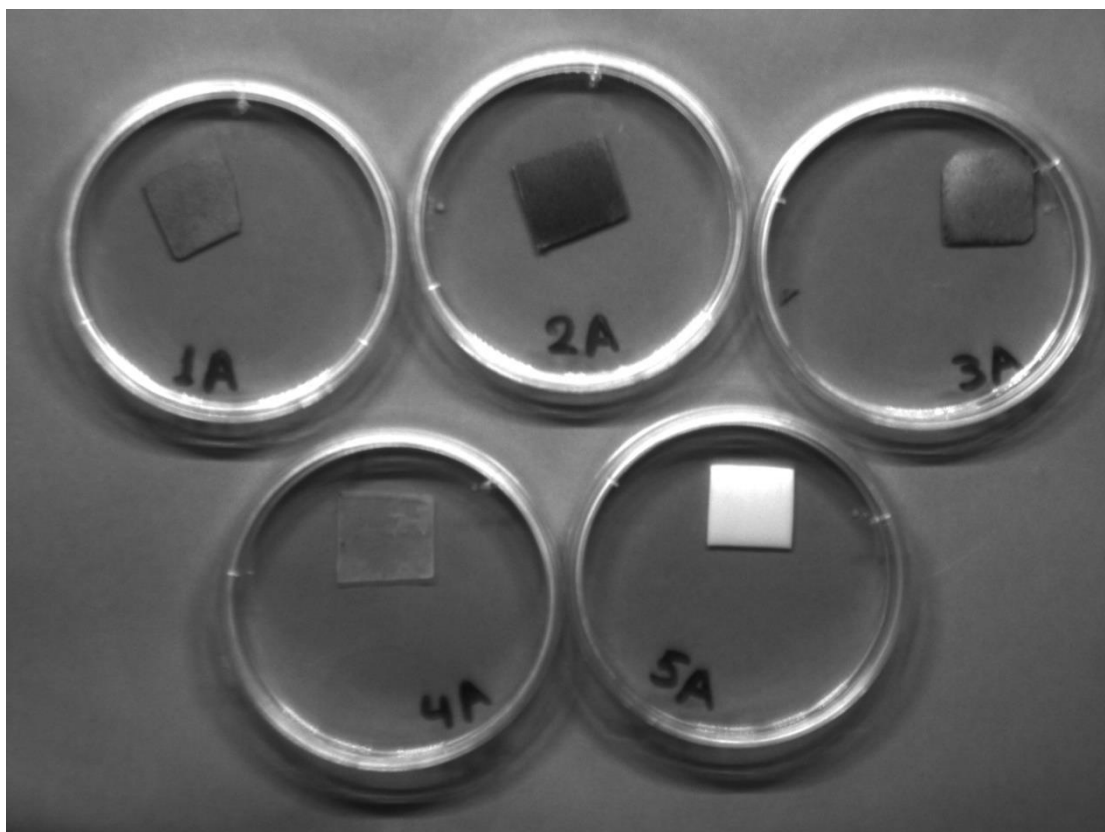
	Πρώτο στάδιο (0-45d)	Δεύτερο στάδιο (45-90d)	Τρίτο στάδιο (90-135d)
Μέση θερμοκρασία (°C)	18	13	12
Ποσοστό υγρασίας (%)	71	75	74
Μέσο ύψος βροχόπτωσης (mm)	54	85	89
Μέση ταχύτητα ανέμου (km/h)	8,2	9,85	12,5
Ηλιακή ακτινοβολία (W/m <sup>2</sup> )	0,1·10 <sup>3</sup>	0,025·10 <sup>3</sup>	0,025·10 <sup>3</sup>

Πίνακας 9: Συγκέντρωση πρωτεϊνών ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) στα δείγματα βιοπλαστικών θαλασσινού νερού

