

# Biorazgradnja polistirenskih mikroplastičnih čestica bakterijskom kulturom *Bacillus cereus*

---

**Badurina-Petričević, Amadea**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:020860>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO**

**Amadea Badurina Petričević**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO**  
**ZAVOD ZA INDUSTRIJSKU EKOLOGIJU**

**Amadea Badurina Petričević**

Biorazgradnja polistirenskih mikroplastičnih čestica bakterijskom kulturom

*Bacillus cereus*

**DIPLOMSKI RAD**

Mentor: doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Neposredni voditelj: Martina Miloloža, mag. ing. oecoling.

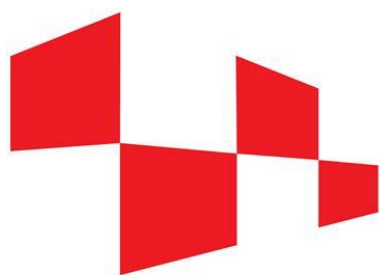
Članovi ispitnog povjerenstva:

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović

dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, rujan 2022.



**HRZZ**

Hrvatska zaklada  
za znanost

*Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ (IP-2019-04-9661) Hrvatske zaklade za znanost na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

## *Zahvale*

*Veliku zahvalnost, u prvom redu, želim izraziti svojoj mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić što mi je omogućila izradu ovog diplomskog rada pod njezinim stručnim vodstvom. Zahvaljujem Vam na podršci, pristupačnosti, strpljenju, savjetima, uloženom trudu i vremenu.*

*Zahvaljujem se asistentici mag. ing. oecoing. Martini Miloloži na savjetima i velikodušnoj pomoći prilikom izrade rada, pozitivnom stavu te prenesenom teorijskom i praktičnom znanju.*

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za industrijsku ekologiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije te tvrtki Comprehensive Water Technology d.o.o. na omogućenom radu u laboratoriju, korištenju uređaja i ugodnoj atmosferi.*

*Hvala dragoj kolegici i prijateljici Luciji Anzulović koja je svojom nesebičnošću uvijek bila tu za mene kroz studentske dane te bila podrška i pomoć tijekom izrade ovog rada.*

*Hvala mami Marinki, tati Zoranu, bratu Dominiku i svim članovima moje obitelji koji su mi pružili bezuvjetnu podršku, motivaciju, ljubav, vjeru i bez kojih ne bih ostvarila ovaj uspjeh te ću im na tome biti zauvijek zahvalna.*

## SAŽETAK

"Tradicionalna" plastika koju dobivamo iz ugljena, prirodnog plina i nafte jedna je od ekološki štetnijih tvari koje proizvodi čovjek, no ona je vrlo važna i korisna za izgradnju kvalitetnog životnog okruženja. Plastika je iznimno primjenjiv materijal; transparentan, isplativ, lagan, jak i izdržljiv, te posjeduje svojstva koja ga čine korisnima u medicini, poljoprivredi, domaćinstvu te u industrijskoj primjeni. Iako su navedena svojstva poželjna, vrlo stabilna struktura plastike otežava proces biorazgradnje. Plastični materijali se prekomjerno koriste, neodgovorno odbacuju te kao takvi opstaju u tlu, moru i slatkovodnim ekosustavima te se razlažu na manje čestice. Sve plastične čestice manje od 5 mm nazivaju se mikroplastikom (MP). Kroz godine istraživanja, utvrđeni su štetni učinci aditiva koji se dodaju plastici tijekom procesa proizvodnje. Stoga je od izuzetne važnosti pronaći učinkovitu metodu uklanjanja mikroplastike iz okoliša. Sadašnje znanje o aerobnoj biorazgradnji ističe potencijal mikrobnih kultura za uklanjanje mikroplastike iz okoliša. U ovom radu ispitala se biorazgradnja polistirena (PS) primjenom bakterijske kulture *Bacillus cereus* pri određenim optimalnim uvjetima. Plan eksperimenta biorazgradnje dizajniran je prema punom faktorskom planu. Na temelju preliminarnih pokusa odredili su se značajni čimbenici za biorazgradnju PS-a. Tijekom procesa pratio se broj izraslih stanica bakterija (CFU), koncentracija ukupnog organskog ugljika (TOC), ukupnog ugljika (TC) i anorganskog ugljika (IC) te je provedena LC/MS analiza u svrhu identificiranja otpuštenih aditiva s površine MP-a ili nastalih razgradnih organskih produkata. Uzorci su okarakterizirani FTIR-ATR analizom. Na kraju svih procesa biorazgradnje ispitana je i ekotoksičnost filtrata primjenom bakterije *Vibrio fischeri* radi utvrđivanja postojećih potencijalnih štetnih učinaka na ispitivani organizam. Eksperimentalni rezultati obrađeni su korištenjem statističke analize varijance (ANOVA). Rezultati pokusa ukazuju da je bolji rast bakterije *Bacillus cereus* uočen pri **najmanjoj veličini čestica** (<300 μm), **najmanjoj vrijednosti koncentracije** (50 mg/L) i **najnižem broju okretaja** (100 o/min). S obzirom na navedene optimalne uvjete, ispitivana bakterijska kultura ima sposobnost biorazgradnje MP-a.

**Ključne riječi:** plastika, mikroplastika, polistiren, biorazgradnja, značajni čimbenici, puni faktorski plan, *Bacillus cereus*

## ABSTRACT

"Conventional" plastic, derived from coal, natural gas and petroleum, is one of the most polluting substances produced by man, but it is very important and useful for building a livable environment. Plastic is extremely versatile, transparent, inexpensive, lightweight, strong and durable, and has properties that make it useful in medicine, agriculture, household and industry. Although these properties are desirable, a very stable plastic structure makes biodegradation difficult. Plastics are overused, irresponsibly discarded, and thus survive in soil, marine, and freshwater ecosystems where they decompose into smaller particles. All plastic particles smaller than 5 mm are called microplastics. Over the years, research has identified the harmful effects of additives added to plastics during the production process. Therefore, it is extremely important to find an effective method to remove microplastics from the environment. Current knowledge on biotechnological aerobic biodegradation shows the potential of microbial cultures to remove microplastics from the environment. In this work, the biodegradation of polystyrene (PS) was studied using a bacterial culture of *Bacillus cereus* under certain optimal conditions. The experimental design for biodegradation was designed according to the Full Factorial Plan. Based on preliminary experiments, important factors for the biodegradation of PS were determined. During the experiments, the colony forming number (CFU), the concentration of total organic carbon (TOC), total carbon (TC) and inorganic carbon (IC) were monitored, and LC / MS analysis was performed to identify the additives released from the surface of MP and the resulting organic degradation products. Samples were characterized by FTIR-ATR analysis. At the end of all biodegradation processes, the ecotoxicity of the filtrate was tested using *Vibrio fischeri* to determine the potential adverse effects present on the test organism. The experimental results were evaluated using statistical analysis of variance (ANOVA). The experimental results show that better growth of the bacterium *Bacillus cereus* was observed at the smallest particle size (< 300  $\mu\text{m}$ ), the smallest concentration value (50 mg/L) and the lowest rotation speed (100 rpm). Under the mentioned optimal conditions, the tested bacterial culture was able to biodegrade MPs.

**Key words:** plastics, microplastics, polystyrene, biodegradation, significant factors, Full Factorial plan, *Bacillus cereus*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	3
2.1. Mikroplastika .....	3
2.1.1. Mikroplastika u okolišu .....	5
2.1.2. Aditivi u mikroplastici .....	8
2.1.3. Toksičnost mikroplastike .....	10
2.1.4. Ispitivanje ekotoksičnosti primjenom morskog bakterijom <i>Vibrio fischeri</i> .....	13
2.1.5. Mikroplastika u ljudskom organizmu .....	15
2.2. Polistiren .....	17
2.3. Biorazgradnja .....	19
2.4. <i>Bacillus cereus</i> .....	23
2.5. Ostali načini uklanjanja mikroplastike iz okoliša .....	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	30
3.1. Materijali .....	30
3.1.1. Mikroplastika .....	30
3.1.2. Mikroorganizam .....	30
3.2. Mediji i kemikalije .....	31
3.2.1. Hranjivi agar .....	31
3.2.2. Mineralni medij .....	31
3.2.3. Fiziološka otopina .....	31
3.2.4. Etanol .....	32
3.2.5. Otopine za određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterijske kulture <i>V. fischeri</i> .....	32
3.3. Mjerni instrumenti i oprema .....	32
3.4. Metode rada .....	36
3.4.1. Priprema mikroplastike .....	36
3.4.2. Sterilizacija mikroplastike .....	36
3.4.3. Uzgoj bakterije <i>Bacillus cereus</i> .....	36
3.4.4. Određivanje pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika .....	36
3.4.5. Određivanje broja živih stanica bakterija (CFU) .....	37
3.4.6. Određivanje ukupnog, organskog i anorganskog ugljika .....	37
3.4.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i spektrometrije masa .....	37
3.4.8. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama .....	38
3.4.9. Određivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i> .....	38
3.5. Provođenje pokusa biorazgradnje MP PS-a .....	39
3.5.1. Preliminarni pokus - provođenje pokusa biorazgradnje polistirena primjenom <i>Bacillus cereus</i> prema Taguchi dizajnu eksperimenta .....	39



3.5.2. Provođenje pokusa biorazgradnje polistirena primjenom <i>Bacillus cereus</i> prema punom faktorskom planu .....	40
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	43
4.1. Promjena CFU tijekom biorazgradnje PS-a bakterijskom kulturom <i>Bacillus cereus</i> .....	45
4.2. Dizajn eksperimenta.....	50
4.3. Određivanje ukupnog, organskog i anorganskog ugljika tijekom procesa biorazgradnje .....	57
4.4. Praćenje produkata razgradnje i otpuštenih aditiva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (LC/MS).....	58
4.5. Analiza mikroplastike FTIR-ATR spektroskopijom.....	61
4.6. Određivanja ekotoksičnosti filtrata morskom bakterijom <i>Vibrio fischeri</i> .....	63
5. ZAKLJUČAK.....	65
6. LITERATURA .....	67
7. POPIS OZNAKA I SIMBOLA .....	82
8. ŽIVOTOPIS .....	84

## 1.UVOD

Plastični materijali su uglavnom sintetski polimeri sastavljeni od lanaca atoma ugljika s vodikom, kisikom, dušikom, sumporom [1]. Plastični materijali su uključeni u svaku domenu naših života otkako je počela njegova proizvodnja 1950-ih godina, kada je započela povećana proizvodnja plastičnih materijala kako bi zadovoljili svakodnevni zahtjevi cijelog svijeta. U posljednjih 70 godina proizvedeno je 8,3 milijarde tona plastike [2]. Razlog povećanja proizvodnje plastike jest proizvodnja jednokratnih plastičnih materijala koji čine oko 50% svih proizvedenih plastičnih proizvoda. Planeta Zemlja i oceani onečišćeni su zbog ogromnog povećanja odlaganja plastike koja je nije biorazgradiva te se nakuplja u svim sastavnicama okoliša [3]. Od ukupne plastike koja se proizvode u svijetu, samo se oko 21% uspješno iskoristi i oporabi dok ostatak završi odloženo i nagomilano na kopnu ili u oceanima. Plastika koja završi u oceanima ubija milijune morskih životinja uključujući i ugrožene vrste. Zapetljavanje u odbačene komade plastike i gutanje plastičnih materijala neki su od najčešćih razloga koji dovode do smrti mnogih životinja [4].

Pod pojmom MP-a podrazumijevaju se plastične čestice manje od 5 mm. S obzirom na prirodu nastanka MP-e dijelimo na primarnu i sekundarnu. Osim izravnih fizičkih utjecaja, MP-e čestice mogu predstavljati dodatne toksikološke rizike, jer zaostali monomeri, poput stirena u polistirenu (PS), ili dodani aditivi kao što su punila, stabilizatori, usporivači plamena ili plastifikatori mogu se izlučiti iz strukture polimera [5, 6]. Aditivi su uglavnom vezani za polimernu matricu putem slabih van der Waalsovih sila [7] te imaju sposobnost otpuštanja izvan polimerne matrice i na taj način dospijevaju u okolinu [8, 9]. Na primjer, dietilheksil ftalat (DEHP), široko korišteni plastifikator pronađen je u 18 različitih vrsta uključujući makroalge, dagnje i ribe [10]. Naime, poznato je da ovi aditivi, kao što su DEHP i bisfenol-A (BPA) djeluju kao endokrini disruptori [5, 11, 12]. Stoga, biodinamički model ukazuje da gutanje MP-a dovodi do pojačane izloženosti navedenim aditivima [13]. Za odgovarajuću procjenu rizika za žive organizme važno je razlikovati moguće učinke same matrice polimera i aditive koji se mogu izlučiti iz matrice.

Kombinacija fizikalno-kemijskih i bioloških procesa pokazala se najuspješnijim načinom uklanjanja MP-a iz okoliša. U fizikalno-kemijske procese uklanjanja MP-a pripadaju mehanička razgradnja (abrazija, zagrijavanje/hlađenje, zamrzavanje/otapanje, vlaženje/sušenje), fotorazgradnja (najčešće UV svjetlom) i kemijska razgradnja (oksidacija ili hidroliza). Iako je većina sintetičkih polimera koji se nalaze u okolišu u određenoj mjeri osjetljiva na foto ili termo oksidacijsku razgradnju, polimeri poput polietilena (PE),

polipropilena (PP), polistirena (PS) i poli(vinil-klorida) (PVC) koji se najčešće koriste u svakodnevnici, otporni su na hidrolizu i enzimsku razgradnju zbog dugačkog centralnog lanca ugljika [14]. Uz kemijska i fizikalna svojstva plastičnih materijala, važnu ulogu pri mikrobiološkoj razgradnji plastike imaju osobine samih mikroorganizama. Vrlo je bitna rasprostranjenost i zastupljenost različitih organizama u prirodi, kao i uvjeti u kojima oni optimalno rastu (pH-vrijednost, temperatura, vlažnost, koncentracija otopljenoga kisika, nutrijenti). Procjenu biorazgradivosti plastike najbolje je provoditi u laboratorijskim uvjetima sukladno okolišnim uvjetima u kojima se ona najbolje razgrađuje. Biorazgradnja je prirodni proces u kojem neku organsku tvar, mikroorganizmi (bakterije, plijesni, kvasci i njihovi enzimi) koriste kao izvor hrane i pritom ih prevode u jednostavnije spojeve, vodu, CO<sub>2</sub> i mineralne soli [15]. Mikroorganizmi stvaraju dva tipa enzima koji sudjeluju u procesu biorazgradnje i čija je prisutnost neophodna za biorazgradnju. To su ekstracelularne i intracelularne depolimeraze [15]. Izlučivanjem ekstracelularnih enzima (egzoenzimi) izvan stanice izravno na supstrat dolazi do razgradnje polimera na manje fragmente koji mogu difundirati kroz polupropusnu staničnu membranu. Taj se proces naziva depolimerizacija, a enzimi koji sudjeluju u njemu nazivaju se depolimeraze. Nastali fragmenti manjih veličina (oligomeri, dimeri i monomeri) se potom dalje u stanici razgrađuju sve do H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> i/ili CH<sub>4</sub> pomoću intracelularnih enzima. Najčešći oblik reakcije depolimerizacije je hidroliza [1, 15]. Dosadašnja eksperimentalna istraživanja pokazala su sposobnost biorazgradnje plastike više bakterijskih rodova kao što su *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Enterobacter* i *Streptomyces* [16].

U ovom radu proveli su se preliminarni pokusi prema Taguchi dizajnu s ciljem određivanja značajnih čimbenika te glavni pokus prema dizajnu punog faktorskog plana kako bi se odredili optimalni uvjeti biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus cereus*. Provedbom preliminarnog pokusa utvrđeni su značajni čimbenici i raspodijeljeni na tri razine prema dizajnu punog faktorskog plana: raspon veličine čestica (<300 μm, 300-500 μm i 500-700 μm), koncentracija čestica ( 50, 500, 1000 mg/L) i broj okretaja (100, 150 , 200 o/min). Uvjeti koji su se pokazali optimalnim za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus cereus* su **najmanja veličina čestica (<300 μm)**, **najmanja vrijednost koncentracije (50 mg/L)** i **najniži broj okretaja ( 100 o/min)**. Analiza varijance (ANOVA) u programu *Design Expert* primijenjena je kako bi se ispitaio učinak procesnih parametara na odziv logaritamske vrijednost CFU-a u procesu biorazgradnje PS-a. Koeficijent determinacije **R<sup>2</sup>** za biorazgradnju PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* iznosi **0,9069** što pokazuje da je model značajan.

## 2.OPĆI DIO

### 2.1. Mikroplastika

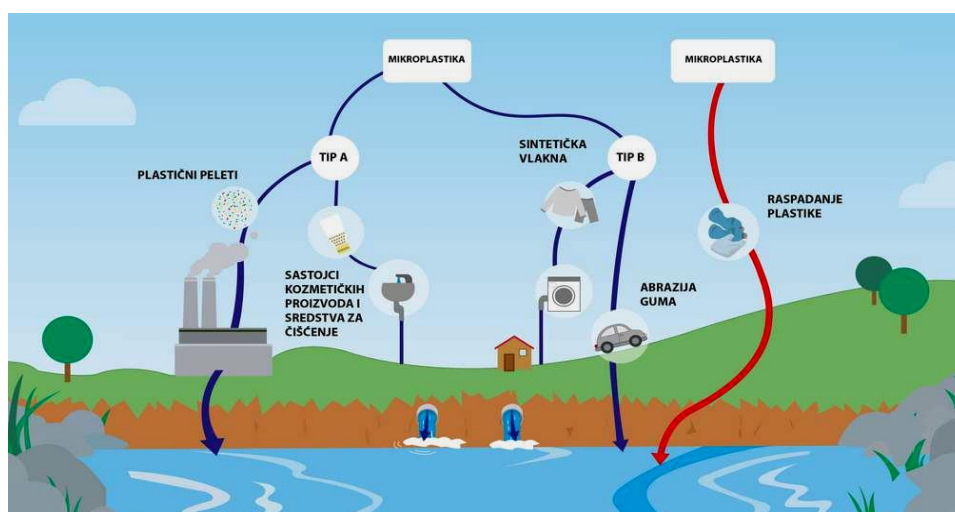
Mikroplastika (MP) su fragmenti bilo koje vrste plastike manji od 5 mm (0,20 in) prema Nacionalnoj upravi za oceane i atmosferu SAD-a (NOAA) [17] i Europskoj agenciji za kemikalije [18]. Podjela MP-a prema veličini čestica prikazana je u **Tablici 2.1.** MP-e uzrokuje onečišćenje ekosustava u kojeg ulazi iz raznih izvora, uključujući kozmetiku, odjeću, ambalažu za hranu i industrijskim procesima. Takve plastične čestice karakterizira različita veličina, oblik, gustoća, boja, kemijski sastav, čvrstoća, žilavost, prozirnost i dr. Oblici čestica heterogene mješavine su razni, od potpuno sferičnih do izduženih vlakana. [19] Trenutno su priznate dvije klasifikacije MP-a. Primarna MP (tip A) uključuje sve plastične fragmente ili čestice koje su po samom postanku promjera manjega od 5 mm prije ulaska u okoliš. To uključuje mikrovlakana iz odjeće, mikrozrnca i plastične kuglice [20]. Sekundarna MP (tip B) nastaje razgradnjom većih plastičnih proizvoda kroz prirodne procese trošenja nakon ulaska u okoliš. Takvi izvori sekundarne MP-a uključuju plastične boce, mreže za pecanje, plastične vrećice, posude za mikrovalnu pećnicu, vrećice čaja i automobilske gume [21]. Poznato je da obje vrste MP-a opstaju u okolišu u visokim razinama, osobito u vodenim i morskim ekosustavima, gdje uzrokuju onečišćenje vode. Istraživanja pokazuju da 35% sve oceanske MP-a dolazi od tekstila/odjeće na bazi poliestera, akrila ili najlona, prvenstveno zbog erozije odjeće tijekom procesa pranja [22]. Na **Slici 2.1.** prikazana je sudbina primarnog i sekundarnog MP-a (tip A i tip B), a na **Slici 2.2.** su prikazane čestice primarne i sekundarne MP-e. Plastični otpad koji dospjeva do vodenih ekosistema potiče iz različitih izvora, od kojih većina potječe od antropogenih aktivnosti. Djelovanje različitih fizičkih, kemijskih i bioloških procesa na obali rijeka, jezera i mora, neadekvatna infrastruktura za upravljanje otpadom i otpadnim vodama i nekontrolirana oslobađanja industrijskog i komercijalnog otpada smatraju se glavnim izvorima onečišćenja okoliša plastikom. Ovi različiti izvori mogu stvoriti i različite vrste plastike u okruženju, od plastičnih vrećica i boca do čestica MP-a. Jedan od ključnih izvora primarne MP-ekoja dospjeva u vodene ekosustavesu čestice PE, PP i PS koje su prisutne u kozmetičkim proizvodima. Najčešće korištena mikroplastična komponenta u kozmetičkoj industriji je PE, oko 93% pri čemu se procjenjuje da globalna godišnja proizvodnja doseže i do 360 miliona tona. Pored kozmetičkih proizvoda, značajan izvor MP-a

u životnoj sredini predstavlja industrija za proizvodnju plastike u vidu plastičnih smola, granula ili sirovina.

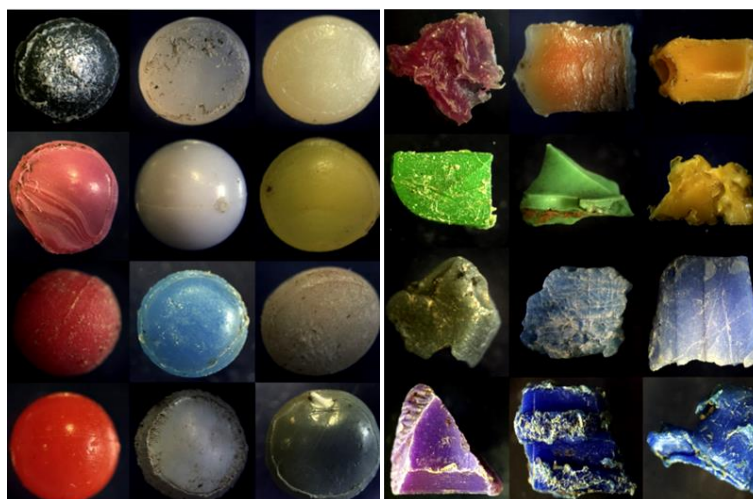
Industrijski proizvedena, plastika, se obično dobiva u vidu granula ili u praškastoj formi sa relativno jednakim dimenzijama [11]. Izvori sekundarne MP-a najčešće imaju porijeklo od sintetičkih vlakana nakon pranja rublja ili mikroplastične čestice nastale utjecajem različitih faktora sredine na razgradnju krupnijih plastičnih predmeta. Najveći problem su otpadne vode, odnosno aktivni mulj koji se koristi u procesu biološke obrade otpadnih voda. Primarna mikroplastika po samom je postanku promjera manjega od 5 milimetara, a sekundarna nastaje usitnjavanjem većih komada plastike. Primarna MP-a predstavlja mikroplastične materije koje su proizvedene za određenu primjenu u industriji ili domaćinstvu. Oni obuhvaćaju plastične granule koje se koriste u sredstvima za čišćenje lica, pastama za zube i kozmetičkim proizvodima kao što su kupke, pilinzi, šminka, puderi, proizvodi za bebe, boje za kosu i slično [23]. Pod sekundarnom MP-a podrazumjevaju se sitni plastični fragmenti nastali raspadanjem većih plastičnih ostataka, kako u vodi tako i na kopnu [24]. Najzastupljenija MP u okolišu je sekundarna MP, najčešće je u obliku kuglica, nepravilnih fragmenata ili vlakana [25].

**Tablica 2.1.** Podjela plastike prema veličini čestica [19].

Kategorija	Kratica	Veličina čestica
Makroplastika	MAP	$\geq 25$ mm
Mezoplastika	MEP	$< 25$ mm – 5 mm
Mikroplastika	MP	$< 5$ mm – 1 $\mu$ m
Nanoplastika	NP	$< 1$ $\mu$ m



**Slika 2.1.** Sudbina plastičnog otpada (tip A i tip B) [26].



**Slika 2.2.** Primarna (lijevo) i sekundarna MP-a (desno) [19].

### 2.1.1. Mikroplastika u okolišu

Porastom količine proizvedene plastike u posljednjih 100 godina, plastika je postala nepoželjan materijal te glavni problem od globalne važnosti jer je uočeno da MP-e dospijeva u sastavnice svih biosfera (**hidrosfera, atmosfera i litosfera**). Plastika se vremenom akumulira u okolišu i razgrađuje pod utjecajem okolišnih čimbenika na sve manje i manje čestice štetno djelujući na okoliš i čovjeka. Najveći udio MP-a nalazi se u vodenim ekosustavima odnosno hidrosferi, a nešto manji udio čestica MP-a pronađen je u litosferi i atmosferi [27].

