

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής
Βακτηριολογίας – Ιολογίας

Πτυχιακή Εργασία

**“Απομόνωση μικροοργανισμών για τη διάσπαση
μικροπλαστικών από επιβαρυνμένα περιβάλλοντα.”**

Κλέα Πιέτρι του Πετρίτ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Πατεράκη Χρυσάνθη, Επίκουρη Καθηγήτρια

Λάρισα

2025

“Απομόνωση μικροοργανισμών για τη διάσπαση μικροπλαστικών από
επιβαρυμένα περιβάλλοντα.”

“Isolation of microorganisms with the ability to break down microplastics
from polluted environments.”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΤΕΡΑΚΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ: Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας με γνωστικό
αντικείμενο «Μικροβιολογία με έμφαση στη Βιοτεχνολογία» του ΤΒΒ - ΠΘ
(επιβλέπουσα)

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας και
Μικροβιολογίας.

ΣΚΛΗΡΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Επίκουρος καθηγητής στο τμήμα Βιοτεχνολογίας του
Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πριν ξεκινήσω με την ανάλυση του θέματος της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για τα άτομα που με βοήθησαν να την φέρω εις πέρας, ο καθένας με τον τρόπο του.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια, την κυρία Πατεράκη, που με δέχτηκε στην ομάδα του εργαστηρίου καθώς και με καθοδηγούσε και με συμβούλευε κατά τη διάρκεια της εργαστηριακής διαδικασίας και της συγγραφής της εργασίας.

Επίσης οφείλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα, Έφη Δουλοπούλου και την ερευνήτρια του εργαστηρίου μικροβιολογίας, Λίνα Ζογμπή, για την ανεκτίμητη βοήθεια και τη συντροφικότητα στο εργαστήριο. Η καθοδήγησή τους και η προθυμία τους να μοιραστούν τις γνώσεις τους ήταν πολύτιμη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές, τους φίλους και την οικογένειά μου για τη συνεχή υποστήριξη, την υπομονή και την ενθάρρυνσή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εκτεταμένη παρουσία μικροπλαστικών σε φυσικά οικοσυστήματα έχει αναδειχθεί ως μία από τις πιο ανησυχητικές μορφές ρύπανσης του 21ου αιώνα, με σοβαρές επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα, στη λειτουργία των τροφικών πλεγμάτων και στην ανθρώπινη υγεία μέσω της βιοσυσσώρευσης. Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην απομόνωση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών από επιβαρυμένα περιβάλλοντα (τα οποία δημιουργήθηκαν με προσθήκη σκόνης επιλεγμένων μικροπλαστικών), με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να διασπούν μικροπλαστικά μέσω βιοαποδομήσιμων βιοχημικών οδών.

Οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε επιλεκτικά μέσα εμπλουτισμένα με πολυμερή (PHB, PET, PLA, PBSA, PBAT) ως μόνη πηγή άνθρακα, και τα στελέχη που παρουσίασαν ενζυμική δραστηριότητα υποβλήθηκαν σε μοριακή ταυτοποίηση, συγκεκριμένα του DNA, μέσω αλληλούχησης γονιδίου 16S rRNA. Ωστόσο μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν και τα πιο γενικευμένα τους χαρακτηριστικά, όπως η δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος μέσω χρώσης κατά-Gram, η βιοαποδομική τους ικανότητα μέσω παρακολούθησης χρόνου κατανάλωσης θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένο με σκόνη μικροπλαστικών. Τέλος μελετήθηκε και η ενζυμική δράση τόσο των πρωτεϊνών που εκκρίνουν εξωκυτταρικά, όσο και των πρωτεϊνών που βρίσκονται ενδοκυτταρικά, με παρακολούθηση κατανάλωσης μικροπλαστικών σε μορφή pellets.

Η καλλιέργεια μικροοργανισμών σε medium 457 + PHB οδήγησε στην απομόνωση έξι στελεχών με ικανότητα υδρόλυσης του πολυυδροξυβουτυρικού (PHB), τα οποία εμφάνισαν διαφοροποίηση στη μορφολογία, στην ταχύτητα ανάπτυξης και στην αποτελεσματικότητα αποδόμησης. Ορισμένα στελέχη παρουσίασαν ταχεία ανάπτυξη και υψηλή ενζυμική δραστηριότητα, ενώ άλλα χαρακτηρίστηκαν από πιο αργή δράση. Η μοριακή ταυτοποίηση με BLASTn και φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι οι περισσότερες απομονώσεις ανήκουν στο γένος *Stenotrophomonas*, με μερικά στελέχη να εμφανίζουν χαμηλότερη ομοιότητα, υποδηλώνοντας πιθανή γενετική ποικιλότητα ή παρουσία νέων μορφών. Τα πειράματα μείωσης βάρους των PHB pellets ανέδειξαν μεγαλύτερη δραστηριότητα των εξωκυτταρικών ενζύμων έναντι των ενδοκυτταρικών, γεγονός που υπογραμμίζει το δυναμικό αξιοποίησης των πιο δραστικών στελεχών σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης μικροπλαστικών.

Abstract

The widespread presence of microplastics in natural ecosystems has emerged as one of the most alarming forms of pollution in the 21st century, with serious implications for biodiversity, trophic network functionality, and human health through bioaccumulation. This thesis focuses on the isolation and biochemical/genetic characterization of microorganisms from contaminated environments (artificially enriched with selected microplastic powders), aiming to evaluate their ability to degrade microplastics via biodegradable biochemical pathways.

Microorganisms were cultivated in selective media enriched with polymers (PHB, PET, PLA, PBSA, PBAT) as additional carbon sources. Strains exhibiting enzymatic activity were subjected to molecular identification, specifically DNA sequencing of the 16S rRNA gene. Additionally, general microbial characteristics were assessed, including cell wall structure via Gram staining, and biodegradation capacity through monitoring the consumption rate of nutrient media enriched with microplastic powder. Enzymatic activity was further investigated for both extracellularly secreted proteins and intracellular proteins, by tracking the degradation of microplastics in pellet form.

The cultivation of microorganisms in medium 457 + PHB led to the isolation of six strains capable of hydrolyzing polyhydroxybutyrate (PHB), which exhibited differences in morphology, growth rate, and degradation efficiency. Some strains demonstrated rapid growth and high enzymatic activity, while others were characterized by slower performance. Molecular identification through BLASTn and phylogenetic analysis revealed that most isolates belong to the genus *Stenotrophomonas*, with some strains showing lower similarity, suggesting possible genetic diversity or the presence of novel forms. Weight reduction experiments of PHB pellets highlighted the greater activity of extracellular enzymes compared to intracellular ones, emphasizing the potential of the most active strains for applications in microplastic bioremediation.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Παραγωγή πλαστικών.....	8
1.2 Διαχείριση πλαστικών.....	9
1.3 Μικροπλαστικά.....	10
1.4 Βιοδιασπώμενα μικροπλαστικά.....	11
1.4.1 PLA.....	11
1.4.2 PHAs	12
1.4.4 PBSA	15
1.4.5 PBAT.....	17
1.5 Μη βιοδιασπώμενα μικροπλαστικά.....	17
1.5.1 Πολυαιθυλένιο (PE).....	18
1.5.2 Πολυπροπυλένιο (PP).....	19
1.5.3 Πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC)	21
1.5.4 Πολυεστέρας (PET):	23
1.6 Επιπτώσεις στην υγεία, την τροφική αλυσίδα και τα οικοσυστήματα.....	24
1.7 Ανάγκη για βιοαποικοδόμηση.....	24
1.8 Μετάβαση από τη γραμμική οικονομία στην κυκλική βιο-οικονομία.....	26
1.9 Σκοπός.....	26
2. Υλικά και μέθοδοι	27
2.1 Επιλογή μικροπλαστικών.....	27

2.2 Απομόνωση μικροοργανισμών	27
2.3 Καλλιέργεια και αποθήκευση μικροοργανισμών που πιθανά υδρολύουν μικροπλαστικά.	29
2.4 Παρατήρηση και απομόνωση αποικιών μικροοργανισμών που υδρολύουν τα μικροπλαστικά.	30
2.5 Μέθοδοι και εργαλεία ταυτοποίησης απομονωμένων μικροοργανισμών.	30
2.6 Έλεγχος χρόνου υδρόλυσης μικροπλαστικών σε τετράγωνα τρυβλία Petri. ...	31
2.7 Χρώση κατά-Gram των βακτηρίων.....	31
2.8 Απομόνωση DNA των μικροοργανισμών που υδρολύουν μικροπλαστικά.	32
2.9 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).	33
2.10 Καθαρισμός δειγμάτων PCR	34
2.11 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	35
2.12 Αλληλούχιση του DNA.	35
2.13 Υδρόλυση pellets μικροπλαστικών.	36
3. Αποτελέσματα.....	36
3.1 Αποτελέσματα καταγραφής τρυβλίων.	37
3.2 Αποτελέσματα χρώσης κατά-Gram.	40
3.3 Αποτελέσματα χρόνου υδρόλυσης σκόνης μικροπλαστικού.....	41
3.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης DNA.	41
3.5 Αποτελέσματα ενζυμικής δράσης για την υδρόλυση PHB pellets.....	44
4. Συζήτηση	46
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50
6. Παράρτημα	56

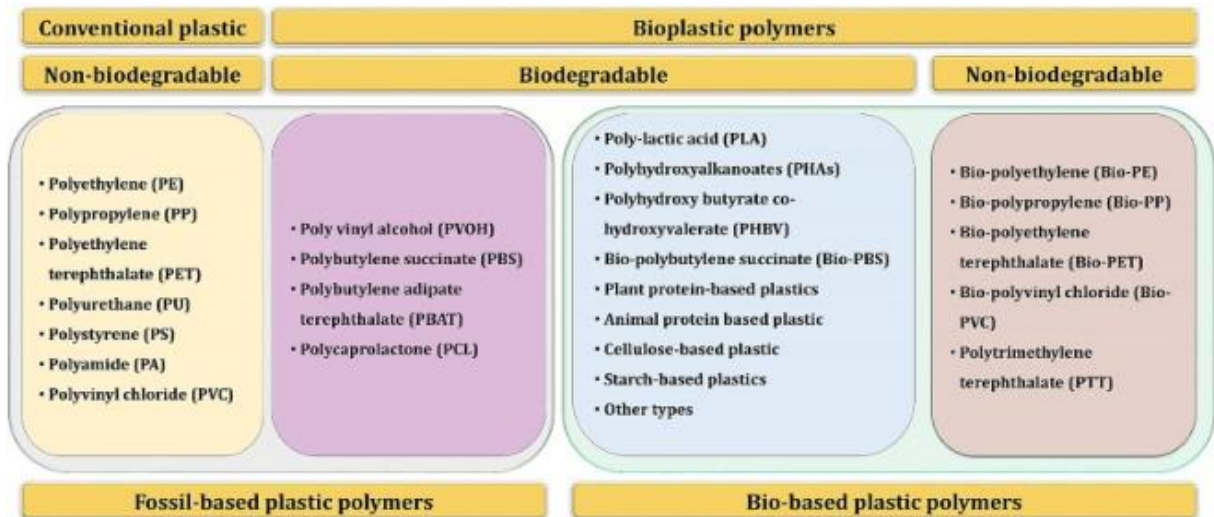
1. Εισαγωγή

1.1 Παραγωγή πλαστικών.

Τα πλαστικά παράγονται και χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο, τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Ο παγκόσμιος πληθυσμός συνεχίζει να αυξάνεται και εκτιμάται πως μέχρι το 2050 θα ξεπεράσει τα 9 δισεκατομμύρια. Αυτό σημαίνει ότι θα αυξηθεί όχι μόνο η κατανάλωση τροφίμων, αλλά και η χρήση πλαστικών, ειδικά αυτών που χρησιμοποιούνται για συσκευασίες. Από το 1950, όταν ξεκίνησε η μαζική παραγωγή πλαστικών (μόλις 2 εκατομμύρια τόνοι τότε), μέχρι το 2015 έχουν παραχθεί περίπου 8,3 δισεκατομμύρια τόνοι. Από αυτά, το 60% (δηλαδή γύρω στα 5 δισ. τόνοι) έχει καταλήξει στο περιβάλλον, σε χωματερές ή αλλού. Μόνο το 9% έχει ανακυκλωθεί και το 12% έχει καεί. Το 2022, η παγκόσμια παραγωγή πλαστικών έφτασε τους 400,3 εκατομμύρια τόνους. Η Ευρώπη συμμετείχε με το 14% αυτής της παραγωγής (58,7 εκατ. τόνοι). Τα βιοπλαστικά παραμένουν ακόμα σε πολύ χαμηλά επίπεδα, κάτω από το 1% σε παγκόσμια κλίμακα. Συγκεκριμένα, το 2022 παράχθηκαν 2,3 εκατομμύρια τόνοι βιοπλαστικών, με την Ευρώπη (EU27+3) να έχει το 27% αυτών (0,62 εκατ. τόνοι). Την ίδια χρονιά, η παγκόσμια παραγωγή ανακυκλωμένων πλαστικών ήταν 35,5 εκατ. τόνοι, με την Ευρώπη να κατέχει το 21% (περίπου 7,5 εκατ. τόνοι). Συνολικά, η παραγωγή πλαστικών αυξάνεται με ρυθμό γύρω στο 4% κάθε χρόνο και προβλέπεται ότι θα διπλασιαστεί μέχρι το 2035 και σχεδόν θα τετραπλασιαστεί μέχρι το 2050 (Geyer et al., 2017; *Plasticsthefastfacts2023*, n.d). Αν συνεχιστεί έτσι, μέχρι το 2050 θα έχουν συσσωρευτεί στο περιβάλλον περίπου 12 δισεκατομμύρια τόνοι απορριμμάτων από πλαστικά. Συνεχίζοντας με την κατηγοριοποίηση των πλαστικών, γίνεται με βάση δύο κύριους άξονες: την προέλευσή τους και τη δυνατότητα βιοδιάσπασής τους (Εικόνα 1) (Ali et al., 2022). Αρχικά, τα παραδοσιακά πλαστικά που γνωρίζουμε παράγονται από ορυκτά καύσιμα, όπως το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο, και χαρακτηρίζονται από την υψηλή ανθεκτικότητα και την αδυναμία τους να αποσυντεθούν εύκολα, γεγονός που τα καθιστά βασική αιτία ρύπανσης. Σε αντίθεση, τα βιοπλαστικά προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως φυτική βιομάζα, υποπροϊόντα βιομηχανιών ή και μέσω μικροοργανισμών, και θεωρούνται πιο φιλικά προς το περιβάλλον. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το να είναι ένα πλαστικό «βιο-βασισμένο» (bio-based) δεν συνεπάγεται απαραίτητα ότι είναι και βιοδιασπώμενο. Υπάρχουν περιπτώσεις όπως το βιοπολυαιθυλένιο (Bio-PE) και το βιοπολυουρεθάνιο (Bio-PU), τα οποία παράγονται από βιολογικές πηγές αλλά δεν αποδομούνται στο φυσικό περιβάλλον, ενώ αντίστροφα υπάρχουν βιοδιασπώμενα πλαστικά όπως το PBAT και το PBS που, αν και προέρχονται από ορυκτά καύσιμα, έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να διαλύονται με τη δράση μικροοργανισμών. Αυτό δείχνει ότι η χημική δομή και οι συνθήκες διάθεσης είναι καθοριστικοί παράγοντες για το αν ένα υλικό μπορεί πραγματικά να βιοδιασπαστεί (Ali et al., 2022).

Όσον αφορά τη διάσπαση και το τέλος ζωής τους, τα βιοπλαστικά μπορούν να υποστούν κομποστοποίηση ή αναερόβια χώνευση, διαδικασίες που τα μετατρέπουν σε πιο αβλαβή προϊόντα, κάτι που ονομάζεται “down-cycling”. Παράλληλα, πιο σύγχρονες τεχνικές, όπως το “up-cycling”, αξιοποιούν ένζυμα και μικροοργανισμούς για να σπάνε τα πλαστικά σε μονομερή ή άλλα χρήσιμα χημικά, ώστε να δημιουργούνται νέα υλικά υψηλότερης αξίας. Έτσι, τα απόβλητα δεν καταλήγουν απλά να διασπώνται, αλλά να επανεντάσσονται

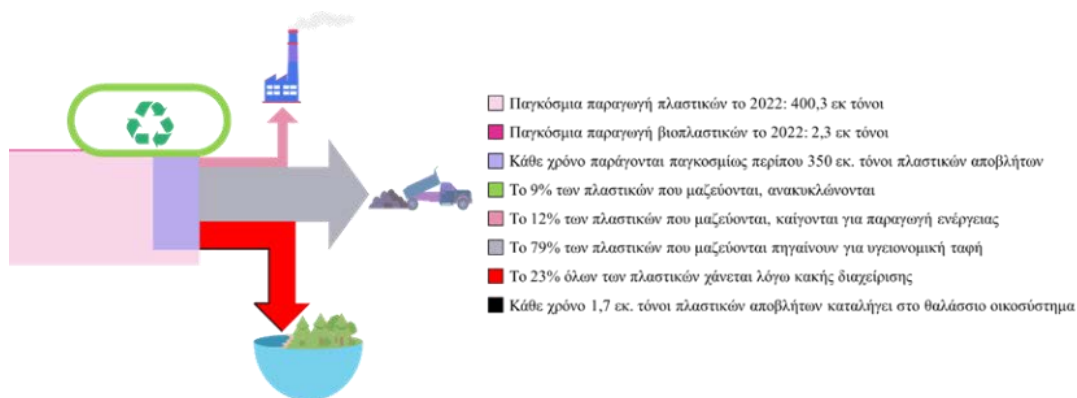
στην παραγωγή με προστιθέμενη αξία. Συνολικά, η κατηγοριοποίηση αυτή αναδεικνύει ότι η βιωσιμότητα ενός πλαστικού δεν σχετίζεται μόνο με το αν προέρχεται από ορυκτές ή βιολογικές πηγές, αλλά και με τον τρόπο που μπορεί να διαχειριστεί στο τέλος του κύκλου ζωής του (Ali et al., 2022). Στο πλαίσιο της κυκλικής βιοοικονομίας, αυτός ο τρόπος σκέψης στοχεύει στη μείωση της εξάρτησης από τα ορυκτά καύσιμα, στον περιορισμό της ρύπανσης και στην καλύτερη αξιοποίηση των απορριμμάτων, ώστε το πλαστικό να μην αποτελεί απειλή αλλά κομμάτι μιας πιο βιώσιμης παραγωγής και κατανάλωσης (Mrowiec, 2018).



Εικόνα 1: Ταξινόμηση διαφορετικών τύπων συμβατικών και βιοπλαστικών ανάλογα με την προέλευση και τη βιοδιασπασιμότητά τους (Ali et al., 2022).

1.2 Διαχείριση πλαστικών.

Το μεγαλύτερο μέρος πλαστικών χρησιμοποιείται στη συσκευασία (35,9%) και ακολουθούν οι κατασκευές (16,0%), τα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα (14,5%) και στα καταναλωτικά αγαθά (10,3%). Οι συσκευασίες αποτελούν και τη μεγαλύτερη πηγή απορριφθέντων πλαστικών παγκοσμίως με τη μικρότερη διάρκεια ζωής και το μικρότερο ρυθμό ανακύκλωσης (96,6% δεν ανακυκλώθηκαν). Κάθε χρόνο παράγονται παγκοσμίως περίπου 350 εκ. τόνοι πλαστικών αποβλήτων και το 0.5% (1,7 εκ. τόνοι) καταλήγει στο θαλάσσιο οικοσύστημα. Παρόλο που η διαχείριση των πλαστικών είναι μια συντονισμένη διαδικασία σε πολλές χώρες του κόσμου, περίπου το 23% των πλαστικών απορριμμάτων δεν ακολουθεί σωστή διαχείριση, ενώ το υπόλοιπο είτε αποτεφρώνεται, είτε θάβεται, είτε ανακυκλώνεται (Εικόνα 2). Η ανθεκτικότητα των πλαστικών που είναι μια από τις επιθυμητές ιδιότητές τους, συνδυασμένη με την κακή διαχείριση των απορριμμάτων, οδηγεί σε συσσώρευση και έχει αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Το 80% των πλαστικών απορριμμάτων που βρίσκονται σε θαλάσσια περιβάλλοντα προέρχονται από χερσαία απορρίμματα.



Εικόνα 2: Διάγραμμα Sankey που απεικονίζει την παγκόσμια παραγωγή των πλαστικών για το 2022 και την κατάληξή τους σύμφωνα με δεδομένα της τελευταίας δεκαετίας.

1.3 Μικροπλαστικά

Η μηχανική τριβή, η επίδραση της ακτινοβολίας UV (φωτοξείδωση) και η βιοαποικοδόμηση προκαλούν τη διάσπαση των πλαστικών σε μικροπλαστικά (0.1 μm - 5mm) και νανοπλαστικά (1 – 100 nm) που μπορούν να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα μέσω της κατανάλωσης τους από θαλάσσιους οργανισμούς. Τα μικροπλαστικά μπορεί να είναι πρωτογενή και συνήθως είναι πρόσθετα σε καλλυντικά ή δευτερογενή που προέρχονται από τριβή, υποβάθμιση πλαστικού και φυσική διάσπαση. Η προέλευση των μικροπλαστικών (βιογενή ή από πετρέλαιο) μπορεί να έχει διαφορετική επίδραση στους θαλάσσιους οργανισμούς. Τα μικροπλαστικά μπορούν να προκαλέσουν συμπεριφορικές και κυτταροτοξικές αλλαγές, ανισορροπία στην αντιοξειδωτική ικανότητα, μεταβολικές διαταραχές και αλλαγές στο ήπαρ και τη φυσιολογία του αίματος, αλλαγές στη σωματική αύξηση, την αναπαραγωγή και τη διατροφή με συνέπειες στην πληθυσμιακή δυναμική των αποθεμάτων. Επίσης μεταφέρουν μικροοργανισμούς (παθογόνους ή μη) αλλά και διάφορες χημικές ενώσεις που προσκολλώνται στην επιφάνεια τους ή προσροφώνται από το εκάστοτε υλικό. Αρκετά επικίνδυνη είναι η μεταφορά έμμονων οργανικών ρύπων (POPs) προκαλώντας σοβαρότερα προβλήματα στην επιβίωση των θαλάσσιων οργανισμών. Τα μικροπλαστικά εμφανίζονται σε διάφορες μορφές, όπως ίνες, σφαιρίδια, φιλμ ή θραύσματα, ανάλογα με την προέλευσή τους. Ένα ιδιαίτερα ανησυχητικό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να απορροφούν και να μεταφέρουν τοξικές ουσίες, όπως βαρέα μέταλλα και οργανικούς ρύπους, γεγονός που τα καθιστά επικίνδυνα για τους οργανισμούς που τα καταναλώνουν.

1. Πρωτογενή μικροπλαστικά: παράγονται σκόπιμα σε μικρό μέγεθος. Χρησιμοποιούνται σε: καλλυντικά (π.χ. scrub), καθαριστικά προϊόντα, συνθετικά ρούχα (π.χ. πολυεστέρας, ακρυλικό), βιομηχανικά προϊόντα. Πηγές αποτελούν απορρίμματα από πλύσιμο ρούχων, ελαστικά αυτοκινήτων, χρώματα, πλαστικές ρητίνες.

2. Δευτερογενή μικροπλαστικά: προέρχονται από τη διάσπαση μεγαλύτερων πλαστικών (μακροπλαστικά). Μερικές από τις διαδικασίες διάσπασης τους είναι: φωτο-οξείδωση, θερμική αποδόμηση, βιοαποδόμηση, μηχανική φθορά.

1.4 Βιοδιασπώμενα μικροπλαστικά.

Βιοδιασπώμενα μικροπλαστικά είναι μικροσκοπικά σωματίδια πλαστικού (με διάμετρο μικρότερη από 5 mm) που προέρχονται από βιοδιασπώσιμα πολυμερή, δηλαδή υλικά τα οποία μπορούν να διασπαστούν από φυσικούς μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες) σε απλές, μη τοξικές ενώσεις όπως διοξείδιο του άνθρακα, νερό και βιομάζα (Sun et al., 2022).

Η βιοδιάσπαση αυτών των μικροπλαστικών εξαρτάται από: τη χημική δομή του πολυμερούς, τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, παρουσία μικροοργανισμών) και τον χρόνο έκθεσης στο περιβάλλον. Αν και χαρακτηρίζονται ως "βιοδιασπώμενα", τα μικροπλαστικά αυτά μπορεί να παραμείνουν στο περιβάλλον για κάποιο διάστημα πριν διασπαστούν πλήρως. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, ενδέχεται να έχουν παρόμοιες επιπτώσεις με τα συμβατικά μικροπλαστικά, όπως μεταφορά ρύπων ή είσοδος στην τροφική αλυσίδα (Sun et al., 2022). Μερικές κατηγορίες βιοδιασπώμενων μικροπλαστικών αποτελούν: το PLA, PHA, PHB, PBSA, PBAT.

1.4.1 PLA

Το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) είναι ένα βιοαποικοδομήσιμο θερμοπλαστικό φυτικής προέλευσης που προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές. Θεωρείται μια φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση στα παραδοσιακά πλαστικά με βάση το πετρέλαιο λόγω της βιοδιασπασιμότητάς του και της ανανεώσιμης προέλευσης (Matuana, 2008). Αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους βιοπολυεστέρες με εφαρμογές σε πολλούς τομείς, λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων του. Καταρχάς, χαρακτηρίζεται από τη βιοαποικοδομησιμότητά του, καθώς μπορεί να διασπαστεί από ένζυμα όπως πρωτεάσες, λιπάσες, κουτινάσες και εστεράσες. Ωστόσο, η πλήρης αποικοδόμηση υπό φυσικές περιβαλλοντικές συνθήκες παραμένει πρόκληση. Όσον αφορά τις μηχανικές του ιδιότητες, το PLA παρουσιάζει υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό, γεγονός που το καθιστά σχετικά άκαμπτο συγκριτικά με άλλα θερμοπλαστικά. Παράλληλα, η ευθραυστότητά του περιορίζει την αξιοποίησή του σε εφαρμογές που απαιτούν μεγάλη αντοχή σε κρούση και ολκιμότητα (Shalem et al., 2024). Τέλος, οι θερμικές ιδιότητες του PLA περιλαμβάνουν μία σχετικά υψηλή θερμοκρασία μετάπτωσης γυαλιού (~60°C), η οποία ενισχύει την ευθραυστότητά του και περιορίζει τη χρήση του σε εφαρμογές που απαιτούν μεγαλύτερη ευελιξία (Kfoury et al., 2013).