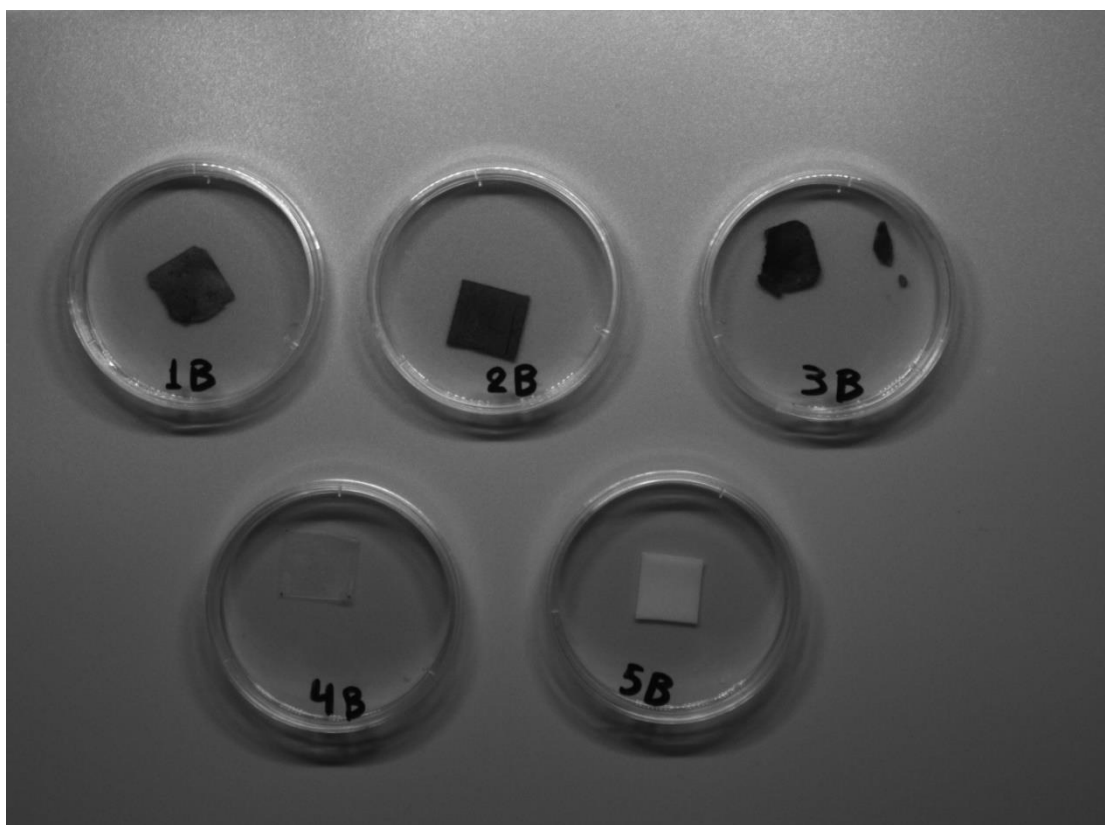
Δείγμα	Συγκέντρωση ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Α' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	43,08
ECOFLEX+30%CS	52,66
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	48,12
PLA4043D	26,96
ECOFLEX(PBAT)	26,96
Β' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	39,56
ECOFLEX+30%CS	60,22
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	83,40
PLA4043D	23,43
ECOFLEX(PBAT)	39,05
Γ' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	20,91
ECOFLEX+30%CS	25,45
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	40,06
PLA4043D	32,00
ECOFLEX(PBAT)	39,05

Πίνακας 10: Συγκέντρωση πρωτεϊνών ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) στα δείγματα βιοπλαστικών χώματος