- **Mikroplastika u zraku**

Glavni izvori MP-a u zraku su čestice iz sintetičke odjeće, erozije sintetičkih guma, građevnog materijala, industrijska emisija te plastični fragmenti namještaja [28]. Godišnja proizvodnja plastičnih tekstilnih vlakana porasla je za više od 6% godišnje, dosegnuvši 60 milijuna metričkih tona, što je uključuje oko 16% svjetske proizvodnje plastike. Razgradnja plastičnih vlakana proizvodi vlaknastu mikroplastiku (MP). Vlaknasti MP-e detektirani su u atmosferskim padalinama, kao i u vanjskom zraku i zraku unutar prostorija [29]. Vlaknasti MP-e podliježe fotooksidativnoj razgradnji u okolišu, te zajedno s djelovanjem vjetra i/ili abrazijom dolazi do fragmentiranja na sve manje čestice. Rizik za zdravlje ljudi je zbog mogućeg udisanja vlaknastih MP-a na koje su adsorbirana onečišćivala kao što su policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) koji su genotoksični [30].

Studija iz 2020. iz *Environment International*-a koju je proveo istraživački tim iz Londona, otkrila je 575-1008 čestica MP-a po m<sup>3</sup> zraka u svakom uzorku zraka prikupljenom s vrha zgrade od 9 katova, dvaput tjedno tijekom mjesec dana [31]. Nadalje, studija iz 2019. iz *Science Advances*-a otkrila je visoku razinu MP-a, posebno čestica laka i komadića nitrilne gume, u snježnim padalinama diljem svijeta sve do Alpa i Arktika. U vrlo udaljenim lokacijama kao što su Greenland i Svalbard (maleni, izolirani otok blizu Arktika u Norveškoj) uzorci snježnih padalina sadržavali su čak 1760 MP-a po litri zraka. Studija potvrđuje da MP-e može putovati kroz gornju atmosferu i taložiti se bilo gdje u svijetu [32].

- **Mikroplastika u vodenim ekosustavima**

Najveće količine MP-a nalaze se u morima i oceanima. Rijeke prenose MP-e u oceane [33], a procjenjuje se da 80% morskog plastičnog otpada potječe iz kopnenih izvora [34]. Istraživanja pokazuju da se svake godine oko 8 milijuna tona MP-a ispušta u oceane [35] te se pretpostavlja da će se do 2050. godine u morima i oceanima nalaziti više plastike nego ribe [36]. MP-e štetno utječe na gotovo 700 vodenih vrsta u svijetu, uključujući morske kornjače, pingvine, rakove [37]. Također, 50 milijardi kilograma plastike koja se trenutno nalazi u oceanima uključuje 23 milijarde kilograma aditiva koji će prije ili kasnije biti otpušteni u oceanske ekosustave [38]. Postoji niz načina kako MP-e dopijeva u vodene ekosustave. Primjerice, prilikom obrade kanalizacijskih otpadnih voda čestice MP-a mogu završiti u površinskim vodama zbog filtera koji ne uspiju zaustaviti prolazak MP-a [39]. Oko 54,5% MP-a koja pluta u oceanima je PE, 16,5% je PP, a ostatak uključuje PVC, PS, poliester (PES) i poliamid (PA). PE i PP plutaju na morskoj površini zbog svoje manje gustoće u usporedbi s morskom vodom dok materijali s većom gustoćom poniru dublje u vodenom stupcu [40]. Na **Slici 2.3.** prikazani su oblici, boje i tekstura površine MP čestica pronađenih u sedimentu i površnoj vodi [41].



**Slika 2.3.** Morfologija MP-a pronadenih u sedimentu i površinskoj vodi.

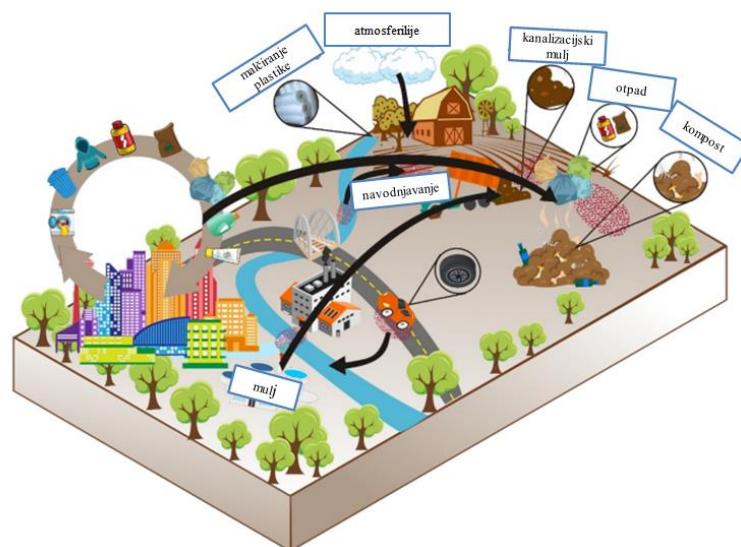
Distribucija i transport MP-a ovisi o mnogo čimbenika, kao što su vremenski uvjeti i fragmentacija, biološko obraštanje, plime i oseke te jake struje. Kina, koja je najveći proizvođač plastike u Aziji s 29,4%, ima ujedno i najveći ekološki problem čija je ugroženost za okoliš iznimno visoka. Istraživanje koje je uključivalo 20 jezera te rijeke Hanjiang i Yangtze pokazuje da koncentracija MP-a u tim vodama varira od 1660 do 8925 čestica po m<sup>3</sup> [42]. Jadransko more je prema količini i zastupljenosti plastičnog otpada, najonečišćenije u Europi nakon sjeveroistočnog dijela Sredozemnog i Keltskog mora [43]. U sjevernom Jadrano detektirane su izrazito visoke koncentracije MP-a, prosječne vrijednosti od oko 406 000 čestica/km<sup>2</sup>, što je do sad među najvišim zabilježenim koncentracijama u Mediteranskom moru. Naime, istraživanjem na 10% uzoraka MP-a, utvrđeno je da 80% PE čestica. U srednjem Jadrano su u 95 % uzorkovanih riba pronadene čestice MP-a, a 80% ispitivanih riba sadržavalo je više od jedne vrste MP-a [44]. Analizom MP-e čestica u Južnom Jadrano identificirano je 16 različitih polimernih vrsta od kojih je najzastupljeniji bio PE s udjelom od 41,2% [45].

- **Mikroplastika u tlu**

U današnje vrijeme sve više dokaza pokazuje da je MP-e sveprisutana u tlu. Međutim, nedostaje kvantifikacija, standardizacija i metodologija za prikupljanje, obradu i analizu uzoraka tla [46]. Izvori nakupljnja MP-a u tlu prikazani su na **Slici 2.4.** [47]. Veći dio MP-a koji se pronalazi u tlu dopijeva iz kanalizacijskog mulja i gnojiva koji se koriste u poljoprivredi, a drugi dio izvora MP-a u tlu predstavlja razgradnja plastičnih proizvoda koji se nalaze na obradivoj zemlji djelovanjem atmosferskih uvjeta, fragmentacije plastičnog otpada i plastičnih proizvoda na odlagalištima otpada, odlaganje otpada u prirode te navodnjavanje



otpadnim vodama [48]. Širenje MP-a u tlu uključuje horizontalnu i vertikalnu migraciju, biološki i nebiološki transport [49]. MP-e površini tla može vrlo lako horizontalno migrirati zbog površinskog otjecanja ili vjetera, a porozna priroda tla pogoduje silaznoj vrtikalnoj migraciji MP-a [50]. MP-e može utjecati na biofizička svojstva tla, pH, strukturu, plodnost i hranjive tvari i mikroorganizme u tlu [51]. U pojedinim regijama svijeta nalazimo do 5 redova veličine MP-a, primjerice u mulju prikupljenom u Čileu pronađeno je 18 000-41 000 MP/ kg. Vlakanasta i fragmentirana PE i PP MP je najčešća vrsta MP-a koja se pronalazi u tlima [52].



Slika 2.4. Izvori nakupljanja MP u tlu.

### 2.1.2. Aditivi u mikroplastici

Kako bi se ispunili različiti zahtjevi tržišta, komercijalni polimeri su modificirani s dodacima odnosno aditivima. Dodavanje aditiva polimerima za proizvodnju komercijalno korisne plastike je tehnologija koja se stalno mijenja zbog pronalaska novih materijala, promjena cijena, poboljšanih strojeva za obradu, promjena potreba kupaca, zakona o zaštiti okoliša, itd. [53]. Iako svjetska potrošnja plastike sada iznosi 176 Mt i raste za oko 5% godišnje [54], većina plastike koja se danas koristi primjenjiva je samo u prisutnosti niza aditiva. Čak i u samim začecima proizvodnje plastike, kada je imala ograničenu komercijalnu upotrebu i bila samo zanimljivost, aditivi su bili neophodni. Prvi sintetski komercijalni termoplast, celuloid, uspješna je priča o aditivima, kada je kamfor dodan kako bi se celulozni nitrat učinio fleksibilnim [55]. Učinak kamfora kao aditiva ili plastifikatora neovisno je otkrio Alexander Parkes u UK (svoj je proizvod nazvao "Parkesine") te John i Isaiah Hyatt u SAD-u („Celuloid“) [56].

Plastificirani PVC razvijen je 1930-ih korištenjem dialkil ftalata, a ključ za obradu krutog PVC-a bio je razvoj toplinskih stabilizatora kao što su metalni sapuni, olovne soli i organokositrenski spojevi. Svjetlosni stabilizatori su prvi put korišteni u celuloznom nitratu kao premazi na ambalaži za zaštitu pakiranog ulja i hrane [57]. Ubrzo je uslijedila upotreba benzofenona i fenil salicilata za zaštitu plastike od vremenskih utjecaja odnosno starenja [58]. Kako bi se primjerice optimizirala učinkovitost udarne čvrstoće za određenu plastiku, potrebno je uzeti niz varijabli u obzir. To uključuje metodu dodavanja aditiva, koncentraciju aditiva, njegovu veličinu čestica i distribuciju čestica. Općenito, veličine čestica aditiva su 1 mm [59]. Njihove koncentracije su obično manje od 1%, ali može se kretati od 0,1% naviše do 10% za pojedine usporivače gorenja [60]. Budući da elastomerni aditivi za povećanje udarne čvrstoće postoje kao diskretne gumene čestice, njihov utjecaj na modul i čvrstoću modificirane plastike je relativno nizak, dok su udarna čvrstoća i istežanje značajno povećani kao što pokazuju podaci za ojačani PS u **Tablici 2.2.** [59]

**Tablica 2.2.** Utjecaj elastomernog aditiva na mehanička svojstva polistirena [59]

Svojstvo	PS	Ojačani PS
Udarne čvrstoća / J/ m	13-21	26-570
Vlačna čvrstoća / Mpa	34-83	10-48
Vlačni modul/ Gpa	2,7-4,1	1,0-3,4
Elongacija / %	1,0-2,5	2-80

PS je čist i proziran, lako se proizvodi i ima dobra mehanička i toplinska svojstva. No, PS je lomljiv polimer i omekšava se pri 100 °C. Pri povišenim temperaturama započinje razgradnja i može doći do otpuštanja mješavina niskomolekularnih spojeva i stirena. Specifični aditivi se ugrađuju za postizanje karakteristika proizvoda koje ovise o krajnjoj upotrebi. Polistirenski aditivi uključuju antioksidanse, UV stabilizatore, maziva za obradu, antistatike i usporivače gorenja. Uz PS, aditivi stvaraju složenu matricu za ekstrakciju i naknadnu identifikaciju korištenjem konvencionalnih otapala i kromatografske metode. Tri glavna čimbenika se moraju uzeti u obzir pri razvoju analitičke metode za analizu polimernih aditiva: 1) sami aditivi nisu čisti spojevi, 2) aditivi su netopivi u polimernoj matrici, i 3) aditivi su niskih koncentracija. Analitička tehnika, dakle, prvo mora odvojiti aditiv od polimera [61]. U **Tablici 2.3.** navdeni su uobičajeni komercijalni aditivi koji se dodaju u PS matrice. Korištenje antioksidansa, usporivača gorenja, maziva i stabilizatora u procesu proizvodnje štiti termoplastiku od oksidacije i biorazgradnje, pridonoseći kvaliteti i korisnosti.

Bisfenol A, na primjer, široko se koristi kao antioksidans i stabilizirajući materijal u polimernim proizvodima [18]. Ostali aditivi uključuju antimikrobna sredstva (koriste se u pakiranju hrane za očuvanje roka trajanja), te boje i pigmente (često se koriste za poboljšanje estetike svojstva materijala) [19]. Primjerice, nanočestice srebra su korištene kao antimikrobno sredstvo u plastičnim materijalima za pakiranje hrane [23]. Nanosrebro oštećuje bakterijske stanice slabljenjem stanične membrane i uništavajući enzime koji transportiraju hranjive tvari unutar stanica, čime se produžuje rok trajanja hrane [24]. Tehnologija stabilizatora ima za cilj produljenje vijeka trajanja plastike koja se koristi u vanjskom uvjetima, osobito u djelovima svijeta koje imaju visoke temperature i duge ljetne sezone [25]. UV stabilizatori ili apsorbenti svjetlosti, na primjer, djeluju na zaštitu polimera od oštećenja UV zračenjem kao što je promjena boje, pucanje, lomljivost ili drugi nepoželjni gubitak fizikalnih svojstava. Neki tipični UV stabilizatori su benzofenoni, amini i benzotriazoli.

**Tablica 2.3.** Uobičajeni aditivi koji se dodaju PS-u, njihova doza i učinak. [60, 61, 62]

Aditiv	Doza	Učinak
2-(20-hidroksi-50 metilfenil)benzotriazol (Tinuvin P)	0,2 -0,3 %	UV stabilizator
Aliciklički bromid	4%	Antioksidans
Stearinska kiselina	1000–2500 ppm	Mazivo
Tetrabromobisfenol A	10-20%	Usporivač gorenja
Tris nonil fenil fosfit (Wytox)	0,2 %	Antioksidans
Heksabromociklododekan	< 1%	Usporivač gorenja
Cink stearat	1000–1800 ppm	Mazivo

### 2.1.3. Toksičnost mikroplastike

Fragmentirani ili na drugi način usitnjeni plastični materijali u obliku MP-a ili NP-a stvaraju sve više primjetne probleme u okolišu. Poremećaj fiziologije i ponašanja organizma zbog MP-a i NP-a su naširoko dokumentirani za morske beskralješnjake. Neki od učinaka se očituju i kod većih morskih kralješnjaka kao što su ribe. **Tablica 2.4.** prkazuje sažetak nedavnih studija u kojima su navedeni toksikološki i patološki učinci MP/NP-a na ribe. MP/NP korišteni u navedenim studijama uglavnom su PS ili PE.

Važan opći fenomen koji treba napomenuti je da su toksikološki efekti obično uzrokovani od manjih plastičnih čestica. Primjeri većih čestica PS-a (oko 100  $\mu\text{m}$  ili više) nemaju značajan učinak u brojnim studijama [63, 64]. Ingestija MP-a može dovesti do abnormalnih ponašanja u pogledu hranjenja i kretanja odraslih jedinki i ličinki [65-67], kao i reproduktivnih problema [68]. U novije vrijeme, zabilježeni su mogući učinci MP-a na mikrobiotu crijeva sisavaca, kao i stanična i metabolička toksičnost na miševima kao pokusnim modelima. Ljudi se izlažu MP-u uglavnom ingestijom, budući da se MP-e nalazi u hrani i ambalaži, no udisanje je također jedan od puteva unosa MP-a.

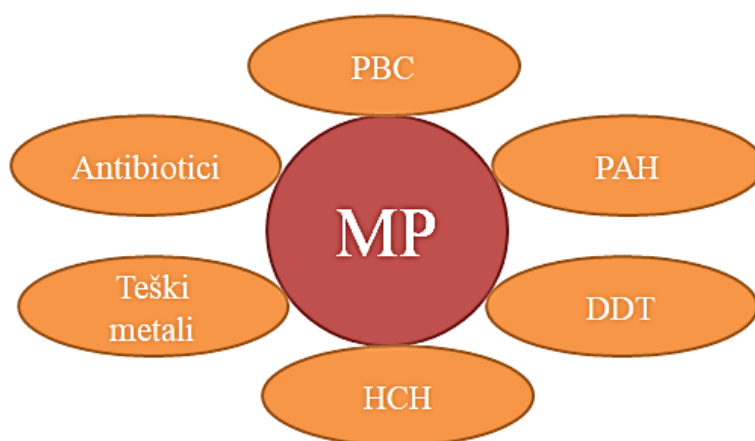
Akutne i kronične patofiziološke posljedice izloženosti MP-a u sustavu sisavaca, posebice ljudi, još uvijek nisu potpuno razjašnjene [75]. Također, treba napomenuti da neke organske i anorganske komponente (npr. bisfenol A (BPA), tributilkosit, Zn, Pb) se iz plastike oslobađaju u okoliš.

**Tablica 2.4.** Sažetak studija toksikoloških i patoloških učinaka MP-a PS-a na ribe.

Vrsta ribe	Vrsta i veličina PS-a	Toksikološka, patološka i bihevioralna opažanja	Izvor
<i>Oryzias melastigma</i>	PS (10–11 $\mu\text{m}$ )	Povećana smrtnosti, smanjenje prosječne duljine i težine ličinki i odraslih jediniku, značajno smanjenje proizvodnje jaja ženkih jedinki	Wang i sur. 2019. [68]
<i>Danio rerio</i>	PS (5 $\mu\text{m}$ ) + Cd	Povećana akumulacija Cd u jetri, crijevima i škrgama, oksidativna oštećenja i upale tkiva	Lu i sur. 2018. [69]
<i>Danio rerio</i>	PS (70 nm, 5 $\mu\text{m}$ , and 20 $\mu\text{m}$ )	Histopatologija jetre (upala i nakupljanje lipida), povišenje enzima antioksidativnog stresa, promjene u metabolizmu jetre	Lu i sur. 2016. [70]
<i>Sebastes schlegelii</i>	PS (0.5 i 15 $\mu\text{m}$ )	Promjene u ponašanju, smanjenje brzine plivanja riba i raspon kretanja, povećana potrošnja kisika i izlučivanje amonijaka, smanjenje rasta	Yin i sur. 2019. [71]
<i>Oryzias latipes</i>	PS (10 $\mu\text{m}$ )	Smanjenje broja jajašaca ovisno o dozi kod zrelih ženki, natečeni enterociti i histološke promjene usne šupljine, glave, bubrega i slezena	Zhu i sur. 2019. [72]
<i>Carassius auratus</i>	PS (5 $\mu\text{m}$ )	Inhibicija rasta ličinki riba na, ubrzan broj otkucaja srca ličinki, smanjena brzina plivanja, histopatološke promjena crijeva, libera i škrga, te oštećenja kože i mišića, povišeni markeri oksidativnog stresa	Yang i sur. 2020. [73]
<i>Tigriopus japonicas</i>	PS (10 $\mu\text{m}$ )	Povećanje ROS-a s promjenama u GSH i enzimskoj aktivnosti	Chio i sur. 2019. [74]

Veći problem stvaraju toksične tvari koje se u prirodnom okruženju adsorbiraju na njezinu površinu [76]. Čestice MP-a imaju izrazitu sposobnost adsorbiranja štetnih tvari, što ih čini još opasnijima za žive organizme (**Slika 2.5.**). Adsorpcija je općenito proces vezanja tvari na površinu nekog materijala [77]. Iako imaju mali promjer, imaju veliku aktivnu površinu i na sebe vežu brojne onečišćujuće tvari poput teških metala, farmaceutika, polikloriranih bifenila (PBC), policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH), diklordifeniltrikloretan (DDT) te pesticida [78].

Interakcija MP-a s metalima kao što su kadmij, živa i drugi toksični elementi u tragovima [79] potencijalno može poslužiti kao vektorski prijenos onečišćujućih tvari u žive organizme. Adsorpcija navedenih onečišćivala može dovesti do kombiniranih i potencijalno pojačanih toksičnih efekata. Stoga se ne može zanemariti niti neizravna toksičnost uzrokovana mikroplastikom.



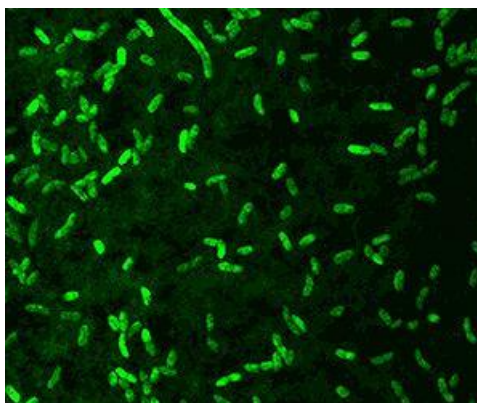
**Slika 2.5.** Adsorpcija štetnih tvari na mikroplastiku [80].

Razlagači (bakterije) i primarni proizvođači (mikroalge) imaju važnu ulogu u vodenom ekosustavu [81]. Nastanjuju gotovo sve vodene okoliše, uključeni su u kruženje hranjivih tvari i protok energije do viših trofičkih razina [82]. Međutim, kada se procjenjuje toksičnost, istraživanja o učincima MP-a na bakterije i mikroalge još uvijek su vrlo ograničena. NP-e ne izaziva nikakve ekotoksikološke učinke na bakteriju *Vibrio fischeri* [83], za razliku od MP-a koji su odgovorni za smanjenje luminiscencije bakterija pri visokim koncentracijama (3600 mg/L) [84]. Što se tiče primarnih proizvođača, NP-e i MP-e ne utječu na rast i fotosintezu nekoliko vrsta morskih mikroalgi [85] u prirodno relevantnim koncentracijama (~0,5 mg/L) [86]. Suprotno tome, učinak inhibicije rasta javlja se pri ekstremno visokim koncentracijama, u rasponu od 10 mg/L do 250 mg/L [87].

Budući da nema standardne metode za procjenu toksičnosti MP-a za jednostanične organizame, na raspolaganju je nekoliko brzih i jednostavnih metoda uključenih u protokole Međunarodne standardne organizacije (ISO) za procjenu akutne toksičnosti MP-a u bakterijama i mikroalgama: ISO 11348-3:2007, ISO 21338: 2010 i ISO 10253: 2006) [88].

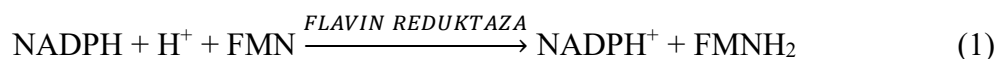
#### **2.1.4. Ispitivanje ekotoksičnosti primjenom morskom bakterijom *Vibrio fischeri***

Bioluminiscencija je vrsta kemiluminiscencije koja se pokreće enzimskom katalizom. Svjetleće bakterije su sveprisutne i prvenstveno nastanjuju morski ekosustav kao slobodni ili parazitski organizmi [89]. Godine 1969. uveden je bakterijski bioluminiscentni test te je kasnije modificiran u enzimsku bioluminiscentnu tehniku. *In vitro* bioluminiscentna reakcija katalizirana enzimima bila je predložena kao test toksičnosti 1990. Trenutno biološki testovi za ispitivanje ekotoksičnosti koriste prirodne bioluminiscentne bakterije kao što su *Vibrio fischeri*, *Vibrio harvey*, *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas leiognathi* [90]. Temeljni princip bioluminiscentnog testa je korelacija promjene kinetičkih parametara bioluminiscentne reakcije s toksičnošću tvari [91]. *Vibrio fischeri* je gram-negativna, štapićasta, nepatogena bakterija poznata i kao *Photobacterium fischeri*. Ime je dobila prema njemačkom bakteriologu Bernhardu Fischeru. Široko je rasprostranjena u okolišu, a obuhvaća suptropsko i umjereno morsko okruženje. Egzistira kao planktonski slobodnoživući organizam ili živi u simbiozi s određenim organizmima poput riba i glavonožaca. U toj simbiozi bakterija služi kao svjetlosni organ koji omogućava zaštitu simbiotskom organizmu maskiranjem ili pomaže prilikom potrage za hranom [92]. Prilikom provedbe testa ekotoksičnosti morska bakterija *Vibrio fischeri* predstavlja bioindikator koji emitira svjetlost ujednačenog intenziteta, danju i noću. Emitiranje svjetlosti bakterije *Vibrio fischeri* sastavni je dio njezinog metabolizma. Mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće je utvrditi svako oštećenje bakterijskog metabolizma nastalog uslijed djelovanja toksične tvari [93]. **Na Slici 2.6.** a prikazan je štapićasti oblik morske bakterije *Vibrio fischeri* [94].