Συνεχίζοντας με τις μεθόδους αποπολυμερισμού του PLA (Li et al., 2024) (Εικόνα 3):

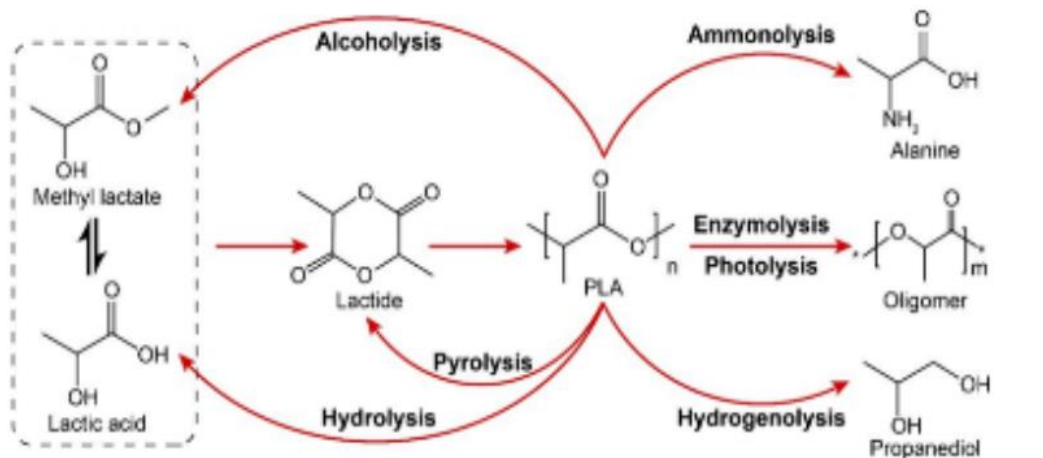
A) Υδρόλυση (Hydrolysis): Το PLA διασπάται σε γαλακτικό οξύ με τη χρήση νερού. Όξινοι ή βασικοί καταλύτες (θειικό οξύ, NaOH, KOH) επιταχύνουν τη διάσπαση. Υψηλές θερμοκρασίες (>200°C).

Β) Αλκοόλυση (Alcoholysis): Το PLA αντιδρά με αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη) για την παραγωγή μεθυλογαλακτικού (methyl lactate). Χρησιμοποιούνται καταλύτες όπως $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, FeCl_3 , ιονικά υγρά. Απαραίτητη η προσεκτική επιλογή καταλύτη για υψηλή απόδοση.

Γ) Πυρόλυση (Pyrolysis): Θερμοχημική μέθοδος που απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες για την παράγωγή λακτιδίου. Περιλαμβάνει ενδομοριακή μεταεστεροποίηση και τυχαία διάσπαση εστερικών δεσμών. Καταλύτες: Sn (κασσίτερος), ZnO , DBU (οργανικός). Πλεονεκτήματα: αποτελεσματική μέθοδος για παραγωγή λακτίδης, ενώ τα μειονεκτήματα: υψηλό κόστος ενέργειας, χαμηλή απόδοση μονομερών, περίπλοκα προϊόντα.

Δ) Ενζυμική Υδρόλυση (Enzymatic Hydrolysis): Χρήση μικροβιακών ενζύμων (π.χ. πρωτεάση K, λιπάση) για την παραγωγή oligομερών PLA.

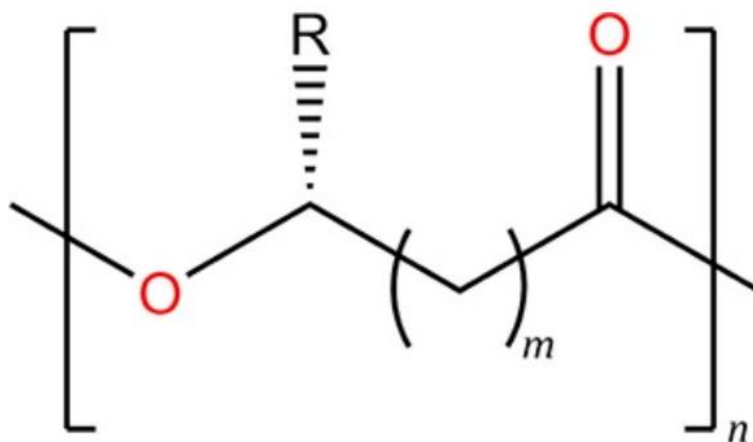
Ε) Άλλες Μέθοδοι: α. Αμινολύση / Αμμωνόλυση: Χρήση αμμωνίας ή αμινών για παραγωγή αμινοξέων (π.χ. αλανίνη) με καταλύτη: Ru/TiO_2 . β. Αναγωγική / Οξειδωτική Αποδόμηση: Αναγωγή: Χρήση H_2 με καταλύτες Ru για παραγωγή προπανεδιόλης. Οξείδωση: Θερμική οξείδωση, αεριοποίηση – περιορισμένη έρευνα. γ. Φωτόλυση / Ηλεκτρόλυση: για παραγωγή oligομερών: Φωτόλυση: UV ακτινοβολία με φωτοευαίσθητοποιητές (π.χ. CaO , TiO_2). Ηλεκτρόλυση: Χρήση ηλεκτροκαταλυτών (π.χ. $\text{CuCo}_2\text{O}_4/\text{Ni}$) – νέα τεχνολογία.



Εικόνα 3: Μέθοδοι αποπολυμερισμού του PLA και τα παράγωγά του (Li et al., 2024).

1.4.2 PHAs

Οι πολυϋδροξυαλκανοϊκοί εστέρες (PHAs) είναι βιοδιασπώμενοι πολυεστέρες που παράγονται από μικροοργανισμούς ως υλικά ενδοκυτταρικής αποθήκευσης. Θεωρούνται βιώσιμη εναλλακτική λύση στα συμβατικά πλαστικά λόγω της βιοδιασπασιμότητας και της μη τοξικής φύσης τους (Muneer et al., 2020) (Εικόνα 4).



Polyhydroxyalkanoate (PHA) general structure

Εικόνα 4: Στερεοχημική διάταξη PHA [25].

Τα πολυϋδροξυαλκανοϊκά (PHAs) παρουσιάζουν ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν σημαντικά υποψήφια υλικά για βιομηχανικές και ιατρικές εφαρμογές. Καταρχάς, διαθέτουν υψηλή βιοαποδομησιμότητα και βιοσυμβατότητα, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα για χρήση τόσο στον τομέα της συσκευασίας όσο και σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Επιπλέον, τα PHAs παρουσιάζουν ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως θερμοκρασία τήξης, θερμοκρασία μετάπτωσης υάλου και κρυσταλλικότητα, οι οποίες τα καθιστούν συγκρίσιμα με τα συνθετικά πλαστικά. Όσον αφορά την παραγωγή τους, αυτά τα πολυμερή μπορούν να παραχθούν από ποικιλία μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων όπως το *Bacillus megaterium* και είδη του γένους *Pseudomonas*, συνήθως υπό συνθήκες περιορισμένων θρεπτικών συστατικών (Muneer et al., 2020; Poltronieri & Kumar, 2017; Zhou et al., 2023).

Μέθοδοι αποπολυμερισμού του PHA (Πίνακας 1) (Clark & Shaver, 2024):

Μέθοδος	Θερμοκρασία (°C)	Καταλύτης	Προϊόντα	Απόδοση (%)
Μεθανόλυση	150-200	Ιονικά υγρά, Ru/CeO ₂	3-υδροξυβουτυρικό οξύ	85-95
Αιθανόλυση	140-180	Κατιονικά άλατα	Αιθυλεστέρες PHA	80-92
Όξινη Υδρόλυση	120-160	H ₂ SO ₄ , ZnCl ₂	Καρβοξυλικά οξέα	75-90
Βασική Υδρόλυση	100-140	NaOH, KOH	Άλατα PHA	80-88
Ενζυματική Υδρόλυση	30-50	Λιπάσες, Εστεράσες	Μονομερή PHA	60-85
Θερμολυτική Απόσταξη	170-250	Χωρίς καταλύτη	Κροτονικό οξύ, CO ₂	92

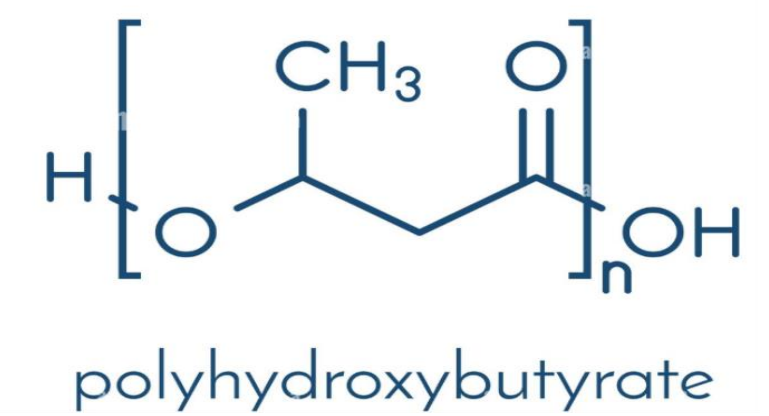
Πυρόλυση	300-500	Κατάλυση με μέταλλα (Ni, Co)	Υδρογονάνθρακες, CO, CO ₂	70-85
----------	---------	------------------------------	--------------------------------------	-------

Πίνακας 1: Μέθοδοι και συνθήκες αποπολυμερισμού του PHA (Clark & Shaver, 2024) .

1.4.3 PHB

Ο πολυυδροξυβουτυρικός εστέρας (PHB) είναι ένα βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές που παράγεται από διάφορους μικροοργανισμούς ως μορφή αποθήκευσης ενέργειας και άνθρακα. Είναι μέρος της οικογένειας πολυυδροξυαλκανοϊκών (PHA) και θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στα συμβατικά πετροχημικά πλαστικά λόγω της βιοδιασπασιμότητας και της βιοσυμβατότητάς του (P R. et al., 2021) (Εικόνα 5).

Το πολυ(υδροξυβουτυρικό) (PHB) παρουσιάζει ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδιαίτερα σημαντικό στις βιοτεχνολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματά του είναι η βιοαποδομησιμότητα και η βιοσυμβατότητα. Το PHB μπορεί να διασπαστεί από μικροοργανισμούς σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό, ενώ η βιοσυμβατότητά του το καθιστά κατάλληλο για εφαρμογές στον ιατρικό τομέα, όπως η χρήση του ως φορέας φαρμάκων. Παράλληλα, σημαντικό χαρακτηριστικό του αποτελεί η ποικιλία των πηγών παραγωγής του. Συγκεκριμένα, το PHB παράγεται από βακτήρια και αρχαία, συχνά με τη χρήση υποστρωμάτων πλούσιων σε άνθρακα. Η σύνθεσή του μπορεί να πραγματοποιηθεί από διάφορα μικροβιακά στελέχη, όπως είδη του γένους *Bacillus* αλλά και κυανοβακτήρια, τα οποία αξιοποιούν το ηλιακό φως και το CO₂ για την παραγωγή του (Clark & Shaver, 2024; P R. et al., 2021).



Εικόνα 5: Στερεοχημική διάταξη του PHB.

Μέθοδοι αποπολυμερισμού του PBH (Πίνακας 2) (Gabirondo et al., 2025):

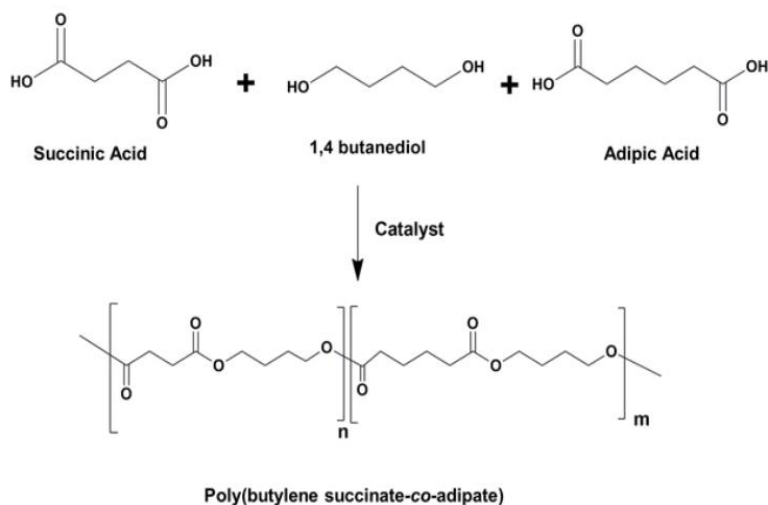
Μέθοδος Αποπολυμερισμού	Καταλύτης / Αντιδραστήριο	Συνθήκες	Κύρια Προϊόντα	Σχόλια
Υδρόλυση (χημική)	NaOH (0.5–4 M)	70 °C, 4 ώρες	3-Hydroxybutyric acid (3HB), Crotonic acid (CA)	Σε βασικό μέσο, η αντίδραση ακολουθεί μηχανισμό E1cB

Οξινή αποδόμηση	H ₂ SO ₄ (συμπυκνωμένο)	70 °C, 5 ώρες	CA (98%), 3HB (2%)	Η αφυδάτωση του 3HB οδηγεί σε CA μέσω μηχανισμού E1
Οργανοκαταλ υόμενη αποδόμηση	Ταυρίνη (zwitterionic catalyst)	180 °C, pH 5.5, 12 ώρες	3HB καθαρότητα) (98%	Υψηλή εκλεκτικότητα, αποφεύγεται η παραγωγή CA
Αλκοόλυση (αλκοολική αποδόμηση)	p-TSA + Μεθανόλη ή Αιθανόλη	140– 151 °C, 3–4 ώρες	Methyl/Ethyl 3- hydroxybutyrate	Χρήση βιοδιασπώμενων διαλυτών, κατάλληλο για παραγωγή μονομερών
Αποδόμηση υπό υψηλή πίεση	p-TSA + Μεθανόλη/Αιθαν όλη	Υψηλή πίεση, 151 °C	Alkyl esters	Χρήση σε αντιδραστήρα υψηλής πίεσης για παραγωγή πολυμερίσιμων μονομερών

Πίνακας 2: μέθοδοι αποπολυμερισμού του PHB (Gabirondo et al., 2025).

1.4.4 PBSA

Το PBSA (Polybutylene Succinate-co-Adipate) είναι ένα βιοδιασπώμενο αλειφατικό συμπολυμερές, που συντίθεται από: 1,4-βουτανودیολη (BDO), ηλεκτρικό οξύ (SA) και αδιπικό οξύ (AA). Χαρακτηρίζεται από: υψηλή ευκαμψία, καλή επεξεργασιμότητα, αντοχή σε κρούσεις και τέλος θερμική και χημική ανθεκτικότητα. Χρησιμοποιείται κυρίως σε συσκευασίες και γεωργικά καλύμματα (mulch films) (Εικόνα 6) (Chen et al., 2024; Chien et al., 2022). Αποδομείται τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο για κομποστοποίηση (Guo et al., 2024). Χρησιμοποιείται ευρέως σε βιοϊατρικές εφαρμογές, στη γεωργική συσκευασία και στη βιομηχανία τροφίμων. Η παραγωγή του πραγματοποιείται μέσω πολυμερισμού εστεροποίησης, κατά τον οποίο τα μονομερή ενώνονται με αποβολή νερού. Συγκεκριμένα, η διαδικασία βασίζεται στη χημική συμπύκνωση των αντίστοιχων οξέων με την 1,4-βουτανودیολη, σε υψηλές θερμοκρασίες (συνήθως άνω των 180°C) και υπό κενό ή αδρανή ατμόσφαιρα. Για την επιτάχυνση και βελτιστοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιούνται καταλύτες, όπως τα τιτανικά άλατα, ενώ εναλλακτικά μπορεί να εφαρμοστεί ενζυμικός πολυμερισμός με τη χρήση ενζύμων, όπως η λιπάση *Candida antarctica*.



Εικόνα 6: Στερεοχημική διάταξη του PBSA (Chen et al., 2024).

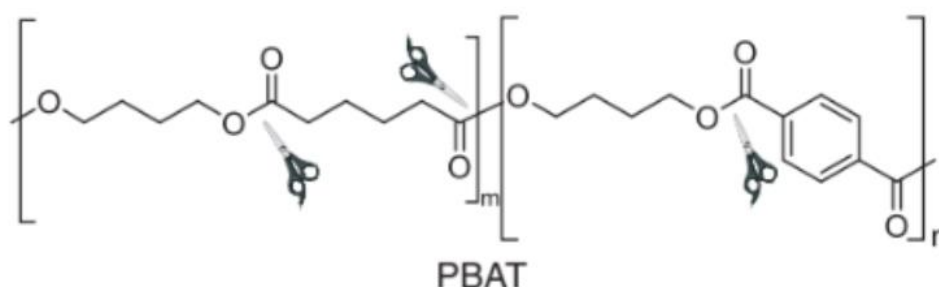
Οι μέθοδοι αποπολυμερισμού (Πίνακας 3) (Chen et al., 2024; Chien et al., 2022; Gabirondo et al., 2025):

Μέθοδος Αποπολυμερισμού	Περιγραφή	Παράγοντες/Συνθήκες	Προϊόντα Αποδόμησης
Υδρόλυση	Διάσπαση εστερικών δεσμών με νερό	Θερμοκρασία, pH, παρουσία ενζύμων	Μονομερή όπως σουκινικό οξύ και 1,4-βουτανοδιόλη
Ενζυματική αποδόμηση	Χρήση ενζύμων (π.χ. λιπάσες) από μικροοργανισμούς	Βιολογικές συνθήκες, παρουσία βακτηρίων όπως <i>Rhodococcus</i> , <i>Bacillus</i>	Ολιγομερή, μονομερή
Βιοαποδόμηση σε κομποστοποίηση	Αποδόμηση σε συνθήκες κομποστοποίησης (θερμότητα, υγρασία, μικροοργανισμοί)	50–60°C, αερόβιες συνθήκες	CO ₂ , H ₂ O, βιομάζα
Φωτοαποδόμηση	Διάσπαση μέσω UV ακτινοβολίας	Έκθεση σε φως, οξυγόνο	Ριζικές ενώσεις, μικρότερα μόρια
Θερμική αποδόμηση (πυρόλυση)	Θέρμανση σε απουσία οξυγόνου	>300°C	Πτητικά οργανικά, αέρια, άνθρακας
Χημική αποδόμηση με καταλύτες	Χρήση οξέων ή βάσεων για επιτάχυνση της υδρόλυσης	Καταλύτες όπως HCl ή NaOH	Μονομερή, οξέα και αλκοόλες

Πίνακας 3: Μέθοδοι αποπολυμερισμού του PBSA (Chen et al., 2024; Chien et al., 2022; Gabirondo et al., 2025).

1.4.5 PBAT

Το PBAT είναι ένα βιοδιασπώμενο πλαστικό που προέρχεται από πετρελαϊκές πρώτες ύλες και αποτελεί συν-πολυμερές των: Αδιπικού οξέος (AA), Τερεφθαλικού οξέος (TPA), 1,4-βουτανοδιόλης (BDO). Συνδυάζει αλειφατικές μονάδες (για ευκαμψία) και αρωματικές μονάδες (για αντοχή) (Εικόνα 7) (Yang et al., 2023).



Εικόνα 7: Στερεοχημική διάταξη του PBAT (Yang et al., 2023).

Αποπολυμερισμός του PBAT (Πίνακας 3) (Ismail et al., 2024):

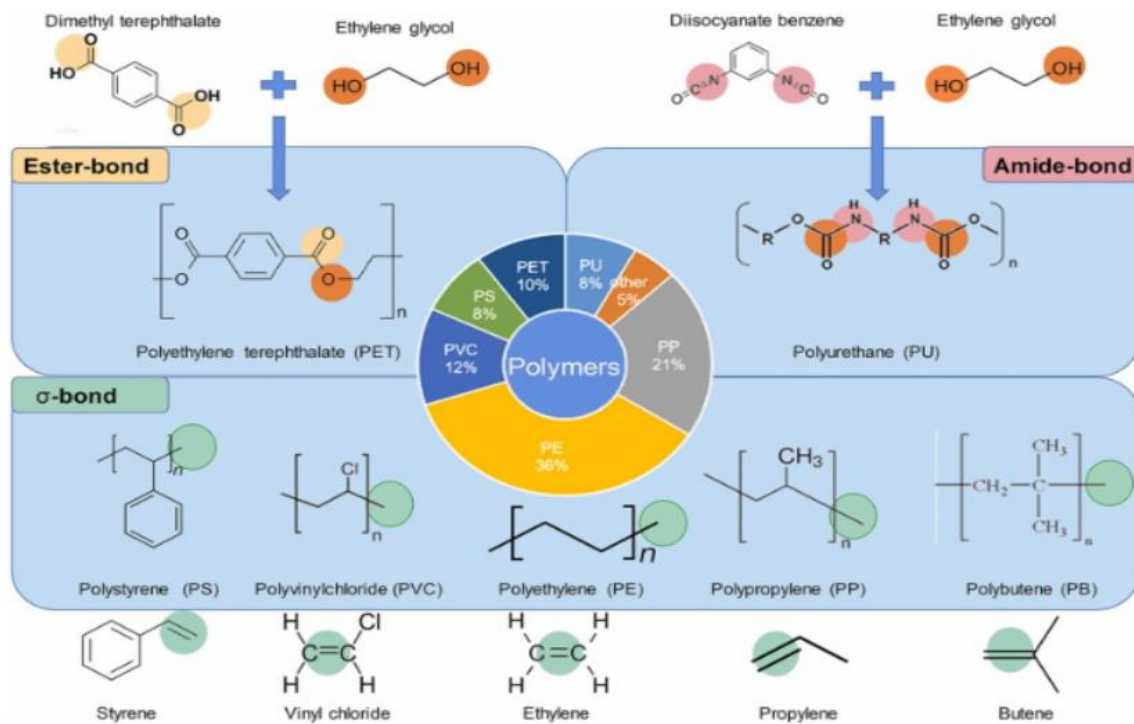
Παράμετρος	Τιμές/Συνθήκες
Θερμοκρασία	30, 50, 70, 80, 90, 100 °C
pH αντίδρασης	8 (διατηρείται με προσθήκη NaOH ή H ₃ PO ₄)
Διάλυμα Αντίδρασης	100 mM φωσφορικό κάλιο (ρυθμιστικό διάλυμα)
Συγκέντρωση PBAT	5–15 g L ⁻¹ (σε μορφή φιλμ 1.0 × 1.0 cm)
Συγκέντρωση Ενζύμου (LCC-WCCG)	0.01–1.5 μM
Όγκος Αντίδρασης	5 mL έως 2 L
Ανάδευση	150–500 rpm
Χρόνος Αντίδρασης	24–96 ώρες

Πίνακας 3: Μέθοδοι αποπολυμερισμού του PBAT (Ismail et al., 2024).

1.5 Μη βιοδιασπώμενα μικροπλαστικά.

Τα μη βιοδιασπώμενα μικροπλαστικά είναι μικροσκοπικά πλαστικά σωματίδια (συνήθως <5 mm) που δεν αποδομούνται φυσικά από μικροοργανισμούς ή περιβαλλοντικές διεργασίες. Παραμένουν στο περιβάλλον για δεκαετίες ή και περισσότερο, προκαλώντας σοβαρές επιπτώσεις σε οικοσυστήματα και οργανισμούς (Prüst et al., 2020). Τα μη βιοδιασπώμενα πλαστικά παρουσιάζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά, τα οποία τα καθιστούν ιδιαίτερα ανθεκτικά στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται από ανθεκτικότητα, καθώς δεν διασπώνται εύκολα από φυσικούς παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, η θερμότητα ή οι μικροοργανισμοί. Επιπλέον, διαθέτουν μικρό μέγεθος, συνήθως μικρότερο των 5 mm (μικροπλαστικά), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσουν σε διαστάσεις νανοπλαστικών (<1 μm). Η χημική τους σταθερότητα

τα καθιστά αδρανή απέναντι σε χημικές αντιδράσεις, ενώ η υδροφοβικότητά τους ευνοεί την προσρόφηση τοξικών ουσιών από το περιβάλλον. Τέλος, παρουσιάζουν δυνητική τοξικότητα, καθώς μπορούν να μεταφέρουν ρύπους και να εισχωρήσουν σε οργανισμούς μέσω της τροφικής αλυσίδας (Prüst et al., 2020). Μεταξύ των σημαντικότερων κατηγοριών μη βιοδιασπώμενων πλαστικών συγκαταλέγονται: α) το πολυαιθυλένιο (PE), β) το πολυπροπυλένιο (PP), γ) το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) και δ) ο πολυεστέρας (PET), τα οποία αποτελούν τις βασικές πρώτες ύλες για την πλειονότητα των πλαστικών προϊόντων (Yao et al., 2022).



Εικόνα 8: Κατηγορίες μη βιοδιασπώμενων μικροπλαστικών (Yao et al., 2022).

1.5.1 Πολυαιθυλένιο (PE)

Το πολυαιθυλένιο είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές που προέρχεται από τον πολυμερισμό του αιθυλενίου (C_2H_4) και αποτελεί το πιο κοινό πλαστικό παγκοσμίως, λόγω της ευκολίας παραγωγής, του χαμηλού κόστους και της ευρείας χρήσης του (Yao et al., 2022). Η χημική του σύσταση βασίζεται σε επαναλαμβανόμενες μονάδες αιθυλενίου ($-CH_2-CH_2-$) με κορεσμένους δεσμούς άνθρακα-άνθρακα ($C-C$), γεγονός που το καθιστά χημικά αδρανές και ανθεκτικό σε οξέα, βάσεις και άλατα, αν και παραμένει ευαίσθητο σε ισχυρά οξειδωτικά, όπως το θειικό και το νιτρικό οξύ. Από θερμικής άποψης, δεν διαλύεται σε κοινούς διαλύτες κάτω από τους $60^\circ C$, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να διαλυθεί μερικώς σε οργανικούς διαλύτες όπως το τολουέν ή το τριχλωροαιθυλένιο.

Όσον αφορά τις μηχανικές του ιδιότητες, το πολυαιθυλένιο εμφανίζει καλή αντοχή σε κρούση, αλλά χαμηλή αντοχή σε εφελκυσμό και ερπυσμό, με τη μηχανική του

συμπεριφορά να εξαρτάται κυρίως από το μοριακό βάρος και την κρυσταλλικότητα. Το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) παρουσιάζει υψηλότερη κρυσταλλικότητα και, συνεπώς, μεγαλύτερη μηχανική αντοχή, ενώ το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE) χαρακτηρίζεται από χαμηλότερη κρυσταλλικότητα και μεγαλύτερη ευκαμψία. Παράλληλα, η αντοχή του στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV) είναι περιορισμένη, εκτός αν κατά την παραγωγή προστεθούν ειδικοί σταθεροποιητές. Τέλος, η βιοαποδομησιμότητά του είναι εξαιρετικά χαμηλή, γεγονός που δυσχεραίνει την αποδόμησή του στο περιβάλλον και συμβάλλει στη συνεχή συσσώρευση πλαστικών αποβλήτων (Yao et al., 2022).