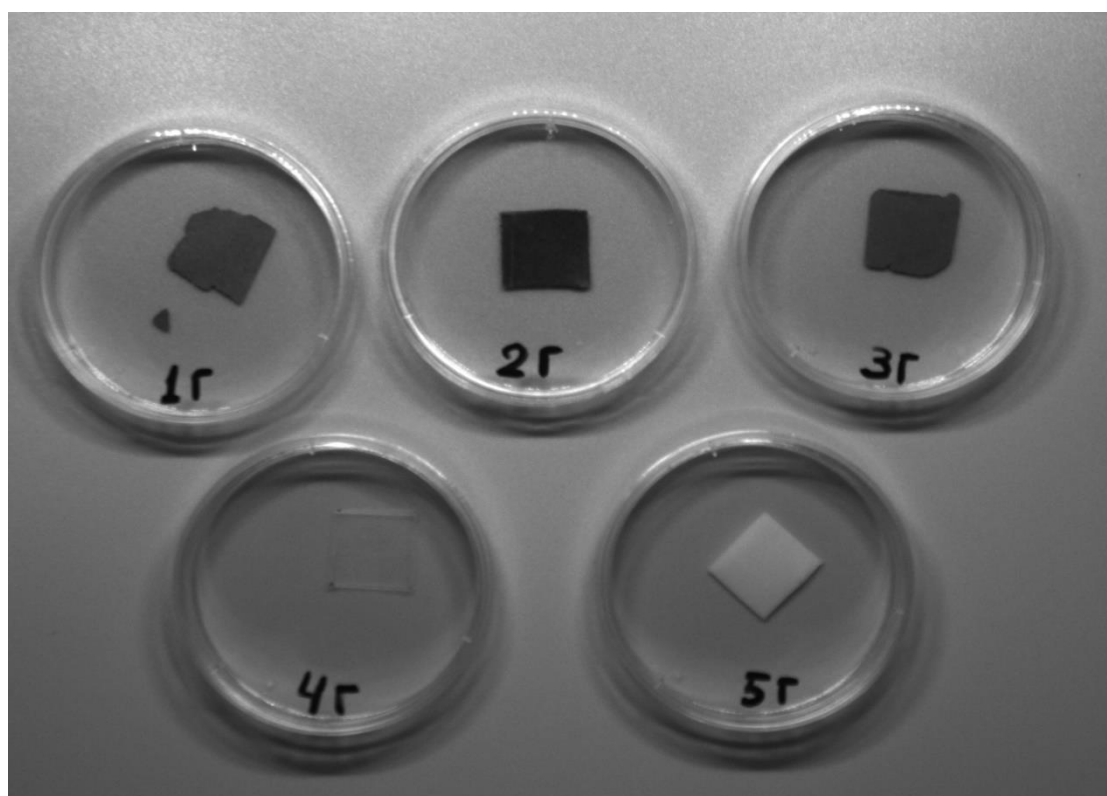
Δείγμα	Συγκέντρωση ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Α' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	96,13
ECOFLEX+30%CS	94,47
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	75,68
PLA4043D	82,86
ECOFLEX(PBAT)	-
Β' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	7,68
ECOFLEX+30%CS	13,21
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	-
PLA4043D	-
ECOFLEX(PBAT)	6,58
Γ' Χρονικό στάδιο	
PLA4043D+30%CS	-
ECOFLEX+30%CS	12,66
PLA4043D+ECOFLEX(10-15%)+30%CS+8%MMTClays	12,11
PLA4043D	6,03
ECOFLEX(PBAT)	7,13