**Slika 2.6.** Štapićasti oblik morske bakterije *Vibrio fischeri*

Metoda određivanja aerobne toksičnosti u skladu je sa normom HRN/ EN ISO 11348-1:2000 en, *Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri, Method using freshly prepared bacteria*. Metoda se temelji na procjeni smanjenja fiziološke aktivnosti čiste kulture bakterija *Vibrio fischeri* u prisutnosti toksičnih tvari, odnosno otpadne vode. Određivanje toksičnosti prema bakterijama *Vibrio fischeri* zasniva se na bioluminiscenciji koja nastaje oksidacijom molekule luciferina (falvin-mononukleotid, FMN). Mehanizam se temelji na redukciji FMN u FMNH<sub>2</sub> u prisutnosti reduciranog oblika nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH) i enzima falvin-reduktaze, jed. 1:



FMNH<sub>2</sub> se potom oksidira u FMN u prisutnosti molekulskog kisika, aldehida i enzima luciferaze pri čemu se emitira plavozelena svjetlost valne duljine 490 nm, jed. 2:



Suspendirana kultura bakterijskih stanica izlaže se rastućem nizu koncentracija toksične tvari, odnosno sve većem udjelu otpadne vode u smjesi, pri čemu se svi ostali parametri u testu održavaju konstantnima. Mjeri se intenzitet luminiscencije na početku testa i nakon 15, odnosno 30 minuta. Instrument očitava dva rezultata: EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> koji predstavljaju volumni udio (%) uzorka pri kojemu dolazi do 20%-tnog, odnosno 50%-tnog pada luminiscencije. Navedena metoda je primjenjiva za ispitivanje aerobne toksičnosti svih otpadnih voda, kao i otopina toksičnih tvari, uz pravilnu pripremu uzoraka [95].

Heinlaan M. i sur. [96] ispitali su toksičnost NP-PS čestica veličina 26 i 100 nm u 9 pokusa. Na *V. fischeri*, *R. subcapitata*, *D. magna* uvrđena je toksičnost nedijaliziranih čestica PS-a. Nakon dijalize uzorka toksičnost čestica nije dokazana. Name, toksičnost nedijalizirane nanoplastike bila je "lažno pozitivna" zbog prisutnih aditiva.

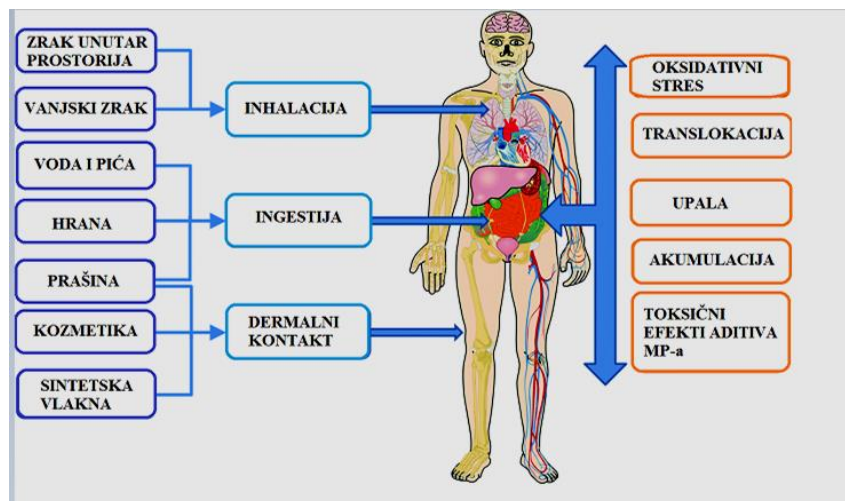
### 2.1.5. Mikroplastika u ljudskom organizmu

MP-e je sveprisutna u okolišu te se putem hranidbenog lanca prenosi trofičkim razinama sve do čovjeka kao krajnjeg potrošača. MP-e se u ljudski organizam može unijeti inhalacijom čestica MP-a iz zraka, dermalnim putem kroz kožu te ingestijom [97]. Na **Slici 2.7.** prikazani su putevi kojim čovjek unosi MP-e u organizam, reakcije kojima se prenosi MP-e do unutrašnjosti ljudskog organizma te moguć štetni utjecaj na čovjeka [98].

Mikroplastika sadrži fragmente stabilizatora, maziva, punila, plastifikatora i drugih kemikalija koje proizvođači koriste kako bi plastici dali poželjna svojstva, kao što su prozirnost, fleksibilnost i trajnost. Međutim, mnoge od tih kemikalija klasificirane su kao otrovne i štetne za ljudsko zdravlje. Nekoliko starijih studija pronašlo je dokaze plastike u ljudskom tijelu. Znanstvenici su otkrili aditive kao što su bisfenol A (BPA) i ftalate u ljudskom urinu. Međutim, do sada nijedna objavljena studija nije izravno ispitala učinak ovih sitnih plastičnih čestica na ljudsko zdravlje. U novoj studiji objavljenoj u časopisu *Environment International*, istraživači u Nizozemskoj razvili su metodu analize ljudske krvi za otkrivanje MP-e [99]. U navedenoj studiji analizirala se krv 22 zdrava dobrovoljca. Za ovu studiju, znanstvenici su tražili čestice koje bi se mogle apsorbirati kroz membrane u ljudskom tijelu. Filtrirali su krv kako bi prikupili sve plastične čestice između 700 nm i 500 000 nm. Kako bi izbjegli bilo kakvo onečišćenje plastikom, istraživači su koristili filtere od staklenih vlakana. Znanstvenici su prepostavili da će detektirati pet uobičajenih plastičnih materijala: poli(metil metilakrilat) (PMMA), koristi se u stomatologiji i drugim medicinskim primjenama, PP koji se obično koristi za pakiranje i tekstil, PS koji se koristi za lagano pakiranje, PE najraširenija plastika koja se koristi za vrećice, polietilen tereftalat (PET) koji se široko koristi u tekstilu i spremnicima za hranu i piće. Uzorci iz filtara obrađeni su dvostrukom pirolizom kako bi se dobili kromatogrami iz kojih su znanstvenici mogli identificirati sadržaj. U krvi više od polovice testiranih pronađen je PET, od kojeg se proizvodi većina plastičnih boca koje svakodnevno konzumiramo. PP nije identificiran ni u jednom uzorku. U pojedinim uzorcima krvi pronađene su i najmanje 3 različite vrste plastike. Postoji nekoliko načina na koje je plastika mogla ući u krvotok - putem zraka, hrane, vode, proizvoda za osobnu njegu kao što su pasta za zube i sjajilo za usne, dentalni polimeri i ostaci tinte za tetovaže.



No, nije utvrđeno što se događa s mikroplastikom nakon ulaska u krvotok. *In vitro* studije su pokazale učinke mikroplastike na stanice. Nedavna studija u Njemačkoj pokazala je da mikroplastične čestice mogu destabilizirati lipidne membrane - barijere koje okružuju sve stanice - što može utjecati na njihovo funkcioniranje [100]. Druga studija pokazala je da MP-e ima mnogo učinaka na stanice, uključujući i smrt stanica. MP-e se nakuplja u jetri, bubrezima i crijevima. Općenito, izloženost MP-u remeti lipidni metabolizam, potiče oksidativni stres i neurotoksične efekte [101]. Također, MP-e može oštetiti crijevnu barijeru, poremetiti signalizaciju površine receptorskih stanica i mijenjati ekspresiju gena u jezgri. Stres koji proizlazi iz navedenih oštećenja može aktivirati urođeni stanični imunološki sustav mogao bi potaknuti proizvodnju ROS-a iz NADP oksidaze (NOX) te više ROS-a zbog narušavanja učinkovitosti procesa lančanog prijenosa elektrona [102]. Proći će neko vrijeme prije nego što bude konačno dokazano na koji način mikroplastika šteti zdravlju. Jedna od najvećih poteškoća u proučavanju učinaka mikroplastike na naše tijelo je nedostatak kontrolne populacije za istraživanje. No, definitivno je da nitko ne može izbjeći redovito gutanje MP-a [103].



**Slika 2.7.** Putevi unosa MP-a u organizam te moguć štetni utjecaj na čovjeka [104].

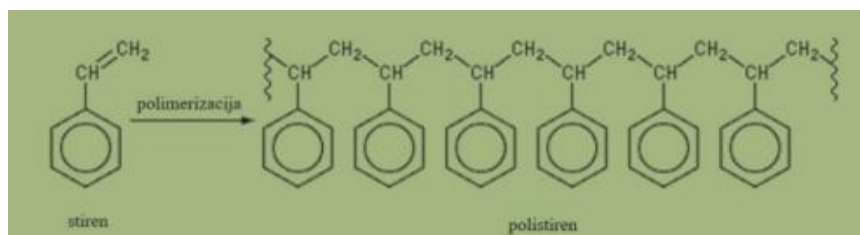
## 2.2. Polistiren

PS je homopolimer sastavljen od ponavljajućih jedinica stirena. Može biti u obliku termoplastike ili termoseta. Prirodno postoji kao prozirni termoplastični materijal. Kruti oblik ovog polimera je vrsta pjenastog materijala (ekspandirani polistiren- EPS) koji je široko primjenjivan, što ovu plastiku čini vodećim u ambalažnoj industriji. PS je netoksičan i bez mirisa pa je vrlo koristan u pakiranju hrane.

PS se uglavnom koristi u četiri vrste proizvoda: GPPS, polistiren visokog utjecaja (HIPS), PS pjena i EPS. Njihove primjene su sažete u **Tablici 2.5.** [105]. Vrlo je inertan što znači da je otporan na kiseline i lužine. Međutim, osim što je inertan, PS nije biorazgradiv, stoga više onečišćuje okoliš [106]. Čisti polistiren je plastomer amorfne strukture koji se dobiva radikalskom polimerizacijom stirena prikazanoj na **Slici 2.8.** [107]. Molekulska masa PS-a kreće se od 100 000 do 400 000 [108]. Lako se otapa u kloriranim i aromatskim organskim otapalima poput benzena i toluena [107]. Od mehaničkih svojstava PS-a istaknuta je visoka čvrstoća (46-55 MPa) i niska elastičnost (isteže se 3-4 %) [107]. Dobra električna izolacijska svojstva PS-a rezultat su njegove čiste ugljikovodične prirode, a izolacijske karakteristike zadržava čak i u vlažnim uvjetima [109]. PS posjeduje svojstvo velike optičke prozirnosti, jeftin je i lako se prerađuje. Međutim, lomljiv je i ima nisku udarnu žilavost. No, bez obzira na navedene nedostatke, često se upotrebljava u svakodnevici i njegova proizvodnja iznosi i do nekoliko milijuna tona godišnje [110]. Fizikalna, kemijska i toplinska svojstva PS-a prikazana su u **Tablici 2.6.**

**Tablica 2.5.** Sažeta primjena PS-a

Vrsta PS-a	Primjena
GPPS/ OPS	Jednokratni pribor za jelo
HIPS	Boce za jogurt i posude za začine
PS pjena	Pladnjevi za hranu, ladice
EPS	Hladnjaci, panele



**Slika 2.8.** Prikaz dobivanja PS-a radikalskom polimerizacijom stirena [107].

Kao i druge plastike, PS se široko koristi zbog svojih dobrih mehaničkih svojstava i relativno niske cijene. PS se široko koristi u građevinskim materijalima (izolacija), pjenu za pakiranje, spremnicima za hranu, čašama za jednokratnu upotrebu, tanjurima, priboru za jelo, kutijama za kasete i diskove. Oko 21 milijuna tona PS-a proizvedeno u svijetu 2013. godine [112].

Kao rezultat takve široke uporabe, PS se akumulira u okolišu, uzrokujući onečišćenje okoliša, probleme ljudskog zdravlja i promjene u ekosustavu zbog toksičnih efekata. PS materijali se mogu reciklirati; međutim, većina pjenastih PS-a završava na odlagalištu. Budući da je pjenasti PS lagan i glomazan, troškovi transporta glavna su komponenta recikliranja. Stopa recikliranja pjenastog PS-a u Sjedinjenim Američkim Državama je porasla na 28% u 2010. godini od oko 20% u 2008. godini [113]. Kako bi se smanjilo onečišćenje okoliša uzrokovano PS-om, primijenjena su neka rješenja kao što je smanjenje upotrebe PS proizvoda i korištenje modificiranih PS materijala koji se mogu biorazgraditi u okolišu. EPS je zabranjen za prodaju i upotrebu na nekim mjestima kao što su San Francisco, Washington DC, Pariz, Toronto, i New York zbog velikog problema u vodenim sustavima [114]. Također, provedene su studije kako bi se pronašli mikroorganizmi koji mogu razgraditi PS u okolišu kao što je tlo, odlagalište otpada i aktivni mulj.

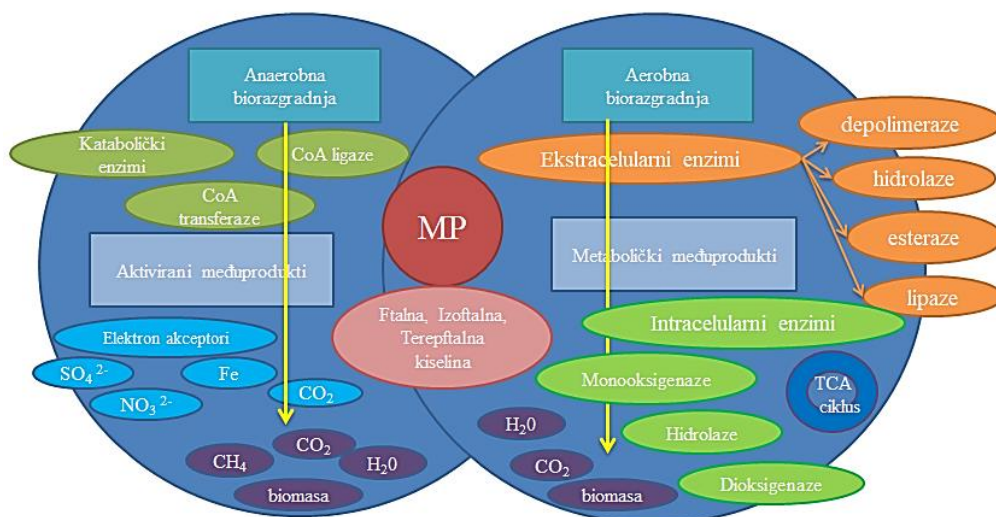
**Tablica 2.6.** Fizikalna, kemijska i toplinska svojstva PS-a [111].

Polimer	Monomer	$\rho / \text{g/cm}^3$	$T_{\text{staklište}} / ^\circ\text{C}$	$T_{\text{talište}} / ^\circ\text{C}$	$T_{\text{raspad}} / ^\circ\text{C}$
PS	$-\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}_2-$	1,04 – 1,06	+1,6	239-275	285

### 2.3. Biorazgradnja

Biorazgradnja je prirodan proces u kojem neku organsku tvar, mikroorganizmi (bakterije, plijesni, kvasci i njihovi enzimi) koriste kao izvor hrane i prevode ih u jednostavnije spojeve, vodu, ugljikov (IV) oksid i mineralne soli [115]. Kombinacija fizikalnih, bioloških i kemijskih procesa dovodi do fragmentacije polimernih materijala, a kombinacija okolišnih čimbenika (sunčeva svjetlost, pH, salinitet, temperatura, sadržaj vlage) te same karakteristike polimera (veličina, gustoća) značajno utječu na razgradnju MP-a. Jedan od okolišnih čimbenika je sunčeva svjetlost prilikom kojeg dolazi do fotodegradacije polimernih materijala. Proces biorazgradnje mikroorganizmima postiže se različitim enzimatskim aktivnostima i cijepanjem veza u makromolekulama. Mikrobna biorazgradnja MP-a uključuje nekoliko koraka: **1)** Početna razgradnja većih polimera u polimere manjih struktura, **2)** Razgradnja polimera do oligomera, dimera i monomera i **3)** Mineralizacija MP-a mikrobnom biomasom [116].

**Slika 2.9.** prikazuje, razgradnju MP-a na ugljikov dioksid (potpuna mineralizacija) pomoću nekoliko enzima, i transformacija proizvedenih međuprodukata kao izvora energije te za proizvodnju biomase. Izvanstanični enzimi (esteraza, lipaza, lignin peroksidi, lakaza i manganovi peroksidi) mikroorganizama neophodni su za povećanje hidrofilnosti funkcionalnih skupina polimera kao što su karbonilne ili alkoholne skupine te mogu poboljšati vezivanje mikroorganizama i daljnju biorazgradnju [117]. Hidrolaze (kao što su lipaze, esteraze, poli(3-hidroksibutirat) depolimeraze i kutinaze) su ekstracelularni enzimi te su uglavnom uključeni u razgradnju kompleksnih spojeva do monomera ili dimera, a kasnije ih mikroorganizmi iskorištavaju kao izvor ugljika i energije [118]. Prianjanje mikroorganizama na površinu MP-a i naknadno stvaranje biofilma uobičajeni je način rasta mikroorganizama. Proces stvaranja biofilma na površini mikroplastike uključuje: **(1)** bioobraštanje, **(2)** razgradnja plastifikatora, **(3)** napad na glavni polimerni lanac, **(4)** hidroliza ili oksidacija i **(5)** prodiranje mikroorganizama u polimernu strukturu. Za učinkovitu biorazgradnju MP-a potrebno je da potencijalni mikroorganizmi posjeduju odgovarajuće enzimske i metaboličke puteve.



**Slika 2.9.** Shematski prikaz enzimske aerobne i anaerobne biorazgradnje MP-a.

U odsustvu biofilma dolazi do sekvencijalne razgradnje MP-a u uobičajene metabolite tzv. ciklusa trikarboksilne kiseline (TCA). Ciklus trikarboksilne kiseline je jedan od glavnih metaboličkih puteva za stvaranje energije iz većine organskih spojeva. U TCA ciklusu, acetil koenzim A (acetyl-CoA) je ključni međuprodukt i koristi se u staničnim aktivnostima poput stvaranja CO<sub>2</sub> procesom oksidacije, formiranja acetata ili u biosintezi.

Glavna uloga TCA ciklusa je stvaranje ATP-a koji osigurava energiju u stanicama mikroorganizama. Dvije molekule ATP-a sintetiziraju se oksidacijom 2 mola acetata, dok se 34 mola ATP-a sintetizira lancem prijenosa elektrona u fosforilaciji [119]. Heterotrofne bakterije imaju glavnu ulogu u procesu biorazgradnje, međutim, sve se više prepoznaje uloga i djelovanje gljiva [120]. Prema literaturi bakterije koje imaju sposobnost razgradnje biorazgradljivih polimernih materijala su *Pseudomonas aeruginosa* [121], *Pseudomonas stutzeri* [122], *Bacillus pumilus*, *Bacillus halodenitrificans* i *Bacillus cereus* [123], *Rhodococcus ruber* [124], *Bacillus gottheilii* [125], *Pseudomonas citronellolis* [126], *Bacillus spp.* [127], *Bacillus cereus* [125], *Brevibacillus sp.* [128], *Pseudomonas sp.* [129], *Thermobifida fusca* [130], *Pseudomonas putida* [131]. Dosadašnja istraživanja o biorazgradnji MP-a mikroorganizmima dana su u **Tablici 2.7.**

Sharma i sur. [122] izolirali su aerobnu bakteriju *Pseudomonas stutzeri* iz prirodnog okoliša te je koristili za ispitivanje biorazgradnje LDPE i PP mikroplastike. Svi pokusi su izvedeni u triplikatu i provodili su se 45 dana, a rezultati su prikazani kao prosjek od tri. Analizirane su promjene u istezanju, naprežanju i vlačnoj čvrstoći. Došlo je do smanjenja postotka istezanja, za koji je utvrđeno da je najveće u PP, 6,4% više nego u LDPE-u i 13,3% u usporedbi s

kontrolnim uzorkom odnosno slijepom probom. Utvrđeno je da se vlačna čvrstoća smanjuje s porastom vremena inkubacije PP-a. Općenito, došlo je do povećanja vlačne čvrstoće, sa smanjenjem istezanja u ranim fazama biorazgradnje.

**Tablica 2.7.** Dosadašnja istraživanja biorazgradnje plastike.

Mikroorganizam	Vrsta MP-a	t (vrijeme provođenja eksperimenta) / d	Značajne praćene promjene i provedene analize	Učinkovitost/ %	Literatura
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LDPE	60 d	Deformacija i formiranje novih funkcionalnih skupina- FTIR-ATR spektroskopija	50,5%	Rajandas i sur. 2012. [121]
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	PP	45 d	Smanjenje postotka istezanja i vlačne čvrstoće- Tenzijometar	-	Sharma i sur. 2004. [122]
<i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus halodenitrificans</i> i <i>Bacillus cereus</i>	PE	21 d	Morfološka ispitivanja biofilma, analiza toplinskih svojstava, analiza razgradnih produkata, analiza indeksa tečenja- GC-MS analiza, TGA-DTA-DSC, MFI	8,5%	Roy i sur. 2008. [123]
<i>Rhodococcus ruber</i>	PS	60 d	Gubitak težine PS mikročestica, kinetika formiraja biofilma-gravimetrija, SEM-pretražna elektronska mikroskopija	0,8%	Mor i sur. 2008. [124]
<i>Bacillus gottheilii</i>	PS	40 d	Strukturne i morfološke promjene - FTIR spektroskopija, SEM analiza	5,8%	Auta i sur. 2017. [125]
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	PVC	45 d	Strukturne i morfološke promjene, promjene u težini - FTIR-ATR, GPC, gravimetrija, TGA	18,58%	Giacomucci i sur. 2019. [126]
<i>Bacillus spp.</i>	PVC, LDPE, HDPE	90 d	Morfološke promjene- SEM, AFM	0,26%	Kumari i sur. 2019. [127]
<i>Bacillus cereus</i>	PS	40 d	Strukturne i morfološke promjene - FTIR spektroskopija, SEM analiza	7,4%	Auta i sur. 2017. [125]
<i>Bacillus cereus</i>	PET	40 d	Strukturne i morfološke promjene - FTIR spektroskopija, SEM analiza	6,6%	Auta i sur. 2017. [125]
<i>Brevibacillus sp.</i>	LDPE, HDPE, PP	140 d	Strukturne i morfološke promjene, topološka svojstva, analiza razgradnih produkata - FTIR, SEM, EDS, AFM, GC-MS, NMR	20-40%	Skariyachan i sur. 2018. [128]
<i>Pseudomonas sp.</i>	PP	40 d	Strukturne i morfološke promjene - FTIR spektroskopija, SEM analiza	17,33%	Habib i sur. 2020. [129]
<i>Thermobifida fusca</i>	PET	21 d	Promjene u težini, određivanje temperatura i toplina faznih transformacija, praćenje kinetike kemijskih reakcija, mjerenje toplinskog kapaciteta – gravimetrija, diferencijalna pretražna kalorimetrijska (DSC) analiza	50 %	Müller i sur. 2005.[130]
<i>Pseudomonas putida</i>	PE	30 d	Morfološke promjene - SEM analiza	75,3%	Saminathan, P. i sur. 2014. [131]

Praćenjem biološke potrošnje kisika (BPK) može se odrediti biorazgradivost mikroplastičnih čestica. Pod pretpostavkom da su bakterije koristile mikroplastične čestice kao izvor organskih hranjivih tvari, gubitak mase povezan je s povećanjem BPK. Kako se razdoblje inkubacije povećavalo, BPK vrijednosti su rasle (razlaganje čestica na manje čestice, aditive) jer su bakterije koristile otopljeni kisik i organske hranjive tvari. Nadalje, povećanje CFU/mL s povećanjem vremena inkubacije ukazuje na to da bakterije koriste plastiku kao jedini izvor ugljika te na taj način podržavaju i pospješuju njezinu biorazgradnju. **Mor i sur.** [124] istražili su kolonizaciju, stvaranje biofilma i djelomičnu biorazgradnju PS-a aktinomicetom *Rhodococcus ruber*. Formiranje biofilma, pomoću bakterijskog soja C208, poboljšalo je biorazgradnju PS-a. Kvantifikacija biomase biofilma provedena je korištenjem kristal violetnog (CV) obojenja i praćenjem sadržaja proteina u biofilmu. Dodatak mineralnog ulja (0,005% w/v), povećalo je biomasu biofilma, a produljena inkubacija do 8 tjedana rezultirala je gravimetrijskim gubitkom težine PS-a od 0,8%. **Skariyachan i sur.** [128] proučavali su biorazgradnju filmova i peleta PE niske i visoke gustoće (LDPE i HDPE) i PP pomoću termofilnih sojeva *Brevibacillus sps.* i *Aneurinibacillus sp.* izlolanih iz postrojenja za obradu otpadnih voda. Pokus je trajao 140 dana. Strukturne i morfološke promjene kao i topološka svojstva krajnjih produkta biorazgradnje nakon 140 dana proučavane su Fourierovom infracrvenom spektroskopijom (FTIR), skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM), mikroskopijom atomskih sila (AFM), energetski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom (EDS), nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR) i plinskom kromatografijom-masenom spektroskopijom (GC-MS). Biorazgradnja kombinacijom osam izolata pri temperaturi od 50°C i pH od 7,2 se pokazala učinkovitijom u usporedbi s primjenom čistih izolata. Postotak smanjenja težine LDPE, HDPE i PP filmova iznosi  $58,21 \pm 2\%$ ,  $46,6 \pm 3\%$  i  $56,3 \pm 2\%$  pri 50°C. Nadalje, uočeno je da je postotak smanjenja težine filmova mnogo veći u usporedbi s smanjenjem težine peleta, zbog veće dostupne površine. Smanjenje težine i filmova i peleta sugeriralo je da su prisutni mikroorganizmi kompatibilni i sposobni razgraditi plastiku. U navedenoj studiji učinkovitost biorazgradnje LDPE i HDPE je 20-40 %, a duže razdoblje inkubacije može pospješiti proces biorazgradnje. Bakterijski sojevi korišteni u studiji **Habib i sur.** [129] izolirani su iz uzoraka antarktičkog tla. Zabilježen je gubitak težine od približno 17,33% nakon inkubacije s čistim PP-om nakon 40 dana pokusa. Promjene u strukturi PP određene su pomoću FTIR spektroskopije na frekvencijskom području  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ . Primjećen je porast pH-vrijednosti od 0. do 40 dana, sa 7,12 na 8,17. Konstanta brzine uklanjanja (K) PP mikroplastike po danu određena je preko kinetike prvog reda i vremena poluživota,  $t_{1/2}$ .