Οι μέθοδοι αποπολυμερισμού εμφανίζονται στον Πίνακα 4 (Yao et al., 2022):

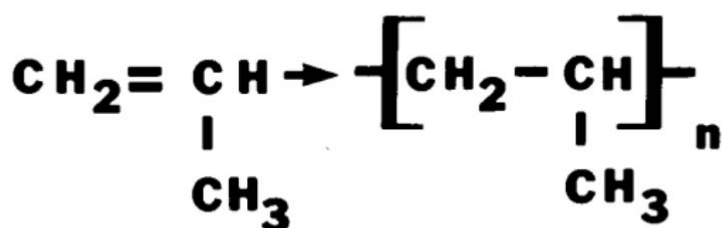
Μέθοδος	Μηχανισμός	Συνθήκες	Παρατηρήσεις
Φωτοαποδόμηση	Ενεργοποίηση μέσω UV ακτινοβολίας → δημιουργία ελεύθερων ριζών → οξείδωση	UV ή ορατό φως, παρουσία φωτοκαταλυτών (π.χ. TiO_2 , ZnO)	Χαμηλή απόδοση σε υπόγεια στρώματα, απαιτεί χρωμοφόρα ή προσμίξεις
Θερμική αποδόμηση	Θερμική οξείδωση → διάσπαση μακρομορίων → παραγωγή ριζών και πτητικών ενώσεων	Πυρόλυση: 300–600°C, Μικροκύματα, Καταλύτες (π.χ. NiO , HY , HZSM-5)	Υψηλή ενεργειακή απαίτηση, παραγωγή αερίων και υγρών προϊόντων
Καταλυτική χημική διάσπαση	Υδρογόνωση με καταλύτες → μετατροπή σε λιπαντικά, κεριά, υγρά προϊόντα	Καταλύτες Pt/SiO_2 , Pt/SrTiO_3 , $\text{Pt/Al}_2\text{O}_3$, θερμοκρασίες ~280–300°C	Υψηλή απόδοση (έως 80%), περιορισμένη εφαρμογή εκτός εργαστηρίου
Μηχανική επεξεργασία	Φυσική θραύση → δημιουργία μικροπλαστικών → αύξηση επιφάνειας για περαιτέρω διάσπαση	Ανάμειξη με ιζήματα, περιστροφή σε μίξερ για 24 ώρες	Χρήσιμη ως προκατεργασία για αύξηση της αποτελεσματικότητας άλλων μεθόδων

Πίνακας 4: Μέθοδοι αποπολυμερισμού του PE (Yao et al., 2022).

1.5.2 Πολυπροπυλένιο (PP)

Το πολυπροπυλένιο είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές που παράγεται από την πολυμερισμό της προπυλενίου (C_3H_6). Ανήκει στην οικογένεια των πολυολεφινών και είναι γνωστό για την ανθεκτικότητα, την ευελιξία και το χαμηλό κόστος παραγωγής (Εικόνα 9) (Clayman, 1981).

POLYMERIZATION OF PROPYLENE



Propylene Polypropylene

Εικόνα 9: Στερεοχημική διάταξη του PP (Clayman, 1981).

Συνεχίζοντας με τα χαρακτηριστικά του από φυσικής πλευράς, πρόκειται συνήθως για ένα ημιδιαφανές ή λευκό υλικό, το οποίο μπορεί εύκολα να χρωματιστεί. Έχει πυκνότητα περίπου 0,90–0,91 g/cm³, δηλαδή είναι ελαφρύτερο από το νερό, ενώ το σημείο τήξης του κυμαίνεται μεταξύ 160–170 °C. Παρουσιάζει καλύτερη αντοχή σε θερμοκρασία σε σχέση με το πολυαιθυλένιο, χωρίς ωστόσο να θεωρείται ιδιαίτερα υψηλή, και είναι υδροφοβικό, αφού δεν απορροφά νερό. Όσον αφορά τις μηχανικές του ιδιότητες, χαρακτηρίζεται από υψηλή αντοχή σε κάμψη, γεγονός που το καθιστά σχετικά άκαμπτο, ενώ παράλληλα παρουσιάζει καλή αντοχή στην κόπωση, διατηρώντας το σχήμα του ακόμη και μετά από επαναλαμβανόμενες καμπτικές καταπονήσεις. Ωστόσο, εμφανίζει χαμηλή αντοχή σε χαμηλές θερμοκρασίες, καθώς γίνεται εύθραυστο κάτω από το 0 °C, εκτός εάν υποστεί τροποποίηση. Διαθέτει επίσης καλή αντοχή σε κρούση, ιδίως όταν ενισχυθεί με κατάλληλους τροποποιητές. Σε χημικό επίπεδο, παρουσιάζει εξαιρετική αντοχή έναντι οξέων, βάσεων και διαλυμάτων αλάτων, ενώ εμφανίζει ανθεκτικότητα και σε οργανικούς διαλύτες, μέχρι ένα ορισμένο σημείο. Είναι μη τοξικό, κάτι που το καθιστά κατάλληλο για εφαρμογές που σχετίζονται με την επαφή με τρόφιμα. Ωστόσο, έχει χαμηλή αντοχή στην υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς φθείρεται με την έκθεση στον ήλιο, εκτός αν προστεθούν σταθεροποιητές κατά την παραγωγή του (García-López et al., 2024; Harussani et al., 2022).

Συνεχίζοντας με μερικούς μεθόδους αποπολυμερισμού του πολυπροπυλενίου που αναλύονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 5) (Damayanti et al., 2022; García-López et al., 2024; Harussani et al., 2022):

Μέθοδος	Συνθήκες	Καταλύτες	Κύρια προϊόντα	Σχόλια
Θερμική πυρόλυση	350–500 °C, αδρανής ατμόσφαιρα (N ₂ ή κενό), ατμοσφ. πίεση	-	Προπένιο, προπάνιο, βουτάνιο, υγρά καύσιμα, κεριά	Υψηλή ενέργεια, ευρεία κατανομή προϊόντων
Καταλυτική πυρόλυση	250–400 °C, αδρανές περιβάλλον	Ζεολίθοι (HZSM-5), SiO ₂ /Al ₂ O ₃ ,	Κυρίως προπένιο και άλλα ελαφρά αέρια	Μειωμένη ενέργεια,

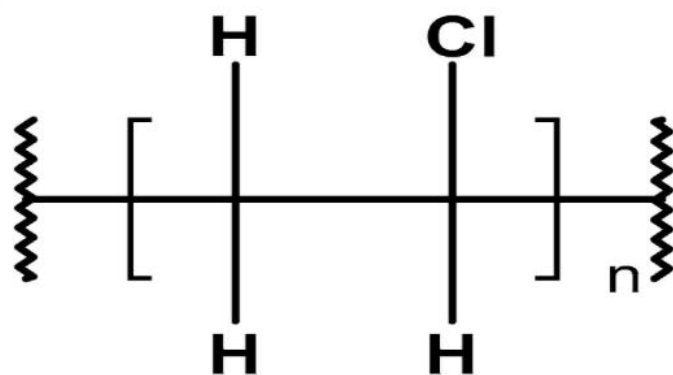
		οξειδία μετάλλων		υψηλότερη εκλεκτικότητα
Οξείδωση (θερμική γήρανση)	>150 °C, παρουσία O ₂ ή UV ακτινοβολίας	-	Οξειδωμένα θραύσματα αλυσίδας, CO ₂ , H ₂ O	Δεν ανακτάται μονομερές κυρίως υποβάθμιση υλικού
Υδρογονοδιά- σπαση	350–450 °C, υψηλή πίεση H ₂	Καταλύτες Ni, Pt, Pd σε φορείς	Υδρογονάνθρακες μικρής αλυσίδας (προπάνιο, βουτάνιο)	Παράγει καθαρά καύσιμα
Διάσπαση με μικροκύματα	400–500 °C τοπικά	Καταλύτες- απορροφητέ- ς μικροκυμά- των (Fe ₃ O ₄ , SiC)	Παρόμοια προϊόντα με πυρόλυση	Ταχύτερη θέρμανση, χαμηλότερη συνολική ενέργεια
Υπερκρίσιμο υγρό μέσο	250–400 °C, υπερκρίσιμο νερό ή αλκοόλες	Μερικές φορές οξειδία μετάλλων	Υδρογονάνθρακες, αλκοόλες	Έλεγχος προϊόντων ανάλογα με το μέσο

Πίνακας 6: Μέθοδοι και συνθήκες αποπολυμερισμού του PP (Damayanti et al., 2022; García-López et al., 2024; Harussani et al., 2022).

1.5.3 Πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC)

Το PVC είναι ένα θερμοπλαστικό πολυμερές με μονομερές τη βινυλοχλωρίδιο (C₂H₃Cl). Εμφανίζεται ως λευκό, εύθραυστο στερεό με πυκνότητα περίπου 1,4 g/cm³ Wikipedia. Είναι το τρίτο πιο παραγόμενο συνθετικό πλαστικό στον κόσμο (μετά το πολυαιθυλένιο και το πολυπροπυλένιο), με ετήσια παραγωγή περίπου 40 εκατομμυρίων τόνων (Εικόνα 10) (Zhang et al., 2024).

Συνεχίζοντας με τα χαρακτηριστικά του PVC: το PVC διαθέτει αντοχή σε χημικά (όξινα, αλκαλικά), έχει σταθερότητα και μεγάλη διάρκεια ζωής, υλικό ανθεκτικό στην οξείδωση ECVm. Διακρίνεται μεταξύ άκαμπτου PVC (uPVC) και εύκαμπτου/πλαστικοποιημένου PVC, ανάλογα με τα πρόσθετα που χρησιμοποιούνται. Όσον αφορά τις μηχανικές ιδιότητες η διάταση στη θραύση: 20–40%, σημείο τήξεως: 100–260 °C. Τέλος προσφέρει καλή θερμική και ηλεκτρική μόνωση. Η προσθήκη πλαστικοποιητών, σταθεροποιητών, χρωστικών κ.ά. επιτρέπει τη ρύθμιση χαρακτηριστικών όπως ευκαμψία, αντοχή, χρώμα, διαφάνεια, προστασία από UV, αντιμικροβιακή δράση (Zhang et al., 2024).



PVC

Εικόνα 10: Στερεοχημική διάταξη του PVC (Chruściel et al., 2023).

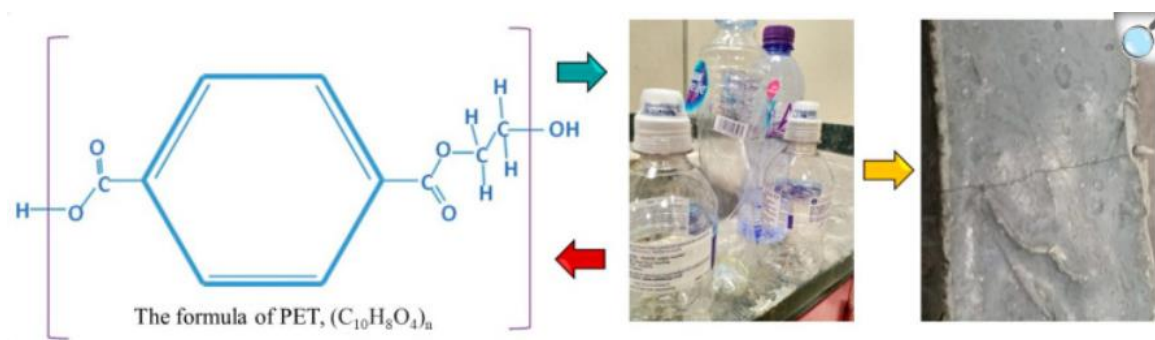
Μέθοδοι αποπολυμερισμού του PVC (Πίνακας 7) (Chamas et al., 2020; Chruściel et al., 2023) :

Μέθοδος	Περιγραφή	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Θερμική Αποδόμηση	Θέρμανση του PVC σε υψηλές θερμοκρασίες (>250°C) για διάσπαση των δεσμών.	Απλή τεχνολογία, δυνατότητα ανάκτησης HCl.	Παραγωγή τοξικών ενώσεων (διοξίνες).
Καταλυτική Πυρόλυση	Χρήση καταλυτών (π.χ. οξείδια μετάλλων) για μείωση θερμοκρασίας αποδόμησης.	Μειωμένη ενεργειακή απαίτηση.	Ακριβοί καταλύτες, ανάγκη για καθαρισμό.
Χημική Ανακύκλωση	Αντιδράσεις με χημικά αντιδραστήρια για διάσπαση του πολυμερούς.	Δυνατότητα ανάκτησης μονομερών.	Πολύπλοκες διεργασίες, χρήση διαλυτών.
Φωτοχημική Διάσπαση	Χρήση UV ακτινοβολίας για διάσπαση δεσμών C-Cl.	Χαμηλή θερμοκρασία, δυνατότητα ελέγχου.	Χαμηλή απόδοση, περιορισμένη εφαρμογή.
Βιολογική Αποδόμηση	Χρήση μικροοργανισμών για διάσπαση PVC (σε πειραματικό στάδιο).	Φιλική προς το περιβάλλον.	Πολύ αργή διαδικασία, περιορισμένη απόδοση.

Πίνακας 7: Μέθοδοι αποπολυμερισμού του PVC (Chamas et al., 2020; Chruściel et al., 2023).

1.5.4 Πολυεστέρας (PET):

Το τereφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πλαστικό πολυμερές γνωστό για την αντοχή, την ελαφριά φύση του και την ανακυκλωσιμότητα του. Χρησιμοποιείται κυρίως στην κατασκευή φιαλών για νερό και αναψυκτικά, καθώς και σε συνθετικά υφάσματα όπως ο πολυεστέρας (B. Patel et al., 2023). Αποτελείται από μονομερείς μονάδες τereφθαλικού αιθυλενίου ($C_{10}H_8O_4$)₂ (B. Patel et al., 2023; Chamas et al., 2020; Tsironi et al., 2022) (Εικόνα 11). Χαρακτηρίζεται από αντοχή, καλή συμπεριφορά σε κρούση, ημιάκαμπτη αλλά ελαφριά δομή, καθώς και άχρωμη και ημικρυσταλλική μορφή. Λόγω των μηχανικών του ιδιοτήτων και των ιδιοτήτων φραγμού που διαθέτει, χρησιμοποιείται ευρέως σε εφαρμογές όπως τα ιατρικά δοχεία, η εμφιάλωση και γενικότερα η συσκευασία. Παράλληλα, το PET είναι ανακυκλώσιμο υλικό ωστόσο, η μεγάλη του ανθεκτικότητα δημιουργεί περιβαλλοντικές προκλήσεις, καθώς συμβάλλει στη συνεχιζόμενη ρύπανση από πλαστικό.



Εικόνα 11: Στερεοχημική διάταξη του PET (Khan et al., 2024).

Συνεχίζοντας με τις μεθόδους αποπολυμερισμού του PET, αναλύονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7) (Cheranov et al., 2019):

Μέθοδος Αποπολυμερισμού	Διαλύτης	Συνθήκες
Γλυκόλυση	Αιθυλενογλυκόλη (EG)	160-300°C, καταλύτες όπως φωσφαζίνες, οργανικές βάσεις
Υδρόλυση (Ουδέτερη)	Νερό	420°C, υψηλή πίεση
Υδρόλυση (Βασική)	NaOH, KOH	80°C, 60:40 EtOH:H ₂ O, 5 wt% NaOH
Υδρόλυση (Όξινη)	PTSA, ZnCl ₂	150-180°C, 3-8 ώρες
Μεθανόλυση	Μεθανόλη	140-200°C, ετερογενείς καταλύτες όπως bamboo leaf-ash, CO ₂ για βελτίωση διαλυτότητας
Αμινολυση	Εθανολαμίνη	120°C, καταλύτες όπως ZnO, χωρίς καταλύτη σε ορισμένες περιπτώσεις
Ενζυμική Υδρόλυση	-	50-70°C, ένζυμα όπως Is-PETase, LCC, PHL7

Ιοντικά Υγρά & DES	Ιοντικά υγρά, βαθιά ευτηκτικά διαλύματα	100-190°C, 1,3-dimethylurea/Zn(OAc) ₂ DES
--------------------	---	--

Πίνακας 7: Μέθοδοι αποπολυμερισμού του PET (Cheranov et al., 2019).

1.6 Επιπτώσεις στην υγεία, την τροφική αλυσίδα και τα οικοσυστήματα.

Η υπερβολική παρουσία μικροπλαστικών στο περιβάλλον αρχίζει να αφήνει εμφανές αποτύπωμα στην ανθρώπινη υγεία, καθώς τα μικροσκοπικά αυτά σωματίδια εισχωρούν στον οργανισμό μέσω της κατανάλωσης τροφίμων και νερού, αλλά και μέσω της αναπνοής. Η συσσώρευσή τους σε ιστούς μπορεί να πυροδοτήσει φλεγμονώδεις αντιδράσεις, να εντείνει το οξειδωτικό στρες και να μεταφέρει επιβλαβείς χημικές ουσίες, ενώ η παρουσία τους έχει επιβεβαιωθεί σε κρίσιμα όργανα όπως οι πνεύμονες, το κυκλοφορικό σύστημα και ο πλακούντας. Σε βάθος χρόνου, η έκθεση σε μικροπλαστικά ενδέχεται να αποδυναμώνει το ανοσοποιητικό και το ορμονικό σύστημα, να αυξάνει την πιθανότητα χρόνιων ασθενειών και να επηρεάζει αρνητικά τόσο τη γονιμότητα όσο και την υγιή ανάπτυξη του εμβρύου, καθιστώντας το ζήτημα αυτό σοβαρή πρόκληση για τη δημόσια υγεία (Hoang et al., 2025; Li et al., 2023; Mamun et al., 2023).

Η επίδρασή τους στην τροφική αλυσίδα είναι επίσης σημαντική, καθώς η παρουσία τους εντοπίζεται ήδη στα χαμηλότερα επίπεδα, όπως στο ζωοπλαγκτόν, και μέσω της τροφικής μεταβίβασης συγκεντρώνονται στα ανώτερα επίπεδα (Cole et al., 2013). Τα μικροπλαστικά συχνά μεταφέρουν στην επιφάνειά τους τοξικούς ρύπους, οι οποίοι απελευθερώνονται κατά την πέψη και επιβαρύνουν τους οργανισμούς που τα καταναλώνουν. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση της διατροφικής αξίας και της ποιότητας προϊόντων, ιδίως των ψαριών και των θαλασσινών, με συνέπειες τόσο για την ανθρώπινη διατροφή όσο και για την τοπική οικονομία σε περιοχές που βασίζονται στην αλιεία. Επιπλέον, η μείωση πληθυσμών εξαιτίας της ρύπανσης μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στα οικοσυστήματα, διαταράσσοντας την ισορροπία των τροφικών πλεγμάτων (Cole et al., 2013; Ziani et al., 2023).

Σε επίπεδο οικοσυστημάτων, η ρύπανση από μικροπλαστικά μεταβάλλει τόσο τα θαλάσσια όσο και τα χερσαία περιβάλλοντα. Στους θαλάσσιους χώρους, η παρουσία τους οδηγεί σε μείωση της βιοποικιλότητας, προκαλεί τραυματισμούς σε οργανισμούς, αλλοιώνει τις δομές των ενδιαιτημάτων και διευκολύνει τη διασπορά ξενικών ειδών. Στη στεριά, η εναπόθεσή τους στο έδαφος επηρεάζει αρνητικά τη μικροπανίδα και τη γονιμότητα, ενώ μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη των φυτών. Στην ατμόσφαιρα, τα μικροπλαστικά είναι ικανά να μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις, ακόμη και σε απομονωμένες περιοχές. Η συνεχής αύξηση των συγκεντρώσεών τους δημιουργεί έναν κύκλο ρύπανσης που είναι εξαιρετικά δύσκολο να ανατραπεί, καθιστώντας αναγκαία τη μείωση της χρήσης πλαστικών, την υιοθέτηση εναλλακτικών υλικών και την ενίσχυση των μέτρων διαχείρισης απορριμμάτων (Cverenkárová et al., 2021).

1.7 Ανάγκη για βιοαποικοδόμηση.

Η πλαστική ρύπανση αποτελεί ένα από τα πιο σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα του 21ου αιώνα, επηρεάζοντας τόσο τα θαλάσσια όσο και τα χερσαία οικοσυστήματα. Μια από τις πιο ανησυχητικές μορφές αυτής της ρύπανσης είναι τα μικροπλαστικά, τα οποία προέρχονται είτε από τη διάσπαση μεγαλύτερων πλαστικών αντικειμένων είτε από βιομηχανικές και καταναλωτικές πηγές. Η παρουσία τους είναι πανταχού παρούσα: από

τους ωκεανούς και τα ποτάμια, μέχρι το έδαφος, τον αέρα και ακόμη και τα τρόφιμα που καταναλώνουμε καθημερινά (Cai et al., 2023). Αυτό καθιστά την αντιμετώπιση των μικροπλαστικών αναγκαία όχι μόνο για την προστασία του περιβάλλοντος αλλά και για τη δημόσια υγεία.

Η βιοαποδόμηση των μικροπλαστικών από μικροοργανισμούς αποτελεί μια από τις πιο υποσχόμενες λύσεις στην αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος. Σε αντίθεση με τις μηχανικές ή χημικές μεθόδους αποικοδόμησης, η βιοαποδόμηση είναι φιλική προς το περιβάλλον, χαμηλού κόστους και μπορεί να εφαρμοστεί σε φυσικά οικοσυστήματα χωρίς να προκαλεί πρόσθετη ρύπανση (Thakur et al., 2023). Ουσιαστικά, οι μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια, μύκητες και άλγη, χρησιμοποιούν ένζυμα για να διασπάσουν τα πλαστικά σε απλούστερες, μη τοξικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να ενσωματωθούν σε φυσικούς βιοχημικούς κύκλους (Cai et al., 2023).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το βακτήριο *Ideonella sakaiensis*, το οποίο χρησιμοποιεί τα ένζυμα PETase και MHETase για να διασπά το PET σε αιθυλενογλυκόλη και τереφθαλικό οξύ, ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από άλλα μικροβιακά είδη ή να διασπαστούν περαιτέρω σε περιβαλλοντικά αβλαβείς ενώσεις (Lori et al., 2023). Παρόμοια ικανότητα έχουν και άλλα βακτήρια, όπως είδη των γενών *Pseudomonas*, *Bacillus* και *Rhodococcus*, αλλά και ορισμένοι μύκητες και άλγη, οι οποίοι μπορούν να αποικοδομήσουν πολυαιθυλένιο (PE), πολυπροπυλένιο (PP) και PET με διαφορετικά επίπεδα αποτελεσματικότητας (Cai et al., 2023; Thakur et al., 2023).

Η βιοαποδόμηση δεν περιορίζεται μόνο σε ατομικούς μικροοργανισμούς. Σε φυσικά περιβάλλοντα, τα μικροπλαστικά συχνά καλύπτονται από μικροβιακές κοινότητες που σχηματίζουν τη λεγόμενη *plastisphere*, η οποία περιέχει γονίδια για την αποικοδόμηση πλαστικών και άλλες λειτουργίες, όπως ο κύκλος του αζώτου (Hu et al., 2024). Αυτό δείχνει ότι η φύση μπορεί να οργανώνει συλλογικές διαδικασίες για την απομάκρυνση πλαστικών, κάτι που αποτελεί σημαντικό στοιχείο για τη μελλοντική βελτιστοποίηση της βιοαποδόμησης.

Παρά τη σημασία της, η βιοαποδόμηση αντιμετωπίζει αρκετές προκλήσεις. Ο ρυθμός αποικοδόμησης είναι γενικά αργός και στο φυσικό περιβάλλον μπορεί να διαρκέσει δεκαετίες ή ακόμα και αιώνες, ανάλογα με τον τύπο του πλαστικού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες [66]. Η δομή των πλαστικών, η υψηλή κρυσταλλικότητα και οι ισχυροί δεσμοί C–C καθιστούν την αποικοδόμηση ιδιαίτερα δύσκολη. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται για πόρους και συχνά τα *biofilms* που σχηματίζονται πάνω στα πλαστικά μπορούν να περιορίσουν την αποτελεσματικότητα των ενζύμων (Hu et al., 2024). Τέλος, ο αριθμός των γνωστών μικροοργανισμών που μπορούν να αποικοδομήσουν πλαστικά αποτελεσματικά παραμένει περιορισμένος [63-64].

Η επιστημονική έρευνα εστιάζει στην ενίσχυση της βιοαποδόμησης μέσω διαφόρων στρατηγικών. Η μεταγονιδιωματική ανάλυση βοηθά στην ανακάλυψη νέων γονιδίων και ενζύμων που σχετίζονται με την αποικοδόμηση πλαστικών, ενώ τεχνικές προκαταρκτικής επεξεργασίας, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, η θερμική επεξεργασία ή η οξειδωση, μπορούν να κάνουν τα πλαστικά πιο προσβάσιμα στους μικροοργανισμούς (Cai et al., 2023; Hu et al., 2024). Η συνθετική βιολογία προσφέρει εργαλεία για την τροποποίηση ενζύμων, όπως το PETase, ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητά τους, ιδιαίτερα απέναντι σε πλαστικά υψηλής κρυσταλλικότητας. Επίσης, η συνδυαστική χρήση

βιοηλεκτροχημικών μεθόδων και προηγμένων οξειδωτικών διεργασιών μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την αποικοδόμηση (Cai et al., 2023).

Η βιοαποδόμηση των μικροπλαστικών έχει επίσης σημαντικές επιπτώσεις για τη δημόσια υγεία. Τα μικροπλαστικά μπορούν να συσσωρεύουν τοξικές ουσίες και βαρέα μέταλλα, τα οποία μπορεί να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα. Με την αποικοδόμησή τους, μειώνεται η πιθανότητα βιοσυσσώρευσης και η έκθεση των ανθρώπων και των ζώων σε επικίνδυνες ουσίες (Jain et al., 2023). Επιπλέον, η διαδικασία αυτή μπορεί να συμβάλλει στην αποκατάσταση των οικοσυστημάτων και στη διατήρηση της βιοποικιλότητας, προστατεύοντας τόσο το θαλάσσιο όσο και το χερσαίο περιβάλλον.

Συμπερασματικά, η βιοαποδόμηση των μικροπλαστικών από μικροοργανισμούς αποτελεί μια κρίσιμη και πολλά υποσχόμενη λύση στο πρόβλημα της πλαστικής ρύπανσης. Παρά τις δυσκολίες, οι συνεχείς επιστημονικές προσπάθειες δείχνουν ότι μπορούμε να αυξήσουμε την αποτελεσματικότητα αυτής της διαδικασίας και να δημιουργήσουμε βιώσιμες τεχνολογίες που συνδυάζουν τη φύση με την καινοτομία. Η γνώση που αποκτάται σήμερα για μικροοργανισμούς, ένζυμα και μικροβιακές κοινότητες αποτελεί τη βάση για μελλοντικές εφαρμογές που μπορούν να διασφαλίσουν ένα καθαρότερο και πιο υγιές περιβάλλον για τις επόμενες γενιές.

1.8 Μετάβαση από τη γραμμική οικονομία στην κυκλική βιο-οικονομία.