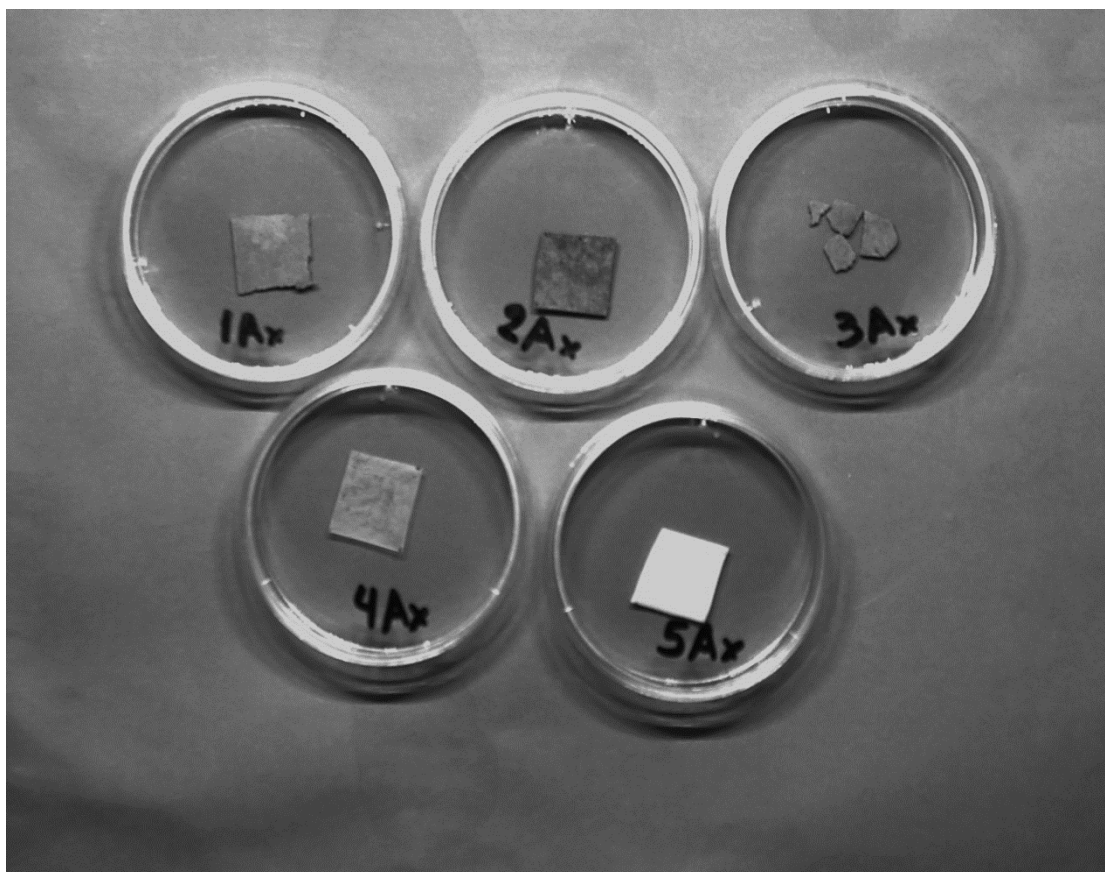
Εικόνα 38: Βιοπλαστικά πρώτου σταδίου μετά από 45d στο θαλασσινό νερό



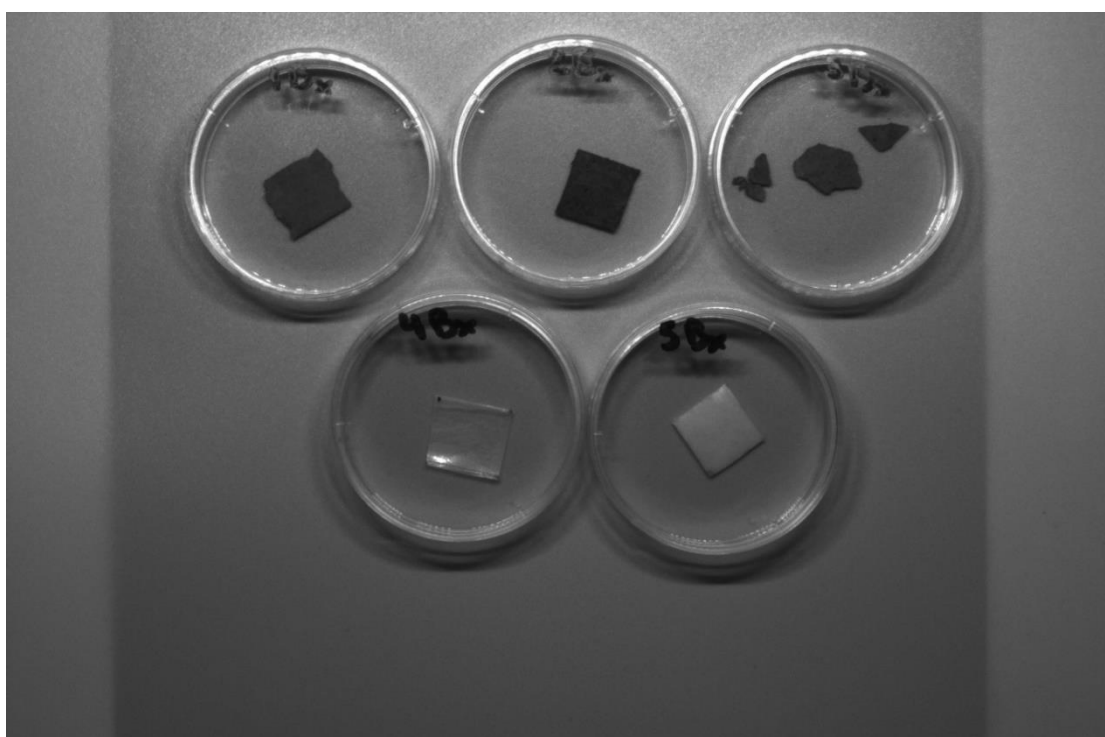
Εικόνα 39: Βιοπλαστικά δεύτερου σταδίου μετά από 90d στο θαλασσινό νερό