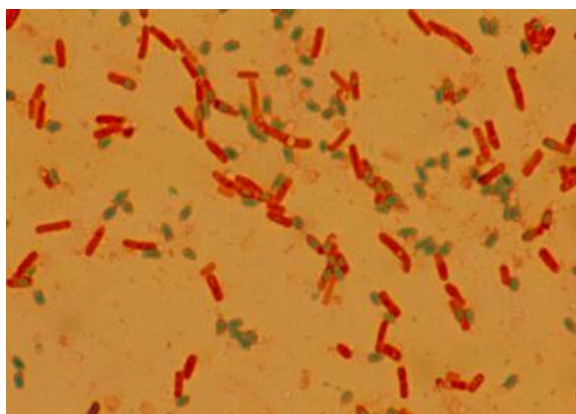
Zabilježena je stopa uklanjanja PP-a od  $0,0047 \text{ dan}^{-1}$  i vrijeme poluživota od približno 147 dana. Müller i sur. [130] proučavali su enzimatsku razgradnju PET-a s *Thermobifida fusca*. *Thermobifida fusca*, termofilna aktinomiceta, jedna je od više sojeva aktinobakterija koje proizvode enzime za hidrolizu PET-a. Nakon tri tjedna inkubacije PET filmovi izgubili su 50% od svoje početne težine, što odgovara gubitku od približno 10 mg. PET filmovi u slijepim probama nisu pokazali značajne promjene u težini (ukupno manje od 1,3%) i stoga se razgradnja jasno može pripisati djelovanju enzima. Biorazgradnja PET-a hidrolazom ThF izoliranom iz aktinomicete *T. fusca* odvija se pri optimalnih  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ . Saminathan i sur. [131] izolirali su *Pseudomonas putida* iz vrtnog tla i ispitali sposobnost razgradnje PE unutar mjesec dana provedbe eksperimenta. Plastični uzorci testirani u ovoj studiji bili su PE vrećica, čaša i poklopac za mlijeko. Među navedenim plastičnim uzorcima, poklopac za mlijeko pokazao se kao najbolje razgradiv plastični materijal (75,3%). Također, ovaj rad potvrđuje da je vrtna zemlja dobar izvor mikroorganizama koji mogu razgraditi plastične materijale. Morfologija površine PE uzoraka analizirana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) prije i nakon razgradnje. Studija dokazuje da je *P. putida* učinkovita bakterija za bioremedijaciju i biorazgradnju plastičnih materijala.

#### 2.4. *Bacillus cereus*

Bakterija *Bacillus cereus* spada u rod *Bacillus*, a sam naziv *Bacillus* dolazi zbog štapićastog, ovalnog oblika bakterija unutar ovog roda [133]. Vrste roda *Bacillus* su sveprisutne u okolišu, te su aerobne ili fakultativno anaerobne, Gram-pozitivne štapićaste bakterije koje stvaraju spore (Slika 2.10.). Veličina vegetativnih stanica ovog roda varira od  $2,5 \text{ }\mu\text{m}$  do  $10 \text{ }\mu\text{m}$ , a u promjeru od  $0,5 \text{ }\mu\text{m}$  do  $1,2 \text{ }\mu\text{m}$ . Optimalna temperatura rasta se kreće od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  do  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  [134]. Endospore koje proizvode nisu samo otporne na nepovoljne fizikalne i kemijske uvjete, već neke vrste imaju neobična fiziološka svojstva koja im omogućavaju da preživljavaju ili napreduju u nepovoljnom okolišu, od pustinjskog pijeska i vrućih izvora do Arktičkog tla i od slatkih voda do morskog sedimenta [135]. Rod uključuje termofilne, psihrofilne, acidofilne, alkalofilne, halotolerantne i halofilne predstavnike koji su sposobni rasti na temperaturama, pH-vrijednostima i koncentracijama soli na kojima bi moglo preživjeti još samo nekoliko organizama [135]. Ekstremna heterogenost ovog roda odražava se u širokom rasponu ekoloških niša koje mnoge vrste zauzimaju. Većina sojeva je katalaza pozitivna, posjeduju flagele po čitavoj površini tijela i sporuliraju u zraku [133]. Ograničenost hranjivih tvari zajednički je okidač sporulacije u rodu *Bacillus*.



Stoga, vrste roda *Bacillus*, tipičnog roda bakterija koje stvaraju endospore, prekidaju vegetativni rast i započinju sporuliranje kada, na primjer, ključni nutrijent kao što je ugljik ili dušik postane ograničen. Endospora može godinama ostati u stanju dormancije, ali nakon što se opet pojave povoljni uvjeti, spora brzo klija i mikroorganizam se vraća u svoje normalno funkcioniranje [134]. Bakterija *Bacillus cereus* je gram-pozitivna, pokretljiva, mezofilna, štapićasta bakterija koja može biti obligatno aerobna ili fakultativno anaerobna, te proizvodi centralne endospore koje mogu biti ovalne ili cilindrične [134]. *B. cereus* je tipični saprofit tla i lako se širi na različite tipove hrane, pogotovo biljnog podrijetla, ali se često pronalazi i u mesu, jajima i mliječnim proizvodima [136]. S obzirom na to da je sveprisutna u prirodi lako se širi kroz sustave proizvodnje hrane i onečišćenje s njom je gotovo neizbježno. Spore su jako hidrofobne i izuzetno otporne na velik broj stresora zbog čega lako prijanjaju na opremu u proizvodnji hrane. Uzrokuje probleme i zbog svoje sposobnosti stvaranja biofilma na različitim supstratima [137]. Neki sojevi *B. cereus* su patogeni za ljude, dok se drugi koriste kao probiotici za životinje [138]. U prirodi, bakterija postoji kao spora i kao vegetativna stanica. Dok je lišena metaboličke aktivnosti, spora *B. cereus* je otporna na ekstremne okolišne uvjete uključujući toplinu, zamrzavanje, sušenje i zračenje te se može smatrati infektivnim sredstvom za ovu bakteriju [133].



**Slika 2.10.** Mikrofotografija bakterijske kulture *Bacillus cereus* [139].

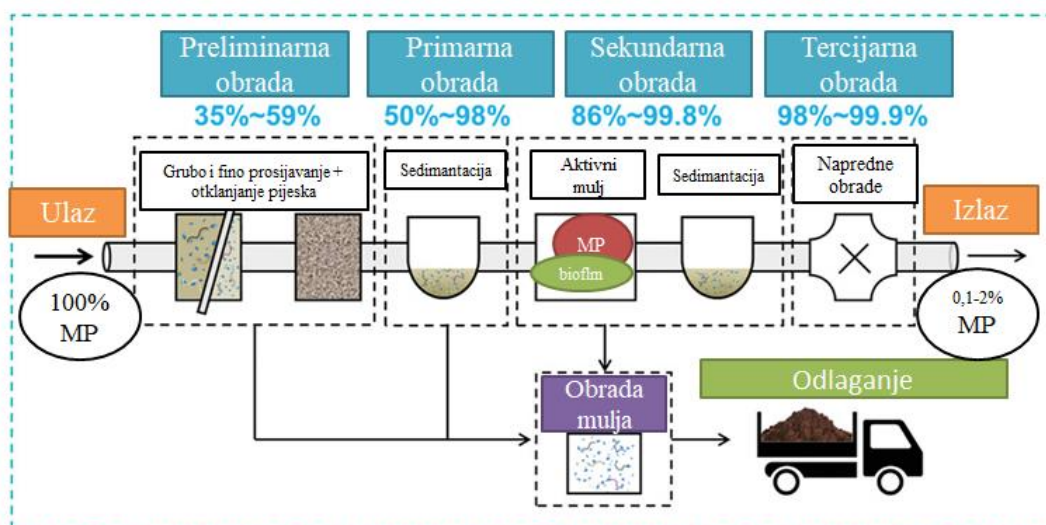
**Roy i sur.** [123] ispitali su biorazgradnju filmova od polietilena niske gustoće (LDPE) koji sadrže tragove prooksidansa (kobaltov stearat) u prisutnosti sojeva *Bacillus pumilus*, *Bacillus halodenitrificans* i *Bacillus cereus* u bazičnim uvjetima. Filmovi su na početku pokusa bili podvrgnuti abiotičkom tretmanu koji je uključivao UV-B zračenje, te su naknadno inokulirani bakterijskim sojevima. Razgradnja polimernog lanca praćena je promjenama mehaničkih, morfoloških, strukturnih i toplinskih svojstava.

UV-B predobrada dovela je do stvaranja ekstrahiranih oksidiranih spojeva, kao i neoksidiranih ugljikovodika niskih molekulskih težina, što je potvrđeno GC–MS analizom. Bakterijski konzorcij navedenih sojeva doveo je do gubitka polimerne mase od  $8,4 \pm 1,37\%$ , što je također bilo popraćeno i porastom broja bakterija. Nadalje, morfološka ispitivanja dokazala su formaciju biofilma koji nije ujednačeno raspoređen na polimernoj površini, što je vidljivo na SEM fotografijama. U studiji **Aute i sur.** [125] osam bakterijskih sojeva (*Bacillus cereus*, *Bacillus gottheilii*, *Bacillus cibi*, *Acinetobacter schindleri*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus aquimaris* i *Stenotrophomonas maltophilia*) izolirano je iz mangrova sedimenta u Maleziji kako bi se ispitala mogućnost uklanjanja mikroplastike biorazgradnjom. Biorazgradnja se ispitivala na UV-tretiranoj mikroplastici: PE, PET, PP i PS. Samo dva izolata, *Bacillus cereus* i *Bacillus gottheilii*, rasla su na polimernoj podlozi koja je sadržavala različite čestice mikroplastike kao jedine izvore ugljika. Proveden je eksperiment s tikvicama na rotacijskim tresilicama radi procjene biorazgradljivosti navedenih izolata. Biorazgradnja se pratila bilježenjem gubitka težine mikroplastike i praćenjem promjene rasta CFU vrijednosti u mineralnom mediju. Biorazgradnja je potvrđena i procjenom morfoloških i strukturnih promjena analizama skenirajuće elektronske mikroskopije i infracrvene spektroskopije Fourierove transformacije. Izračunati postotak gubitka mase mikroplastičnih čestica primjenom *B. cereus* nakon 40 dana bio je 1,6%, 6,6%, i 7,4% za PE, PET, odnosno PS. *B. gottheilii* bilježi postotke gubitka težine od 6,2%, 3,0%, 3,6%, i 5,8% za PE, PET, PP, odnosno PS. U slijepoj probi (neinokuliranoj mikroplastici) nije primijećena promjena mase. Rezultati su pokazali da je *B. cereus* biorazgradio 0,0019 g mikroplastike PS na dnevnoj bazi. Nadalje, primjenom *B. cereusa*, PS mikroplastični polimer bi se za otprilike 363 dana smanjio na polovicu (tj. od 0,50 g do 0,25 g). **Kumari i sur.** [127] proučavali su bakterijsko prijanjanje i biorazgradnju PVC-a, LDPE-a i HDPE-a sojem morskih bakterija AIIW2 nizom analitičkih i mikroskopskih ispitivanja tijekom 90 dana. Na temelju sekvence gena 16S rRNA i filogenetske analize soja AIIW2 dokazana je 97,39% sličnosti s vrstom *Bacillus*. Biorazgradnja plastike određivana je gubitkom težine nakon 90 dana s  $0,26 \pm 0,02$ ,  $0,96 \pm 0,02$  i  $1,0 \pm 0,01$  % za PVC, LDPE i HDPE filmove, redom u odnosu na početne težine. Mineralizacija plastičnih filmova do CO<sub>2</sub> najveća je u LDPE-u, a zatim u HDPE-u i PVC-u. Bakterijska interakcija s polimernim materijalima dovela je do povećane hrapavosti i oštećenja na površini što je dokazano skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) i mikroskopijom atomskih sila (AFM). Oksidativno djelovanje bakterija dokazano je FTIR analizom spektara gdje je primijećeno da je došlo do savijanja alkanskih lanaca (–CH<sub>2</sub> i –CH<sub>3</sub>) i karbonilnih (–CO) skupina u LDPE-u i HDPE-u, dok je do

blagog istezanja došlo u hidroksilnim (–OH) skupinama u PVC-u. Naime, intenzivnija biorazgradnja primjećena je u LDPE i HDPE filmovima u usporedbi s PVC filmovima, što može biti posljedica prisutnosti atoma klora u PVC strukturi koji ga čini teže razgradivim. Biorazgradnja PE filmova u razdoblju od 90 dana proučavana je u studiji **Balsubramanian i sur.** [140] Abiotička razgradnja PE filmova izvedena je kao predobrada fotooksidacijom i termooksidacijom. Biorazgradnja je provedena inokulacijom čiste kulture *Bacillus cereus* Ma-Su CECRI-1 (C1). Promjene mehaničkih svojstava praćene su vlačnom čvrstoćom i postotkom istezanja. Kemijske promjene praćene su infracrvenom (FTIR) spektroskopijom s Fourierovim transformacijama. Utvrđeno je da početna abiotička predobrada pokreće reakciju razgradnje polimernog lanca, te na taj način bakteriji postaje dostupnija površina PE za daljnju biorazgradnju. Površinska istraživanja dokazala su prisutnost polarnih skupina čime se povećava površinska energija snižavanjem kontaktnog kuta i čini površinu polimera hidrofilnom.

## 2.5. Ostali načini uklanjanja mikroplastike iz okoliša

Zbog velike upotrebe MP-a kao aditiva u proizvodima za osobnu njegu i stvaranja mikrovlakana tijekom pranja sintetskog tekstila, komunalne otpadne vode sadrže velik broj MP-a. Prije ulaska u okoliš otpadne vode se pročišćavaju u uređajima za obradu otpadnih voda ( engl. *Wastewater treatment plants*-WWTPs ). Iako se uređaji za prečišćavanje otpadnih voda smatraju pouzdanim filterima za hvatanje svih vrsta onečišćujućih tvari koje postoje u općinskim vodama, dokazano je da je upravo otpadna voda iz uređaja za obradu otpadnih voda ključna točka ispuštanja MP-a u prirodni okoliš [141]. Zbog nedostatka učinkovitih tehnologija za uklanjanje MP-a u procesima obrada otpadnih voda, brojni MP-ovi mogu proći kroz tradicionalne sustave i ući u prirodne vodne recipijente. Štoviše, MP-ovi koji se uklanjaju pročišćavanjem otpadnih voda uglavnom se zadržavaju u mulju, koji se uglavnom izravno odlažu ili dalje prerađuju kao gnojivo za poljoprivredna zemljišta. Na taj se način MP-ovi ponovno mogu vratiti u vodne sustave erozijom tla ili površinskim otjecanjem [142]. Mehaničko prikupljanje MP-a već se dugo primjenjuje kao način uklanjanja onečišćenja MP-om i pri tome se koriste mreže ili automatski kolektori, no takav način pročišćavanja oduzima mnogo vremena i nije u potpunosti učinkovit. Tipičan proces pročišćavanja otpadnih voda u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda sastoji se od četiri faze: preliminarna obrada, primarna obrada, sekundarna obrada i tercijarna obrada (**Slika 2.11**).



**Slika 2.11.** Faze procesa obrade otpadnih voda.

Prvi korak uređaja za pročišćavanje otpadnih voda se sastoji od preliminarne i primarne faze obrade. U prvoj fazi cjelokupnog procesa, krpe, štapići i drugi krupni predmeti se odvajaju tijekom procesa preliminarne obrade kako bi se izbjeglo oštećenje na pumpama i membranama u kasnijim procesima pročišćavanja. Obično se sastoji od grubog prosijavanja (6–150 mm), finog prosijavanja (manje od 6 mm) i koraka uklanjanja pijeska. Velika grmlja masti, ulja i masti sadržana u otpadnoj vodi mogu biti od pomoći pri hvatanju MP-a tijekom preliminarne obrade [143]. Stoga se suspendirani ili plutajući MP-ovi uklanjaju zajedno s drugim netopivim nečistoćama dajući učinkovitost uklanjanja MP-a od  $\approx 35\text{--}59\%$ , gdje se relativno teži MP-ovi mogu nataložiti u flokulama mulja, dok plutajući i lakši MP-ovi ostaju zarobljeni u mastima i uljima tijekom površinskog odvajanja. Kao rezultat toga, oko 50-98% MP-a može se ukloniti nakon primarne obrade [144]. Na učinkovitost uklanjanja MP-a utječe nekoliko karakteristika MP-a, uključujući njihovu veličinu, kemijski sastav i morfologiju. Nakon primarne slijedi sekundarna obrada, gdje se preostale suspendirane krutine i otopljene organske onečišćujuće tvari u vodi mogu dalje ukloniti kombiniranom uporabom aktivnog mulja i spremnika za bistrenje. Osim što su zarobljeni muljem, mikroorganizmi u aktivnom mulju mogu poboljšati učinkovitost uklanjanja MP-a. Zbog formiranja i rasta biofilma na površini MP-a, relativna gustoća MP-a se mijenja, što olakšava potonuće i naknadno odvajanje suspendiranih MP-a [145]. Poznato je da postoji nekoliko bakterija, kao što su, npr. *Bacillus*, *Rhodococcus* i *Nocardia asteroidi*, koji su sposobni razgraditi MP-e, [146] međutim,

niske stope biorazgradnje i kratko vrijeme kontakta između aktivnog mulja i MP-a rezultiraju zanemarivim učinkom na razgradnju MP-a u sekundarnoj obradi.

Ukupna učinkovitost uklanjanja MP-a je 86–99,8% u odnosu na efluent prije obrade uz smanjenje prosječne veličine MP-a [147]. Tercijarna obrada, koja se naziva i napredna obrada, završna je faza cijelog procesa, koji se često koristi za proizvodnju vode za piće visoke kvalitete. Obično se primjenjuje gravitacijsko filtriranje, filtriranje pijeska, disk filteriranje, flotacija otopljenog zraka, biološki aktivno filtriranje, filtriranje membranskim bioreaktorima (MBR) i drugi napredni tretmani kako bi se smanjila koncentracija suspendiranih krutih nečistoća, organskih onečišćivala, teških metala i patogena u vodi [148]. Koristeći navedene tehnike odvajanja, može se postići visoka učinkovitost uklanjanja MP-a od 98-99,9%. Zbog ključnih prednosti visoke učinkovitosti odvajanja i kompaktne veličine postrojenja, tehnike filtracije kao što su mikrofiltracija (MF), ultrafiltracija (UF), reverzna osmoza (RO), dinamičke membrane (DM) i MBR, pokazale su se izvedivima za proizvodnju vode visoke kvalitete iz primarnog ili sekundarnog efluenta [149]. Korištenjem asimetričnih membrana s porama mikrometarske ili nanometarske veličine, nečistoće uključujući bakterije, protozoe, viruse i suspendirane krute tvari mogu se učinkovito ukloniti. Iako su UF i RO pokazali dobru učinkovitost za uklanjanje MP-a, milijuni MP čestica i dalje su ostali u otpadnim vodama nakon ovih tretmana [150]. Nadalje, razvoj kemijskih procesa za razgradnju dovelo je do mogućnosti trajnog uklanjanja MP-a. U tim procesima, katalizatori imaju značajnu ulogu u stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i tako pokreću razgradnju MP-a. Napredni oksidacijski procesi (engl. *Advanced Oxidation Processes*, AOPs) su poznati kao vrlo učinkovita metoda za uklanjanje organskih onečišćivala stvaranjem ROS-a s visokim standardnim redukcijskim potencijalima, kao što su sulfatni radikal ( $\text{SO}_4^{\bullet-}$ ,  $E^0 = 3,1 \text{ V}$ ) i hidroksilni radikal ( $\bullet\text{OH}$ ,  $E^0 = 2,7 \text{ V}$ ) [151]. Zbog njihove jake oksidacijske sposobnosti, veliki izbor onečišćivala, uključujući boje, antibiotike i POPs, učinkovito je razgrađen ili mineraliziran ovom tehnikom [103]. MP-ove je teže biorazgraditi zbog znatno veće molekulske mase u usporedbi s organskim onečišćivalima niske molekulske mase. Iako su prijašnji radovi dokazali da ROS generirani putem AOP-a mogu narušiti površinsku strukturu MP-a, [152] istraživanja AOP-a u razgradnji MP-a iznimno su rijetka. Fotokataliza je ekološki prihvatljiva tehnika koja iskorištava besplatnu i neiscrpu sunčevu energiju. Posljednjih godina značajno se primjenjuje u pročišćavanju vode zbog svoje visoke učinkovitosti razgradnje antibiotika, pesticida i boja [153]. Mehanizam procesa fotokatalitičke razgradnje može se pripisati interakciji između ROS-a (npr. hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ), superoksid ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )) nastalih na površini poluvodiča i organskog supstrata, čime se razbijaju kemijske veze

organskih onečišćujućih tvari do njihove potpune mineralizacije prema  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . Fotopobuđene šupljine, nastale prijenosom elektrona iz valantne vrpce u vodljivu vrpcu, sposobne su izravno oksidirati organske tvari u  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{TiO}_2$  je klasični foto-katalizator sposoban oksidirati organska onečišćenja s visokom učinkovitošću. Također ima nekoliko prednosti, uključujući nisku toksičnost, nisku cijenu i izvrsnu otpornost na kiseline i lužine [154]. Posljednjih godina, materijali na bazi  $\text{TiO}_2$  opsežno su proučavani u fotokatalitičkoj razgradnji MP-a.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroplastika

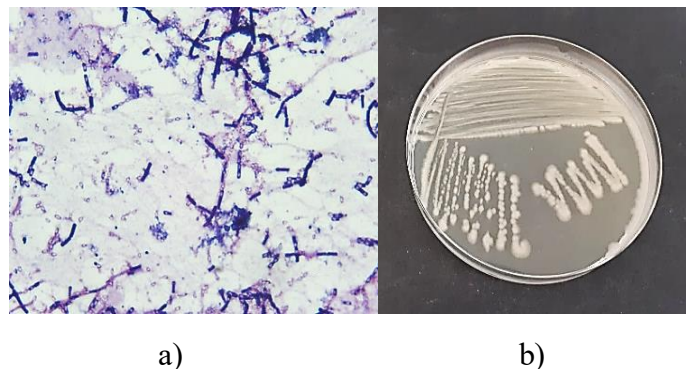
Prilikom provedbe pokusa korištena je mikroplastika polistiren (PS), koja je usitnjena na veličine čestica <math><300 \mu\text{m}</math>, <math>300-500 \mu\text{m}</math> i <math>500-700 \mu\text{m}</math> (Slika 3.1.).



Slika 3.1. Plastični pribor PS korišten za dobivanje MP-a.