Η αντιμετώπιση του περιβαλλοντικού προβλήματος που δημιουργείται από τη χρήση πλαστικών είναι πλέον προτεραιότητα τόσο του Παγκόσμιου Οικονομικού Φόρουμ (WEF), της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EU), του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) και των Ηνωμένων Εθνών (UN). Αυτή τη στιγμή η βιομηχανία πλαστικών εφαρμόζει ακόμη το γραμμικό μοντέλο της παραγωγής των πλαστικών που περιλαμβάνει την εξόρυξη πετρελαίου και τη μετατροπή του σε χρήσιμα προϊόντα, αντί στην ανακύκλωση (9%) ή την επαναχρησιμοποίηση προϊόντων. Η διάρκεια ζωής ενός πλαστικού προϊόντος, από τη χρήση έως την απόρριψη, εξαρτάται από την εφαρμογή, αλλά μπορεί να είναι πολύ σύντομη (λίγα λεπτά σε συσκευασίες τροφίμων). Η μετάβαση από τη γραμμική παραγωγή στην κυκλική είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς είναι ανάγκη να εφαρμοστούν βιώσιμες διεργασίες με θετικό περιβαλλοντικό αντίκτυπο χωρίς να επηρεαστεί ιδιαίτερα το οικονομικό όφελος της βιομηχανίας πλαστικών. Η κυκλική οικονομία πρέπει να αντικαταστήσει σταδιακά το σημερινό γραμμικό μοντέλο που αντιτίθενται στην έννοια της αποδοτικής παραγωγής. Για τη μετάβαση αυτή θα πρέπει να σχεδιαστούν καινοτόμες διεργασίες και προϊόντα, να γίνει η κλιμάκωση της παραγωγής και να ληφθούν πολιτικές αποφάσεις που θα προωθούν την βιώσιμη κυκλική οικονομία. Η βιο-οικονομία, που από τη φύση της βασίζεται σε ανανεώσιμες πρώτες ύλες και την επαναχρησιμοποίηση ή την ανακύκλωση των πρώτων υλών μπορεί να αντικαταστήσει μερικώς την εξάρτηση από τα ορυκτά καύσιμα και να οδηγήσει στην αειφόρο ανάπτυξη.

1.9 Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η απομόνωση, η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να διασπούν μικροπλαστικά. Η έρευνα εστιάζει σε δείγματα από περιβάλλοντα με έντονη ρύπανση, όπου είναι πιθανό οι οργανισμοί να έχουν αναπτύξει μηχανισμούς προσαρμογής. Τα μικροπλαστικά αποτελούν ένα από τα πιο σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα σήμερα, καθώς

χρησιμοποιούνται ευρέως και είναι ανθεκτικά στη φυσική αποδόμηση. Η παρουσία τους σε νερά, εδάφη και ζωντανούς οργανισμούς απειλεί τη βιοποικιλότητα και την ανθρώπινη υγεία, ενώ οι συμβατικές μέθοδοι διαχείρισης αποβλήτων συχνά αποδεικνύονται ανεπαρκείς.

Η εργασία επικεντρώνεται στη βιολογική αποδόμηση των μικροπλαστικών μέσω μικροοργανισμών, ως μια πιο φιλική προς το περιβάλλον στρατηγική. Η συλλογή δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από εδάφη που επιβαρύνουμε εμείς σκοπευμένα, με στόχο τον εντοπισμό οργανισμών που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς διάσπασης των πλαστικών πολυμερών.

Η μεθοδολογία περιλαμβάνει τη σταδιακή καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα, όπου τα μικροπλαστικά αποτελούν βοηθητική πηγή άνθρακα. Στη συνέχεια γίνεται η επιλογή και η απομόνωση των στελεχών με μεγαλύτερη βιοδιασπαστική ικανότητα και ο χαρακτηρισμός των φυσιολογικών και βιοχημικών ιδιοτήτων τους. Μέσω αυτών των διαδικασιών επιδιώκεται η κατανόηση των μηχανισμών διάσπασης και η αξιολόγηση της δυνατότητας εφαρμογής τους σε περιβαλλοντικές βιοτεχνολογικές πρακτικές.

Η μελέτη στοχεύει να συμβάλει στην ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών διαχείρισης ρύπων και να ενισχύσει τη γνώση γύρω από τη βιολογική αποδόμηση μικροπλαστικών, προσφέροντας εργαλεία για την αποκατάσταση ρυπασμένων οικοσυστημάτων και την προώθηση βιώσιμων λύσεων στην πλαστική ρύπανση.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Επιλογή μικροπλαστικών.

Αρχικό βήμα για την εκτέλεση του πειράματος αποτελούσε η επιλογή κατάλληλων ειδών μικροπλαστικών για να εξασφαλιστούν όσο δυνατόν καλύτερα αποτελέσματα. Επιλέχθηκαν 5 είδη μικροπλαστικών: PHB, PLA, PBAT, PBSA και PET. Η επιλογή αυτή έγινε αρχικά με βάση των ιδιοτήτων τους ως προς το αν είναι βιοδιασπώμενα πολυμερή ή μη βιοδιασπώμενα, διότι υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να παρατηρήσουμε και να λάβουμε αποτελέσματα από τα πρώτα σε σύγκριση με τα δεύτερα. Τα PHB, PLA, PBAT και PBSA είναι βιοδιασπώμενα υπό ορισμένες συνθήκες, σε αντίθεση με το PET που αποτελεί ένα πολύ ανθεκτικό πλαστικό.

2.2 Απομόνωση μικροοργανισμών

Αφού έγινε η επιλογή των μικροπλαστικών, υπολογίστηκε από κάθε ένα 5 g (τα οποία βρίσκονταν σε μορφή σκόνης) και τα θάφτηκαν ξεχωριστά στο έδαφος, στον προάυλιο χώρο του τμήματος βιοχημείας και βιοτεχνολογίας σε βάθος περίπου 20cm και επιφάνεια περίπου 200 cm². Περίπου 15 μέρες μετά το θάψιμο των μικροπλαστικών, έγινε για πρώτη φορά η συλλογή δείγματος από το έδαφος, μάζας περίπου 10 g, συγκεκριμένα από PHB και PET. Για την ενίσχυση των μικροοργανισμών των δειγμάτων προστέθηκε σε ένα σκεύος duran: 2g δείγμα χώματος, 1g κατάλληλου μικροπλαστικού σε μορφή σκόνης για κάθε δείγμα, 50mL αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και 50 mL αποστειρωμένο medium 1 που αποτελείται από: peptone 5g/L και meat extract 3g/L. Στην συνέχεια τα αφήνω να αναδευτούν για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η

διαδικασία αυτή την επαναλήφθηκε και μετά από 30 μέρες για τα ίδια μικροπλαστικά και για το PLA, PBSA, PBAT.

Η ποσότητα μικροβίων σε ένα δείγμα εδάφους ποικίλει ανάλογα με τον τύπο του εδάφους, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, την υγρασία, τη θερμοκρασία και πολλούς άλλους παράγοντες. Κατά μέσο όρο υπάρχουν $10^5 - 10^8$ ολικοί βακτηριακοί πληθυσμοί σε 1g εδάφους. Για να προκύψουν μετρήσιμες αποικίες αποικίες (25-250 αποικίες στο τρυβλίο) πρέπει να γίνουν τουλάχιστον 7 διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος σε αναλογία 1:10, δηλαδή 1ml δείγματος αραιωμένο σε 9ml Ringer. Το Ringer είναι ένα διάλυμα που αποτελείται από απιονισμένο νερό και περιεκτικότητα σε NaCl 0,9%. Επομένως η διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων αποτελεί τα εξής βήματα: 1) Με πιπέτα των 1000μL γίνεται προσθήκη 1 mL του διαλύματος που προέκυψε από το δείγμα του εδάφους σε 9 mL διαλύματος Ringer (αραίωση 10^{-1}). 2) Αναδευση του νέου διαλύματος για λίγα δευτερόλεπτα σε Vortex. Στην συνέχεια λήψη με νέο tip 1 mL του αραιωμένου δείγματος και προσθήκη σε 9 mL διαλύματος Ringer (αραίωση 10^{-2}). Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι την αραιώση 10^{-7} . 3) Επιστροφή ορισμένων αραιωμένων διαλυμάτων σε τρυβλία που περιέχουν medium 457 MINERAL MEDIUM (BRUNNER) – PHB ή PET αντίστοιχα. 4) Επώαση στους 30°C και παρακολούθηση ανάπτυξης αποικιών. Για επιστροφή στα τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν 200 μl δειγμάτων α) χωρίς αραιώση, β) 1η αραιώση (10^{-1}), β) 3η αραιώση (10^{-3}), γ) 5η αραιώση (10^{-5}) και δ) 7η αραιώση (10^{-7}).

Το medium 457 MINERAL MEDIUM (BRUNNER) + Άγαρ αποτελείται από: Na_2HPO_4 2.44g/L, KH_2PO_4 1.52g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g/L, Trace element solution SL-4: 10mL και Άγαρ 16 g. Γίνεται ρύθμιση του pH στο 6,9 και αποστειρώνονται οι φωσφορικές ουσίες σε ξεχωριστό δοχείο από τα υπόλοιπα υλικά. Η ανάμειξη τους θα γίνει όταν μετά την αποστείρωση η θερμοκρασία τους φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Το SL-4 αποτελείται από: EDTA 0.50g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20g/L, Trace element solution SL-6 100mL και υπόλοιπο απιονισμένο νερό μέχρι 900mL.

Το SL-6 αποτελείται από: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03g/L, H_3BO_3 0.30g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.20g/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03g/L, και τέλος συμπληρώνω απιονισμένο νερό στα 1000mL.

Για την προετοιμασία των τρυβλίων Petri έγινε επιστροφή 2 στρώσεων θρεπτικού υλικού. Η πρώτη στρώση περιείχε μόνο medium 457 + Άγαρ (16%). Αφού στεγνώσει και σταθεροποιηθεί γίνεται προσθήκη της δεύτερης στρώσης στην οποία έχει αναμειχθεί και διάλυμα PHB ή PET. Για το διάλυμα PHB χρησιμοποιήθηκε: 30g/l PHB σε μορφή σκόνης και απιονισμένο νερό, ενώ για το διάλυμα PET: 40g/L PET σε μορφή σκόνης και απιονισμένο νερό. (Ωστόσο πριν την ανάμειξη τους τα διαλύματα αυτά τοποθετήθηκαν σε μηχανή υπερήχων για 30 λεπτά). Τέλος, αφού έγινε η επιστροφή των επιθυμητών διαλυμάτων στις κατάλληλες αραιώσεις, για κάθε τρυβλίο δόθηκε ένας μοναδικός κωδικός για τον διαχωρισμό και την καλύτερη παρακολούθηση τους.

Για την εξήγηση κωδικών τρυβλίων: π.χ. PET_2h_D1_A0 --> στην πρώτη θέση (π.χ. PET) βρίσκεται πάντα το όνομα του μικροπλαστικού που παρατηρούνταν η υδρόλυση (είναι το μικροπλαστικό που βρίσκεται στο τρυβλίο και αυτό του δείγματος από το έδαφος). Στην δεύτερη θέση (π.χ. 2h) βρίσκεται ο αριθμός των ωρών που έχει επωαστεί το δείγμα στο

θρεπτικό της επιλογής (σε αυτή τη περίπτωση το medium 1) πριν την επίστρωση στα κατάλληλα τρυβλία. Στην τρίτη (π.χ. D1) θέση θα βρίσκεται ο αριθμός της ημέρας που επιστρώθηκαν τα τρυβλία σχετικά με την συλλογή του δείγματος από το περιβάλλον. Και στην τέταρτη θέση (π.χ. A0) θα βρίσκεται ο αριθμός της αραιώσης που υπέστη το δείγμα του τρυβλίου.

Τέλος επώσθησαν σε θερμοκρασία δωματίου έως 30°C και ξεκίνησε η καθημερινή παρακολούθηση για τυχόν αποικίες μικροοργανισμών που υδρολύουν τα μικροπλαστικά.

2.3 Καλλιέργεια και αποθήκευση μικροοργανισμών που πιθανά υδρολύουν μικροπλαστικά.

Παράλληλα επιλέχθηκε η καλλιέργεια ενός στελέχους βακτηρίου, το *Thermobifita Fuska* που έχει τα εξής χαρακτηριστικά: είναι θερμοφίλο, αερόβιο, Gram-θετικό βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια *Nocardiopsaceae* και είναι γνωστό για την ικανότητά του να διασπά την κυτταρίνη και άλλα πολυμερή φυτικής προέλευσης (Hegde & Dasu, 2014; Schoch et al., 2020). Είναι αρκετά σημαντικό στη βιοτεχνολογία, ιδιαίτερα για την παραγωγή ενζύμων που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία βιομάζας (Hegde & Dasu, 2014; Schoch et al., 2020). Επίσης επιλέχθηκε για καλλιέργεια και ένας μύκητας, ο *Candida blankii* (ή πιο πρόσφατα ταξινομημένος ως *Tardiomyces blankii*) είναι ένα είδος ζυμομύκητα που ανήκει στην ευρύτερη ομάδα των Ascomycota. Πρόκειται για έναν ευκαιριακά παθογόνο οργανισμό, ο οποίος έχει απομονωθεί από περιβαλλοντικά δείγματα αλλά και από ανθρώπινες λοιμώξεις, κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Schoch et al., 2020).

Για την καλλιέργεια του *Thermobifita Fuska* χρησιμοποιήθηκε ως medium το CZAPEK PEPTONE AGAR που περιέχει τα εξής συστατικά: σακχαρόζη 30.00g/L, NaNO₃ 3.00g/L, K₂HPO₄ 1.00g/L, MgSO₄·7H₂O 0.50g/L, KCl 0.50g/L, FeSO₄ 7H₂O 0.01g/L, εκχύλισμα ζύμης 2.00g/L, πεπτίνη 5.00g/L και άγαρ 20.00g/L, διαλυμένα σε απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1000.00mL. Το τελικό pH πρέπει να είναι ρυθμισμένο στο pH=7,3.

Αφού επιστρώθηκαν τα τρυβλία με τον μικροοργανισμό με μέθοδο streaking, όπου είναι μια βασική τεχνική στην μικροβιολογία για την απομόνωση καθαρών αποικιών μικροοργανισμών σε τρυβλία Petri με άγαρ.

Πώς γίνεται το streaking (Etheridge & Craig, 1973): αρχικά αποστειρώνεται ο μεταλλικός κρίκος εμβολιασμού και έπειτα θερμαίνεται μέχρι να κοκκινίσει για να αποστειρωθεί. Στην συνέχεια αφού κρυώσει ο κρίκος γίνεται λήψη, από προϋπάρχων cryovial, δείγματος με τον μικροοργανισμό. Έπειτα απλώνεται το δείγμα σε ένα τμήμα του άγαρ με κινήσεις σαν "Z". Τέλος αποστειρώνεται ξανά ο κρίκος και δημιουργείται νέα σπορά από το προηγούμενο τμήμα σε νέο τμήμα του άγαρ. Γίνεται επανάληψη της διαδικασίας αυτής 3-4 φορές, κάθε φορά σε διαφορετικό τμήμα του τρυβλίου.

Εφόσον ο *Thermobifita fusca* είναι θερμοφίλο βακτήριο η επώαση του γίνεται στους 50°C.

Συνεχίζοντας με τον *Candida blankii* χρησιμοποιήθηκε ως medium το UNIVERSAL MEDIUM FOR YEASTS (YM). Το θρεπτικό μέσο περιέχει: yeast extract 3g/L, malt

extract 3g/L, soy peptone 5g/L, γλυκόζη 10g/L και άγαρ 15g/L, διαλυμένα σε απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1000mL. Γίνεται επίστρωση των τρυβλίων Petri με μέθοδο streaking και στην συνέχεια επωάζονται στους 30°C.

Μετά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή cryovials για τη μακροχρόνια αποθήκευση των στοκ καλλιέργειών σε υγρή μορφή στους -80°C. Η διαδικασία περιλάμβανε διαδοχικά στάδια. Αρχικά δημιουργήθηκε και αποστειρώθηκε το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο για κάθε μικροοργανισμό ήταν το ίδιο με εκείνο του αντίστοιχου τρυβλίου, χωρίς όμως την προσθήκη άγαρ. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια κρίκου μεταφέρθηκε μία αποικία από κάθε μικροοργανισμό στην υγρή καλλιέργεια. Οι καλλιέργειες τέθηκαν σε αναδευτήρα (*shaker*) υπό τις κατάλληλες συνθήκες και για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα: για τον *Thermobifida fusca* εφαρμόστηκαν 180 στροφές/λεπτό στους 50°C για 15–17 ώρες, ενώ για τον *Candida blankii* 220 στροφές/λεπτό στους 30°C για 12–13 ώρες. Μετά την ανάπτυξη, σε αποστειρωμένα cryogenic vials προστέθηκαν 1ml υγρής καλλιέργειας και 1ml γλυκερόλης. Το μείγμα αναδεύτηκε έντονα ώστε να ομογενοποιηθεί πλήρως και κατόπιν αποθηκεύτηκε στους -80°C για μακροχρόνια διατήρηση.

2.4 Παρατήρηση και απομόνωση αποικιών μικροοργανισμών που υδρολύουν τα μικροπλαστικά.

Μετά από στενή καθημερινή παρακολούθηση ακολούθησε η απομόνωση με αποστειρωμένα εργαλεία των μικροοργανισμών που μπόρεσαν να υδρολύσουν τα μικροπλαστικά, συγκεκριμένα το PHB, και στη συνέχεια η επανακαλλιέργεια σε νέα τρυβλία Petri που είχαν επίσης ως θρεπτικό υλικό 457+PHB, τα οποία χωρήστηκαν σε τεταρτημόρια και κάθε τεταρτημόριο περιείχε αποικίες αποκλειστικά από έναν μικροοργανισμό. Αυτό αποτέλεσε κρίσιμο σημείο, συγκεκριμένα για τις περαιτέρω αναλύσεις, καθώς με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η πιθανότητα επιμόλυνσης και κατ' επέκταση μειώνεται η πιθανότητα εσφαλμένων αποτελεσμάτων.

2.5 Μέθοδοι και εργαλεία ταυτοποίησης απομονωμένων μικροοργανισμών.

Τελευταίο στάδιο των πειραμάτων αποτελεί η ταυτοποίηση διάφορων χαρακτηριστικών δομής και λειτουργίας των μικροβίων, που υδρολύουν τα μικροπλαστικάε διάφορες μεθόδους και εργαλεία που θα οδηγήσουν στην οριστική αναγνώριση των μικροοργανισμών, ώστε να γνωρίζουμε με ακρίβεια ποιος είναι ο καθένας.

2.6 Έλεγχος χρόνου υδρόλυσης μικροπλαστικών σε τετράγωνα τρυβλία Petri.

Για τον προσδιορισμό του χρόνου που χρειάζονται να υδρολύσουν το PHB τα απομονωμένα στελέχη μικροβίων, το τετράγωνο τρυβλίο Petri χωρίστηκε με χάρακα σε μικρότερα τετράγωνα, με πλευρές μήκους 2cm, όπου σε κάθε τετράγωνο προστέθηκε με αποστειρωμένη τσιμπίδα ένα φίλτρο μικρού μεγέθους και κυκλικού σχήματος. Ως medium του τρυβλίου αυτού χρησιμοποιήθηκε το medium 457+PHB + άγαρ και κατασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο όπως τα υπόλοιπα παραπάνω. Ωστόσο οι στρώσεις σε αυτή τη περίπτωση έπρεπε να είναι πιο λεπτές καθώς σε αυτή τη περίπτωση δεν ήταν προτεραιότητα η μακροχρόνια διαβίωση των μικροοργανισμών, αλλά η παρακολούθηση της λειτουργίας τους. Έπειτα παράχθηκαν, από αποικίες των τρυβλίων, υγρές καλλιέργειες οι οποίες είχαν όλες ως medium το 457 χωρίς PHB και άγαρ. Μετά από ανάδευση σε shaker στους 30°C και στις 180 στροφές για 15-16 ώρες, κάθε φίλτρο δέχτηκε μερικές σταγόνες από διαφορετική υγρή καλλιέργεια, μοναδική για το καθένα. Στην συνέχεια ακολούθησε επώαση του τρυβλίου στους 30 °C και παρακολούθηση χρόνου υδρόλυσης του μικροπλαστικού.

2.7 Χρώση κατά-Gram των βακτηρίων.

Η χρώση κατά- Gram είναι μια βασική τεχνική μικροσκοπίας που χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει τα βακτήρια σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Gram-θετικά και Gram-αρνητικά, ανάλογα με τη δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος (Moyes et al., 2009). Αρχικά, παρασκευάζεται το επίχρισμα, το οποίο προέρχεται από μερικές σταγόνες υγρής καλλιέργειας σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα και στη συνέχεια θερμαίνεται ελαφρά πάνω από φλόγα ώστε να στερεωθεί. Στο δεύτερο στάδιο εφαρμόζεται η πρωτογενής χρωστική, δηλαδή το κρυσταλλικό βιολετί (Crystal Violet), που καλύπτει το δείγμα για περίπου ένα λεπτό. Μετά από ξέπλυμα με νερό, η χρωστική έχει διεισδύσει σε όλα τα βακτήρια, σχηματίζοντας σύμπλοκα με το κυτταρόπλασμα. Ακολουθεί η χρήση ιωδιούχου διαλύματος ως στερεωτικού

(mordant), το οποίο επίσης παραμένει στο δείγμα για περίπου ένα λεπτό και στη συνέχεια απομακρύνεται με νερό. Το ιώδιο σχηματίζει αδιάλυτο σύμπλοκο με το κρυσταλλικό βιολετί (CV-I complex), το οποίο παγιδεύεται στο παχύ πεπτιδογλυκανικό τοίχωμα των Gram-θετικών βακτηρίων. Το τέταρτο στάδιο είναι ο αποχρωματισμός με αλκοόλη ή ακετόνη για περίπου 10–30 δευτερόλεπτα, που ακολουθείται από άμεσο ξέπλυμα με νερό. Πρόκειται για το κρίσιμότερο βήμα της διαδικασίας, καθώς στα Gram-αρνητικά βακτήρια η εξωτερική μεμβράνη διαλύεται και το λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης δεν συγκρατεί το CV-I σύμπλοκο, με αποτέλεσμα να αποχρωματίζονται, ενώ τα Gram-θετικά διατηρούν τη μωβ χρώση. Τέλος, εφαρμόζεται η αντίχρωση με σαφρανίνη (Safranin) για περίπου ένα λεπτό. Μετά το τελικό ξέπλυμα και το στέγνωμα, τα Gram-αρνητικά βακτήρια εμφανίζονται ροζ/κόκκινα, ενώ τα Gram-θετικά παραμένουν μωβ λόγω της διατήρησης του CV-I συμπλόκου.

Συνοπτικά:

Τύπος	Τοίχωμα	Αντίδραση στη χρώση
Gram-θετικά	Παχύ πεπτιδογλυκάνη	Συγκρατεί το CV-I
Gram-αρνητικά	Λεπτό πεπτιδογλυκάνη + εξωτερική μεμβράνη	Χάνει το CV-I, βάφεται με σαφρανίνη

2.8 Απομόνωση DNA των μικροοργανισμών που υδρολύουν μικροπλαστικά.

Στην συνέχεια ακολούθησε απομόνωση του DNA (DNA extraction) των βακτηρίων αυτών που θα χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια για την ταυτοποίηση τους. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει δύο στάδια. Για την απομόνωση του DNA των βακτηριακών καλλιέργειών, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο δύο βασικών σταδίων: η συλλογή των κυττάρων και η εκχύλιση του DNA. Αρχικά, μεταφέρθηκαν 5–7mL καλλιέργειας σε φυγοκεντρικούς σωλήνες και υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση στις 4.000 στροφές ανά λεπτό για 12 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 5 mL διαλύματος 150 mM NaCl, διαδικασία που επαναλήφθηκε πολλές φορές για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων υπολειμμάτων. Μετά από νέα φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1mL 150 mM NaCl και φυγοκεντρήθηκε σε erpendorf σωλήνες για 5 λεπτά στις 13.000 στροφές ανά λεπτό στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά και, έπειτα από γρήγορη περιδίνηση, αφαιρέθηκαν τα υπολείμματα υγρού.

Για την εκχύλιση του DNA, προστέθηκαν αρχικά 250μL Trizol στο ίζημα και η καλλιέργεια ομογενοποιήθηκε με αποστειρωμένα sticks. Στη συνέχεια, προστέθηκαν επιπλέον 250μL Trizol και πραγματοποιήθηκε πλύση της άκρης του stick. Το μείγμα ανακινήθηκε έντονα με vortex για περίπου 2 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στις 12.000 στροφές ανά λεπτό για 12 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, πριν προστεθούν 100μL χλωροφορμίου και ακολουθήσει έντονη ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα. Μετά από επώαση 2–3 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου και νέα φυγοκέντρωση για 15 λεπτά στις 12.000 στροφές ανά λεπτό στους 4°C, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο erpendorf και απομακρύνθηκαν τα υπολείμματα Trizol. Η διαδικασία επαναλήφθηκε με δεύτερη φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε ξανά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 250μL ισοπροπανόλης, το δείγμα ανακινήθηκε έντονα για 15 δευτερόλεπτα και επώαστηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στις 12.000 στροφές ανά λεπτό, απομάκρυνση του υπερκειμένου και πλύση του ιζήματος με 100μL διαλύματος 75% αιθανόλης. Μετά από σύντομη ανάδευση με vortex, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 12.000 στροφές ανά λεπτό στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, ενώ τα υπολείμματα αφαιρέθηκαν με γρήγορη περιδίνηση. Τέλος, το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει υπό κενό για 30–45 λεπτά, έως ότου εξατμιστεί πλήρως το διάλυμα, και διαλύθηκε σε 40–50μL αποστειρωμένου ddH₂O για την τελική απομόνωση του DNA. Τέλος για τον έλεγχο της καθαρότητας και της ποιότητας του δείγματος έγινε χρήση του μηχανήματος NanoDrop, ένα εξειδικευμένο εργαστηριακό όργανο που χρησιμοποιείται για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών σε πολύ μικρούς όγκους δειγμάτων, συνήθως 1–2 μL (Desjardins & Conklin, 2010).

2.9 Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μια *in vitro* τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων που επιτρέπει την εκθετική αντιγραφή συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA μέσω διαδοχικών κύκλων θερμοκρασιακών μεταβολών. Η μέθοδος βασίζεται στη δράση μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης και σε ειδικά σχεδιασμένους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (primers) που καθορίζουν την περιοχή στόχου (Delidow et al., n.d.).

Η PCR περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια ανά κύκλο:

1. Αποδιάταξη (Denaturation): Θερμική διάσπαση της δίκλωνης αλυσίδας DNA (~94–95°C).
2. Υβριδισμός εκκινητών (Annealing): Πρόσδεση των primers στις συμπληρωματικές αλληλουχίες (~50–65°C).
3. Επιμήκυνση (Extension): Σύνθεση νέας αλυσίδας DNA από την πολυμεράση (~72°C).

Μετά από 25–40 κύκλους, η αρχική ποσότητα DNA μπορεί να ενισχυθεί εκατομμύρια φορές, επιτρέποντας την ανίχνευση και ανάλυση ακόμα και εξαιρετικά μικρών ποσοτήτων γενετικού υλικού (Delidow et al., n.d.).