*Εικόνα 40: Βιοπλαστικά τρίτου σταδίου μετά από 135d στο θαλασσινό νερό*

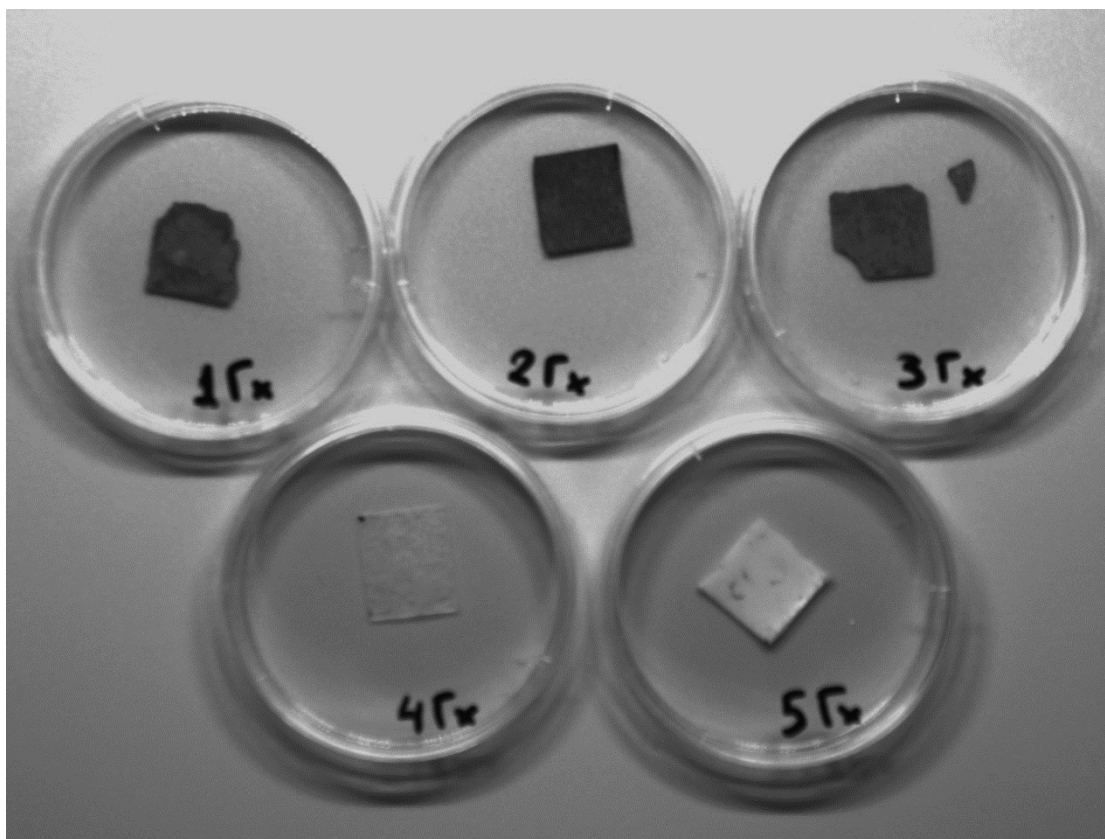


Εικόνα 41: Βιοπλαστικά πρώτου