##### 3.1.2 Mikroorganizam

Bakterijska kultura *Bacillus cereus* (Slika 3.2.) korištena u pokusu pohranjena je u zbirci mikroorganizama na Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Navedena kultura, *Bacillus cereus* izolirana je iz uzorka aktivnog mulja nastalog prilikom pročišćavanja komunalnih otpadnih voda grada Vrgorca.



Slika 3.2. Mikrofotografija *Bacillus cereus* a) i fotografska snimka izrasle bakterijske kulture *Bacillus cereus* na hranjivom agaru b) dobivene tehnikom iscrpljivanja pri <math>37 \text{ }^\circ\text{C}</math> tijekom 24 h.

## 3.2. Mediji i kemikalije

### 3.2.1. Hranjivi agar

Za uzgoj bakterijske kulture pripremljen je hranjivi agar (HA) prema uputama proizvođača (Biolife Manual, Ingraf, Italija 1991). Podloga je homogenizirana, zagrijana do vrenja i sterilizirana 15 minuta u autoklavu pri 121 °C i 1,1 atm.

### 3.2.2. Mineralni medij

Za provođenja procesa biorazgradnja mikroplastike u dvije Erlenmeyerove tikvice pripravljeno je 1,0 L mineralnog medija (MM) početnih pH-vrijednosti oko 7. pH-vrijednost MM-a se podešavala pomoću 1 M KOH i HCl. Tako pripremljen MM se sterilizirao prije upotrebe i koristio se za pripremu suspenzije bakterijske kulture. MM je pripremljen prema literaturi [155], a njegov točan sastav prikazan je u **Tablici 3.1**.

**Tablica 3.1.** Sastav mineralnog medija.

Tvar	$\gamma$ / g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,1
5 mL elemenata u tragovima:	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,232
ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,174
FeSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,116
CoSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,096
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,022
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,008
MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,008

### 3.2.3. Fiziološka otopina

Za pripremu decimalnih razrjeđenja, odnosno za određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija (eng. *Colony forming units*, CFU), korištena je 0,9% fiziološka otopina. Ona je pripravljena dodatkom 9 g NaCl u 1000 mL deionizirane vode te je prije upotrebe sterilizirana.



### 3.2.4. Etanol

Za sterilizaciju MP korišten je etanol,  $w = 70\%$ , koji je pripremljen u odmjernoj tikvici od 1000 mL. Pomoću menzure odmjereno je i u tikvicu stavljeno 730 mL etanola ( $w = 96\%$ ,  $M = 46,07 \text{ g/mol}$ ,  $\rho = 0,805 \text{ kg/L}$ ), te je do oznake nadopunjeno deioniziranom vodom.

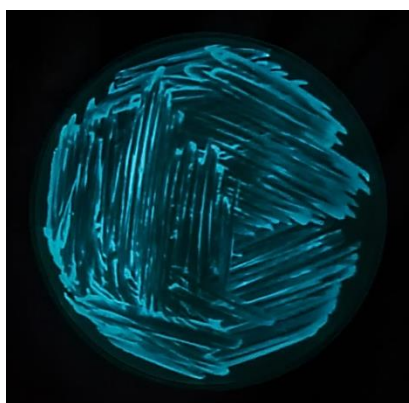
### 3.2.5. Otopine za određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterijske kulture *V. fischeri*

- Otopina za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izoosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (Slika 3.3.) koja je pripremljena otapanjem 20 g NaCl, 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,2 g  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 mL glicerola, 10 g glukoze i 10 g rafinoze u 1 litri deionizirane vode. Tako pripremljena otopina za resuspenziju je prokuhana i ohlađena te joj je pH-vrijednost podešena s NaOH ili HCl tako da se nalazi u rasponu od 6,8 do 7,2.

- Otopina NaCl

2%-tna otopina NaCl-a je korištena kao radna otopina za pripremu niza razrjeđenja prilikom provedbe testa ekotoksičnosti MP-e primjenom bakterijske kulture *Vibrio fischeri*. Ova je otopina pripremljena otapanjem 2 g NaCl-a u 100 mL deionizirane vode pri čemu pH-vrijednost mora biti u rasponu od 6,8 do 7,2.

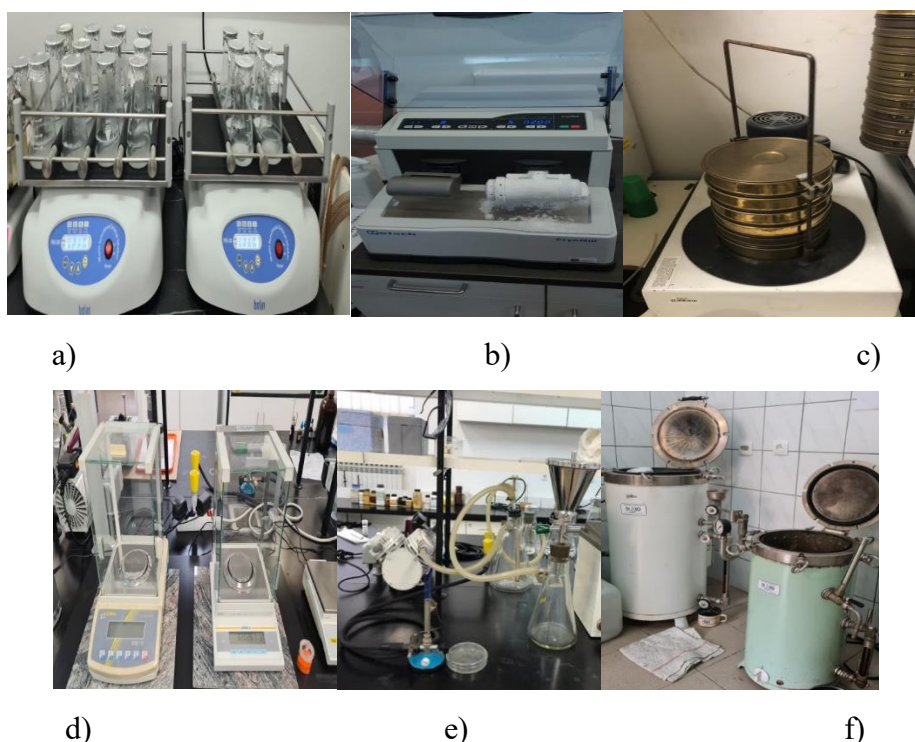


**Slika 3.3.** Luminiscentna bakterija *Vibrio fischeri* nakon 48 h uzgoja na čvrstoj hranjivoj podlozi pri 15 °C.

## 3.3. Mjerni instrumenti i oprema

U radu je korištena rotacijska tresilica (SIA BIOSAN PSU-10i Orbital Shaker, Latvia.). Za usitnjavanje plastičnih materijala korišten je kriomlin nadopunjen s tekućim dušikom (Retsch,

Njemačka), a za prosijavanje MP-a mehanička sita (W. S. Tyler RX-86-1 Sieve shaker, USA). Za precizno vaganje korištena je vaga KERN ALJ 220-4NM. Za filtraciju sterilizirane mikroplastike korišten je membranski lijevak uz vakuum pumpui sterilni celulozno nitratni (C/N) membranski filteri Ahlstrom ReliaDisc™, promjera pora 0,45 μm. Prilikom pripreme decimalnih razrjeđenja korišten je homogenizator. Za sterilizaciju MM-a, hranjive podloge, fiziološke otopine, čistog staklenog posuđa, kao i onečišćenog posuđa, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija. Optička gustoća određivana je na spektrofotometru Hach, Model DR/2400, SAD pri valnoj duljini  $\lambda = 600$  nm. Za uzgoj bakterija, korišten je termostat Termomedicinski aparati, Hrvatska pri 37 °C. Za provedbu pokusa biorazgradnje pri 15 °C upotrebljavao se termostat (Liebherr, FKU 1800-20C/774, Njemačka). U radu je korištena magnetska tresilica WiseStir MSH - 20A za podešavanje pH-vrijednosti MM-a. U pokusima je pH-vrijednost određivana pH elektrodom SenTix® 940, a koncentracija otopljenoga kisika kisikovom elektrodom FDO® 925 pomoću prijenosnog mjerača WTW Multi 340i. Instrument je prije svake upotrebe kalibriran. Navedeni mjerni instrumenti i oprema prikazani su na **Slici 3.4.**





g)

h)

**Slika 3.4.** Mjerni instrumenti i oprema korišteni pri provođenju eksperimenta: rotacijska tresilica a); kriomlin b); mehanička sita c); analitička vaga d); vakumski filtar lijevak e); autoklav f); prijenosni mjerač WTW g); spektrofotometer h).

Na **Slici 3.5.** prikazani su uređaji pomoću kojih se provodila kvalitativna i kvantitativna analiza. Pomoću uređaja za određivanje ukupnog organskog ugljika, TOC-V, Shimadzu, određivao se ukupni ugljik (engl. *Total Carbon*, TC), ukupni organski ugljik (engl. *Total Organic Carbon*, TOC) i anorganski ugljik (engl. *Total inorganic Carbon*, TIC). Na uređaju za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU, uzorci su se razdvajali po masi. Uređaji se nalaze u *spin-off* tvrtki CWT (engl. *Comprehensive Water Technology*) na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. PS karakterizirana je pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama tj. FTIR-ATR spektrometru, PerkinElmer, Spectrum One.



a)

b)



c)

**Slika 3.5.** Uređaji korišteni za praćenje biorazgradnje MP-a: TOC-V uređaj a); uređaj za HPLC b); FTIR-ATR spektrometar c).

Na **Slici 3.6.** prikazan je uređaj Luminometar LUMISTox 300 i termometar LUMISTherm, Hach-Lange GmbH koji su uz liofiliziranu luminiscentnu bakteriju *Vibrio fischeri* korišteni za određivanje toksičnosti filtrata, odnosno vodene faze dobivene nakon procesa biorazgradnje mikroplastike.

Bakterijska kultura *Bacillus cereus* mikroskopirana je pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera) prikazanog na **Slici 3.7.**



**Slika 3.6.** Luminometar LUMISTox 300 i termometar LUMISTherm, Hach-Lange GmbH.



**Slika 3.7.** Svjetlosni mikroskop s kamerom.

## **3.4. Metode rada**

### **3.4.1. Priprema mikroplastike**

Za provedbu pokusa biorazgradnje MP-e korišteni su plastični proizvodi koji se upotrebljavaju u svakodnevnom životu, PS jednokratna ambalaža. Proizvodi su prvo usitnjeni šakrama na manje komade te su zatim usitnjeni u kriomlinu nadopunjenim s tekućim dušikom. Nakon toga slijedilo je sušenje na zraku 24-48 h pri sobnoj temperaturi te prosijavanje pomoću mehaničkih sita određenih veličina pora u svrhu dobivanja čestica veličine: **500-700  $\mu\text{m}$ , 300-500  $\mu\text{m}$  i <300  $\mu\text{m}$ .**

### **3.4.2. Sterilizacija mikroplastike**

Prije same provedbe eksperimenta, čestice PS-a su se sterilizirale pomoću 70% etanola tijekom 10 min pri 160 o/min i sobnoj temperaturi na rotacijskoj tresilici. Čestice MP-a su se izdvojile iz etanola metodom membranske filtracije uz ispiranje sterilnom deioniziranom vodom poštujući sterilnu tehniku rada. Čestice MP-a zaostale na sterilnom membranskom filtru (veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ ) su se pomoću sterilne žlice i pincete prebacile u Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL za postavljanje pokusa.

### **3.4.3. Uzgoj bakterije *Bacillus cereus***

Za preduzgoj kulture pripremljena je 24-satna kultura *B. cereus* uzgojena na HA pri 37 °C. U MM odgovarajuće pH-vrijednosti priređena je suspenzija koja je postavljena na tresilicu tijekom 24 h, 160 o/min pri sobnoj temperaturi. Preduzgoj kulture se provodio u svrhu prilagodbe bakterije na uvjete mineralnog medija, kao i za postizanje log faze rasta.

### **3.4.4. Određivanje pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika**

Tijekom 30 dana trajanja pokusa promjena pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika mjerila se ukupno 2 puta, prvog i zadnjeg dana pokusa biorazgradnje. Promjene pH-vrijednosti pratile su se pomoću pH elektrode spojene na multimeter, a koncentracija otopljenog kisika u uzorku pratila se kisikovom elektrodom, koja je također spojena na multimeter. U svrhu dezinficiranja, prije uranjanja elektroda u tikvice s uzorcima, elektrode su se uronile u izosan, dezinficijens, te su dva puta isprane deioniziranom vodom. Mjerne vrijednosti su zabilježene nakon što su se ustalile.

### 3.4.5. Određivanje broja živih stanica bakterija (CFU)

Za određivanje točnog broja izraslih kolonija bakterije *Bacillus cereus* pripremljena su decimalna razrjeđenja. Broj izraslih kolonija bakterije *Bacillus cereus* izraženog pomoću CFU određen je ukupno šest puta tijekom 30 dana trajanja pokusa. Postupak određivanja CFU sastoji se od inokulacije 1 mL prethodno pripremljenog razrjeđenja u praznu sterilnu Petrijevu zdjelicu koji se potom zalije s HA i dobro homogenizira 7-10 puta u obliku broja osam. Sve Petrijeve zdjelice stave se na inkubaciju u termostatu 24-48 sati pri 37 °C. Nakon inkubacijskog vremena, određuje se broj izraslih kolonija brojanjem uzevši u obzir brojivi raspon od 30 do 300, dok se CFU vrijednost računa prema formuli (3) [156] :

$$\text{CFU / (st/mL)} = \frac{(\text{broj izraslih kolonija})}{\text{volumen upotrebljenog uzorka}} \times \text{recipročnavrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad (3)$$

### 3.4.6. Određivanje ukupnog, organskog i anorganskog ugljika

Za određivanje TOC-a bilo je potrebno izuzeti 0,5 mL uzorka poluautomatskom pipetom sa sterilnim nastavkom te profiltrirati uzorak kroz okrugli membranski filter veličine pora 0,45 μm. Isti postupak proveden je i za TC-a, dok je vrijednost IC izračunata iz razlike TC-a i TOC-a. Za TOC analizu korišten je TOC-VCSH, Shimadzu uređaj. Postupak određivanja TOC-a sastojao se od izuzimanja 0,5 mL uzorka u staklene bočice u koje je dodano 9,5 mL deionizirane vode kako bi ukupan volumen iznosio 10 mL. U staklenu bočicu s uzorkom za mjerenje TOC-a dodano je i 3 kapi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u svrhu neutralizacije anorganskog ugljika. Drugom setu bočica s izuzetim uzorcima istog volumena iz kojih se mjeri TC, kiselina se ne dodaje.

### 3.4.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i spektrometrije masa

LC/MS analiza ili tekućinska kromatografija uz masenu spektrometriju provedena je u svrhu praćenja otpuštanja aditiva s površine čestica mikroplastike i praćenja razgradnih produkata u vodenu fazu tijekom provedbe pokusa biorazgradnje PS-a primjenom *B. cereus*. Prilikom LC/MS analize korištene su dvije pumpe za podešavanje protoka mobilne faze (0,1% mravlje kiseline +MiliQ i acetonitril/metanol) vrijednosti 0,5 cm<sup>3</sup> /min. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 5 μL. S obzirom da se ne zna točan sastav uzorka, korištena je metoda bez kolone.

### 3.4.8. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

Nakon provedbe pokusa biorazgradnje PS-a, čestice su izdvojene metodom membranske filtracije te dodatno isprane sterilnom destiliranom vodom. U svrhu potvrde biorazgradnje, odnosno narušavanja strukture čestica PS-a, krute čestice su analizirane FTIR-ATR spektroskopijom. Uređaj je prikazan predhodno na **Slici 3.4. d)**. Analiza je provedena u svrhu dobivanja spektara te praćenja promjena intenziteta, kao i nastanka, nestanka ili pomaka karakterističnih pikova za PS. Spektri su snimani u području  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ . Prije početka analize provedena je inicijalizacija uređaja. Nakon inicijalizacije, kao i prije svakog mjerenja uzorka, snimljena je pozadina (eng. Background) kako bi se uklonili pozadinski šumovi. Nakon snimanja spektara, njihovo očitavanje i daljnja obrada provedena je u programu IR Solution, EP, Japan.

### 3.4.9. Određivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*

Nakon 30 dana provođenja pokusa biorazgradnje izdvojene su čestice PS-a nakon čega je slijedila provedba testa ekotoksičnosti. Za ispitivanje ekotoksičnosti filtrata (vodene faze dobivene nakon filtracije čestica i bakterije) pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* korišten je navedeni filtrat, suspenzija bakterije *Vibrio fischeri* i 2%-tna otopina NaCl-a. Uzorci su se čuvali na temperaturi  $2-5 \text{ }^\circ\text{C}$  u zatamnjenoj posudi ne duže od 48 h. U slučaju da se uzorak čuvao duže od dva tjedna bilo ga je potrebno čuvati na temperaturi od  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Podešavanje pH-vrijednosti napravljeno je prije ispitivanja s NaOH ili HCl. pH-vrijednost filtrata je prema uputama za korištenje luminometra LUMISTox 300 iznosila između 6 i 8,5. Bakterijska suspenzija pripravljena je na način da se ušicom mikrobiološke eze zahvatilo malo čiste kulture morske bakterije *Vibrio fischeri* te je suspendirana u epruveti napunjenoj 2/3 otopinom za resuspenziju. Tako pripravljena bakterijska suspenzija termostatirana je 15 minuta u termostatu na  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  radi prilagodbe bakterijske kulture uvjetima. Prije provođenja samog testa ekotoksičnosti izmjerena je relativna luminiscencija bakterijske suspenzije *Vibrio fischeri* koja mora iznositi najmanje 1000 da bi se ispitivanje ekotoksičnosti provelo. Test ekotoksičnosti proveden je prema linearnom nizu nakon što je utvrđena valjana vrijednost izmjerene relativne luminiscencije.

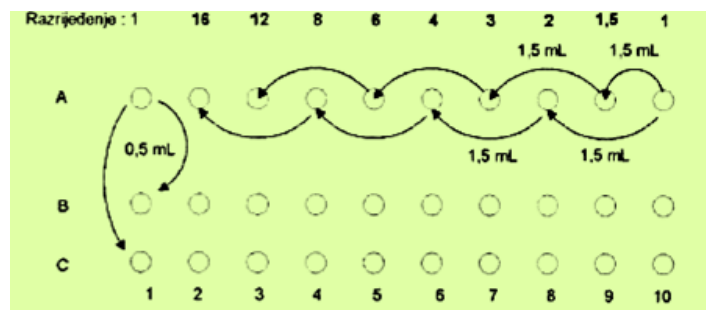
- Linerni niz

1. U prvu kivetu stavi se 2/3 kivete 2%-tne otopina NaCl, u zadnju 2/3 uzorka razrijeđenog onoliko puta, koliko je utvrđeno screening testom. U predzadnju kivetu stavi se 1 mL 2%-tne

otopine NaCl, a u sve ostale kivete stavi se po 1,5 mL 2%-tne otopine NaCl.

2. U A nizu napravi se niz željenih razrjeđenja na način na koji je prikazan na **Slici 3.8**.

3. U sve ostale kivete B i C niza stavi se po 0,5 mL inokuluma.



**Slika 3.8.** Prikaz provedbe testa toksičnosti pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* prema linearnom nizu.

Rezultati ispitivanja bioaktivnosti morske bakterije *Vibrio fischeri* prije i poslije izloženosti filtrata su vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  koje ukazuju na veću ili manju toksičnost ispitivanog uzorka filtrata, odnosno mineralnog medija koji služi kao kontrola. Eksperimentalni rezultat je i vrijednost faktora,  $f$ , koji mora biti oko 1 (0,6 do 1,3).

### 3.5. Provođenje pokusa biorazgradnje MP PS-a

#### 3.5.1. Preliminarni pokus - provođenje pokusa biorazgradnje polistirena primjenom *Bacillus cereus* prema Taguchi dizajnu eksperimenta

Preliminarni pokus trajao je 30 dana. Cilj istraživanja bio je ispitivanje značajnih čimbenika za proces biorazgradnje MP-a, polistirena (PS), primjenom bakterijske kulture *Bacillus cereus*. Pokus se provodio na termostatiranim rotacijskim tresilicama pri 15 °C i 25 °C u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 250 mL, odnosno radnog volumena  $V_R = 100$  mL. Dizajn eksperimenta se provodio prema Taguchi dizajnu koji daje kombinaciju čimbenika na određenim razinama. Prema Taguchi dizajnu, potrebno je bilo odrediti čimbenike i razine pri kojima će se čimbenici ispitivati. Prilikom ispitivanja praćena je promjena optičke gustoće (OG), ukupnog broja izraslih kolonija bakterija (CFU), koncentracije otopljenoga kisika, temperatura i pH-vrijednost, TC, TOC, TIC te razgradni produkti i/ili aditivi potencijalno nastali/otpušteni prilikom biorazgradnje MP-a. FTIR-ATR spektroskopijom okarakterizirana je potencijalna strukturna promjena PS-a.



Za ovaj je pokus bilo predviđeno 7 čimbenika - pH-vrijednost, temperatura, broj okretaja, veličina MP-e, koncentracija MP-e, OG i dodatak glukoze, na 2 razine - minimalna i maksimalna vrijednost. U **Tablici 3.2.** prikazan je raspis ortogonalne matrice  $L_8$  prema Taguchi dizajnu koja se dobiva u programu (*Design Expert 7.0 SAD*), nakon unosa čimbenika i razina.

**Tablica 3.2.** Raspis ortogonalne matrice  $L_8$  prema Taguchi dizajnu.

Pokus	pH-vrijednost / -	$T / ^\circ\text{C}$	veličina MP-e / $\mu\text{m}$	$\gamma_{\text{MP}} / \text{mg/L}$	broj okretaja / o/min	OG / -	$\gamma_{\text{GLU}} / \text{mg/L}$
P1-1	8	15	500-700	1000	100	0,5	0,0
P1-2	6	15	<300	50	100	0,1	0,0
P1-3	8	15	500-700	50	200	0,1	100
P1-4	6	15	<300	1000	200	0,5	100
P1-5	6	25	500-700	50	100	0,5	100
P1-6	8	25	<300	1000	100	0,1	100
P1-8	6	25	500-700	50	200	0,1	0,0
P1-7	8	25	<300	50	200	0,5	0,0

Jedan pokus se sastojao od 16 tikvica. Sastav tikvica pojedinog pokusa činili su: mineralni medij pH-vrijednosti 6 ili 8, suspenzija bakterije *Bacillus cereus* OG vrijednosti 0,1 ili 0,5, te PS veličine čestica 500-700  $\mu\text{m}$  ili <300  $\mu\text{m}$  i koncentracije 1000 ili 50 mg/L. U pojedine pokuse dodano je i 100 mg/L glukoze.

### 3.5.2. Provođenje pokusa biorazgradnje polistirena primjenom *Bacillus cereus* prema punom faktorskom planu

Nakon preliminarnog pokusa postavljen je glavni pokus koji je trajao 30 dana. Svrha glavnog pokusa bila je određivanje optimalnih uvjeta biorazgradnje čestica PS-a bakterijom *Bacillus cereus*. Pokus se provodio na termostatiranim rotacijskim tresilicama pri sobnoj temperaturi u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 250 mL, odnosno radnog volumena  $V_R = 100 \text{ mL}$ . Dizajn eksperimenta se provodio prema punom faktorskom planu koji daje kombinaciju čimbenika (A, B, C) na određenim razinama (1, 2, 3). Za puni faktorski plan potrebno je odrediti čimbenike i razine na koje bi bili ispitani čimbenici. Za ovaj su pokus predviđena tri čimbenika – veličina MP-e (A), koncentracija MP-e (B) i broj okretaja rotacijske tresilice (C) na tri razine – minimalna (1), srednja (2) i maksimalna (3) vrijednost. Nakon unosa čimbenika i razina, prema programu (*Design Expert 7.0 SAD*) se dobiva matrica koja predstavlja broj

pokusa i kombinaciju čimbenika na tri razine za svaki pokus. Jedan pokus se sastojao od 27 tikvica. Popis čimbenika na tri razine prikazan je u **Tablici 3.3**.

**Tablica 3.3.** Popis ispitivanih čimbenika na tri razine prema punom faktorskom planu.

	Razina	1	2	3
A	veličina MP	<300 μm	300-500 μm	500-700 μm
B	γ <sub>MP</sub>	50 mg/L	500 mg/L	1000 mg/L
C	broj okretaja	100 o/min	150 o/min	200 o/min

Tikvica se sastojala mineralnog medija odgovarajuće pH-vrijednosti, suspenzije mikroorganizma *Bacillus cereus* odgovarajuće optičke gustoće, i mikroplastike – PS, odgovarajuće veličine čestica i koncentracije. Kontrolna tikvica (slijepa proba) sadržavala je sve osim čestica MP-a. Na dan postavljanja pokusa pripremila se suspenzija bakterije u mineralnome mediju te se odredila optička gustoća pri valnoj duljini od 600 nm.