Στόχος του πειράματος αυτού ήταν η ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου, το οποίο είναι ένα εξαιρετικά συντηρημένο τμήμα του βακτηριακού DNA που κωδικοποιεί το 16S ριβοσωμικό RNA, ένα βασικό συστατικό της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος στους προκαρυώτες. Συνήθως το γονίδιο αυτό έχει μήκος περίπου 1500 βάσεις. Είναι ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία στη ταυτοποίηση και φυλογενετική ανάλυση βακτηρίων (Treimo et al., 2006).

Για την συγκεκριμένη PCR χρησιμοποιήθηκε η DreamTaq πολυμεράση και για την ρύθμιση παράλληλων αντιδράσεων και για την ελαχιστοποίηση πιθανότητας σφαλμάτων στην πιπέτα, γίνεται παρασκευή ενός κυρίου μείγματος PCR (Master Mix) αναμειγνύοντας νερό, ρυθμιστικό διάλυμα, dNTP, εκκινητές και DreamTaq DNA πολυμεράση (η οποία προστίθεται τελευταία στιγμή). Παρασκευάζεται αρκετό κύριο μείγμα για τον αριθμό των αντιδράσεων συν μία επιπλέον. Τέλος γίνεται διαχωρισμός του κυρίου μείγματος σε μεμονωμένα PCR tubes και στη συνέχεια προστίθεται το πρότυπο DNA. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο προήλθε από την εταιρεία που την προμήθευσε την ThermoFisher Scientific (Thermo Scientific DreamTaq DNA Polymerase, n.d.).

Για την παρασκευή του Master Mix τοποθετείται ένα σωληνάριο eppendorf σε πάγο και προστίθενται τα ακόλουθα συστατικά, όπου πρέπει να γίνει υπολογισμός των ποσοτήτων έτσι ώστε να προκύψει για κάθε αντίδραση σε τελική ποσότητα 50 μ L ανά tube: Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50 μ L, χρησιμοποιώντας 5 μ L 10X DreamTaq Buffer και 5 μ L dNTP Mix (2 mM από κάθε νουκλεοτίδιο). Προστέθηκαν οι εκκινητές σε τελική συγκέντρωση 0.1–1.0 μ M για τον forward primer και 0.1–1.0 μ M για τον reverse primer. Το δείγμα DNA κυμάνθηκε από 10 pg έως 1 μ g, ενώ το υπόλοιπο διάλυμα συμπληρώθηκε με nuclease-free water ώστε να επιτευχθεί ο τελικός όγκος των 50 μ L.

Στην συνέχεια ακολουθεί ανάδευση κάθε tube σε vortex και spin down. Τέλος ρυθμίζονται οι συνθήκες της PCR, όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία και ο αριθμός των κύκλων. Κατάλληλες συνθήκες για την βέλτιστη δράση της Dreamtaq πολυμεράσης αποτελούν:

Βήμα	Θερμοκρασία, °C	Χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική μετουσίωση	95	1-3 min	1
Μετουσίωση	95	30s	25-40
Υβριδισμός	Tm-5	30s	
Επιμήκυνση	72	1 min	
Τελική επιμήκυνση	72	5-15 min	1

Το συνιστώμενο βήμα επιμήκυνσης είναι 1 λεπτό για προϊόντα PCR έως 2kb. Για προϊόντα μεγαλύτερης διάρκειας, ο χρόνος παράτασης θα πρέπει να παραταθεί κατά 1 λεπτό/kb.

2.10 Καθαρισμός δειγμάτων PCR

Για καθαρισμό dsDNA μικρότερο από 2kb με το Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB #T1030), το δείγμα αναμιγνύεται με DNA Cleanup Binding Buffer σε αναλογία 5:1 (π.χ. 500μL buffer για 100μL δείγμα), αναδεύεται με πιπέτα και τοποθετείται στη στήλη. Στη συνέχεια η στήλη αυτή φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 16.000 στροφές. Το flow-through που προκύπτει απορρίπτεται και η στήλη πλένεται με 200μL DNA Wash Buffer, επαναλαμβάνοντας το βήμα αυτό αν χρειάζεται. Στη συνέχεια η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο και το DNA εκλύεται με τουλάχιστον 6 μL DNA Elution Buffer ή νερό χωρίς νουκλεάσες, αφήνεται για 1 λεπτό πάνω στη στήλη και φυγοκεντρείται ξανά για 1 λεπτό ώστε να συλλεχθεί το καθαρό DNA σε τελικό όγκο 6–20 μL.

2.11 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Αφού ολοκληρωθεί η PCR ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπου είναι μια βασική τεχνική στη μοριακή βιολογία που χρησιμοποιείται για την ανάλυση του μεγέθους, της καθαρότητας και της ποσότητας DNA. Το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο λόγω των φωσφορικών ομάδων. Όταν εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο, τα μόρια DNA μετακινούνται προς τον θετικό πόλο μέσα στην πηκτή αγαρόζης, η οποία λειτουργεί ως μοριακό κόσκινο (Boncinelli et al., 1983). Η διαδικασία ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια. Αρχικά, παρασκευάζεται η πηκτή αγαρόζης, με διάλυση αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE (σε αυτή την περίπτωση 1%), η οποία θερμαίνεται μέχρι να λιώσει και στη συνέχεια χύνεται σε καλούπι με τοποθετημένη χτένα ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις φόρτωσης. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει την ικανότητα διαχωρισμού, καθώς χαμηλότερες συγκεντρώσεις (π.χ. 0,8%) ευνοούν τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA (>1 kb), ενώ υψηλότερες (π.χ. 2%) τον διαχωρισμό μικρότερων μορίων DNA (<500bp). Στο επόμενο στάδιο, τα δείγματα DNA αναμιγνύονται με φορτωτικό διάλυμα (loading dye) και τοποθετούνται στις θέσεις της πηκτής, μαζί με δείκτη μεγέθους DNA (ladder) για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση, κατά την οποία εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση 80–120V για περίπου 20 λεπτά, με αποτέλεσμα τα μικρότερα μόρια DNA να μετακινούνται ταχύτερα και σε μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με τα μεγαλύτερα. Τέλος, η πηκτή παρατηρείται κάτω από υπεριώδες ή μπλε φως για την απεικόνιση των τμημάτων DNA, ενώ για τον προσδιορισμό του μήκους βάσεων των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή Gel Analyzer.

2.12 Αλληλούχηση του DNA.

Στην συνέχεια τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχισή με μέθοδο Sanger στην εταιρία Cemla. Η μέθοδος Sanger (chain-termination), που αναπτύχθηκε το 1977 από τον Frederick Sanger, βασίζεται στη χρήση ειδικών νουκλεοτιδίων (ddNTPs) που στερούνται 3'-OH και σταματούν τη σύνθεση DNA όταν ενσωματωθούν από την πολυμεράση. Έτσι προκύπτουν θραύσματα DNA διαφορετικού μήκους που διαχωρίζονται με καπυλλιακή ηλεκτροφόρηση και ανιχνεύονται μέσω φθορίζοντος σήματος, δίνοντας το χαρακτηριστικό χρωματογράφημα. Η μέθοδος παρέχει υψηλή ακρίβεια και μήκος ανάγνωσης έως ~800–1000 bp, γι' αυτό θεωρείται το «χρυσό πρότυπο» για την επιβεβαίωση μεταλλάξεων, την ανάλυση SNPs, την ταυτοποίηση κλωνοποιημένων πλασμιδίων και τη μελέτη γονιδίων. Παρά τα πλεονεκτήματά της, είναι πιο αργή και δαπανηρή για μεγάλης κλίμακας ανάλυση σε σχέση με τις τεχνολογίες Next-Generation Sequencing (NGS) και έχει μειωμένη ευαισθησία στον εντοπισμό παραλλαγών χαμηλής συχνότητας. Ωστόσο, παραμένει ευρέως χρησιμοποιούμενη σε ερευνητικά και διαγνωστικά εργαστήρια λόγω της αξιοπιστίας της (Sanger F. et al., 1977).

2.13 Υδρόλυση pellets μικροπλαστικών.

Για την παρατήρηση και τον προσδιορισμό καθαρά την ενζυμικής δράσης των μικροοργανισμών εξετάστηκε η λειτουργικότητα των πρωτεϊνών τους, τόσο αυτών που εκκρίνουν όσο και αυτών που υπάρχουν στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης τους. Η διαδικασία απαιτεί την παρασκευή υγρών καλλιιεργειών των μικροοργανισμών, χρησιμοποιώντας το ίδιο θρεπτικό μέσο και τις ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν προηγουμένως. Η διαδικασία περιείχε τα εξής βήματα:

- A) Προετοιμασία buffer Tris/HCl 100mM + 1mM CaCl με pH=8. Ωστόσο επειδή στα επόμενα βήματα θα προστεθεί και θρεπτικό υλικό θα υποστεί πολύ μεγαλύτερη αραιώση απ' ότι χρειάζεται οπότε απαιτείται διπλασιασμός της συγκέντρωσης των συστατικών του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), προκειμένου να επιτευχθούν οι επιθυμητές συνθήκες αντίδρασης. Επομένως θα γίνει προσθήκη για το x2 διάλυμα: Tris 24,23g/L, HCl 1mM ποσότητα όση χρειάζεται για να σταθεροποιηθεί το pH στο 8, CaCl 2H₂O 0,29g/L και dH₂O περίπου 800μL (αναλόγως την ποσότητα HCl που θα χρειαστεί να προστεθεί).
- B) Προετοιμασία θρεπτικού medium 1. Περιλαμβάνει: Peptone 5g/L και Meat extract 3g/L. Στην συνέχεια αποστέρωση όλων των υλικών και των pellets μικροπλαστικών. Και τέλος σε σκευάσματα falcon γίνεται προσθήκη 10 ml υγρής καλλιέργειας και φυγοκεντρείται στις 4000 στροφές για 10 λεπτά.

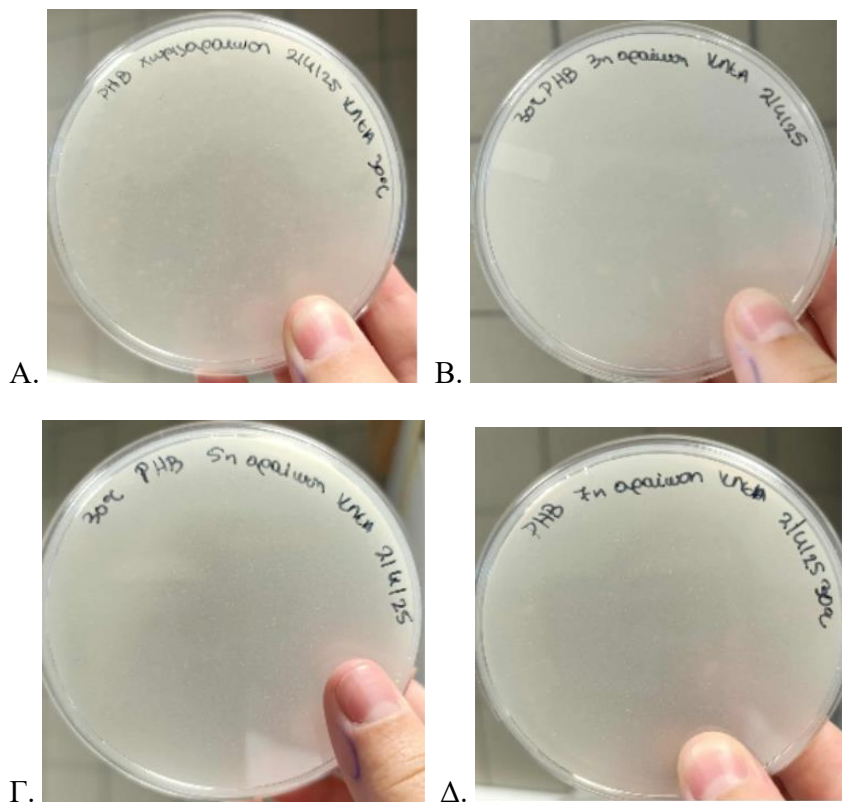
Για την μελέτη των ενζύμων που βρίσκονται εξωκυτταρικά: σε νέο σωληνάριο τύπου Falcon, στο οποίο έχουν μεταφερθεί 5mL υπερκείμενου, προστίθενται 5mL ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), καθώς και ποσότητα PHB pellet ίση με το 1% της συνολικής μάζας, δηλαδή περίπου 0,1g. Για την μελέτη των ενδοκυτταρικών ενζύμων ακολουθείται μια ελάχιστη τροποποιημένη διαδικασία. Φυγοκεντρώνται 2 φορές οι υγρές καλλιέργειες. Προστίθενται 10mL υγρής καλλιέργειας σε falcon στις 4000 στροφές για 10 λεπτά. Στην συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο. Προσθέτω 10 ml buffer στο ίδιο falcon και το τοποθετώ σε μηχανήμα υπερήχου για 10 λεπτά. Γίνεται η δεύτερη φυγοκέντρωση από την οποία γίνεται προσθήκη 5mL από το υπερκείμενο σε νέο falcon και 5mL του buffer Tris/HCl. Επίσης προστίθενται και περίπου 0,1g PHB pellets. Τέλος τα πλέον έτοιμα διαλύματα στα falcon αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 ημέρες.

3. Αποτελέσματα.

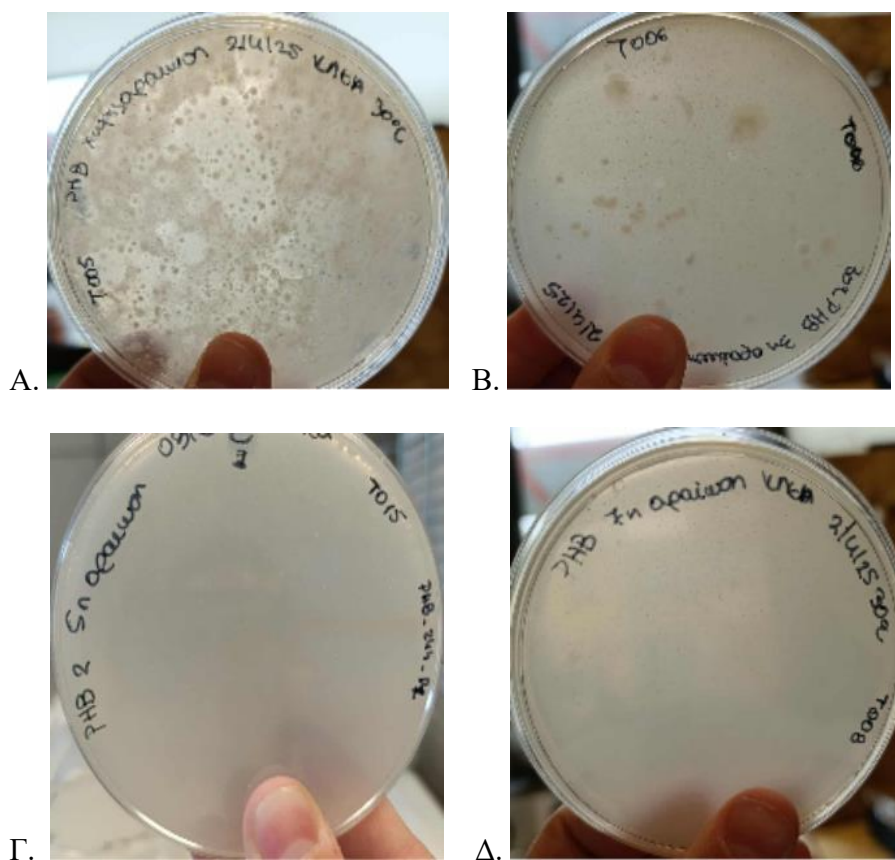
Σε όλες τις πειραματικές συνθήκες, τα δείγματα καλλιιεργήθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν όλα τα μικροπλαστικά που είχαν επιλεγεί (PHB,PHA,PLA,PBAT,PBSA και PET), επιτρέποντας την άμεση αλληλεπίδραση μικροβίων και πλαστικών. Παρόλο που τα βακτήρια ήρθαν σε επαφή με όλα τα δοκιμαστικά υλικά, μόνο το PHB αποτέλεσε υπόστρωμα που τα μικροοργανισμοί μπόρεσαν να υδρολύσουν και να μεταβολίσουν. Αυτή η διαφοροποιημένη συμπεριφορά υπογραμμίζει την ειδικότητα των βακτηριακών ενζύμων απέναντι στο PHB και θέτει τη βάση για την ανάλυση των μετρήσεων και παρατηρήσεων που ακολουθούν.

3.1 Αποτελέσματα καταγραφής τρυβλίων.

Μετά καθημερινή παρακολούθηση των τρυβλίων Petri με medium 457 + PHB, στα οποία επιστρώθηκαν καλλιέργειες μικροοργανισμών σε διάφορες αραιώσεις, παρουσιάστηκαν τα εξής αποτελέσματα (Εικ. 9-10): Η ανάπτυξη ποικίλων αποικιών μικροοργανισμών ξεκίνησε 24 ώρες μετά την καλλιέργεια κυρίως στα τρυβλία με καλλιέργεια μηδεν αραιώσης, 3ης και 5ης αραιώσης (Εικ. 9). Τα τρυβλία επιστρωμένα με καλλιέργεια 7ης αραιώσης δεν παρουσίασαν καμία ανάπτυξη αποικίας. Έπειτα η υδρόλυση του PHB ξεκίνησε από συγκεκριμένες αποικίες περίπου 48 ώρες μετά την ανάπτυξη των αποικιών, άρα περίπου 72 ώρες μετά την επίστρωση των τρυβλίων (Είκ. 10), ο οποίες στην συνέχεια απομονώθηκαν και ανακαλλιιεργήθηκαν σε νέα τρυβλία με ίδιο medium για πιο αποτελεσματική παρακολούθηση και για αποφυγή επιμόλυνσης.

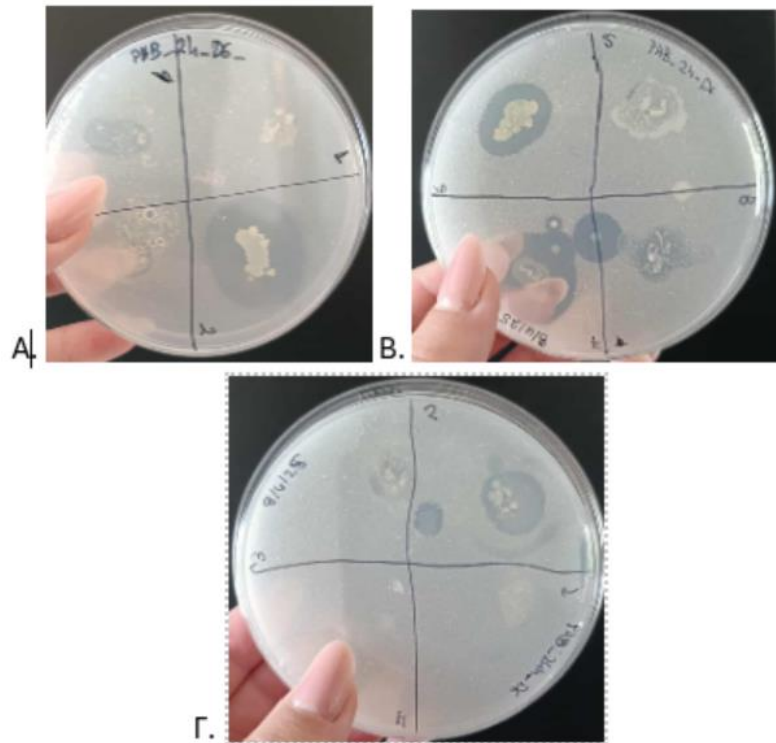


Εικόνα 9: Εξέλιξη τρυβλίων 24 ώρες μετά την επίστρωσή τους.



Εικόνα 10: Εξέλιξη τρυβλίων 72 ώρες μετά την καλλιέργειά τους.

Οι αποικίες που απομονώθηκαν και εν τέλει συνεχίστηκε η ταυτοποίησή τους ήταν 6. Αν και ανακαλλιεργήθηκαν παραπάνω αποικίες, πολλές από αυτές παρουσίασαν πολλές ομοιότητες στην μορφολογία, στο χρώμα τους και στον χρόνο ανάπτυξης τους, επομένως δεν θεωρήθηκε απαραίτητο να αναλυθούν περαιτέρω όλοι. Οι παρατηρήσεις των τρυβλίων με τις απομονωμένες αποικίες έδειξε πως οι PHB_2H_D6 Αποικία 7 (F) και PHB_2H_D6 Αποικία 2 (B) ήταν γρηγορότερες τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην υδρόλυση του μικροπλαστικού, χρειάστηκαν περίπου 72 ώρες να ολοκληρώσουν και τις δύο διαδικασίες. Ακολουθώντας με διαφορά ενός 24ώρου για την υδρόλυση του PHB οι PHB_2H_D6 Αποικία 6 (E), PHB_2H_D6 Αποικία 4 (D). Ενώ οι πιο αργές αποδείχθηκαν οι PHB_2H_D6 Αποικία 1 (A) και PHB_24H_D6 Αποικία 2 (C) που χρειάστηκαν περίπου 5 μέρες να αναπτυχθούν και να αρχίσουν την υδρόλυση του PHB (Εικ.11).



Εικόνα 11: Κατάσταση τρυβλίων με τους απομονωμένους μικροοργανισμούς 72 ώρες μετά την ανακαλλιέργειά τους.

Συμπερασματικά λοιπόν συνεχίστηκε η διαδικασία ταυτοποίησης των αποικιών:

- PHB_2H_D6 Αποικία A
- PHB_2H_D6 Αποικία B
- PHB_24H_D6 Αποικία C
- PHB_2H_D6 Αποικία D
- PHB_2H_D6 Αποικία E
- PHB_2H_D6 Αποικία F

Καθώς εμφανίζουν σαφή διαφοροποίηση τόσο στην μορφολογία των αποικιών όσο στην ταχύτητα ανάπτυξης και στην ικανότητα υδρόλυσης του PHB, με κάποιες αποικίες να αποτελούν πολύ πιο υποσχόμενους υποψήφιους για μελλοντική βιοαποκατάσταση σε σχέση με άλλες. Πιο συγκεκριμένα ξεκινώντας με την PHB_2H_D6 Αποικία A, οι αποικίες είχαν λευκό χρώμα, κυκλικό σχήμα και ήταν σχετικά μέτριου μεγέθους. Αυτό που το διαφοροποίησε από τα υπόλοιπα ήταν ο χρόνος ανάπτυξης του σε όλα τα θρεπτικά που καλλιεργήθηκε αλλά και το γεγονός ότι όταν αυξανόταν το μέγεθος της αποικίας δημιουργούσε ένα είδος φιλμ πάνω από τις αποικίες. Επίσης ο χρόνος υδρόλυσης του PHB ήταν πολύ πιο αργός από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Συνεχίζοντας με την PHB_2H_D6 Αποικία B παρουσίαζε αρκετές ομοιότητες με την αποικία A ως προς το σχήμα και το μέγεθος, ωστόσο το χρώμα της αποικίας έτεινε προς το κίτρινο (δεν ήταν

καθαρά λευκό). Επίσης δεν παρήγαγε το χαρακτηριστικό αυτό φιλμ και ο χρόνος ανάπτυξης και υδρόλυσης του μικροπλαστικού ήταν πολύ πιο γρήγορος. Έπειτα η PHB_24H_D6 Αποικία C επίσης εμφάνιζε πολλές ομοιότητες με τους προηγούμενους δύο μικροοργανισμούς αλλά σε αντίθεση με την αποικία A δεν παρήγαγε το φιλμ και σε σύγκριση με την PHB_2H_D6 Αποικία B ο χρόνος ανάπτυξης και δράσης ήταν πολύ πιο αργός. Η PHB_2H_D6 Αποικία D επιλέχθηκε καθώς οι αποικίες της είχαν το λευκό χρώμα και το κυκλικό σχήμα της αποικίας A αλλά το μέγεθος τους ήταν πολύ μικρότερο από όλων των παραπάνω. Επίσης είχε χαμηλότερη ταχύτητα ανάπτυξης και υδρόλυσης του μικροπλαστικού με την PHB_2H_D6 Αποικία B αλλά αρκετά μεγαλύτερη από τις υπόλοιπες (PHB_2H_D6 Αποικία A και PHB_24H_D6 Αποικία C). Συνεχίζοντας με τις PHB_2H_D6 Αποικία E και PHB_2H_D6 Αποικία F, και οι δύο αποικίες παρουσίαζαν ομοιότητες ως προς την μορφολογία των αποικιών. Είχαν κίτρινο χρώμα, σχήμα κυκλικό και πολύ μικρό μέγεθος. Η μόνη διαφορά τους ήταν ο χρόνος ανάπτυξης και ενζυμικής δράσης τους, καθώς η PHB_2H_D6 Αποικία F αποτέλεσε την πιο γρήγορη σε χρόνο και δράση αποικία απ' όλες, ενώ η αποικία E (αν και αρκετά γρήγορη) ήταν σαφώς βραδύτερη.

3.2 Αποτελέσματα χρώσης κατά-Gram.

Όσον αφορά τις 6 αποικίες που απομονώθηκαν τα αποτελέσματα από την διαδικασία χρώσης κατά-Gram ήταν τα εξής:

PHB_2H_D6 Αποικία A →	Gram + (μωβ χρώμα αποικιών)
PHB_2H_D6 Αποικία B →	Gram - (κόκκινο χρώμα αποικιών)
PHB_24H_D6 Αποικία C →	Gram - (κόκκινο χρώμα αποικιών)
PHB_2H_D6 Αποικία D →	Gram - (κόκκινο χρώμα αποικιών)
PHB_2H_D6 Αποικία E →	Gram - (κόκκινο χρώμα αποικιών)
PHB_2H_D6 Αποικία F →	Gram + (μωβ χρώμα αποικιών)

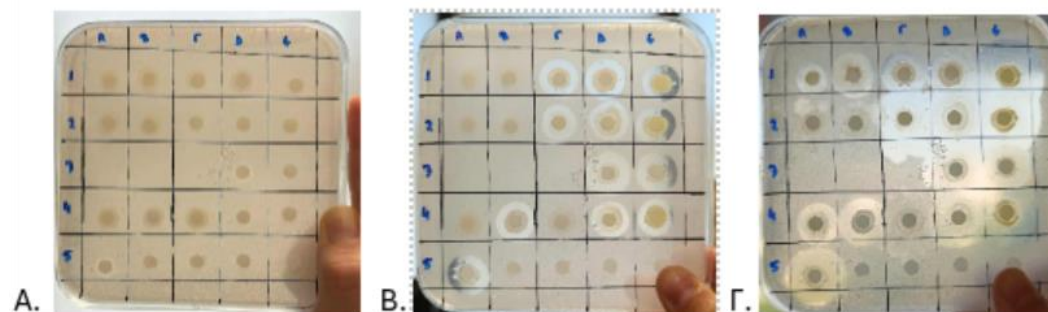
Από τη χρώση κατά-Gram που πραγματοποιήθηκε στις απομονωμένες αποικίες φάνηκε ότι δεν ανήκουν όλες στην ίδια κατηγορία. Πιο συγκεκριμένα, δύο αποικίες (η A και η F) ήταν Gram θετικές, ενώ οι υπόλοιπες τέσσερις ήταν Gram αρνητικές. Αυτό δείχνει ότι η ικανότητα διάσπασης του PHB δεν περιορίζεται σε έναν συγκεκριμένο τύπο βακτηρίων, αλλά μπορεί να συναντάται τόσο σε Gram θετικούς όσο και σε Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς. Η διαφοροποίηση αυτή είναι σημαντική, γιατί οι δύο αυτές ομάδες έχουν διαφορετική δομή στο κυτταρικό τους τοίχωμα, κάτι που επηρεάζει και τον τρόπο με τον οποίο δρουν. Οι Gram θετικοί, λόγω του παχύτερου στρώματος πεπτιδογλυκάνης, θεωρούνται γενικά πιο ανθεκτικοί σε περιβαλλοντικές συνθήκες και συχνά εκκρίνουν ένζυμα που μπορούν να διασπούν πολυμερή όπως το PHB. Από την άλλη πλευρά, οι Gram αρνητικοί έχουν εξωτερική μεμβράνη που τους δίνει μεγαλύτερη ευελιξία και πολλές φορές μεγαλύτερη μεταβολική ποικιλία, κάτι που τους καθιστά ικανούς να αποδομούν πολύπλοκες ενώσεις. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι οι πιο δραστικές αποικίες που βρέθηκαν στο πείραμα (π.χ. η αποικία F) ανήκουν στους Gram θετικούς, ενώ ταυτόχρονα αρκετές Gram αρνητικές αποικίες παρουσίασαν επίσης σημαντική ικανότητα διάσπασης. Αυτό ενισχύει την ιδέα ότι για την αποδόμηση των μικροπλαστικών μπορεί να παίζουν ρόλο διαφορετικοί μηχανισμοί ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Με λίγα λόγια, φαίνεται πως τόσο οι Gram θετικοί όσο και οι Gram αρνητικοί μπορούν να συμβάλλουν

στη διαδικασία, πιθανόν με διαφορετικές στρατηγικές, κάτι που δίνει ακόμη μεγαλύτερο ενδιαφέρον στην περαιτέρω μελέτη τους.