σταδίου μετά από 45d στο χώμα

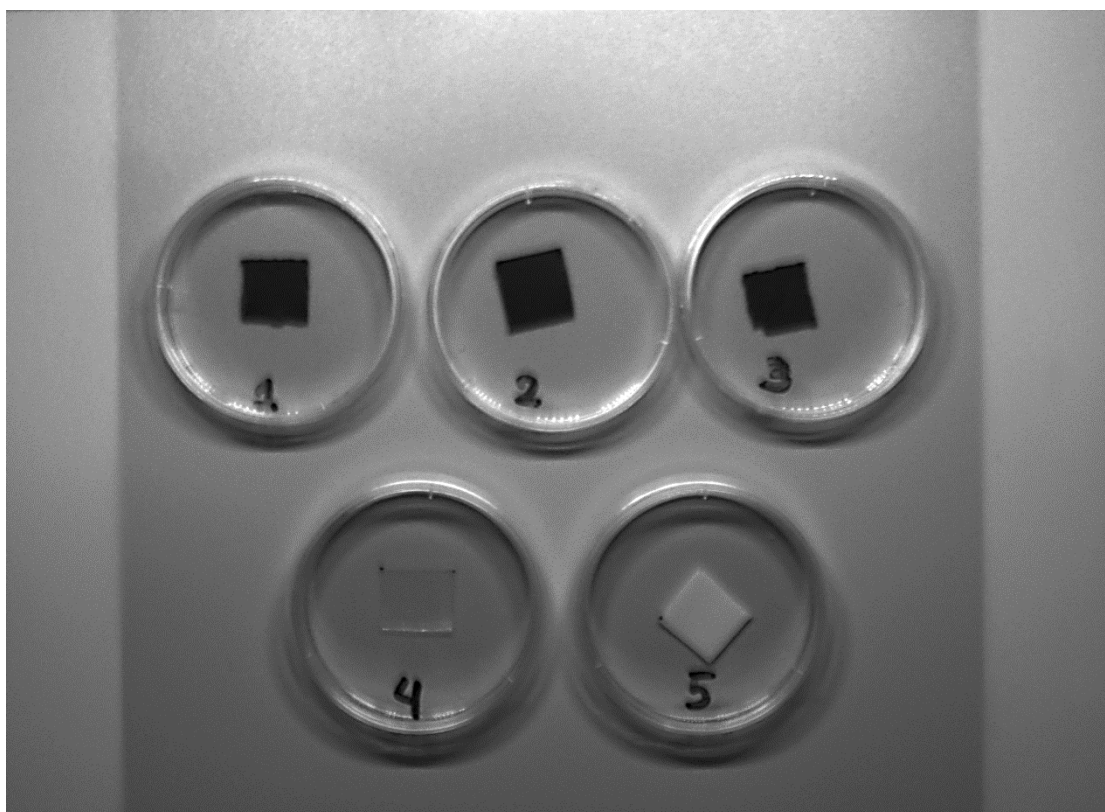


Εικόνα 42: Βιοπλαστικά δεύτερου σταδίου μετά από 90d στο χώμα