Matrica koja predstavlja broj tikvica i kombinaciju čimbenika na tri razine za svaku tikvicu prikazana je u **Tablici 3.4**.

U 0., 3, 7., 14., 21. i 30. danu provođenja pokusa izuziman je uzorak određenog volumena te je određena OG i CFU. Na početku i na kraju svakog eksperimenta određena je pH-vrijednost. Provedena je i TOC analiza, LC/MS analiza, FTIR-ATR spektroskopija te je ispitana ekotoksičnost filtrata nakon procesa biorazgradnje pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*.

U 0. danu određeni su početni uvjeti za provedbu pokusa biorazgradnje čestica PS-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus cereus* koji su prikazani u **Tablici 3.5**.

**Tablica 3.4.** Matrica koja predstavlja broj pokusa i kombinaciju čimbenika na tri razine za svaki pokus.

Pokus	veličina MP/ $\mu\text{m}$	$\gamma_{\text{MP}}$ / mg/L	Broj okretaja o/min
P1	<300	500	200
P2	500-700	500	100
P3	300-500	50	200
P4	<300	50	100
P5	<300	500	150
P6	300-500	1000	100
P7	<300	1000	100
P8	<300	50	150
P9	<300	1000	150
P10	500-700	50	200
P11	<300	50	200
P12	300-500	50	100
P13	500-700	500	150
P14	300-500	500	150
P15	300-500	1000	200
P16	500-700	1000	100
P17	500-700	50	100
P18	500-700	1000	200
P19	<300	1000	200
P20	300-500	1000	150
P21	500-700	1000	150
P22	500-700	500	200
P23	300-500	500	200
P24	<300	500	100
P25	300-500	500	100
P26	300-500	50	150
P27	500-700	50	150

**Tablica 3.5.** Početni uvjeti za pokus biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus*.

MP	$\gamma(\text{O}_2)_0$ / mg/L	pH- vrijednost/ -	$T_0$ / °C	CFU <sub>0</sub> / st/mL	log (CFU)-	$\gamma(\text{TC}_0)$ / mg/L	$\gamma(\text{TOC}_0)$ / mg/L	$\gamma(\text{TIC}_0)$ / mg/L
PS	8,34	7,30	24,6	$9,3 \times 10^6$	6,97	1,64	1,26	0,38

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Plastika predstavlja posljedicu ljudske globalizacije i razvitka čija se negativna strana preslikava u gomilanju otpada i stvaranju potencijalnih opasnih tvorevina njenim raspadanjem u okolišu [157]. Proizvodnja i potrošnja plastičnih materijala porasla je na globalnoj razini zbog svoje svestrane primjene i svojstava poput stabilnosti, izdržljivosti, fleksibilnosti, male težine i visoke tržišne vrijednosti [158]. Veći dijelovi plastike se raspadaju na manje različitim mehanizmima kao što su fizikalni, kemijski i biogeokemijski procesi [159] i pretvaraju se u "mikro/nanoplastiku" (MP/NP) [160]. Najčešći izvori MP-a na kopnu predstavljaju nepravilno odloženi otpadni materijal (plastična ambalaža, neuređeni deponiji, nepravilno odlaganje industrijskog otpada) i industrija (proizvodnja plastike, kozmetička industrija, tekstilna industrija). Najčešće detektirane vrste MP-a u vodenim ekosustavima su PE, PP, PVC, PS, poliuretan (PUR) i poli(etilen-tereftalat) (PET) [161]. Manje od 5% MP-a se reciklira, a najvećim dijelom se akumulira upravo u vodenim ekosustavima [162]. Morski organizmi zabunom zamjenjuju hranu sa česticama MP-a koja se akumulira u njihovom probavnom traktu i uzrokuje razne probleme [9]. Konzumacijom raznih namirnica onečišćenih MP-om čovjek zatvara krug hranidbenog lanca i sam postaje žrtvom svog djelovanja [163]. Također, sve je veća zabrinutost za zdravlje ljudi i zbog hidrofobnih onečišćujućih tvari, kao što su farmaceutici, pesticidi, i/ili teški metali, koji mogu biti adsorbirani na površini MP-a te na taj način potencijalno ulaze u hranidbeni lanac. Mikroorganizmi pokazuju značajnu sposobnost razgradnje brojnih kemijskih spojeva, uključujući i plastiku. Istraživanje metabolizma mikroorganizama i enzimske aktivnosti, kao i primjena različitih pristupa i tehnika za ubrzanje ciljanih procesa biorazgradnje, postaje temelj za biotehnologiju zbrinjavanja plastičnog otpada koji pomaže u rješavanju ekoloških problema povezanih s plastičnim onečišćenjem [164]. Plastika se biološki razgrađuje aerobno u prirodi, anaerobno u sedimentima i odlagalištima i dijelom aerobno i anaerobno u kompostu i tlu. Ugljikov dioksid i voda nastaju tijekom aerobne biorazgradnje, a ugljikov dioksid, voda i metan nastaju tijekom anaerobne biorazgradnje [164]. Bakterije prirodno pretvaraju vrlo složene molekule u manje složene molekule metaboličkim i enzimskim aktivnostima u ekosustavima, što je poznato kao proces biorazgradnje [165]. Različiti biološki čimbenici utječu na višestupanjski proces biorazgradnje plastike [166]. Također, svojstva plastičnih materijala kao što su hrapavost površine, topografija, slobodna energija površine, površinske elektrostatičke interakcije i hidrofobnost površine MP-a utječu na potencijal formiranja bakterioloških biofilmova na površini MP-a [167].

PS, kao najzastupljeniji plastični otpad, teško je biorazgradiv zbog svoje jedinstvene kemijske strukture koja sadrži benzenski prsten vezane za duge linearne alkane [168].

U ovom su se radu proveli eksperimenti biorazgradnje čestica mikroplastike PS-a pomoću bakterijske kulture *Bacillus cereus*. Provedba eksperimenata podijeljena je u dva dijela. Prvi preliminarni pokus proveo se prema Taguchi dizajnu, u svrhu određivanja značajnih čimbenika za biorazgradnju PS-a. U **Tablici 4.1.** prikazani su dobiveni značajni čimbenici za pokus biorazgradnje čestica PS-a. Prilikom ispitivanja značajnih čimbenika za PS pokazalo se da su to veličina čestica, koncentracija čestica PS-a i broj okretaja rotacijske tresilice sa statističkim koeficijentom  $R^2= 0,9997$ . Prema dobivenom postotku značajnosti, najveći doprinos od svih dobivenih značajnih čimbenika ima **veličina MP-a** s doprinosom od 48,52%, a prati ga **broj okretaja** s 41,31%. Mikroorganizmi lakše koloniziraju i stvaraju biofilmove na malim veličinama čestica MP-a [169] te je upravo veličina čestica PS-a značajni čimbenik za proces biorazgradnje. Nadalje, dokazano je da kontinuirana homogenizacija ima bitnu ulogu u održavanju stalne biodostupnosti MP-a mikroorganizmima tijekom provođenja eksperimenta. Niski brojevi okretaja i niske početne koncentracije MP-a pokazale su najbolje rezultate za održavanje suspenzije bakterijske kulture [170].

**Tablica 4.1.** Dobiveni značajni čimbenici za pokus biorazgradnje čestica PS-a primjenom *Bacillus cereus* prema Taguchi dizajnu.

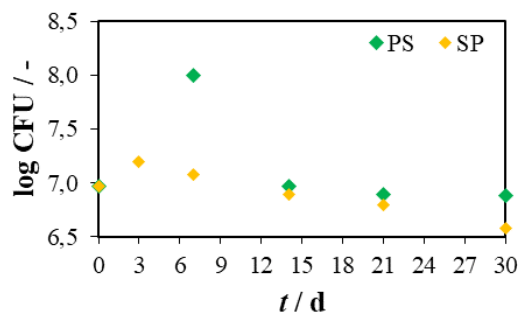
	Čimbenik	Značajnost/ %
<b>C</b>	veličina MP/ $\mu\text{m}$	48,52
<b>D</b>	$\gamma_{\text{MP}}$ / mg/L	5,03
<b>E</b>	Broj okretaja o/min	41,31

S obzirom na navedene značajne čimbenike prema preliminarnom pokusu, proveo se glavni pokus prema punom faktorskom planu u svrhu određivanja optimalnih uvjeta za proces biorazgradnje PS-a. Tijekom pokusa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* pratio se ukupan broj živih stanica bakterije (CFU) te se provela TOC analiza, LC/MS analiza i FTIR spektroskopija. Također, određivala se i ekotoksičnost filtrata na kraju svakog eksperimenta radi utvrđivanja potencijalne ekotoksičnosti. Statističkom obradom u programu **Design Expertu** obrađeni su eksperimentalni podaci čime je utvrđena optimalna kombinacija čimbenika za provedbu procesa biorazgradnje PS-a bakterijskom kulturom *Bacillus cereus*. Eksperimentalni rezultati obrađeni su korištenjem statističke analize varijance (engl. *Analysis of variance, ANOVA*).

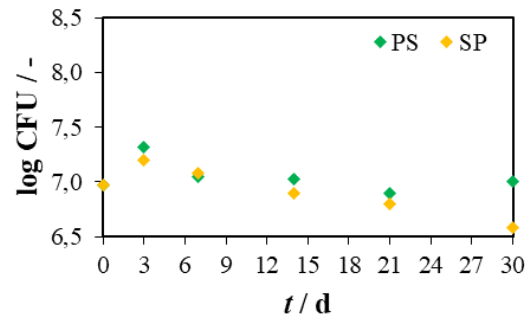
#### 4.1. Promjena CFU tijekom biorazgradnje PS-a bakterijskom kulturom *Bacillus cereus*

CFU vrijednost predstavlja broj izraslih bakterijskih kolonija izraženih po mililitru, a koristi se za mikrobiološku dijagnostiku unutar nekog sustava [171]. CFU vrijednost je u ovom radu služila kao parametar za praćenje tijeka biorazgradnje polimera PS-a pomoću bakterije *Bacillus cereus* tijekom 30 dana provođenja eksperimenta.

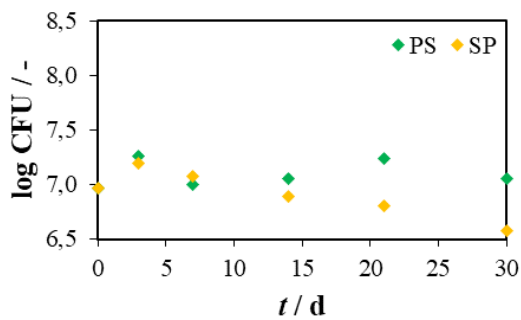
Na **Slici 4.1.** prikazane su promjene CFU vrijednosti bakterijske kulture *Bacillus cereus* u usporedbi sa kontrolom (SP). Promjene su praćene tijekom pokusa biorazgradnje PS-a koji su se provodili pri **100 o/min** unutar 30 dana.



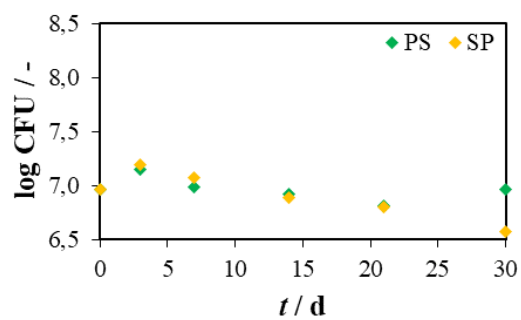
a)



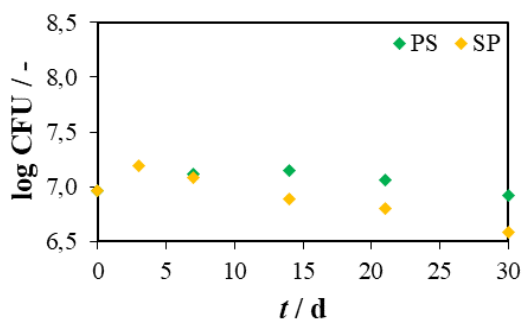
b)



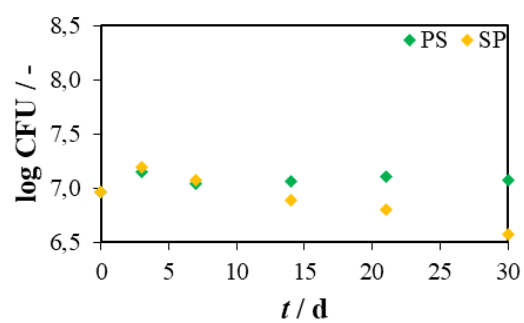
c)



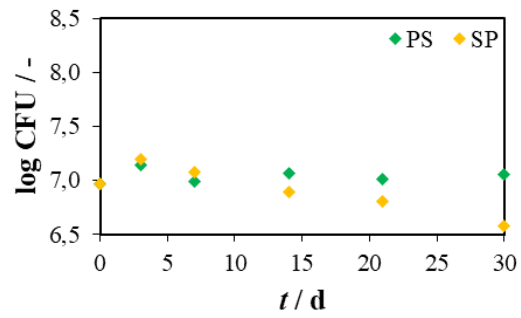
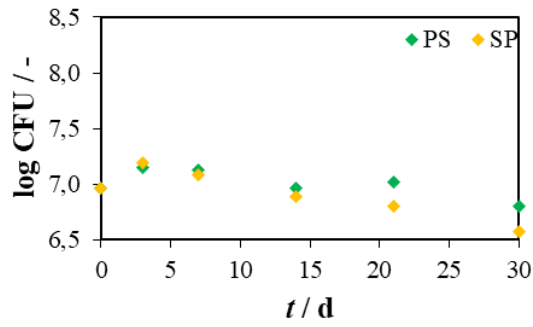
d)



e)

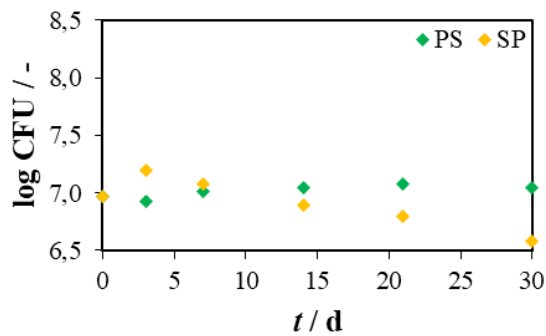


f)



g)

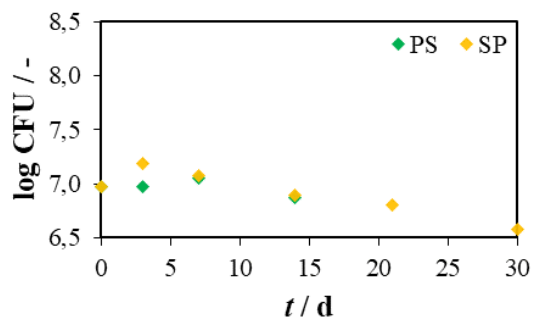
h)



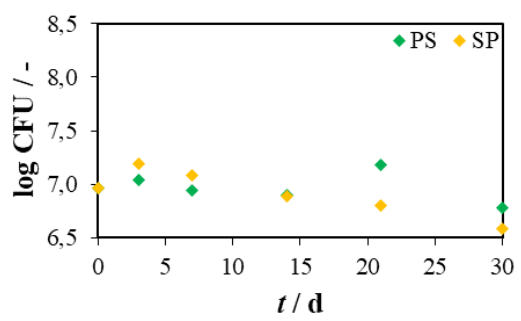
i)

**Slika 4.1.** Promjena logaritamske vrijednosti CFU tijekom procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* za pokuse koji su se provodili pri **100 o/min** a) P24; b) P12; c) P16; d) P7; e) **P4**; f) P17; g) P2 h) P25 i) P6 tijekom 30 dana.

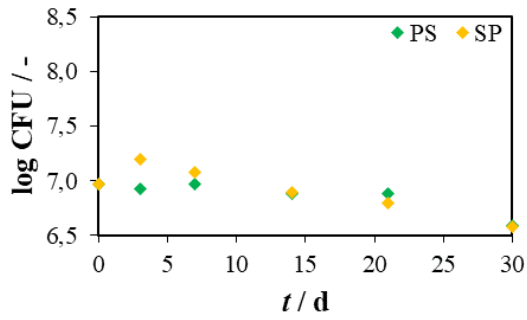
Na **Slici 4.2.** prikazane su promjene CFU vrijednosti bakterijske kulture *Bacillus cereus* u usporedbi sa kontrolom (SP). Promjene su praćene tijekom pokusa biorazgradnje PS-a koji su se provodili pri **150 o/min** unutar 30 dana.



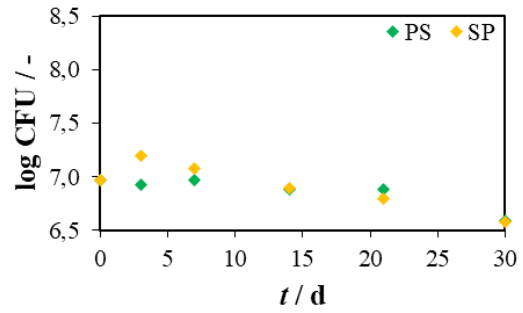
a)



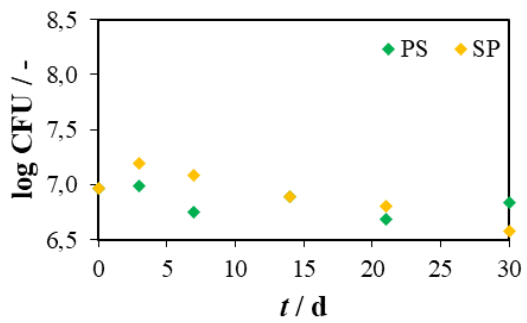
b)



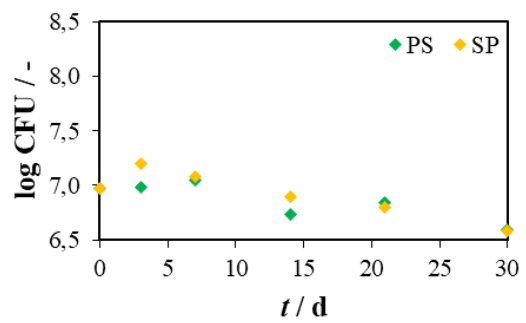
c)



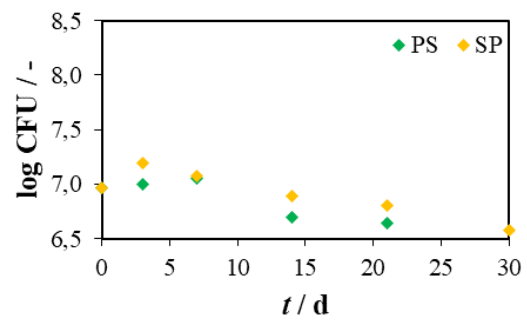
d)



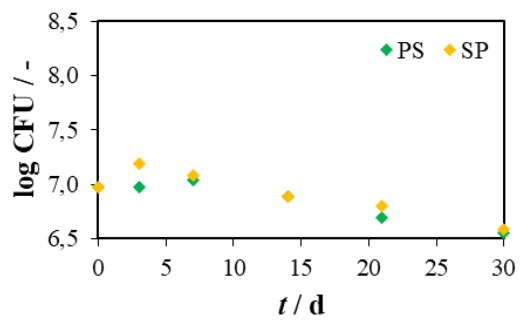
e)



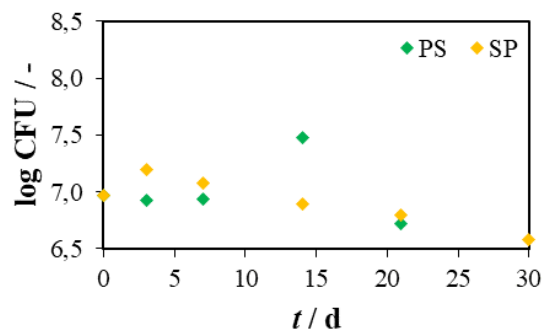
f)



g)



h)

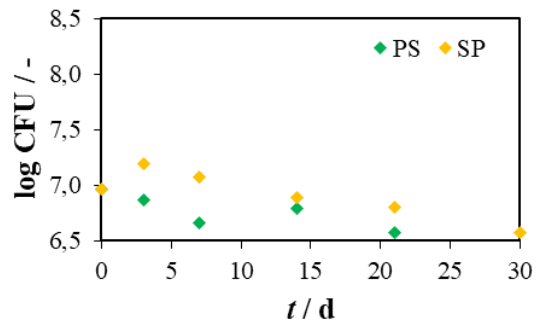


i)

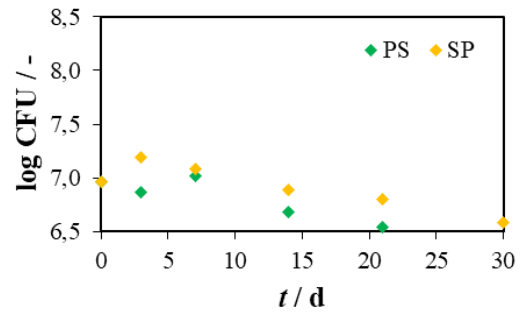
**Slika 4.2.** Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* za pokuse koji su se provodili pri **150 o/min** a) P20; b) P14; c) P27; d) P8 ; e) P26 ; f) P5; g) P13 h) P21 i i) P9 tijekom 30 dana.



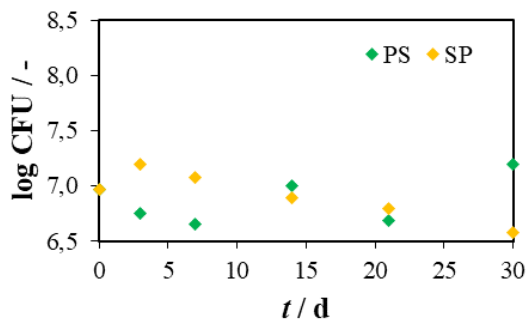
Na **Slici 4.3.** prikazane su promjene CFU vrijednosti bakterijske kulture *Bacillus cereus* u usporedbi sa kontrolom (SP). Promjene su praćene tijekom pokusa biorazgradnje PS-a koji su se provodili pri **200 o/min** unutar 30 dana.



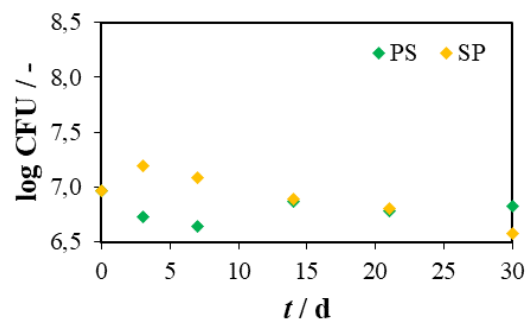
a)



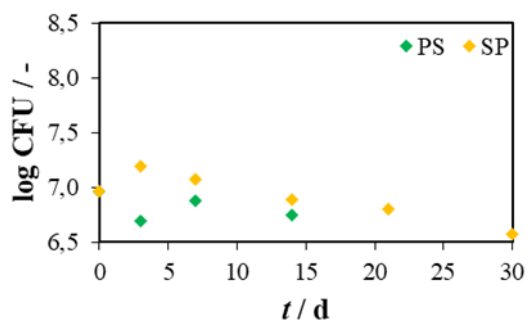
b)



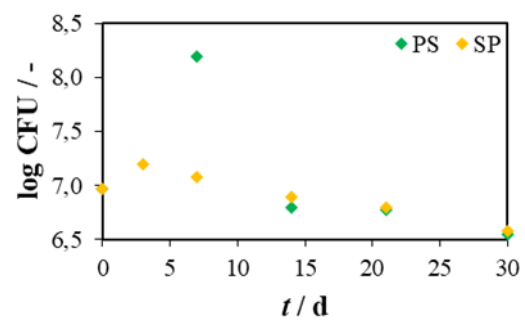
c)



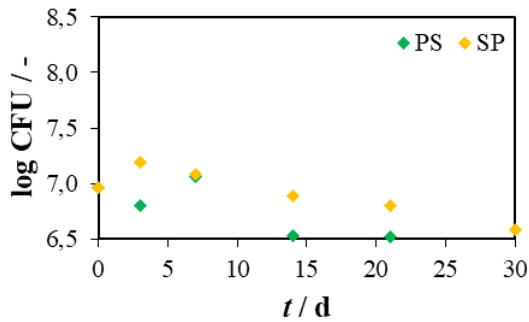
d)



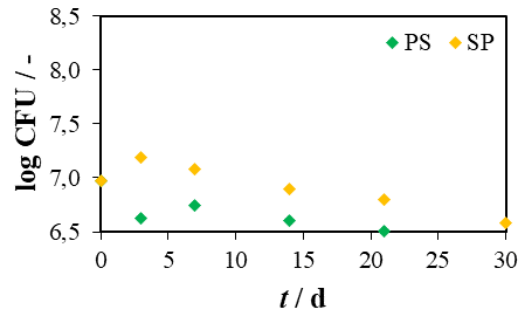
e)



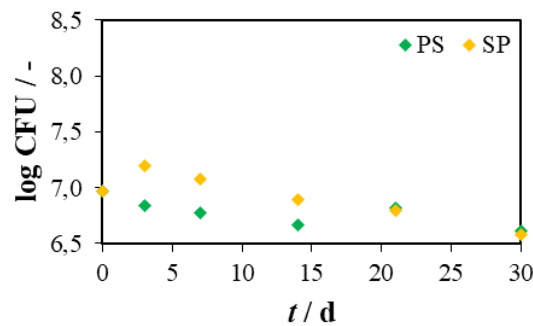
f)



g)



h)



i)

**Slika 4.3.** Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* za pokuse koji su se provodili pri **200 o/min** a) P23; b) P15; c) P18; d) P22 ; e) P11 ; f) P1; g) P3 h) P10 i i) P19 tijekom 30 dana.