3.3 Αποτελέσματα χρόνου υδρόλυσης σκόνης μικροπλαστικού.

Αφού ετοιμάστηκε πλήρως το τετράγωνο τρυβλίο Petri και εμβολιάστηκαν τα φίλτρα με τις υγρές καλλιέργειες (ξεχωριστή καλλιέργεια για κάθε φίλτρο), ξεκίνησε η καθημερινή παρακολούθηση/καταγραφή του και αποδείχθηκε ότι οι μικροοργανισμοί υδρολύουν τα μικροπλαστικά σε διαφορετικούς χρόνους (Εικ.13).

Πιο συγκεκριμένα: PHB_2H_D6 Αποικία F: αποδομεί το PHB σε 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Τα PHB_2H_D6 Αποικία B, PHB_2H_D6 Αποικία D και PHB_2H_D6 Αποικία E υδρολύουν τα μικροπλαστικά 48 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Οι υπόλοιπες αποικίες χρειάστηκαν παραπάνω από 72 ώρες για την ίδια διαδικασία.



Εικόνα 13: Α. 24 ώρες μετά τον εμβολιασμό του τρυβλίου., Β. 48 ώρες μετά τον εμβολιασμό του τρυβλίου, Γ. 72 ώρες μετά τον εμβολιασμό του τρυβλίου.

Η διαφοροποίηση αυτή υποδηλώνει ότι, παρόλο που όλες οι αποικίες διαθέτουν την ικανότητα διάσπασης του PHB, κάποιες εμφανίζουν σαφώς πιο αποδοτικούς μηχανισμούς, πιθανότατα λόγω παραγωγής μεγαλύτερης ποσότητας ή πιο δραστικών ενζύμων. Συνεπώς, η σύγκριση αυτή αναδεικνύει ότι δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί εξίσου ικανοί στη βιοδιάσπαση μικροπλαστικών, και ότι η επιλογή των ταχύτερων και πιο αποδοτικών στελεχών μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία για μελλοντικές εφαρμογές.

3.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης DNA.

Όσον αφορά την αλληλούχιση, τα αποτελέσματα του παρακάτω πίνακα είναι τυπικά αποτελέσματα BLASTn (δηλαδή αναζήτησης ομοιότητας νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στη βάση δεδομένων), όπου το P.I. (Percentage Identity) δείχνει το ποσοστό ταύτισης της αλληλουχίας σου με γνωστές αλληλουχίες στη βάση δεδομένων. Όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό, τόσο πιο στενή είναι η γενετική συγγένεια.

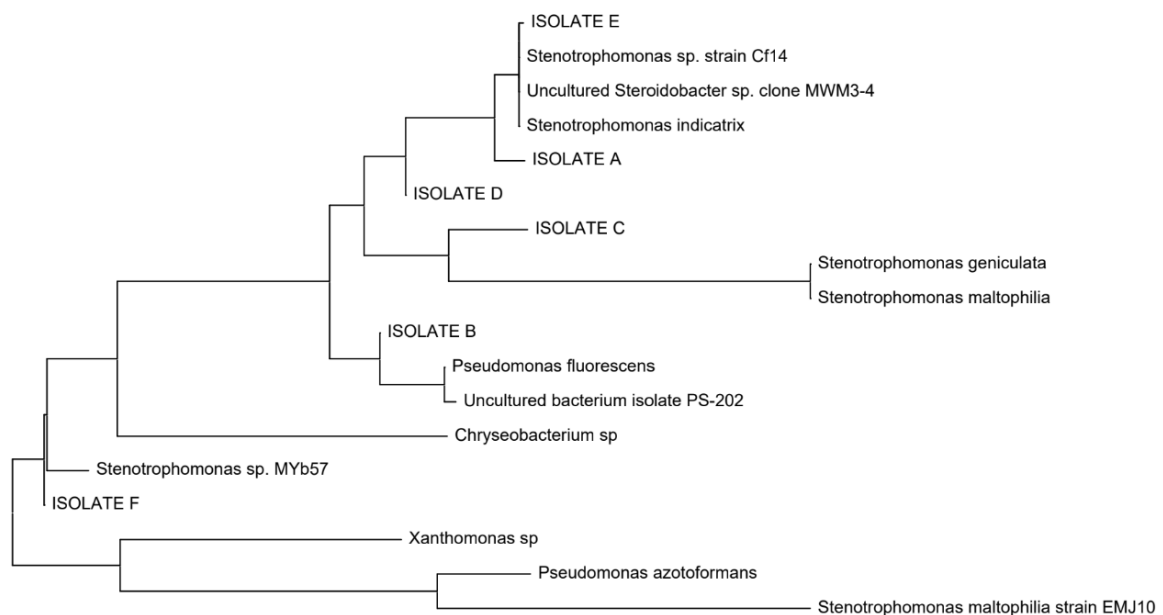
ΑΠΟΙΚΙΕΣ	P.I (Percentage identity)	Κοντινοί μικροοργανισμοί
----------	---------------------------------	--------------------------

Αποικία Α	88.09%	<i>Stenotrophomonas geniculata</i>
	88.08%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Αποικία Β	81.69%	<i>Stenotrophomonas sp. MYb57</i>
	81.11%	<i>Stenotrophomonas maltophilia strain JC178</i>
Αποικία C	78.93%	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
	75%	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	91%	<i>Chryseobacterium sp.</i>
Αποικία D	81%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	79%	<i>Xanthomonas sp.</i>
	77%	<i>Pseudomonas sp.</i>
Αποικία E	97%	<i>Stenotrophomonas indicatrix</i>
	96%	<i>Uncultured Steroidobacter sp. clone MWM3-4</i>
	96%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Αποικία F	88%	<i>Stenotrophomonas geniculata</i>
	87%	<i>Uncultured Stenotrophomonas sp. Clone</i>
	87%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

Οι αποικίες που εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ταύτισης (π.χ. >95%) με γνωστά είδη, όπως η Αποικία E (97% με *Stenotrophomonas indicatrix* και 96% με *S. maltophilia*), πιθανότατα ανήκουν στο ίδιο είδος ή σε πολύ στενά συγγενικό στέλεχος. Αυτό σημαίνει ότι το απομονωμένο στέλεχος μπορεί να θεωρηθεί ότι ταυτοποιήθηκε σε επίπεδο είδους με σχετική βεβαιότητα. Αποικίες με ενδιάμεσα ποσοστά ταύτισης (π.χ. 85–90%), όπως η Αποικία A (88% με *S. geniculata* και *S. maltophilia*) και η Αποικία F (88% με *S. geniculata*, 87% με *S. maltophilia*), δείχνουν συγγένεια με το γένος *Stenotrophomonas*,

αλλά τα ποσοστά δεν είναι αρκετά υψηλά ώστε να αποδοθεί με ασφάλεια ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους. Αυτές οι απομονώσεις μπορεί να ανήκουν σε νέο ή μη πλήρως καταχωρημένο στέλεχος του ίδιου γένους. Επείτα, αποικίες με χαμηλότερα ποσοστά (<85%), όπως η Αποικία Β (81%) και η Αποικία D (81%), εμφανίζουν πιο αδύναμη συγγένεια με είδη του γένους *Stenotrophomonas* και σε ορισμένες περιπτώσεις δείχνουν παράλληλα ομοιότητες με άλλα γένη (π.χ. *Pseudomonas* ή *Xanthomonas*). Αυτό δείχνει ότι πρόκειται για στελέχη γενετικά πιο απομακρυσμένα, τα οποία δεν μπορούμε να ταυτοποιήσουμε με ακρίβεια σε επίπεδο είδους με βάση μόνο το BLASTn, αλλά μπορούμε να τα εντάξουμε στο επίπεδο γένους ή οικογένειας. Τέλος η Αποικία C είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρονσα, γιατί δείχνει χαμηλή ταύτιση με *Pseudomonas azotoformans* (78.9%) και *P. fluorescens* (75%), αλλά επίσης 91% με *Chryseobacterium* sp.. Αυτή η ασάφεια υποδηλώνει ότι πιθανώς το στέλεχος δεν ταιριάζει καθαρά σε κάποιο συγκεκριμένο γένος, ή ίσως αντιπροσωπεύει στέλεχος που δεν είναι καλά καταγεγραμμένο στη βάση δεδομένων.

Στην συνέχεια κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο Maximum Likelihood (Εικόνα 14) που δείχνει τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα στα δείγματα καλλιέργειας και γνωστά βακτηριακά γένη/είδη, κυρίως από την οικογένεια των *Stenotrophomonas*, αλλά και μερικά πιο απομακρυσμένα όπως *Pseudomonas*, *Xanthomonas* και *Chryseobacterium*.

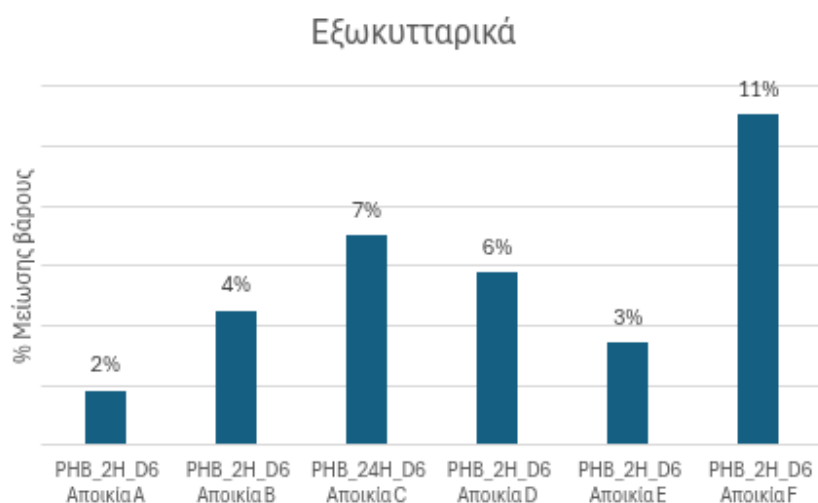


Εικόνα 14. Φυλογενετικό δέντρο Maximum Likelihood. Η ανάλυση των απομονώσεων έγινε με τη μέθοδο BLASTn και η κατασκευή φυλογενετικού δέντρου με Maximum Likelihood.

Η ανάλυση των απομονώσεων με τη μέθοδο BLASTn και η κατασκευή φυλογενετικού δέντρου με Maximum Likelihood δείχνουν με σαφήνεια ότι οι περισσότερες αποικίες σχετίζονται στενά με το γένος *Stenotrophomonas*, ενώ καταγράφονται και μερικές διαφοροποιήσεις προς συγγενικά ή ακόμα και πιο απομακρυσμένα γένη. Συγκεκριμένα, η Αποικία Ε παρουσιάζει πολύ υψηλά ποσοστά ταύτισης (97% με *S. indicatrix* και 96% με *S. maltophilia*), κάτι που επιβεβαιώνει και η θέση της στο δέντρο, υποδεικνύοντας ισχυρή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους. Οι Αποικίες Α και F εμφανίζουν ενδιάμεσα ποσοστά (87–88%) με *S. geniculata* και *S. maltophilia*, τοποθετούμενες επίσης στον κλάδο των *Stenotrophomonas*, γεγονός που φανερώνει συγγένεια σε επίπεδο γένους, αλλά όχι ασφαλή ταυτοποίηση σε συγκεκριμένο είδος. Παρόμοια εικόνα παρουσιάζουν οι Αποικίες Β και Δ, με ποσοστά ταύτισης γύρω στο 81% με διάφορα είδη του γένους *Stenotrophomonas* και μερικές δευτερεύουσες ομοιότητες με *Pseudomonas* ή *Xanthomonas*, κάτι που επιβεβαιώνεται από τη θέση τους στο δέντρο σε πιο περιφερειακούς κλάδους, δείχνοντας ότι πρόκειται για γενετικά πιο απομακρυσμένα στελέχη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η Αποικία C, η οποία δίνει χαμηλά ποσοστά ταύτισης με *Pseudomonas azotoformans* και *P. fluorescens*, αλλά ταυτόχρονα εμφανίζει 91% με *Chryseobacterium* sp., γεγονός που υποδηλώνει ασαφή ταξινομική θέση και πιθανώς την ύπαρξη στελέχους που δεν έχει περιγραφεί πλήρως σε βάσεις δεδομένων. Σε συμφωνία με τα δεδομένα BLASTn, το φυλογενετικό δέντρο καταδεικνύει ότι οι περισσότερες απομονώσεις συγκεντρώνονται γύρω από τον κλάδο των *Stenotrophomonas*, με την Αποικία Β να συνδέεται άμεσα με *S. maltophilia*, η Αποικία Α και Δ να σχετίζονται στενά με *S. indicatrix* και *S. geniculata*, και η Αποικία Δ να διαφοροποιείται προς το γένος *Xanthomonas*. Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι καλλιέργειες προέρχονται κυρίως από στελέχη του γένους *Stenotrophomonas*, με κάποιες ενδείξεις ύπαρξης πιο απομακρυσμένων ή αταυτοποίητων μορφών, στοιχείο που μπορεί να αντικατοπτρίζει είτε φυσική γενετική ποικιλοότητα είτε την παρουσία νέων ή ανεπαρκώς καταγεγραμμένων μικροοργανισμών.

3.5 Αποτελέσματα ενζυμικής δράσης για την υδρόλυση PHB pellets.

Υπολογίστηκε το βάρος των PHB pellets τόσο πριν την προσθήκη τους στο διάλυμα, όσο και μετά από έναν μήνα επώασης τους σε αυτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια δημιουργήθηκαν πίνακες που εμφανίζουν το ποσοστό της μείωσης του βάρους των pellets και για τα εξωκυτταρικά αλλά και για τα ενδοκυτταρικά ένζυμα (Εικόνα 14-15).



Εικόνα 14: Διάγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό μείωσης του βάρους των pellets PHB, 30 ημέρες μετά την επώασή τους σε διάλυμα buffer με τα εξωκυτταρικά ένζυμα των μικροοργανισμών κάθε αποικίας.



Εικόνα 15: Διάγραμμα που παρουσιάζει το ποσοστό μείωσης του βάρους των pellets PHB, 30 ημέρες μετά την επώασή τους σε διάλυμα buffer με τα ενδοκυτταρικά ένζυμα των μικροοργανισμών κάθε αποικίας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως μετά από έναν μήνα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, καταγράφεται μια γενική μείωση στο βάρος των pellets PHB και για τα δύο είδη ενζύμων. Η μείωση αυτή είναι πιο εμφανής στις αποικίες που παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα ένζυμα είναι πιο δραστήρια εκτός του κυττάρου και ενδέχεται να αποδομούν πιο αποτελεσματικά το pellet. Αντίθετα, τα ενδοκυτταρικά ένζυμα παρουσιάζουν μικρότερη πτώση και επομένως φαίνεται να είναι λιγότερο δραστήρια, πιθανώς επειδή προστατεύονται από το ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Συνολικά, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι μικροοργανισμοί παράγουν τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά ένζυμα με ικανότητα υδρόλυσης των μικροπλαστικών, αλλά τα

ενδοκυτταρικά εμφανίζουν λιγότερη δραστικότητα σε συνθήκες μακρόχρονης επώασης σε σχέση με τα εξωκυτταρικά.

4. Συζήτηση

Η βιολογική αποδόμηση μικροπλαστικών αποτελεί ένα ταχέως αναπτυσσόμενο ερευνητικό πεδίο, με αυξανόμενες ενδείξεις ότι βακτήρια και μικροοργανισμοί διαθέτουν την ικανότητα υδρόλυσης διαφορετικών πολυμερών. Αρχίζοντας με το πιο αποτελεσματικό μικροπλαστικό της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας το PHB, πειραματικές μελέτες συνέκριναν εννέα βακτηριακά στελέχη, εκ των οποίων πέντε με αποδεδειγμένη και τέσσερα με προβλεπόμενη δραστικότητα PHB-αποπολυμεράσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στον ρυθμό αποικοδόμησης: η *Paucimonas lemoignei* αποικοδόμησε το 12% του PHB σε δύο ημέρες, ενώ το *Cupriavidus* sp. έφθασε το 90% σε μόλις τέσσερις ημέρες. Το *Marinobacter algicola* εμφάνισε χαμηλότερη δραστικότητα, με μόλις 11% σε δύο εβδομάδες, ενώ το *Ralstonia* sp. επέδειξε υψηλή ειδική δραστικότητα ακόμη και σε όξινο pH. Επιπλέον, διαφορετικές μελέτες επικεντρώθηκαν στην απομόνωση βακτηριακών στελεχών από περιβάλλοντα επιβαρυνμένα με πλαστικά και στην αξιολόγηση της ικανότητάς τους να αποικοδομούν το PHB. Μέσω υγρών καλλιιεργειών, δοκιμών σε έδαφος και αναλύσεων με respirometry, διαπιστώθηκε ότι το *Bacillus* sp. DG90 πέτυχε 60% απώλεια μάζας σε υγρή καλλιέργεια, ενώ το *Streptomyces* sp. DG19 εμφάνισε 51% σε υγρή καλλιέργεια και 83% σε δοκιμές εδάφους. Οι αναλύσεις με SEM, FTIR και DSC κατέγραψαν σημαντικές μορφολογικές και χημικές αλλαγές στα φιλμ PHB, επιβεβαιώνοντας την έντονη βιοαποικοδομητική δράση των στελεχών αυτών (Martínez-Tobón et al., 2018). Επιπλέον, απομονωμένα στελέχη από διαφορετικά περιβάλλοντα, όπως *Bacillus* sp. και *Streptomyces* sp., έχουν επιτύχει αποδόμηση έως 83% σε τρεις εβδομάδες, με σαφείς αλλοιώσεις στη δομή του πολυμερούς όπως φάνηκε με τεχνικές SEM, FTIR και DSC (Herrera et al., 2024). Αντίστοιχα, απομονώθηκε το θαλάσσιο βακτήριο *Microbulbifer* sp. SOL03 και αξιολογήθηκε η ικανότητά του να αποικοδομεί το PHB. Σε συνθήκες καλλιέργειας με το PHB ως μοναδική πηγή άνθρακα, το στέλεχος κατάφερε να αποικοδομήσει περίπου 97% του υποστρώματος μέσα σε 10 ημέρες, αποτελώντας την πρώτη αναφορά για τόσο υψηλό ρυθμό αποδόμησης από θαλάσσιο μικροοργανισμό. Το εύρημα αυτό υπογραμμίζει τον σημαντικό ρόλο των θαλάσσιων βακτηρίων στη βιοδιάσπαση των βιοπολυμερών (Lee et al., 2023). Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές ελέγχου της αποικοδόμησης, όπως μια καινοτόμο προσέγγιση για τον έλεγχο της βιοαποικοδομησιμότητας του PHB μέσω επικάλυψης με κυτταρίνη τριακετάτη (CTA). Τα φιλμ που παρασκευάστηκαν εξετάστηκαν σε θαλάσσιες συνθήκες και σε κομποστοποίηση, με στόχο να αξιολογηθεί ο ρυθμός αποδόμησης. Τα αμετάβλητα CTA-φιλμ δεν εμφάνισαν σημάδια αποικοδόμησης σε θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ μετά από αλκαλική επεξεργασία (TCTA) κατέγραψαν 19% διάσπαση στους 20 °C και 56% στους 25 °C σε διάστημα 30 ημερών. Σε κομποστοποίηση, τα TCTA-φιλμ αποδομήθηκαν πλήρως σε μόλις 10 ημέρες, γεγονός που αναδεικνύει τη σημασία της επιφανειακής τροποποίησης για την ελεγχόμενη διάσπαση του PHB. (Chae & Lee, 2025).

Τώρα σε συνάφεια με τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου πειράματος, ορισμένα στελέχη του γένους *Stenotrophomonas*, όπως το *Stenotrophomonas* sp. RZS7, έχουν αναγνωριστεί

για την ικανότητά τους να υδρολύουν το πολυ(3-υδροξυβουτυράτο) (PHB). Το βακτήριο αυτό απομονώθηκε από έναν χώρο απορριμμάτων πλούσιο σε πλαστικά και παράγει εξωκυτταρική PHB-δεπολυμεράση που υδρολύει το PHB σε 3-υδροξυβουτυρικό (3-HB) και ολιγομερή. Η ενζυματική δραστηριότητα βελτιστοποιείται σε θερμοκρασία 30°C σε θρεπτικό μέσο με άλατα, ενώ η καθαρισμένη PHB-δεπολυμεράση έχει μοριακό βάρος 40 kDa και δραστηριότητα 0,7993 U/mg. Η βιοαποικοδόμηση του PHB με το συγκεκριμένο στέλεχος έχει μετρηθεί σε υγρό καλλιεργητικό μέσο και σε φυσικές συνθήκες εδάφους, με ποσοστό αποικοδόμησης έως 87,74%, ενώ η ανάλυση FTIR, HPLC και GC-MS επιβεβαιώνει την αποικοδόμηση του PHB. Επιπλέον, η μικροσκοπία FESEM δείχνει αλλαγές στη μορφολογία της επιφάνειας του PHB σε συνθήκες εδάφους, υποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα της βιοαποικοδόμησης του (Wani, S. J., 2016).

Συνεχίζοντας με ένα από τα πιο αναλώσιμα μικροπλαστικά το PET, εντοπίστηκε αρχικά το βακτήριο *Ideonella sakaiensis*, το οποίο χρησιμοποιεί το PET ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Μέσω της δράσης δύο ενζύμων, της PETase και της MHETase, το βακτήριο διασπά το PET σε τereφθαλικό οξύ και αιθυλενογλυκόλη (Yoshida et al., 2016). Με περαιτέρω έρευνα αποδείχθηκε πως η γενετική διαγραφή του γονιδίου PETase εξαφάνισε την ικανότητα αποικοδόμησης, επιβεβαιώνοντας τον καθοριστικό του ρόλο. Η μελέτη αυτή αποτέλεσε ορόσημο, καθώς σχεδίασαν και βελτίωσαν μέσω κατευθυνόμενης εξέλιξης μια PET-hydrolase με υψηλή καταλυτική αποτελεσματικότητα. Η ενζυμική αυτή παραλλαγή κατάφερε να διασπάσει πάνω από 90% PET σε λιγότερο από 10 ώρες, παράγοντας 16,7 g τereφθαλικού οξέος ανά λίτρο ανά ώρα σε βιοαντιδραστήρα. Το επίτευγμα αυτό θεωρείται κρίσιμο βήμα προς την ανάπτυξη βιομηχανικών εφαρμογών για την ανακύκλωση του PET μέσω βιοκαταλυτών (Tournier et al., 2020). Παράλληλα, ερευνητικές ομάδες εντόπισαν υπονήφειες υδρολάσες από το ανθρώπινο μικροβίωμα, οι οποίες σε *in vitro* πειράματα παρουσίασαν ικανότητα διάσπασης σωματιδίων PET. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε μεταγονιδιωματική ανάλυση του ανθρώπινου μικροβιώματος, με στόχο την ταυτοποίηση ενζύμων ικανών να υδρολύουν το PET. Τα νέα ένζυμα που εντοπίστηκαν, με ομοιότητες προς τις PETase, εκφράστηκαν σε ετερολογικά συστήματα και παρουσίασαν δραστηριότητα έναντι φιλμ και μικροσωματιδίων PET. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν το δυναμικό του ανθρώπινου μικροβιώματος ως πηγή καινοτόμων ενζύμων με εφαρμογές στη διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων. (Knott et al., 2020· Zumstein et al., 2018).