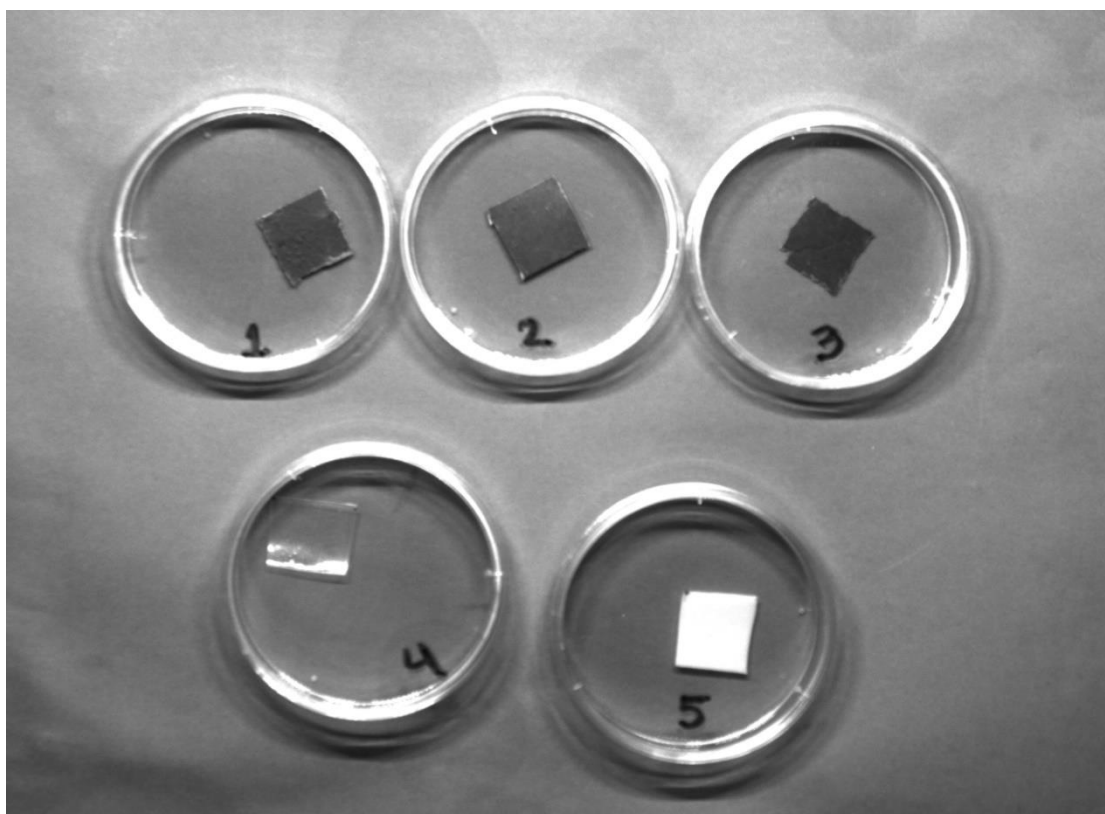




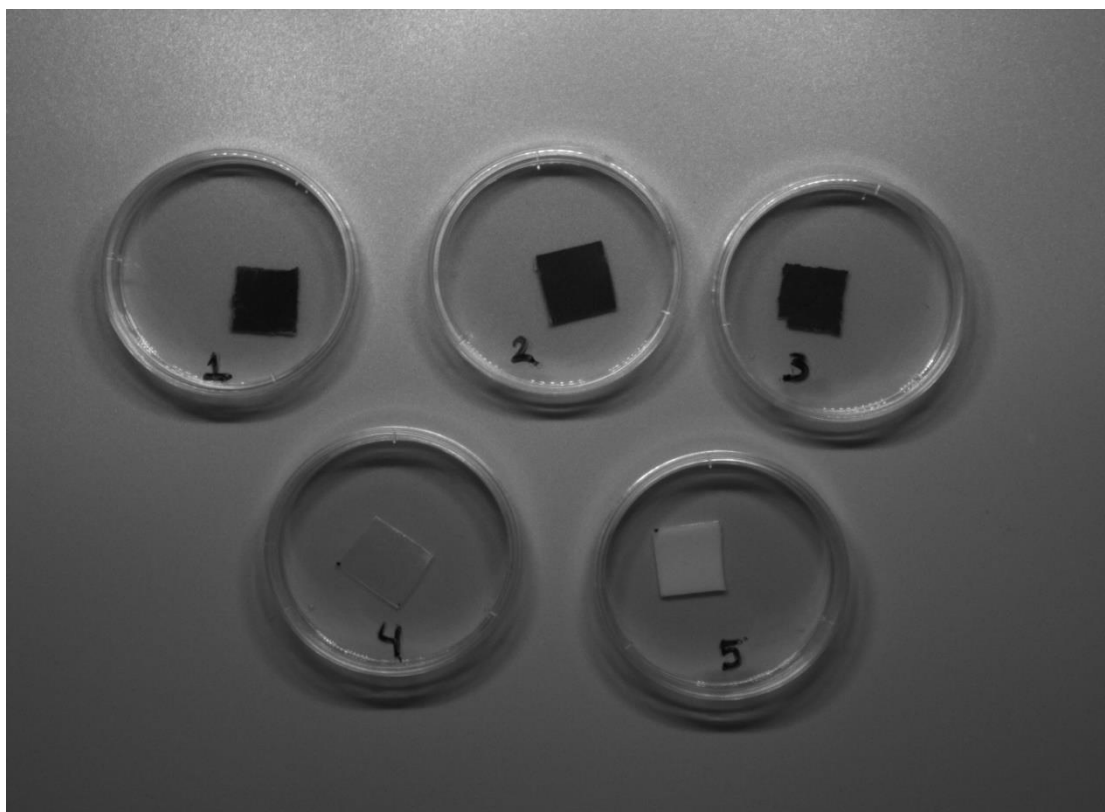
Εικόνα 43: Βιοπλαστικά τρίτου σταδίου μετά από 135d στο χώμα