Broj živih stanica bakterija u 0. danu za pokuse na **Slici 4.1., 4.2. i 4.3.** (a-i) iznosio je  $9,3 \times 10^6$  st/mL. U većini pokusa maksimalan rast uočen je rast do 7. dana, nakon koje slijedi stacionarna faza rasta. Pri 100 o/min već 7. dana maksimalan rast je postignut u pokusima P12, i P24, pri 150 o/min u pokusima P5, P8, P13, P20, P21, P27, pri 200 o/min u pokusima P1, P3, P11, P15. U pokusu P14, također, je već u 7. danu postignut maksimalan rast, no uočen je i skok u 21. danu do kojeg je moglo doći zbog stvaranja endospora u nepovoljnijim uvjetima, odnosno kao odgovor na nedostatak hranjivih tvari [172, 173]. No, skok je prevelik, stoga se pretpostavlja da je došlo do eksperimentalne pogreške. Već u 3. danu je primijećen maksimalan rast u pokusima P2, P4, P7, P25 pri 100 o/min i P26 pri 150 o/min. Eksponencijani rast mikroorganizama u prva tri, odnosno sedam dana ukazuje da prisutnost čestica mikroplastike PS-a potiče rast *Bacillus cereus*-a. Također, bakterijsko razmnožavanje od 0. do 7. dana upućuje da je proces preduzgoja uspješno proveden te da bakterijskoj kulturi *Bacillus cereus* nije bilo potrebno vrijeme prilagodbe na novonastale uvjete. Najintenzivnija biorazgradnja je postignuta u pokusima P4, P24 i P1 gdje CFU iznosi  $1,4 \times 10^8$  st/ mL,  $2,5 \times 10^7$

st/ mL i  $6,2 \times 10^6$  st/ mL. U navedenim pokusima uočavamo najveću razliku između CFU vrijednosti uzorka i SP-a, što ukazuje da je bakterija koristila PS kao supstrat. U pokusima P24 i P1 veličina čestica je  $<300 \mu\text{m}$ , koncentracija 500 mg/L, a broj okretaja 100 o/min (P24) i 200 o/min (P1). Uvjeti pokusa **P4** bili su: veličina čestica PS-a iznosila je  $<300 \mu\text{m}$  uz koncentraciju PS-a 50 mg/L, pri broju okretaja od 100 o/min. Brzinom vrtnje na tresillici od 100 o/min pospješuje se prijenos kisika u mediju s kulturom *Bacillus cereus*. *B. cereus* je aerob ili fakultativni anaerob, a rast *B. cereus*-a optimalan je u prisutnosti kisika. Kultura *B. cereus* uzgojena u aerobnim uvjetima manje je otporna na toplinu i kisele uvjete od kulture *B. cereus* uzgojene anaerobno [174]. Općenito, aerobne bakterije zahtijevaju 15 do 20% koncentracije otopljenog kisika u mediju za bolji rast [175]. Viša koncentracija otopljenog kisika podupire aerobni rast i prokariotskih i eukariotskih stanica u bioreaktorima u nastojanju da se poveća gustoća stanica, sinteza enzima te poboljša učinkovitost procesa [176]. Znanstvenici su predložili potencijalne enzime koji mogu razgraditi PS, kao što su lipaze, esteraze i oksidativni enzimi [177, 178]. Stabilnost C-C veza se smanjuje u alkalnim uvjetima, stoga alkan hidroksilaze mogu pokidati C-C veze glavnog lanca PS-a u kiselim ili alkalnim uvjetima [179]. Međutim, položaj velikih stirenskih skupina na aktivnom mjestu može spriječiti enzimsko kidanje C-C veza. Također, pri 200 o/min može doći do denaturacije enzima jakom rotacijom, što rezultira slabijom biorazgradnjom [180]. Dakle, *Bacillus cereus*-u bolje odgovaraju niži broj okretaja, kao u **P4** i P24. Pokus **P4** je statističkom obradom u programu *Design Expert* prema punom faktorskom planu odabran kao pokus s optimalnom kombinacijom čimbenika za provedbu procesa biorazgradnje PS-a bakterijskom kulturom *Bacillus cereus*, što se slaže s promjenom CFU vrijednosti u tom pokusu. Upravo zato će daljnji rezultati analiza biti prikazani samo za odabrani pokus **P4**.

## 4.2. Dizajn eksperimenta

Koristeći **Taguchi dizajn** proveden je preliminarni pokus kojim su određeni značajni čimbenici, a analizom varijance (*ANOVA*) provjeren je utjecaj na odziv sustava pri promjeni čimbenika. Analiza varijance predstavlja metodu za objektivno sagledavanje rezultata eksperimenata. Ova metoda ustvari dekomponira ukupnu varijaciju u komponente i omogućuje identifikaciju uzroka varijacije [181] Taguchi metoda je statistička metoda koju je razvio dr. Genichi Taguchi kako bi poboljšao kvalitetu proizvedenih dobara te se sve češće primjenjuje u biotehnologiji, marketingu i u oglašavanju. Taguchijeve su metode poznate i kao inženjering kvalitete, a sadrže sljedeće odrednice [182]:

- dizajniranje parametara
- određivanje varijacija
- idealnu kvalitetu
- off-line kontrolu kvalitete
- funkciju gubitka kvalitete
- omjer „signala i šumova“
- filozofiju robusnog dizajna

Ove su odrednice glavna obilježja Taguchijevih metoda koje zbog svojih specifičnosti izazivaju polemike među svjetskim statističarima i znanstvenicima. Njihove osobine i značaj u primjeni zaslužuju dodatna objašnjenja. No, Taguchijeva metoda je jednostavna za primjenu u raznim inženjerskim područjima te se pomoću nje provodi znatno manji broj pokusa za ispitivanje raznih utjecaja pojedinih projektnih varijabli. Primjerice, za proces s četiri varijable na četiri razine ukupno bi trebalo provesti 44 pokusa, dakle 256 pokusa. Korištenjem ortogonalnih polja moguće je analizirati proces pomoću samo 16 pokusa, što znatno ubrzava ispitivanje procesa. Koraci za provedbu eksperimentalnog Taguchi dizajna prema **Barradu i sur.** [183] su: **1)** odabrati izlaznu varijablu koju treba optimizirati **2)** identificirati čimbenike (ulazne varijable) koji utječu na izlaznu varijablu (odgovor) i odabrati razine koje će se testirati **3)** odabrati ortogonalni niz **4)** dodijeliti faktore i interakcije **5)** izvesti eksperimente **6)** provesti statističku analizu i omjer signala i šuma te odrediti optimalne uvjete za podešavanje razine faktora **7)** provesti potvrdni pokus ukoliko je potrebno. Na temelju podataka dobivenih Taguchi metodom proveden je eksperiment u svrhu određivanja optimalnih uvjeta za proces biorazgradnje PS-a prema **punom faktorskom planu**. Puni faktorski plan pokusa predstavlja provođenje svih mogućih kombinacija pokusa, odnosno provođenje pokusa za sve razine projektnih varijabli. Puni faktorski plan pokusa omogućuje prikazivanje utjecaja svake varijable na ciljanu vrijednost, odnosno utjecaj interakcija među varijablama na ciljanu vrijednost [184]. Najjednostavniji i najviše primjenjivan je puni faktorski plan s varijacijom čimbenika na dvije razine. Takav plan omogućuje mali broj pokusa čiji je ukupni broj definiran s  $N = 2^k$ , gdje je k broj čimbenika. Matrica eksperimentalnih uvjeta punog faktorskog plana, istovremeno varira s tri čimbenika na dvije razine. Vrijednosti razina su u transformiranom obliku s maksimalnom (+1) i minimalnom (-1) vrijednošću. Matrica sadrži tri kolone (tri čimbenika) i osam redaka ( $2^3$ ), a svaki pojedini red odgovara eksperimentalnim uvjetima pojedinog pokusa. U prvoj koloni minimalne (-1) i maksimalne (+1) vrijednosti se izmjenjuju u svakom redu, u drugoj koloni svaki drugi red, a u trećoj koloni svaki četvrti red.

Na taj način je osigurana ortogonalnost plana (suma svih vrijednosti razina za pojedini čimbenik je jednaka nuli), što omogućuje međusobno nezavisnu procjenu utjecaja pojedinačnih čimbenika i njihova međudjelovanja [185]. No, budući da broj pokusa eksponencijalno raste s brojem faktora, ovaj plan pokusa ubrzo zahtjeva velik broj pokusa koji trebaju biti provedeni. Metode planiranja pokusa i statistička obrada značajno ubrzavaju i poboljšavaju procese istraživanja te dovode do pouzdanijih zaključaka, stoga se sve više primjenjuju u industriji [185]. Kako bi se ispitao učinak pojedinih faktora (procesnih parametara) na pojedine odzive (logaritamska vrijednost CFU-a) u procesu biorazgradnje PS-a, primijenjena je analiza varijance (*ANOVA*) u programu *Design Expert*, s razinom značajnosti  $p < 0,05$ . *ANOVA* predstavlja glavnu statističku metodu za testiranje međuovisnosti i procesnih parametara, odnosno računa razlikuju li se dvije ili više grupa nezavisnih varijabli (NV) s obzirom na jednu (zavisnu) varijablu (ZV). Tim postupkom je moguće raščlaniti i procijeniti varijabilnost koja je uvjetovana različitim čimbenicima [186]. Analiza varijance omogućuje definiranje razlika u odstupanjima rezultata od srednjih vrijednosti, što omogućuje testiranje nul-hipoteze ( $H_0$ ). Nul-hipoteza podrazumijeva, da su srednje vrijednost i unutar tretmana (iste razine čimbenika) jednake, te pripadaju istoj populaciji, a varijacija je posljedica pogreške. Granična razina statističke značajnosti ( $\alpha$ ) je mjerilo za osjetljivost statističkog testa te označava postotak u kojem je dozvoljena greška odbacivanja nul-hipoteze. U ovom radu iznosi 0,05 te s tim tvrdimo da je nul-hipoteza ispravna s vjerojatnošću od 95%, odnosno vjerojatnost da nul-hipoteza nije ispravna iznosi 5%. Preporučljivo je da se navodi iznos  $p$ -vrijednosti, a ne samo odnos s razinom značajnosti ( $p < \alpha$ ,  $p > \alpha$ ), jer se na taj način kvantificira mjera značajnosti [187]. U **Tablici 4.2.** prikazani su rezultati obrade u programskom paketu *Design Expert* analizom *ANOVA*, a finalna jednadžba dana je izrazom (4):

$$\begin{aligned} \log\text{CFU} = & + 6,58 + 0,034 \times A + 0,059 \times B - 0,28 \times C + 0,081 \times AB + 0,012 \times AC \\ & + 0,13 \times BC + 0,068 \times A^2 - 0,064 \times B^2 + 0,18 \times C^2 \end{aligned} \quad (4)$$

U **Tablici 4.3.** prikazani su osnovni statistički podaci o dobivenom modelu koji opisuje kvalitetu dobivenog modela za pokus biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus*.

**Tablica 4.2.** Rezultati obrade u programskom paketu *Design Expert* analizom ANOVA.

	Zbroj kvadrata	df	Srednji kvadrat	F- vrijednost	p-vrijednost Vjv. >F
<b>Model</b>	2,04	9	0,23	18,39	< 0,0001
<b>A-veličina MP / μm</b>	0,02	1	0,02	1,73	0,21
<b>B- γ<sub>MP</sub> / mg/L</b>	0,06	1	0,06	5,09	0,04
<b>C- broj okretaja/ o/min</b>	1,43	1	1,43	116,44	< 0,0001
<b>AB</b>	0,08	1	0,08	6,46	0,02
<b>AC</b>	1,74×10 <sup>3</sup>	1	1,74×10 <sup>3</sup>	0,14	0,71
<b>BC</b>	0,19	1	0,19	15,55	0,001
<b>A<sup>2</sup></b>	0,03	1	0,03	2,27	0,15
<b>B<sup>2</sup></b>	0,024	1	0,02	1,96	0,18
<b>C<sup>2</sup></b>	0,18	1	0,18	14,30	0,002
<b>Ostatak</b>	0,21	17	0,012	/	/
<b>Ukupno</b>	2,24	26	/	/	/

**Tablica 4.3.** Pregled statističkih podataka modela; ANOVA analiza varijance.

<b>R<sup>2</sup></b>	0,9069
<b>Prilagođeni R<sup>2</sup></b>	0,8575
<b>Predviđeni R<sup>2</sup></b>	0,7799
<b>Odgovarajuća preciznost</b>	6,284
<b>Standardna devijacija</b>	0,11
<b>Srednja vrijednost</b>	6,70
<b>Koeficijent varijacije (C.V.%)</b>	1,66
<b>PRESS</b>	0,49

Značaj i valjanost modela procijenjeni su koeficijentom determinacije "R-Squared" ( $R^2$ ). Poželjno bi bilo daje vrijednost  $R^2$  jednaka 1. No, to je u realnim sustavima teško postići. Stoga, što je vrijednost  $R^2$  bliža 1, to je bolje slaganje između eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka.  $R^2$  je koeficijent determinacije koji predstavlja procjenu ukupne

varijacije podataka objašnjenih pomoću modela odnosno mjera odstupanja od aritmetičke sredine koja je objašnjena modelom, što je  $R^2$  bliži 1, to model bolje slijedi podatke, odnosno pojava je bolje objašnjena. Izračunava se prema izrazu (5) :

$$R^2 = \frac{\text{suma kvadrata odstupanja (ostatak)}}{\text{suma kvadrata odstupanja (model) + suma kvadrata odstupanja (ostatak)}} \quad (5)$$

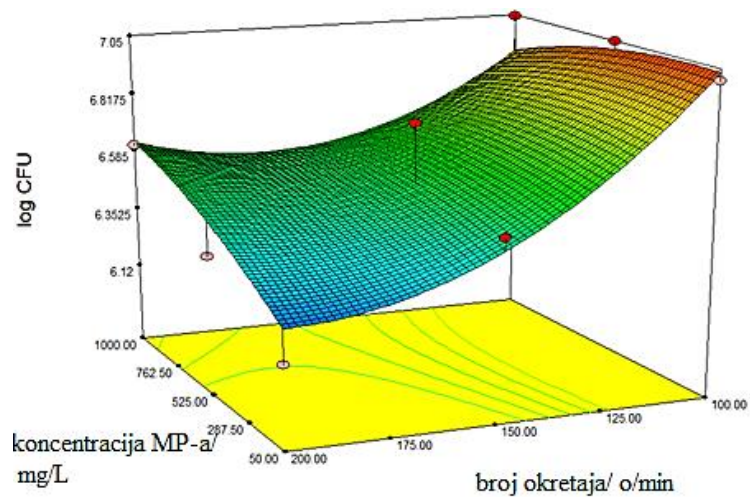
$R^2$  iznosi **0,9069**. "**Predviđeni  $R^2$** " od **0,7799** se slaže s "**Prilagođenim  $R^2$** " od **0,8575** te ukoliko je veći od 0,75 model se može smatrati značajnim. "**Pure Error**" je pogreška ponavljanja pojedinih stanja pokusa u svrhu procjene varijance odziva kao i broja stupnjeva slobode za adekvatno statističko testiranje izrađenog modela. "**Adequate Precision**" mjeri omjer signala i šuma. Poželjan je omjer veći od 4, a dobiveni omjer od **13,986** ukazuje na **adekvatan signal** te se ovaj model može upotrijebiti za daljnje korištenje. **Standardna devijacija,  $\sigma$** , se općenito koristi za kvantificiranje iznosa varijacije ili disperzije vrijednosti skupa podataka. Što je ova vrijednost niža, podaci su manje raspršeni i bliži očekivanim vrijednostima [188]. Vrijednost standardne devijacije koja je dobivena je za biorazgradnju PS-a bakterijom *Bacillus cereus* iznosi **0,11**. "**C. V.**" je koeficijent varijacije i predstavlja relativnu mjeru rasipanja izražena u %. "**PRESS**" je predviđena suma kvadrata ostataka. Rezultati statističke analize varijance (ANOVA) pokazali su da **F-vrijednost** od **18,39** implicira da je **model značajan**. Postoji samo 0,01% šanse da bi korištenjem ovog modela došlo do smetnji. Vrijednosti "**Prob >F**" manje od 0,0500 označavaju da su čimbenici **B, C, AB, BC, C<sup>2</sup>** značajni i predstavljaju koncentraciju MP-a, broj okretaja, veličinu MP-a s koncentracijom MP-a, koncentraciju MP-a s brojem okretaja te (broj okretaja)<sup>2</sup>. Pravi smisao **p-vrijednosti** je u testiranju hipoteze  $H_0$  prema alternativnoj hipotezi  $H_1$ , odnosno p-vrijednost pokazuje vjerojatnost postizanja  $F$ -vrijednosti ako se prihvati  $H_1$ , tj. ako nema utjecaja faktora. Male p-vrijednosti upućuju na odbacivanje  $H_0$  i prihvatanje alternativne hipoteze  $H_1$ , tj. ukazuju da postoji značajan utjecaj parametra na promatranu izlaznu veličinu. Vjerojatnost odgovara površini ispod krivulje  $F$ -razdiobe koja je određena pripadajućom  $F$ -vrijednosti. Formalno se p-vrijednost definira kao najniža razina značajnosti koja rezultira odbacivanjem  $H_0$ . Provela se i optimizacija procesa te su u **Tablici 4.4.** prikazani su optimizirani odabrani čimbenici za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus*, a to su: najmanja veličina čestica (<300  $\mu\text{m}$ ), koncentracija od 117,56 mg/L koja gravitira prema najmanjoj vrijednosti koncentracije (50 mg/L) i najmanja vrijednost broja okretaja (100 o/min).

**Tablica 4.4.** Optimalni uvjeti za biorazgradnju PS-a primjenom *B. cereus*.

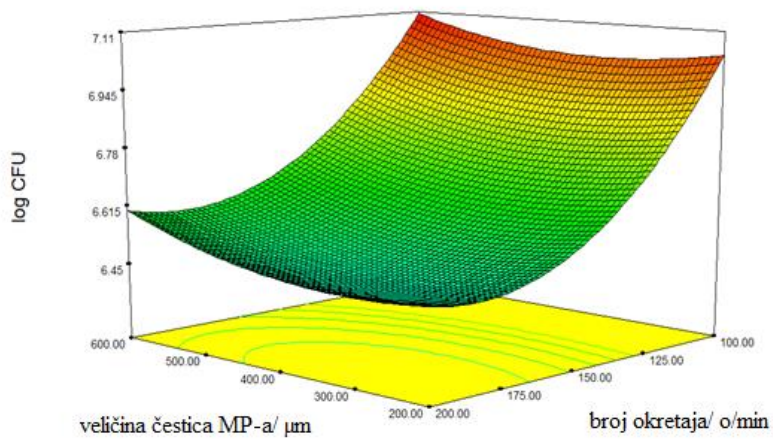
veličina čestica/ $\mu\text{m}$	$\gamma_{\text{MP}}$ / mg/L	broj okretaja /o/min	log CFU / -	poželjnost	
235,59	117,56	100,24	7,13	1,00	<u>Odabrano</u>

Upravo takva kombinacija čimbenika odgovara pokusu **P4** (Tablica 3.4.), u kojem je veličina čestica  $<300 \mu\text{m}$ , koncentracija MP-a  $50 \text{ mg/L}$ , broj okretaja  $100 \text{ o/min}$ . Na Slikama 4.4., 4.5., 4.6. prikazani su trodimenzionalni prikazi (3D) prikazi odzivnih površina (engl. *Response surface methodology*, RSM) prema kojima se može vidjeti utjecaj koncentracije MP-a, veličine čestica MP-a i broja okretaja na log CFU. Crvena boja označava maksimalan utjecaj parametra na log CFU, dok plava boja prikazuje područje s najmanjim utjecajem parametara. Na Slici 4.4. se prema obliku odzivnih površina primjećuje povećanje log CFU pri najmanjem broju okretaja te pri najnižoj koncentraciji MP-a. Slika 4.5. također ukazuje da manji broj okretaja pogoduje većem log CFU. Pri najnižoj vrijednosti broja okretaja crveno područje odzivne površine je za sav raspon veličina čestica MP-a, no najviša log CFU vrijednost je pri najvećoj veličini čestica MP-a i najnižem broju okretaja. Na Slici 4.6. također je potvrđeno da najveća veličina čestica MP-a, kao i najviša koncentracija MP-a pogoduju većoj vrijednosti log CFU. Prema odzivnoj površini, uočava se veći utjecaj veličine čestica uz interakciju broja okretaja te utjecaj koncentracije čestica uz interakciju broja okretaja, što ukazuje da interakcija veličine čestica i koncentracije MP-a ima najmanji utjecaj na CFU vrijednost. Iz 3D prikaza je vidljivo da će u uvjetima najmanje i najviše koncentracije MP-a, najmanjeg i najvećeg ispitivanog raspona veličine čestica MP-a te pri najnižim brojevima okretaja biti najintenzivnija biorazgradnja PS-a s obzirom na najvišu log CFU vrijednost pri tim uvjetima.

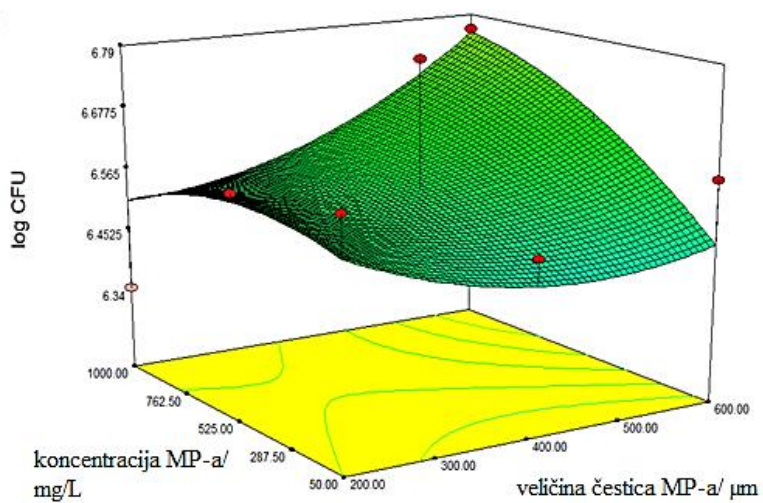




Slika 4.4. Trodimenzionalni prikaz ovisnosti log CFU o koncentraciji MP-a i broju okretaja.



Slika 4.5. Trodimenzionalni prikaz ovisnosti log CFU o veličini čestica MP-a i broju okretaja.



Slika 4.6. Trodimenzionalni prikaz ovisnosti log CFU o koncentraciji MP-a i veličini čestica MP-a.

### 4.3. Određivanje ukupnog, organskog i anorganskog ugljika tijekom procesa biorazgradnje

Rezultati dobiveni TOC analizom za pokus **P4** s optimalnom kombinacijom čimbenika, prikazani su u **Tablici 4.5**. Rezultati pokazuju promjenu vrijednosti ukupnog ugljika (TC), organskog ugljika (TOC) i anorganskog ugljika (TIC) tijekom biorazgradnje PS-a primjenom *B. cereus*.

**Tablica 4.5.** Promjena vrijednosti ukupnog ugljika, organskog ugljika i anorganskog ugljika tijekom procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* za pokus tijekom 30 dana za pokus **P4**.