Πέρα από το PET, αρκετές μελέτες έχουν τεκμηριώσει τη μικροβιακή διάσπαση πολυστυρενίου (PS), επιβεβαιώνοντας ότι τόσο χερσαία όσο και θαλάσσια μικροβιακά συστήματα μπορούν να συνεισφέρουν στην αποδόμηση του συγκεκριμένου πολυμερούς. Για παράδειγμα, το *Bacillus cereus* SHBF2, απομονωμένο από εμπορικό ιχθυοτροφείο, έδειξε ικανότητα να χρησιμοποιεί μικροπλαστικά PE, PP και PS ως μοναδική πηγή άνθρακα, οδηγώντας σε απώλεια μάζας και αλλοιώσεις της χημικής δομής των πολυμερών μετά από 60 ημέρες καλλιέργειας (Yousif et al., 2021). Στο θαλάσσιο περιβάλλον, στελέχη όπως *Alcanivorax xenomutans* και *Halomonas titanicae* παρουσίασαν ικανότητα βιοδιάσπασης PS, με μετρήσιμη απώλεια βάρους του πολυμερούς, αλλαγές στη θερμική του σταθερότητα και σχηματισμό ενδιάμεσων μεταβολιτών που περιείχαν καρβοξυλομάδες, γεγονός που επιβεβαιώνει βιοχημική αποδόμηση του υλικού (Syranidou et al., 2019). Αντίστοιχα, βακτήρια του γένους *Pseudoalteromonas*, τα οποία προέρχονταν από ψυχρά και σκοτεινά θαλάσσια οικοσυστήματα, πέτυχαν μερική διάσπαση PS (περίπου 3,9%) και PP (1,3%) μετά από 80 ημέρες, αναδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο των

ψυχρόφιλων θαλάσσιων μικροοργανισμών στην αποδόμηση μικροπλαστικών σε ακραίες συνθήκες (Kirstein et al., 2019). Ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον εύρημα προέρχεται από το έντομο *Tenebrio molitor*, του οποίου το εντερικό μικροβίωμα φάνηκε να αποδομεί αποτελεσματικά το PS. Οι προνύμφες που τρέφονταν αποκλειστικά με PS εμφάνισαν ικανότητα υδρόλυσης του πολυμερούς εντός 24 ωρών, ενώ επιβίωσαν χωρίς να παρουσιάσουν σημαντικές διαφορές από έντομα που τρέφονταν με φυσική δίαίτα, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι μικροοργανισμοί του εντέρου είναι υπεύθυνοι για την αποτελεσματική διάσπαση του πολυμερούς σε βιολογικά συμβατά υποπροϊόντα (Yang et al., 2015). Συνολικά, οι μελέτες αυτές αναδεικνύουν ότι η βιοδιάσπαση του PS δεν είναι μόνο δυνατή αλλά και πολυπαραγοντική, εξαρτώμενη τόσο από το είδος του μικροοργανισμού όσο και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα τονίζουν τη σημασία της μελέτης διαφορετικών μικροβιακών κοινοτήτων, από θαλάσσια έως ακραία οικοσυστήματα, αλλά και μη συμβατικών βιολογικών συστημάτων, όπως το εντερικό μικροβίωμα εντόμων, για την κατανόηση και αξιοποίηση της βιοαποικοδόμησης πολυμερών όπως το PS.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα του συγκεκριμένου πειράματος η ανάπτυξη των αποικιών στους διαφορετικούς βαθμούς αραίωσης κατέδειξε ότι η μικροβιακή πυκνότητα παίζει καθοριστικό ρόλο στην εγκατάσταση και την εκδήλωση βιολογικής δραστηριότητας. Η εμφάνιση αποικιών ήδη από τις 24 ώρες στις μηδενικές, 3ης και 5ης αραίωσης, σε αντίθεση με την πλήρη απουσία ανάπτυξης στη 7η, υποδηλώνει ότι σε υψηλούς βαθμούς αραίωσης η συγκέντρωση των ζώντων μικροοργανισμών δεν επαρκεί για να ξεκινήσει η καλλιέργεια. Επιπλέον, η έναρξη της υδρόλυσης του PHB 72 ώρες μετά την επίστρωση καταδεικνύει ότι προηγείται μια φάση εγκατάστασης και ανάπτυξης πριν οι μικροοργανισμοί εκδηλώσουν την ενζυμική τους δράση. Η απομόνωση των καλλιεργειών έδειξε την ύπαρξη σαφών διαφορών μεταξύ των αποικιών, τόσο σε μορφολογικό όσο και σε λειτουργικό επίπεδο. Οι αποικίες F και B ξεχώρισαν ως οι πιο δραστικές, ολοκληρώνοντας ταχύτατα την ανάπτυξη και την υδρόλυση του PHB, γεγονός που τις καθιστά υποσχόμενες για εφαρμογές βιοαποκατάστασης. Αντίθετα, οι αποικίες A και C ήταν σαφώς βραδύτερες, με σημαντική καθυστέρηση τόσο στην ανάπτυξη όσο και στην έναρξη της αποικοδόμησης. Η διαφοροποίηση αυτή επιβεβαιώνει ότι η ικανότητα αποικοδόμησης δεν είναι κοινό χαρακτηριστικό, αλλά εξαρτάται από το γενετικό υπόβαθρο και τον μεταβολισμό κάθε στελέχους. Η μελέτη της μορφολογίας των αποικιών ενίσχυσε τη διαφοροποίηση μεταξύ τους. Οι λευκές και κυκλικές αποικίες, όπως οι A και D, διαφοροποιούνταν στη λειτουργική τους συμπεριφορά, με την πρώτη να σχηματίζει χαρακτηριστικό φιλμ και να εμφανίζει καθυστερημένη δράση, ενώ η δεύτερη παρουσίαζε μεγαλύτερη ταχύτητα υδρόλυσης. Αντίθετα, οι αποικίες με κίτρινο χρώμα και μικρό μέγεθος (π.χ. Αποικία E και F) συνδέθηκαν με υψηλή δραστικότητα, με την αποικία F να ξεχωρίζει ως η ταχύτερη σε όλη τη μελέτη. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι, αν και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά από μόνα τους δεν αρκούν για την πρόβλεψη της δράσης, ορισμένα μοτίβα φαίνεται να σχετίζονται με αυξημένη ενζυμική απόδοση.

Η μοριακή ταυτοποίηση μέσω BLASTn έδειξε ότι οι περισσότερες αποικίες ανήκουν στο γένος *Stenotrophomonas*, το οποίο είναι ήδη γνωστό για την ικανότητά του να αποικοδομεί πολυμερή και να επιβιώνει σε περιβαλλοντικά στρες. Η αποικία E εμφάνισε πολύ υψηλά ποσοστά ταύτισης (97% με *S. indicatrix* και 96% με *S. maltophilia*), γεγονός που επιτρέπει με βεβαιότητα την απόδοσή της σε συγκεκριμένο είδος. Αντίθετα, οι αποικίες A και F εμφάνισαν ενδιάμεσες τιμές (~87–88%), που επιτρέπουν ταξινόμηση μόνο σε επίπεδο

γένους. Οι αποικίες B και D παρουσίασαν ακόμη χαμηλότερα ποσοστά (~81%), με ομοιότητες τόσο με *Stenotrophomonas* όσο και με άλλα γένη, όπως *Pseudomonas* και *Xanthomonas*, στοιχείο που υποδηλώνει γενετική απομάκρυνση και πιθανή παρουσία νέων ή ανεπαρκώς μελετημένων στελεχών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η αποικία C, η οποία παρουσίασε ταυτόχρονα χαμηλή ταύτιση με είδη *Pseudomonas* και υψηλότερη (91%) με *Chryseobacterium* sp. Η ασάφεια αυτή καθιστά δύσκολη την ασφαλή ταξινόμηση, ενισχύοντας την υπόθεση ότι ίσως πρόκειται για στέλεχος που δεν έχει πλήρως καταγραφεί στις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων. Η εύρεση τέτοιων απομονώσεων είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων ενζυμικών μηχανισμών με πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Η φυλογενετική ανάλυση Maximum Likelihood ενίσχυσε τα παραπάνω αποτελέσματα, καταδεικνύοντας ότι οι περισσότερες αποικίες ομαδοποιούνται στον κλάδο των *Stenotrophomonas*, με κάποιες αποκλίσεις προς συγγενικά ή απομακρυσμένα γένη, όπως *Xanthomonas* και *Chryseobacterium*. Η κατανομή των αποικιών στο δέντρο υποδηλώνει αφενός την κυρίαρχη παρουσία του γένους *Stenotrophomonas*, αφετέρου την ύπαρξη γενετικής ποικιλότητας που πιθανώς αντικατοπτρίζει προσαρμοστικότητα σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες και ικανότητα αποικοδόμησης διαφορετικών υποστρωμάτων.

Επιπρόσθετα, τα πειράματα με τα PHB pellets έδειξαν ότι οι μικροοργανισμοί παράγουν τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά ένζυμα με αποικοδομητική δράση. Ωστόσο, η μείωση της μάζας των pellets ήταν σαφώς μεγαλύτερη στα δείγματα με εξωκυτταρική δράση, γεγονός που καταδεικνύει ότι αυτά τα ένζυμα είναι πιο δραστικά στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Αντίθετα, τα ενδοκυτταρικά ένζυμα, αν και δραστικά, φαίνεται να περιορίζονται σε μικρότερη αποδοτικότητα, πιθανώς λόγω της προστασίας τους μέσα στο κύτταρο και της ανάγκης συγκεκριμένων συνθηκών για βέλτιστη λειτουργία.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν ότι το μικροβιακό σύνολο που απομονώθηκε περιλαμβάνει στελέχη με διαφορετική δυναμική στην αποικοδόμηση του PHB. Ορισμένα στελέχη, όπως η αποικία F, εμφανίζουν εξαιρετικά υψηλή δραστηριότητα και ταχύτητα δράσης, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικά για εφαρμογές βιοαποκατάστασης μικροπλαστικών. Παράλληλα, η γενετική ποικιλότητα που καταγράφηκε δείχνει ότι υπάρχουν και στελέχη που δεν έχουν πλήρως ταυτοποιηθεί, τα οποία ενδέχεται να αντιπροσωπεύουν νέους μικροοργανισμούς με ανεκμετάλλευτες δυνατότητες. Η συνδυαστική δράση ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών ενζύμων καταδεικνύει επίσης την πολυπλοκότητα των μηχανισμών υδρόλυσης, αναδεικνύοντας την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη και βιοτεχνολογική αξιοποίηση των πιο δραστικών στελεχών.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ali, S. S., Elsamahy, T., Abdelkarim, E. A., Al-Tohamy, R., Kornaros, M., Ruiz, H. A., Zhao, T., Li, F., & Sun, J. (2022). Biowastes for biodegradable bioplastics production and end-of-life scenarios in circular bioeconomy and biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 363, 127869. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127869>
- Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2018). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review. *Environmental Pollution*, 234, 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.070>
- B. Patel, A., M. Gol, A., J. Vyas, A., I. Patel, A., v. Dudhrejiya, A., & J. Chotaliya, U. (2023). A brief review on PET - Polyethylene Terephthalate Containers. *International Journal of Technology*, 50–56. <https://doi.org/10.52711/2231-3915.2023.00006>
- Boncinelli, E., Simeone, A., de Falco, A., Fidanza, V., & la Volpe, A. (1983). An agarose gel resolving a wide range of DNA fragment lengths. *Analytical Biochemistry*, 134(1), 40–43. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90260-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90260-9)
- Chae, H., & Lee, S. (2025). Controlled biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) by cellulose triacetate surface modification. *Scientific Reports*, 15, 10782. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-10782-9>
- Cai, Z., Li, M., Zhu, Z., Wang, X., Huang, Y., Li, T., Gong, H., & Yan, M. (2023). Biological Degradation of Plastics and Microplastics: A Recent Perspective on Associated Mechanisms and Influencing Factors. *Microorganisms*, 11(7), 1661. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071661>
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(9), 3494–3511. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>
- Chen, Y., Pan, K., Mai, K., Jiao, jian, Zeng, xiangbin, Fu, Q., & Li, J. (2024). Synthesis, Properties, and Degradation of Poly(butylene succinate-co-sebacate-co-salicylate) Copolyesters. *Journal of Polymers and the Environment*, 32(8), 3765–3775. <https://doi.org/10.1007/s10924-024-03200-0>
- Cheranov, O., Arterburn, L., Centeno, D., Feuerborn, L., Min, H., Penrod, C., Raley, G., Yarkosky, E., & Kessler, E. (2019). Explorations of Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolase for addressing PET Plastic Pollution. *The FASEB Journal*, 33(S1). https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.lb211
- Chien, H.-L., Tsai, Y.-T., Tseng, W.-S., Wu, J.-A., Kuo, S.-L., Chang, S.-L., Huang, S.-J., & Liu, C.-T. (2022). Biodegradation of PBSA Films by Elite *Aspergillus* Isolates and Farmland Soil. *Polymers*, 14(7), 1320. <https://doi.org/10.3390/polym14071320>
- Chruściel, J., Kudzin, M., Piwowarska, D., & Festinger, N. (2023). Risks Associated with the Presence of PVC in the Environment and Methods of Its Elimination. <https://doi.org/10.20944/preprints202311.1904.v1>

- Clark, R. A., & Shaver, M. P. (2024). Depolymerization within a Circular Plastics System. *Chemical Reviews*, 124(5), 2617–2650.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00739>
- Clayman, H. M. (1981). Polypropylene. *Ophthalmology*, 88(9), 959–964.
[https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(81\)80012-7](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(81)80012-7)
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environmental Science & Technology*, 47(12), 6646–6655. <https://doi.org/10.1021/es400663f>
- Cverenkárová, K., Valachovičová, M., Mackuľák, T., Žemlička, L., & Bírošová, L. (2021a). Microplastics in the Food Chain. *Life*, 11(12), 1349.
<https://doi.org/10.3390/life11121349>
- Cverenkárová, K., Valachovičová, M., Mackuľák, T., Žemlička, L., & Bírošová, L. (2021b). Microplastics in the Food Chain. *Life*, 11(12), 1349.
<https://doi.org/10.3390/life11121349>
- Damayanti, D., Saputri, D. R., Marpaung, D. S. S., Yusupandi, F., Sanjaya, A., Simbolon, Y. M., Asmarani, W., Ulfa, M., & Wu, H.-S. (2022). Current Prospects for Plastic Waste Treatment. *Polymers*, 14(15), 3133.
<https://doi.org/10.3390/polym14153133>
- Delidow, B. C., Lynch, J. P., Peluso, J. J., & White, B. A. (n.d.). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocols. In *PCR Protocols* (pp. 1–30). Humana Press.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-244-2:1>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, 1. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Etheridge, D. E., & Craig, H. M. (1973). A bilayer plate technique to detect broad-spectrum antagonism in microorganisms and its application to wood-inhabiting fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 19(11), 1455–1458.
<https://doi.org/10.1139/m73-236>
- Gabirondo, E., Maiz-Iginitz, A., Ximenis, M., Świderek, K., Andrés-Sanz, D., Moliner, V., Cabedo, L., Westlie, A. H., Chen, E. Y.-X., Cerrón-Infantes, D. A., Unterlass, M. M., López-Gallego, F., Etxeberría, A., & Sardon, H. (2025). Selective chemical recycling of polyhydroxybutyrate into high-value hydroxy acid using the taurine organocatalyst. *Chemical Science*, 16(32), 14509–14517.
<https://doi.org/10.1039/D5SC02196K>
- García-López, E. I., Aoun, N., & Marci, G. (2024). An Overview of the Sustainable Depolymerization/Degradation of Polypropylene Microplastics by Advanced Oxidation Technologies. *Molecules*, 29(12), 2816.
<https://doi.org/10.3390/molecules29122816>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7).
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Guo, R.-T., Li, X., Yang, Y., Huang, J.-W., Shen, P., Liew, R. K., & Chen, C.-C. (2024). Natural and engineered enzymes for polyester degradation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 22(3), 1275–1296.
<https://doi.org/10.1007/s10311-024-01714-6>
- Harussani, M. M., Sapuan, S. M., Rashid, U., Khalina, A., & Ilyas, R. A. (2022). Pyrolysis of polypropylene plastic waste into carbonaceous char: Priority of plastic waste management amidst COVID-19 pandemic. *Science of The Total Environment*, 803, 149911. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149911>

- Hegde, K., & Dasu, V. V. (2014). Structural Stability and Unfolding Properties of Cutinases from *Thermobifida fusca*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(2), 803–819. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1037-5>
- Herrera, C., González, D., Medina, J., & Chávez, F. P. (2024). Screening and characterization of PHB-degrading bacteria from plastic-polluted environments. *Biotechnology for the Environment*, 4, 9. <https://doi.org/10.1186/s44314-024-00009-y>
- Hoang, H. G., Nguyen, N. S. H., Zhang, T., Tran, H.-T., Mukherjee, S., & Naidu, R. (2025). A review of microplastic pollution and human health risk assessment: current knowledge and future outlook. *Frontiers in Environmental Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2025.1606332>
- Hu, X., Gu, H., Sun, X., Wang, Y., Liu, J., Yu, Z., Li, Y., Jin, J., & Wang, G. (2024). Metagenomic exploration of microbial and enzymatic traits involved in microplastic biodegradation. *Chemosphere*, 348, 140762. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140762>
- Ismail, M., Abouhmad, A., Warlin, N., Pyo, S.-H., Örn, O. E., Al-Rudainy, B., Tullberg, C., Zhang, B., & Hatti-Kaul, R. (2024). Closing the loop for poly(butylene-adipate-co-terephthalate) recycling: depolymerization, monomers separation, and upcycling. *Green Chemistry*, 26(7), 3863–3873. <https://doi.org/10.1039/D3GC04728H>
- Jain, R., Gaur, A., Suravajhala, R., Chauhan, U., Pant, M., Tripathi, V., & Pant, G. (2023). Microplastic pollution: Understanding microbial degradation and strategies for pollutant reduction. *Science of The Total Environment*, 905, 167098. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167098>
- Kfoury, G., Raquez, J. M., Hassouna, F., Odent, J., Toniazzo, V., Ruch, D., & Dubois, P. (2013). Recent advances in high performance poly(lactide): From “green” plasticization to super-tough materials via (reactive) compounding. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 1). Frontiers Media S. A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2013.00032>
- Khan, M. I., Fares, G., Abbas, Y. M., & Alqahtani, F. K. (2024). Eco-Innovative UHPC—Enhancing Sustainability, Workability, and Ductility with Recycled Glass Cullet Powder and Plastic Bottle Hybrid Fibers. *Materials*, 17(2), 393. <https://doi.org/10.3390/ma1702039>
- Knott, B. C., Erickson, E., Allen, M. D., Gado, J. E., Graham, R., Kearns, F. L., ... & Beckham, G. T. (2020). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Nature Communications*, 11, 5790. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19583-2>
- Kirstein, I. V., Wichels, A., Krohne, G., & Gerds, G. (2019). Accumulation of microplastics in the deep sea: An evaluation of *Pseudoalteromonas*-mediated degradation under low temperature and darkness. *Environmental Pollution*, 246, 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.019>
- Lawlor, K. (2000). Comparison of methods to investigate microbial populations in soils under different agricultural management. *FEMS Microbiology Ecology*, 33(2), 129–137. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00053-2)
- Lee, Y. J., Choi, T. R., Song, H. S., Bhatia, S. K., Gurav, R., Park, J. Y., ... & Yang, Y. H. (2023). Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) by marine bacterium *Microbulbifer* sp. SOL03. *Marine Pollution Bulletin*, 186, 114413. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114413>

- Li, Y., Tao, L., Wang, Q., Wang, F., Li, G., & Song, M. (2023). Potential Health Impact of Microplastics: A Review of Environmental Distribution, Human Exposure, and Toxic Effects. *Environment & Health*, 1(4), 249–257. <https://doi.org/10.1021/envhealth.3c00052>
- Li, Y., Wang, S., Qian, S., Liu, Z., Weng, Y., & Zhang, Y. (2024). Depolymerization and Re/Upcycling of Biodegradable PLA Plastics. *ACS Omega*, 9(12), 13509–13521. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08674>
- Lin, L., Hui, S., Lu, G., Wang, S.-L., Wang, X.-D., & Lee, D.-J. (2017). Molecular dynamics simulations on dissolutive wetting of Al–Ni alloy droplets on NiAl substrate. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 75, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.03.035>
- Lori, M., Hartmann, M., Kundel, D., Mayer, J., Mueller, R. C., Mäder, P., & Krause, H.-M. (2023). Soil microbial communities are sensitive to differences in fertilization intensity in organic and conventional farming systems. *FEMS Microbiology Ecology*, 99(6). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad046>
- Mamun, A. al, Prasetya, T. A. E., Dewi, I. R., & Ahmad, M. (2023). Microplastics in human food chains: Food becoming a threat to health safety. *Science of The Total Environment*, 858, 159834. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159834>
- Martínez-Tobón, D. I., Singh, A., & Oleszkiewicz, J. A. (2018). Biodegradation of polyhydroxybutyrate films by diverse bacterial strains. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 132, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.05.010>
- Mastalygina, E. E., & Aleksanyan, K. v. (2023). Recent Approaches to the Plasticization of Poly(lactic Acid) (PLA) (A Review). *Polymers*, 16(1), 87. <https://doi.org/10.3390/polym16010087>
- Matuana, L. M. (2008). Solid state microcellular foamed poly(lactic acid): Morphology and property characterization. *Bioresource Technology*, 99(9), 3643–3650. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.062>
- Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15(1). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- Mrowiec, B. (2018). Plastics in the circular economy (CE). *Environmental Protection and Natural Resources*, 29(4), 16–19. <https://doi.org/10.2478/oszn-2018-0017>
- Muneer, F., Rasul, I., Azeem, F., Siddique, M. H., Zubair, M., & Nadeem, H. (2020). Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers. *Journal of Polymers and the Environment*, 28(9), 2301–2323. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01772-1>
- Naser, A. Z., Deiab, I., & Darras, B. M. (2021). Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. *RSC Advances*, 11(28), 17151–17196. <https://doi.org/10.1039/D1RA02390J>
- P R., Y., Das, M., & Maiti, S. K. (2021). Recent progress and challenges in cyanobacterial autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), a bioplastic. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105379. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105379>
- Plasticsthefastfacts2023. (n.d.).

- Poltronieri, P., & Kumar, P. (2017). Polyhydroxyalcanoates (PHAs) in Industrial Applications. In *Handbook of Ecomaterials* (pp. 1–30). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48281-1_70-1
- Prüst, M., Meijer, J., & Westerink, R. H. S. (2020). The plastic brain: neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00358-y>
- Rosenboom, J.-G., Langer, R., & Traverso, G. (2022). Bioplastics for a circular economy. *Nature Reviews Materials*, 7(2), 117–137. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00407-8>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Shalem, A., Yehezkeli, O., & Fishman, A. (2024). Enzymatic degradation of polylactic acid (PLA). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 413. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13212-4>
- Syranidou, E., Nikolaki, S., Kalogerakis, N., & Mantzavinos, D. (2019). Biodegradation of polystyrene by marine bacteria: Formation of intermediates and surface alterations. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.039>
- Su, J., Wu, Y., Ma, X., Zhang, G., Feng, H., & Zhang, Y. (2004). Soil microbial counts and identification of culturable bacteria in an extreme by arid zone. *Folia Microbiologica*, 49(4), 423–429. <https://doi.org/10.1007/BF02931604>
- Sun, Y., Li, X., Cao, N., Duan, C., Ding, C., Huang, Y., & Wang, J. (2022). Biodegradable microplastics enhance soil microbial network complexity and ecological stochasticity. *Journal of Hazardous Materials*, 439, 129610. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129610>
- Thakur, B., Singh, J., Singh, J., Angmo, D., & Vig, A. P. (2023). Biodegradation of different types of microplastics: Molecular mechanism and degradation efficiency. *Science of The Total Environment*, 877, 162912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162912>
- Thermo Scientific DreamTaq DNA Polymerase. (n.d.). www.thermofisher.com/fastdigest
- Treimo, J., Vegarud, G., Langsrud, T., Marki, S., & Rudi, K. (2006). Total bacterial and species-specific 16S rDNA micro-array quantification of complex samples. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 985–998. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02805.x>
- Tournier, V., Topham, C. M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E., ... & Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580(7802), 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>

- Tsironi, T. N., Chatzidakis, S. M., & Stoforos, N. G. (2022). The future of polyethylene terephthalate bottles: Challenges and sustainability. *Packaging Technology and Science*, 35(4), 317–325. <https://doi.org/10.1002/pts.2632>
- Tsuboi, S., Hoshino, Y. T., Yamamoto-Tamura, K., Uenishi, H., Omae, N., Morita, T., Sameshima-Yamashita, Y., Kitamoto, H., & Kishimoto-Mo, A. W. (2024). Enhanced biodegradable polyester film degradation in soil by sequential cooperation of yeast-derived esterase and microbial community. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(9), 13941–13953. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-31994-y>
- Wani, S. J., Shaikh, S. S., Tabassum, B., Thakur, R., Gulati, A., & Sayyed, R. Z. (2016). *Stenotrophomonas* sp. RZS 7, a novel PHB degrader isolated from plastic contaminated soil in Shahada, Maharashtra, Western India. *3 Biotech*, 6(2), 179. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0477-8>
- Yang, Y., Min, J., Xue, T., Jiang, P., Liu, X., Peng, R., Huang, J.-W., Qu, Y., Li, X., Ma, N., Tsai, F.-C., Dai, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, C.-C., & Guo, R.-T. (2023). Complete bio-degradation of poly(butylene adipate-co-terephthalate) via engineered cutinases. *Nature Communications*, 14(1), 1645. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37374-3>
- Yang, Y., Yang, J., Wu, W.-M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., & Yang, R. (2015). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Chemical and physical analysis. *Environmental Science & Technology*, 49(20), 12087–12093. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02661>
- Yao, Z., Seong, H. J., & Jang, Y.-S. (2022). Environmental toxicity and decomposition of polyethylene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 242, 113933. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113933>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., ... & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196–1199. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>
- Yousif, E., Haddad, R., & Khatib, A. (2021). Biodegradation of polyethylene, polypropylene and polystyrene microplastics by floc-forming *Bacillus cereus* strain SHBF2 isolated from a commercial aquafarm. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100707. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100707>
- Zhang, X., Feng, X., Guo, W., Zhang, C., & Zhang, X. (2024). Chemically recyclable polyvinyl chloride-like plastics. *Nature Communications*, 15(1), 8536. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52852-y>
- Zhou, W., Bergsma, S., Colpa, D. I., Euverink, G.-J. W., & Krooneman, J. (2023). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. *Journal of Environmental Management*, 341, 118033. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033>
- Ziani, K., Ioniță-Mîndrican, C.-B., Mititelu, M., Neacșu, S. M., Negrei, C., Moroșan, E., Drăgănescu, D., & Preda, O.-T. (2023). Microplastics: A Real Global Threat for Environment and Food Safety: A State of the Art Review. *Nutrients*, 15(3), 617. <https://doi.org/10.3390/nu15030617>
- Πολυμερών, Ε. Τ. (2013). ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΕΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ.