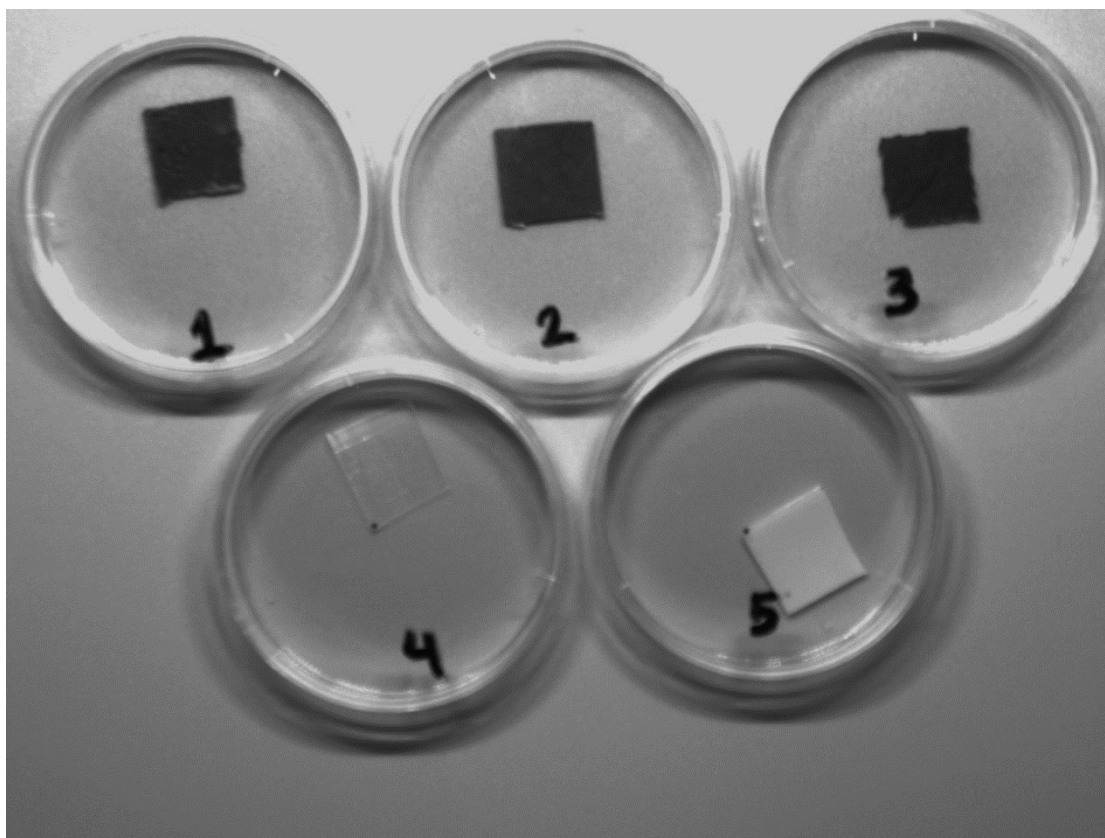
Εικόνα 44: Βιοπλαστικά για γήρανση στην αρχή του πειράματος



Εικόνα 45: Βιοπλαστικά για γήρανση μετά από 45d



Εικόνα 46: Βιοπλαστικά για γήρανση μετά από 90d



Εικόνα 47: Βιοπλαστικά για γήρανση μετά από 135d