6. Παράρτημα

1. Παρακάτω εμφανίζονται οι αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA των αποικιών Α-Ε:

-ΑΠΟΙΚΙΑ Α: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ (FASTA FORMAT)

Ε:

```
AACCCCATGGCCAAAGTTCGAACGGYAGCRAGGWSWKSTTGCTCYTTGGRTGGGA
GAGGGGGAAGGGTGAGGATACATCKGAMTCTACTTTTTTCGAGAGGGGATAACGASGG
AAACTTATACTRCTWACGTCCTACAGCTAAAAGTGAGGGACCGTCAYCTTCTGRCCT
TGCRCATGAGCCTGAGTCGAATTTCGGATTATCTWGGTGGAGGGGTTTCAGGCCCGCCA
CGATSACKATCCGKACCTAGACTAAGAKGATGATCASCRCCTGAAACTGAGACCC
GATCCCTACTCCTACSGGAGGTGGCRATGATTAATATTGGACAATGGGCCCCGATCCT
GATCCGCCCMTACCGYGAGGATGAACAACGSCCTGKGGTTGTAATKCCCTTTTGTG
ARAAASAAATCCMKCKGCTAATACCTGGTTGGGATGACGGTACCCWAAGAATAAG
CACCGGCTAAGTTCGTGCCMGRGCCRCGSTAATAACKAARGGYGCWAGCGTTACTC
RSAGTTACTGGRCGTAAAGCGTGCGTAKGTGGTTGTTTAAKTCTGTTGYGAAAGCCC
TGGGCTCAACCTGGSAACTGCARYGGAMACTGGACAACCTAGAKTGAGGTAGAKGGT
AKYGSATTTCCCGGTGTARCAKTGAAATGCGTAGARATCRRSAGGAACRTCCATGGC
GAASGCMKCTACCTGKACCRACACTGACACTGARGCACG
AAAGCGTGSGGAGCAAACAGGATTASATACCCTGSTAGTCCACGCCCTARACGATGC
GAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGYACGCACWATCAAAGCTACGCGTTAMMGTTT
GCCGCTGGGGAGTACGGTCKCAAGACTGAAACTCATWGGAATTGACSGGRCCCGC
ACAGCGSTGGAGTATGTGTYTAATTGATSMACAMSAAKAACCTTMCCTGGCCTYGA
CATRCKWGAACWTWCAGAKATGGACTGTTGCCWTCKGAACACAGACMCAGCTGCTY
GCATSGCTGTCCCKWGCCYCGTGTMTGTGAGATTTAGGGCYAAGTACCMGCACAAS
CCKCWRCTTGTTCYTYATTGCCWGYACGTAATGCTSGACSTCTMTGCARCCGCCGG
TCACACGGAGAGGTGGGATGACGTCAGTCYCTGGCCTTASGCYAGGCTAACCAC
```

Ε:

```
ACCYYSAYMCACGTGGYASCGYCCTCCCGAAGGTTARCTACCTGCTTCTGGTGCAA
CMMACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGC
RRCATTGCTGATCTGGAATTACAASCGATCCCAACTTCMKGAACKCAATTTGCAAAC
GCCATCCCGAACAGAAATAGGGTTTCTGGAATTGSTTTACCTCCSCSGTGTGMACCC
TTCTGTCCCTACCATTGAASTASKGGGTASCCATGGCCKAARGGSCCAGAAKAACTT
GASTCCTCCCCCACTTTCCTCCGGTTGGCCMCCGMGGCCTCCTTAAATGTCCCACCA
ATACKGGTGGKMAACAARGGAMAAGGKTGGCCCTCKTTGCGGAACCTTAMCCCAMC
ATCTCASAACACAASTTAACAACRSCCATGCRSCACCGGTGTTCTGTTTCCCAAAGGC
ACCAATCCATCTYTGAAGGTTCTCGAAWGGTCAGGGCCGGGTAAGGTCCTTCCSGT
TGCACCAAATTAAACCACAGACTCCACGSCTGGTGCGGSCCCCKCCAATTCCTTTGA
KTTTAASTCTTGCGACSKAATTCCCMAGGSGKCRAAYTAAAGGCGTTASTGCCSATA
AGCATGTCAAAGCGCACACCGGATASATGACRTAKCTTAYAGSGYGTGSAAYACCGG
GATATMTWAYCGTGTGYGCTCCMCRCKCTCTCAYGTCWCAGTGWCWATGTTGSYM
CGTGASSTCCCCTCGACTKGKGTGYYYYYCYAKATCTCTACRYWYTCMGYGATAC
```

ASSARRWAYTCCGCTACTCTCTAYACWCTCTAKYTACMCWKTTGAAWGTGCWKCY
CMCGTGTWASCCGRGSTYTYWCATCACASAYWTMRAACAACMTMTACGCRCKYT
ATACGCM SWATATCTSAKAATMACKYGCGCACTCTKCATATAGCGCGTGCTGSTGRC
AMRAWTTAMSSKGCKCATWCTSTCTGGTAWMCCGTCAATCMCTAACGGRTTATRTC
ATGCCGATTYYCTYMMCTAMAAATGGTCTAYACACCCARAACGTCTTTCTMAMCCA
CGSAKGATSKCGKRTATCRGYTGGCCMCAKTGCACAATACACAGTGGCKYCYCCGW
KAGAYCTGGAMCGGTTCAATTCCAGKASGAKAATCTCTCTGAAAMGTA

-ΑΠΟΙΚΙΑ B: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ (FASTA FORMAT)

F:

GGACAAAWCGCTGGCCAACAATTGCAAGTCGARCGGAGAAARGAGCTTGCTGCTGC
TTGCATCGSCRGAGGGGTGAGTRTGCCTAKGATCTGACTGGTAKTGTGGGACAACGT
TTCSAAAGGAACGCTTATACCGCAWACGTCCTACRGSARAAAGCRRGGGACCTTCRG
GCCTTGCSCTATCASATGAGCCTARGTCGGATTAGCTTTTTGGTGATGTAATGGCTCA
CCAAGGCSACGATCCSTAWCTGGTCTGAGAGGATGATCAKTCTCACTGRAACTGAAA
CTGAGTCCMGACTCCTACTCCAAGCAGCAGTGGGGAAGATTGRAAAATGGGCRAGA
GCCTGATCCTGCCATGCCCCGTGTGTGAGGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTCC
CTTTTGATGAAGGGTTGTACATTACTACTCTGACCTGGTTGGGATGACGACACAATA
AGAATAGGCTACGTCTGTGTTCTGTCGCCGCGGCCACACTAATGGKGCRRGGCGTTARC
CTTACTTACAGTTACTGGRCCTAGCGTAKGTGGTTGGGGWTGTTKRAKGTGGAAGCG
CMRGGCTCGRSCTGGGAACGGCATCCGMAACTGGMAMTGTASARTATGGKAGAGGG
TGAKGGAATTKCAWGTGTAGCTGTGAAATGCRTATGTRTAGAAATSARCASCARTGK
CSATGGCGAMCRCCTGKACTGATACTGACACTGACGTGCRAGMRCGTGRGCGTGAR
RCGCGATTAGGTAACTGACCCTCCTCGCCCTCACCCATRTCRCTAGMCCTTTGATA
KCCTTGARCTCTTAGTGGCGCATCTCAARCATTAMGTTKACCGTTCTGSSGCSTASGG
ASTACRAGGTTAAACTTTRAAATGAAATGWAACKKGCCCGCRCCASSCRCWGRASC
WGGAGGTTTKAKTTCTTAATMCATGCAAAACCWTAACCCGKMCCTGRCWCCGAY
RWACYGTWSCAGATTACGRATWKKKGMCCTKKCGGCCAWCATGGAACAYMGGWGM
CWGCRTGGCTKGTCGRKCWGCTCGCGTCSYGKAGTAYGTTMGARTTTAKGTSCRRT
WCCAACAACCACCTTRTRCCYTWTGTCMYCACTACGTRAYGGGTGGTCRCTSGTAG
GYGAYCTGCAGRCGACAAATCGCGMASCAGSTGCGAGMRTGASGKATAAGTTGMTS
AGTGTCTTGA YCRCATCGGGTCT

R:

AAYTYKYKRRCMWCCGTGGGKYAMSCGYCCCTCCCGAAGGTAAACTASCTRCTTC
TGGTGCAACMMACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTA
TTCACCGCRACATTCTGATTCKSGATTACCAACGATTCCSAATTCMCKCAATCCAATT
GCARAAYGCSATCCGACTACAAAYGGTTTTATGGGAATAGSTCCACCTCSSGGCTTG
KGMACCCTTTGTACCSACCATTGGARCAAGTGTGTARCCCAKGSCGKAARGGCCATG
AAGACYTGACSTCMTCCCCMCCTTCTCCTCGGTTTGGCACCGGSMGTCTCCTTAAAT
GCCACCATTAACSTGGTGGKMACTAARGAMMARGGTTGCSCTCGTTACSGGACTTAA
CCCAACATCTCAMGACMCSARCTGACSACCGCCATGCMRCAMCTGGCTCAATGTTCC
CSAARGCACCAATCCATCTYTGGAAAGTTCAATTGGATGTCAAGGCCTGGTAARGGTC
TTCSCGTTGCTTCSAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGGGCSGGCCCCCSTCMATT
CMYTTGAATTTTAACCYTGSSGMCGTACTCCCCARGSGGKCAACTTAATGCGTTARCT

GCGCCACTAASAKCTCAAGGCTCCCMACGGCTASTTGACATCKYTTACAGCGTGKAC
WAYCMCGGKATCTMATCCTGTGTGCKCCCCACGCTYTCKCACSTCASTGTSWSTATS
WKKCCMCGTGGTCGCCYTCKCCACTGGTGTKYCYTCCYATATCTACRCACCTTYWCC
GCKACACASGARATWCYACCACCCTCTACCAYACTCTAGCTTGCCASTTTTGCATGC
RCTTCCCACGTTGAGMCCGGGGATTTCWCATCMCACWTAWCAAACCACCTACRCGC
GCKYTAYRCCCAGTAAWTCYSATTAATMRCTTGCRCCCTCTKYATTACMGCGGCTGC
TGGGCACARAGTTAGMCGTGCTTATWTCTGTGTYGGTAMSTCAAAYTSCASAGTATTAA
WCTACGACCSWTCYTYCYAACTAAAGTGCTTTACATCCGAGACSTCTTCMMMCCC
CGCAWKGCTGGATCAGCTTCGCCATTGTCCMTATTCCAATGCTGCCTCCCGWWGGA
ATCTGAACCGGTTYCAGTCCCGKTKACKAWCATCCTCTYGCTCC

-ΑΠΟΙΚΙΑ C: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ (FASTA FORMAT):

F:

CGYAAAGGGGWGGGCCTAAACATGGCAAGTCGAACGGTTTRATYCTTCGGATTCTY
CATAGCGGCGTAGWGGKGC GGAR CAGAGTGCAMCCYGCCTTTATCTTGGGGATAGC
CTTTCAAAGGGAKATTAAGCCCCCTTAATATATTAAGTGGCATCGCTTGATATTGAA
AACTACSGTGGATAGAGATGGTGACGCGCCGATTTCGAGTTGCTGAGGTAACGGCT
CAMGAMGTCTGCGATCTTTAGGGGCCTGTGGGGGTGATCCCCCACACTGGTACTGAR
ACRCGGACCASACTCCTACGGGAGGCATCAGTGAGGAATATTGRACAATGGGTGAA
AGCCKGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACKGCCCTATGGGTTGTAACTTCTT
TTGTATAGGGATAAACCTAGATACGTGTATCTWGCTGAAGGTACTATACRARTAAGC
ACCGGCTAACTCCSTGCCAGCWGCCGCGGTAMTACSGAGGGTGCAMGCGTTATCCG
RATTTATTGSGTTTAWAGGGTCCGTARGCGGACYCGTARSTCAKTGKTGAAWTCTCA
CWGCTTAACTGTGAAACTGCCATTGATACTGCKGGTCTTGAGTGTTGTTGAAGTASC
TGRAATAAGTASTGTAKCGSTGAAATGCMTAKATATTACTTAGAACACCAATTGCRA
AGGCAGGKYACTARCAACA ACTGACGCTGATGKACGAAWGCGTGGGGAGCGAACR
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAKACGATGCTACTCGTTTTTGGGCTTTCG
GGTTCAGAACTAARCGAAARTGATRAGTTAGCCACCTGGGAGTACGTTTCGAGATGA
AACTCAAGGAATTGACGKGGGCCCCGCACAGCGGYRRATKATSTGGTTTAMTTCSAAT
ATTCGCARAWAACCTTACCACKCTTTAATGGSAKTTGAGGGCGTAAGGAGTRG
GCTTTCTTSGAACATTTT

R:

GAGATTTGGCTTTCCYTGAGGGGGYYSTGCTAAGGGSTGAGACTACRGGTTCTGGT
ACTTCCATGGCTTGGCGGTGGGGGTGGGWGTGCCCGGAACGTATAAAGCGCGCCA
TGGCTGATGCGCGATTACKAGCGATTCCRGCTTCATAGASTCGAGTTGCAGACTCCA
ATCCSAASTGAGACCAGCTTTCGAGATTTGSATCWMATCKCTKTGTASCTGCCCTCTG
TACTGGCCATTGTACTATGTGKGTGGCCCGGGGCGYARGGSCCGTGGGGATTTGASG
TCTTCCCMCCTTCTCTCYCTACTTGCGTAKGCMGYCGSACTARAKYCCCCAAYTTAM
TGATGGMAACTAGTGACARGGGTTGCGCTSGTTGCAGGACTTAACCTAACACCTCAC
GGCAGGAGCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGAAAATTGKCCGAARAARASCCTAT
TTCTAAGCCTGTCAMTTCCCATTTAAGCCTTGGKAAGGKTCCTCGCGTAKCAYCKAA
TTAWACCACATAATCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCYTTGAGTTTCATTC
TTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGCTAACTTATCASTTTCGCTTAGTCTCTGAACCCGA
AAGCCCAAAAACGAGTTASCATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCT

GTTTCGCTCCCCACGCTTTCKTCCATCAGCGTCWGTTGTTGCTTAGTAACCTGCCTTCG
CAATTGGTGTCTAAGTAATATCTATGCATTTACCGCTACACTACTTATTCCAGCTA
CTTCAACAACACTCAMGACCCGAGTATCAATGGCAGTTTCACAGTTARGCTGTGAG
ATTTACCACTGACTTACGARTCCGCCTACGACCCTTTAAACCCAATAAATCCGGATA
ACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTAATT
CKTATRGTACCTTCAGCTAGATACAGTATCTAGGTTTATCCTATACAAAGAGTTTAC
AACCCATAGGCCGTCGTCKTYASSCGGATGGCTGGATCAGCTTCACCCATKGTGATA
KTTCCGTCACCTGCTGCCTCCCGKAGGAAGT
CTGTCTCRKGGTCYCAGTRCCAGKATTGTTAWTCASGCKYCTSRRTGCCCTAMAGGAK
CGCACACTGGGTGACCAGTTAGCGTCGCAAGCTGATKCTGATCCTTGASGCSGRTRG
CCCCAACYGTAAC

-ΑΠΟΙΚΙΑ D ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ (FASTA FORMAT):

F:

ACTAAGGGGGMGGGCCTTAACCATGSWAGTCGARCGGATGAAARGAGCAKGTTCGCT
GCTTGCGTGCCAGAGGGGKAAGGSTGAGGAATACATCKGCCTCTACTTGTTCGACR
ACGTTWCCRTAGGAAAGCTTATACCGCTAACGTCCTACAGCAAAAGGTGAGGGACC
GTCAGCCCTTGCCCTTGCGCATGAGCCTGAGTCGAATTCGCTTTATGGTGATGTAATG
GCTCAGGCCCCACCGGCGACKATCCGTACCTGGACGATGAGGATGATCACTGRAAC
TGAAACTGAGACCCGACCCCTACTCCAAGSGGAGGCGGCAATGGGGAAAATTGGAC
MAAGGGCCCGAGCCTGATCCGCCCCTAGCGCGAGGATGAACAACGSATTCKGGTTG
TATTTCCCTTTTGTGAAAAASAATWCCWCCGGCTAATACCTGGTTGGGATGACGG
TACCCTAAGAATAAGCWCCGTCTAAGTTCTGCGCCAGCRGCCACGGTAATACKAARG
GYGCWARCCTTACTCRCAGTTACTGRRCTAACGCATGCGTATGTGGTTGTTTAATTC
TGTATCSAMRGCCCTGRSCTCAACCTGGSAACTGCAACTGAACTGTACARCTAGAK
TGAGGTAGAKGGTATCRCAATCCCRSTGTAACTTSAATRCKTAGARATCKASASG

R:

CRCCMAKRKAKMCMACCSGTWGGKMASCYCCCTCCCGAAGGTTAARCTACCTGCTT
CTGGTGCAACMMACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT
ATTCACCGCRACATTGCTGATCTGCAATAACAASCGATCCCAACTTCMKGAACKCAA
TTTGMAAACGCSATCCCGGAYAGAAAYGGGGTTTCGGGAATAGSTTTACCTCCSGCS
GTGTGMACCCTTTGGTCCCTACATTTGAASTAGTGGGGAASCCMTGGCCKAARGGSC
ATGAAGAACTGGASTCCTCCCCCCTTTCTCCGGGTTGGCCMCCGGMGGCCCCCTTAA
AATGTCCAACMATAASKGGYGGKMAAAYAARGGAMAAGGTTGGCCTTGKTTGSGGA
ATTAAMCCAACATCCCAMSAACMSAASGAASAACRCCCTGGARCAACCGGCGTTCT
GTTTCCSAAAGGMMCAATCCMTCCYYGAAAGTTCCCTCGRATGGCAAGGGCYGGGA
AGGKTCCTCSSSTTGGYTYSRAATTACMMMTGAYYCAACGGYTGKKCCGGSCCCK
YAATYAYTTGRATTTMASTTTGCGCCGTACTCCCCAGGCGKCAAYTAAGCGTTRSTG
CSGAACACTACATGTCAAGCGCCAMAGCTCATGACRTACTTACAGGYGGACATACAGTA
TATATATYGTGTGCGCCCCRCGCTTCATGCWCTGTGWSTATGTGCCCRTGTACTCTCT
GCCWGTATGYCTCYKATCTCACACWTYACGTATACACGRATTCACATMCTAYACTA
CWCTCWCTGYMGAGTGCATGYGCATTCAAGTTARSCCGAGATTCATMCAGATTACA
AMCCACTACGMGCTWACGGGATCCAKASCTTGMCCCTKCATACGGCTCGTCCAGTTA
ACCTGCCWAYGCGTTACKTTACCAGGTATCMASCATCTCTMTGCCTCATCGGAGCTA
CACGATSGTATAGATGCAAKTGCAWTCAATGTCGTGAGTC

-ΑΠΟΙΚΙΑ Ε ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ (FASTA FORMAT):

F:

TMRSWKKS GSGRYWGGCCCWAMMMATGCAAGTTCGAAMGGCAGCACAGAGGAGC
TTGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTTTTT
CGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAA
AGCAGGGGAYCTTCGGRCCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTT
GGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCA
GCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTC
GGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCCGGCTAATACCTGGTTGGGA
TGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTTGTT
TAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCASTGGAAACTGGACAA
CTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTASCAGTGAATGCKTAGAGAT
CGGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCWGTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCA
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACRA
TGCAACTGKATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCASTATCAAATAACGCGTTAAGTTC
GCYCCCTGGSGAGTASWGTGCGAGASTGAAACTCARAGAATTGACRGGGGCCCGCRC
CAGCGSTGGAGTATGGTGKTTKAKTYTATKCTACGCGAARASCTTGCTGYCTTKAC
WYGTGCGMACKTTGMAATATGAWKGTGCTTSTGTAAGTSGGAMACAGYACYCAKGG
CKGTMKCGCSTGSTGYCTTSMTRTAYKARGRTGATGTGYCTAMCGACCGSAGGCCC
TSTCCCMYCMCTGGCCGTACGKWATGATGGGRCKSKMGCGATATSCCAGTACCCA
CCCGGSKCAGACGCTGAGAWGGATGAGCATGTGCWTTCTTCCGGTGGRGCTCWCTC
ACCCTMTT

R:

AAMMYMYYYSGGSCMMCCSTTGGGCAAGCGCCCTCCCGAAGGTAAAGCTACCTGCT
TCTGGTGCAACAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGT
ATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGA
GTTGCAGACTCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCGTCGCCG
GCTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCC
ATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTGTACCCGGCGGTCTCCTTAGA
GTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT
AACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTTCGAGTT
CCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGT
TCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
TTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTAG
CTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCACCCAACATCCAGTTCGCATCGTTTAGGGCGTG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGTGCCTCAGTGTGAGTG
TTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCTCCCGATCTCTACGCATTTCACT
GCTACACCGGGAATTCCGCTACCCTCTACCACACTCTAGTTGTCCAGTTTCCACTGCA
GTTCCCAGGTTGAGCCAGGGCTTTCACAACAGACTTAAACRACCACCTACGCACGC
TTTACGCCCAGTAATTCCGAGTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGG
CACGAAGTTAGCCCGTGCTTAKTTCTTTGGGTACCGTCATCCCAACCAGGTATTAGCC
GGCTGGATTTCTTTTCCCAACAAAGGGCTTTACAGCCGAAGGCCTTCTTCACCCACG
CGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCAT

TKGTCGATATCCCCACTGCTGCCTCCCGGTAGAGTCTGACCGTGTTYTCRGTTCAGG
TGTGACTGATCAKCCGTCTCAGAACAGCTACGGAAATCGACTCGCCTTTGGGTKGGG
GCCRT

-ΑΠΟΙΚΙΑ 7 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ (FASTA FORMAT):

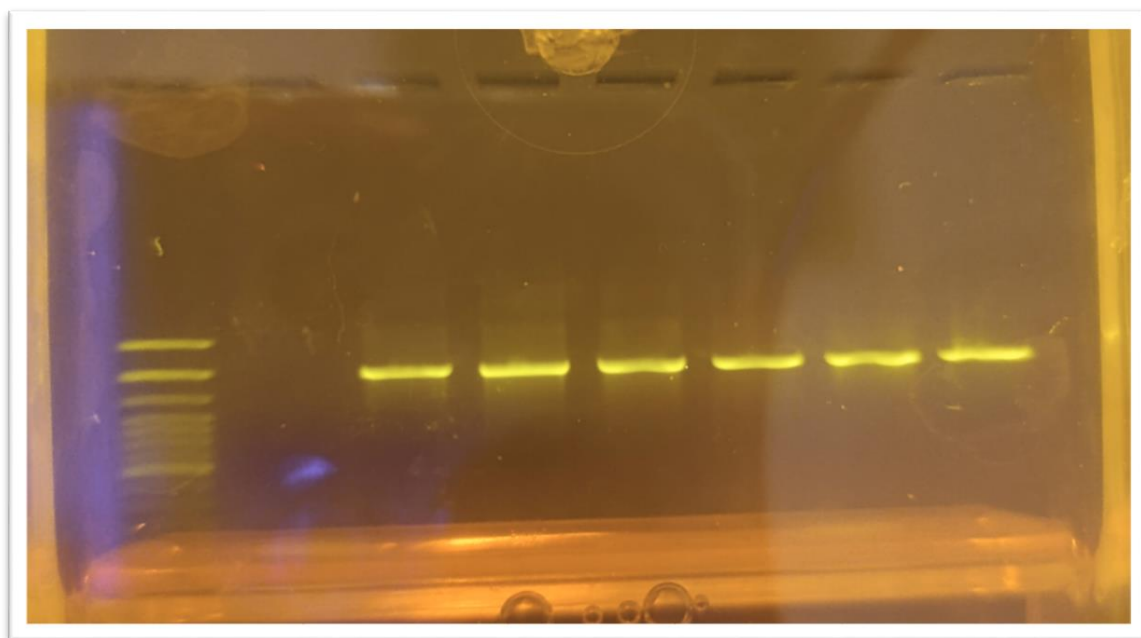
F:

TGKAGAAITYTKTCGCTTCCTTGGKTGGYGASTGRCGGAYGGGTGAGGAATACATCR
SAWTCTACTTTTTCKGGGGGGGATAACKTAAGGAACTTACRCTAATACCKCMWACT
ACCTACGGSTGAAAGCRKGGGAGCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGASCCGATGTC
KGATTASCTGGTTGGSRRGGTAARGGCCACCARGGCKACRATCCGTASCTGGYCKG
AAAGGATGATCASCACACTGGAAGTGAAGACMCGGTCCARACTCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGRACAATGGGCGCAAGCCTGATCCASCCMTACCGCGTGGGT
GAARAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAARAAATCCAGCCRGCTAA
TACCTGGTTGGRATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCSTGCCRGCA
SCCGCGTAATACGAAGGTGCAAGCGTTACTCSKAATTACTGGGCGTAMAGCGTGC
GTAKGTGGTCGTTTARSTCTGYTGYGARMSCGCTGGGCTCAMCCTGGGAMCTGCAKK
GGATACTGGACATCTAAAGTGYGGKAGAGGGTAKCGRAWTTCCCGGTGTAKCRRTG
AAATGCGTAGAGATCGGSAGGAACATCCATGGYGAATGCMGCTACCTGGACCAASR
CTGACRCTGAGGCACGAAAGCGTGSGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTARTCC
ACGCCCTAAACSATGCGAACTGWATGTTGGGTGCAATTTRGCACGCAAWWWTCGM
AGC

R:

CMMYTMYWRRCCCCRRTTGGAMRGCGCCCTCCCKAAGTTAAGCTACCTGCTTCTGGK
GSACAAACTCCCATGGWGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCAC
CGCAACAATGCTGATCTGCSATTACTARCGATTCCSACTTCATGGAGTCSAGTTGCAA
ACTCCAATCCGGACTGARATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCGYCSCCGGYTTGSAR
CCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCGWAAGGGCCATGATGA
CTTGACSTCMTCCCACTTCCTCCGTTTGKAMCCGSGGTCTCCTTAWARTTCCCA
CCATTACSTGSTGSSAAMTAARGAMAARGGTTGSSCTCSTTGSGGGAATTAACCCAAC
ATCTCAMSAMACGARCTGAASACMGCCMTGGMRCAMCTGTGTTCKAGTTCCRAAS
GCACCAATCCATCTCKGGAARKTYCTSKACATGTCAAGGCCWGGTAAGGTTCTTCGC
GTTGCATCGAATTAAWCCACATRCTCCRCCGCTTGTGCGGGYCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTYAGYCTTGCGRCCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAAYGCGTTAKCTKCGA
TACTGMGTGCSAAATTGCACCCAACATCCTRTTCGCATCGTTTAKACGCGTGGACTA
CCAAGGTATCTAATCCTGTGTTGCTCTCCACGCTTTCGTGCTCTCAATGTCASTGTTG
GKCCAGGTAGCTGCCTCTCGCCATGSATGTTCTCCCKATMTCTACGCRYWTTCACT
GCGTACACCGRGAATTCCSCTACYCTCYACCACACATCTARTTGTSCAGKTACCACTG
CAGTTCCCRGAGTKGAGAYCCWKSCTWTYWCWACAKACWYRMAACAAMCMCST
MCRCAMGCTYTWYRCCCAGTAWWWTYCGAGKAAMGCTTGCRCCCTATCRYATTWT
CMGCGGCTGCTKGKSACGAAGATTAKCCMGTGCTYATTTCTYTGSRRKCCSSTCMTC
CYTACCMKKYWTGCMGYSCGKAMWGGATKTCTWWCMCCASAWAGSGSCTYTACCA
GCCCGMGCTGCTGCACCATGCCKGGMTGSCATGGATCAGCATTGCSCCMATKKGTC
AATMTKMMSCATGCCTGCCTCCGGTAGGATCTGACCGGTYGTCAGTYCAGWGGCGT
GAATCCCACTTCAGACCWGGCTACGGAYTGACCGCTTTGRGTGAGCTGWTTAAGCC

2. Στην Εικόνα 16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων που υποβλήθηκαν σε καθαρισμό μετά την PCR. Το στάδιο αυτό λειτουργεί ως ποιοτικός έλεγχος, επιβεβαιώνοντας τόσο την επιτυχία της διαδικασίας καθαρισμού όσο και το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος. Με τη χρήση του λογισμικού Gel Analyzer εκτιμήθηκε ότι το μήκος των παραγόμενων αλληλουχιών κυμαίνεται περίπου στις 1500–1600 βάσεις. Επίσης η παρουσία μίας και μόνο ζώνης ανά δείγμα υποδηλώνει την απουσία επιμολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς, καθώς και την έλλειψη υπολειμμάτων από την PCR.



Εικόνα 16: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης σε gel αгарόζης δειγμάτων PCR μετά τον καθαρισμό τους.