<i>t</i> / dan	$\gamma(\text{TOC};\text{P4})$ / mg/L	$\gamma(\text{TOC};\text{SP})$ / mg/L	$\gamma(\text{TC};\text{P4})$ / mg/L	$\gamma(\text{TC};\text{SP})$ / mg/L	$\gamma(\text{TIC};\text{P4})$ / mg/L	$\gamma(\text{TIC};\text{SP})$ / mg/L
<b>0.</b>	1,257	1,257	1,639	1,639	0,382	0,382
<b>3.</b>	1,831	1,330	1,918	2,581	0,087	1,251
<b>7.</b>	3,738	4,088	8,716	4,660	4,978	0,572
<b>14.</b>	2,904	2,826	3,106	3,605	0,202	0,779
<b>21.</b>	3,040	5,070	5,002	5,971	1,962	0,901
<b>30.</b>	4,168	13,141	4,574	16,396	0,406	3,255

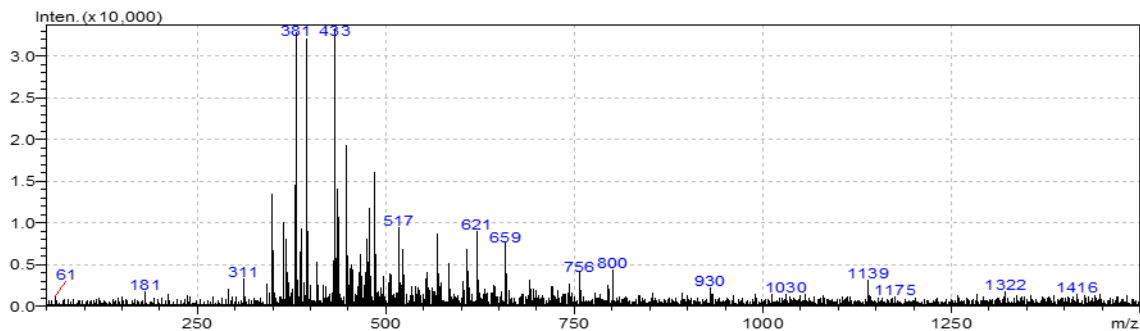
Primjećen je rast ukupnog, organskog i anorganskog ugljika u većini pokusa do **7. dana** nakon čega se vrijednosti ustabile. Koncentracija TOC-a u pokus **P4** biorazgradnje PS-a u **0. dana** poprima vrijednost u iznosu od 1,257 mg/L nakon čega su njezine vrijednosti u laganom porastu do **7. dana** te se ustabile do završetka pokusa. U **7. danu** vrijednost TOC-a u pokusu P4 iznosi 3,738 mg/L. Mikroorganizmi za rast i razmnožavanje koriste ugljik kao izvor hranjivih tvari, te se očekivalo da će povećanjem CFU vrijednosti doći do pada koncentracije TOC-a, no to se nije dogodilo. Pretpostavlja se da je povećanje koncentracije TOC-a posljedica nastanka organskih produkata nastalih uslijed narušavanja strukture PS-a ili otpuštanja aditiva s površine PS-a [189]. Tijekom 30 dana pokusa, vrijednosti TOC-a u uzorcima koji sadržavaju MP-e su bile približno jednake vrijednostima TOC-a u SP-u. Međutim najveća razlika TOC-a u uzorku i SP-a zabilježena je u 30. danu. Koncentracija TOC-a je porasla u **30. danu** kada postiže i svoju maksimalnu vrijednost od 4,168 mg/L. Tu maksimalnu vrijednost TOC-a u 30. danu možemo povezati sa smanjenjem log CFU-a, odnosno odumiranjem bakterije.

Najveće povećanje vrijednosti TOC primjećeno je u **7.** i **30.** danu, a moguća je posljedica nastanka organskih produkata budući da spojevi poput monomera i oligomera mogu povećati sadržaj organske tvari usljed narušavanja strukture PS-a [190]. No, da bi se to moglo reći sa sigurnošću, potrebno je provesti LC/MS analizu u svrhu potvrde za nastale razgradne produkte i/ili otpuštene aditive čije se pojedine funkcionalne skupine razlikuju u odnosu na funkcionalne skupine PS-a. Smanjenje i porast koncentracije TC-a prati trend ponašanja TOC-a i TIC-a, što je u skladu s očekivanjima koje se temelji na definiciji TC-a kao sume svih vrsta ugljika u uzorku, a koji uključuje i organski i anorganski. Najviše vrijednosti TC-a i TIC-a postignute su u **7. danu**. Vrijednosti TIC-a su niže u usporedbi s vrijednostima TOC-a sve do **7. dana**. Vrijednost TIC-a je u **0. danu** za pokus **P4** iznosio je 0,382 mg/L. U pokusu **P4** vrijednost TIC-a je blago rasla do **7. dana** gdje je zabilježena vrijednost od 4,978 mg/L, što je ujedno i najveća zabilježena vrijednost. U SP uzorcima za pokus **P4** zabilježena vrijednost TIC-a u **3. danu** je 1,251 mg/L, dok je maksimalna vrijednost zabilježena u **30. danu** i iznosi 3,255 mg/L. Tijekom 30 dana pokusa, vrijednosti TIC-a u uzorcima koji sadržavaju MP-e su bile približno jednake vrijednostima TIC-a u SP-i. Međutim najveća promjena TIC-a u uzorku i SP-a zabilježena je u **7. danu**. Kako trend ponašanja TIC vrijednosti prati trend ponašanja TOC-a, najznačajnija vrijednost TIC-a postignuta je upravo u **7. danu**. Osim toga, kako se TIC veže uz razvijanje CO<sub>2</sub> kao jednog od produkata biorazgradnje [189], pretpostavlja se da je u **3.** i **7. danu** biorazgradnja PS-a bakterijom *Bacillus cereus* najintenzivnija. Temeljem procjene da je biorazgradnja PS-a najintenzivnija u **3.** i **7. danu** ide i postojanje najveće razlike između CFU vrijednosti ovih uzoraka MP-a i SP-a upravo u tim danima. Vrijednost CFU-a je rasla (**Slika 4.1.e**) te je u **3. danu** postignuta najviša vrijednost tijekom pokusa od **P4** od  $1,4 \times 10^8$  st/mL. Dakle, može se zaključiti da bakterijska kultura *Bacillus cereus* u najvećoj mjeri iskorištava PS kao supstrat u prvih 7 dana u kojima je i biorazgradnja najintenzivnija.

#### **4.4. Praćenje produkata razgradnje i otpuštenih aditiva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (LC/MS)**

Na **Slikama 4.7.-4.11.** prikazani su maseni spektri odabranog pokusa **P4** s optimalnom kombinacijom čimbenika dobiveni LC/MS analizom za 3., 7., 14., 21. i 30. dan. Novonastali pikovi koji su analizirani u **3. danu**, gdje je najintenzivnija biorazgradnja PS-a u pokusu **P4** nalaze se na omjeru m/z 381, 433, 517, 621 i 800, što je u skladu s razlikom između CFU vrijednosti PS-a u pokusu **P4** i **SP-a**, a koja je u **3. danu** najveća.

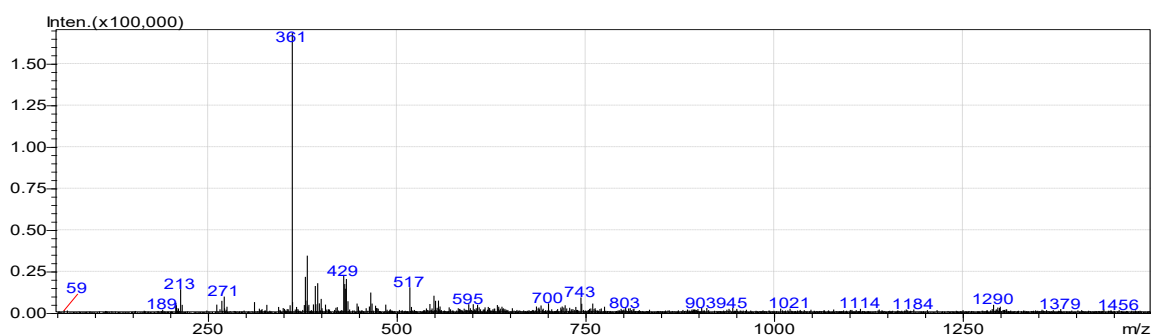
Identificirani pikovi su deterdženti (m/z 381,517) koji nisu aditivi, ali se dodaju radi mehaničke stabilnosti polistirenskih emulzija na što izravno utječe priroda i površinska koncentracija adsorbiranih ionskih deterdženata [191].



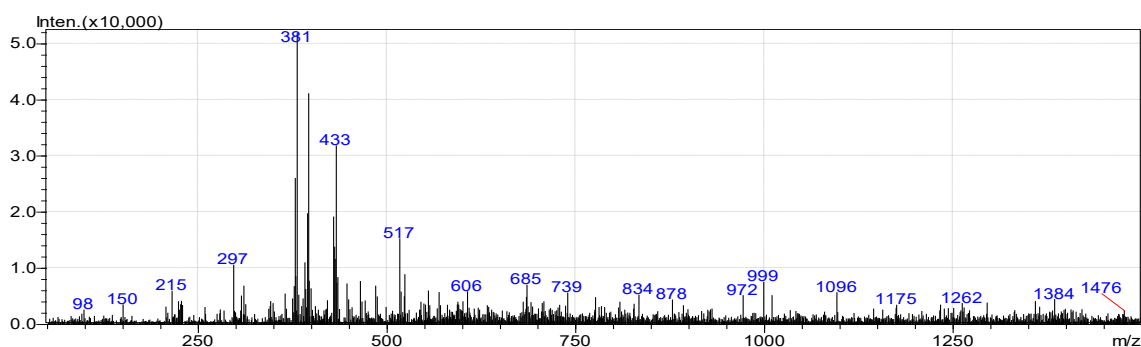
**Slika 4.7.** Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* u **3. danu** za pokus **P4**.

Sami po sebi deterdženti nisu opasni, no u svom kemijskom sastavu sadrže toksične kemikalije poput natrijeva lauril sulfata (SLS) ili natrijeva lauret sulfata (SLES) koji su neurotoksični, izazivaju biokemijske i stanične promjene, mutacije i rak te pripadaju skupini endokrinih disruptora [192]. Također, identificiran je i polipropilen glikol (PEG) na m/z 621 koji je jedan od učinkovitih plastifikatora koji se koristi za polimere zbog prednosti širokog raspona molekulskih masa, netoksičnosti, mješljivosti i biološke razgradljivosti [193]. Pik na m/z 800 identificiran je kao dioktil ftalat (DOP), koji je plastifikator. U **7. danu**, smanjenje m/z omjera sa 381 na 361 upućuje da je došlo do biorazgradnje mikroplastičnih čestica PS-a, a ostali intenziteti pikova su smanjeni. Također, u **7. danu** identificiran je i pik na m/z 429 koji pripada plastifikatoru dioktil ftalatu (DOP). DOP je bezbojna, viskozna, teško hlapljiva, lipofilna kapljevina bez mirisa, dobro topljiva u organskim otapalima, kao što su ulja, benzini i sredstva za uklanjanje boja [194]. Zbog prekomjerne uporabe DOP može dospjeti u zrak i vezati se začestice prašine, čime je povećan rizik izloženosti za ljude zbog moguće inhalacije, unosa ili apsorpcije. Također, može se vezati za čestice tla i procjeđivanjem s oborinama dospjeti u podzemne vode, u kojima se polagano otapa. Nakon što dospije u tijelo, DOP se lako metabolizira, najčešće u primarne i sekundarne monoesterske ftalate (MEHP) [195]. U **14. i 21. danu**, također, dolazi do smanjenja inteziteta navedenih pikova. U **30. danu**, izuzev smanjenja pikova omjera m/z 517 i 398, dolazi do ponovnog povećanja intenziteta pika na m/z 433 koji je identificiran kao polietilen glikol (PEG). PEG je mješavina polimera koji su međusobno povezani.

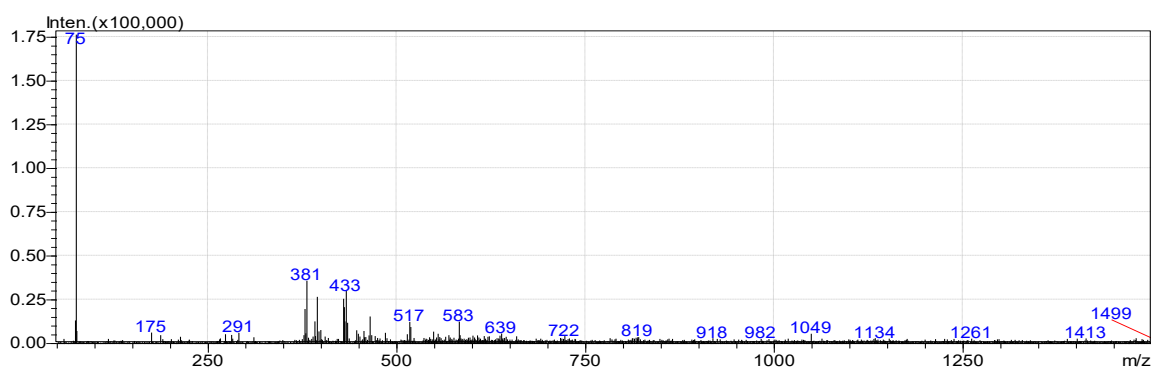
Polietilen je najčešći oblik plastike, a u kombinaciji s glikolom postaje gusta i ljepljiva tekućina. PEG se smatra sigurnim za korištenje za ljude i okoliš, no često se pojavljuje sve više slučajeva alergijskih reakcija kod ljudi izazvanih od strane PEG-a koji je prisutan u brojnim naizgled nepovezanim proizvodima poput prerađene hrane, kozmetike, lijekova i dr. [196]. Ionski oblik i ime spojeva identificiranih tijekom biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus* za pokus P4 prikazani su Tablici 4.6. [197].



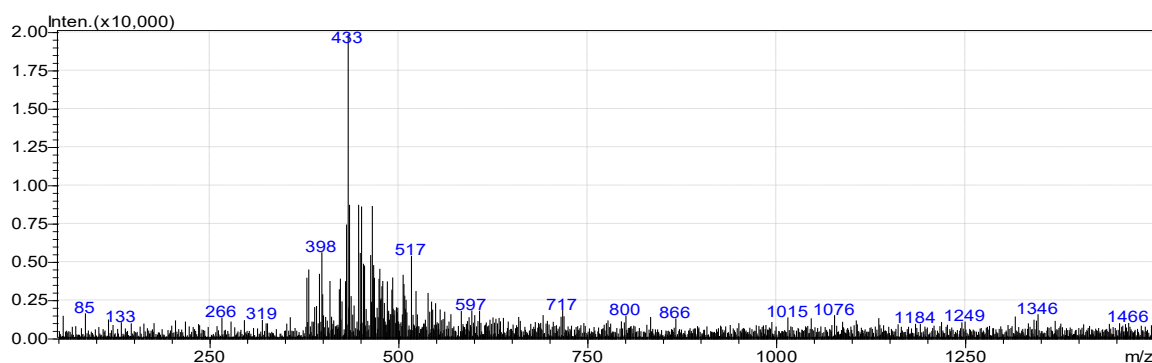
**Slika 4.8.** Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* u 7. danu za pokus P4.



**Slika 4.9.** Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* u 14. danu za pokus P4.



**Slika 4.10.** Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* u 21. danu za pokus P4.



**Slika 4.11.** Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* u **30. danu** za pokus **P4**.

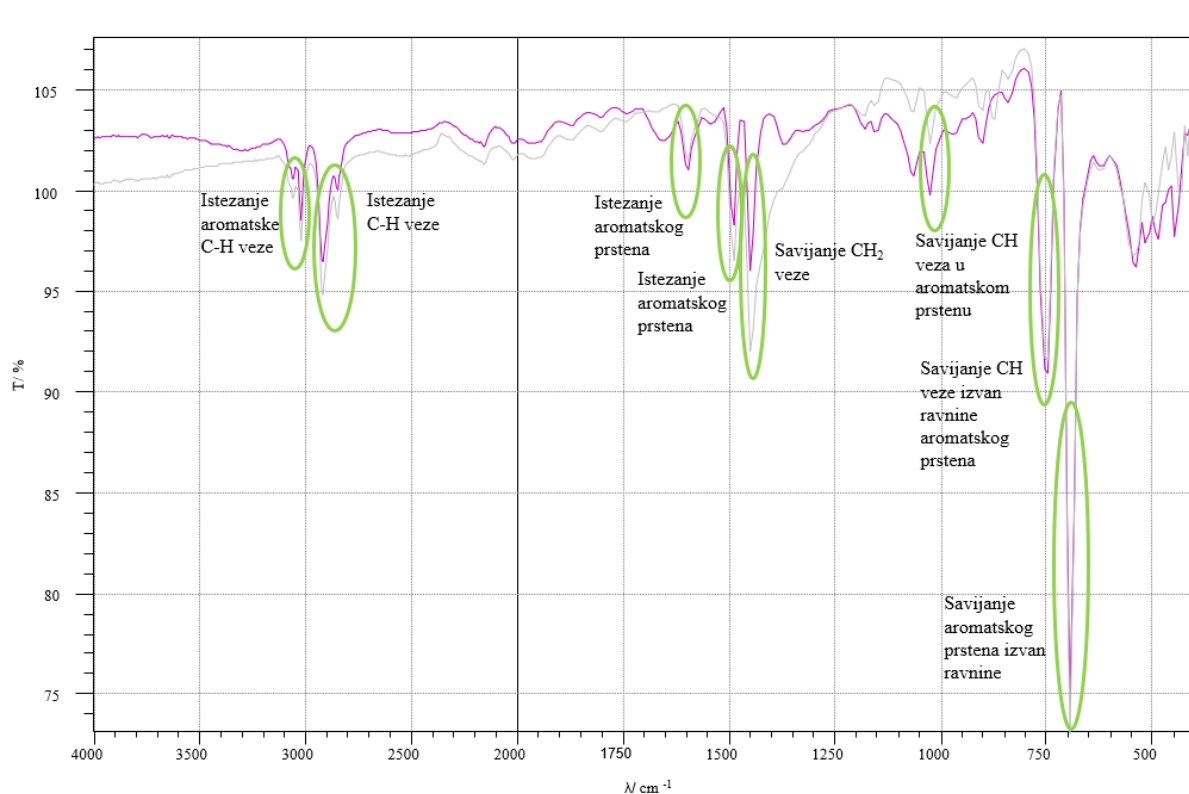
**Tablica 4.6.** Ionski oblik i ime spoja identificiranih tijekom biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus* za pokus **P4**.

m/z omjer	Ionska forma	Spoj
361	$[AB_3+Na]^+$	$[C_{14}H_{22}O][C_2H_4O]_n$ , deterdžent
381	$[AB_3+Na]^+$	$[C_{15}H_{30}O][C_2H_4O]_n$ , Deterdžent
429	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ , dioktil ftalat (DOP)
433	$[A_9B+Na]^+$	$[C_2H_4O]_nH_2O$ , PEG, polietilen glikol
450	$[M_2+H]^+$	$N,N'$ - $C_{13}H_{24}N_2O$ , dicikloheksilurea
517	$[AB_7+H]^+$	$[C_{14}H_{22}O][C_2H_4O]_n$ , deterdžent
621	$[A_{10}B+Na]^+$	$[C_3H_6O]_nH_2O$ , polipropilen glikol
800	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ , dioktil ftalat (DOP)

#### 4.5. Analiza mikroplastike FTIR-ATR spektroskopijom

FTIR-ATR spektroskopija korištenih čestica PS-a provodila se prije i poslije provedbe pokusa biorazgradnje. Na **Slici 4.7.** prikazani su dobiveni FTIR spektri za početni PS (**siva linija**) i PS nakon provedbe procesa biorazgradnje (**ljubičasta linija**) primjenom bakterije *Bacillus cereus* u pokusu **P4** s optimalnom kombinacijom čimbenika. Analizom spektara početnih uzoraka i usporedbom s bazom podataka, potvrđeno je da se radi o PS-u. Pratili su se intenziteti karakterističnih pikova (na **Slici 4.7.** zaokruženi **zeleno**), odnosno spektri su analizirani u skladu s literaturnim podatcima. Za PS promatran je karakteristični pik na  $\sim 3024\text{cm}^{-1}$  koji pripada aromatskom C-H istezanju i pikovi na  $\sim 1601\text{cm}^{-1}$  i  $\sim 1490\text{cm}^{-1}$  koji odgovara C=C vezi aromata. Oni su očekivani zbog prisutnosti aromatske skupine u strukturi molekule PS-a.

Pikovi na  $\sim 1450\text{ cm}^{-1}$  i  $\sim 1027\text{ cm}^{-1}$  predstavljaju  $\text{CH}_2$  savijanje, odnosno savijanje C-H veza u aromatskom prstenu [198, 199]. Prisutnost benzenskog prstena, utječe na ograničenu rotaciju oko jednostrukih veza u polimernom lancu PS-a, zbog čega navedena vrsta MP-a ima ukrućenu nesavitljivu konformaciju. Savijanje aromatskih skupina izvan ravnine vidljivo je iz pika na  $\sim 694\text{ cm}^{-1}$ , dok pik pri  $537\text{ cm}^{-1}$  odgovara savijanju aromatskog prstena izvan ravnine. Spektar je analiziran u skladu s literaturnim podacima. Na **Slici 4.7.** prikazani su FTIR spektri PS-a dobiveni nakon procesa biorazgradnje primjenom bakterije *Bacillus cereus* u usporedbi sa spektrom prije procesa biorazgradnje. Prilikom procesa biorazgradnje primjenom *Bacillus cereus* većina pikova karakterističnih za PS i dalje je prisutna, međutim intenzitet tih pikovaje smanjen. Najizraženije smanjenje intenziteta vidljivo je kod pika na  $1027\text{ cm}^{-1}$ . Također, došlo je i do stvaranja novih pikova. Osim smanjenja intenziteta, stvaranje novih skupina pokazatelj je da se početni polimerni lanac rascijepao na manje lance, odnosno da je došlo do biorazgradnje MP-a.



**Slika 4.7.** Uzorak PS-a prije biorazgradnje (siva linija) i uzorak PS-a pokusa **P4** nakon biorazgradnje (ljubičasta linija).

#### 4.6. Određivanja ekotoksičnosti filtrata morskom bakterijom *Vibrio fischeri*

Ispitivanje ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* provedena je u svrhu utvrđivanja potencijalno štetnih učinaka na ovaj organizam, a koji mogu nastati kao posljedica otpuštanja aditiva s površine MP-a ili nastanka novih organskih razgradnih produkata prilikom biorazgradnje MP-a. Osnovni princip bioluminiscentnog ispitivanja je povezanost promjena kinetičkih svojstava bioluminescentne reakcije s toksičnošću ispitivanih tvari, odnosno, pad luminiscencije proporcionalan je s toksičnošću ispitivane tvari [200]. Ekotoksičnost filtrata ispitana je nakon provedenih pokusa biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus*, a postupak samog ispitivanja opisan je u poglavlju 3.4.10. U Tablici 4.7. prikazani su rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata dobivenih nakon biorazgradnje PS-a.

**Tablica 4.7.** Vrijednosti EC<sub>20</sub>/ % i INH/ % kao rezultat ekotoksičnosti filtrata (\* vrijednost nije bilo moguće procijeniti).

Pokus	EC <sub>20</sub> / %	INH / %
P1	*	24,99
P2	*	16,05
P3	30,72	65,12
P4	*	22,85
P5	25,46	43,10
P6	13,45	52,43
P7	25,00	49,60
P8	9,26	51,09
P9	16,89	39,23
P10	18,62	34,04
P11	27,50	34,53
P12	13,37	36,60
P13	*	18,68
P14	27,40	40,11
P15	*	33,43
P16	*	19,80
P17	20,42	44,86
P18	25,84	44,07
P19	16,39	22,84
P20	33,39	44,12
P21	12,34	15,06
P22	*	31,46
P23	*	23,55
P24	13,51	58,43
P25	*	40,97
P26	*	15,50
P27	8,69	51,54



Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata provedenog pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* pokazuju najniže izmjerene EC<sub>20</sub> vrijednosti u pokusima P8, P21, P12, P6. Ovi rezultati prikazani su u **Tablici 4.7**. EC<sub>20</sub> se prema literaturi [201] definira kao koncentracija tvari koja rezultira 20%-tnim štetnim učinkom na ispitivanu populaciju *V. fischeri*. Općenito, što je ova vrijednost niža, štetni učinak je veći. Najniže EC<sub>20</sub> vrijednosti su izmjerene u pokusima P8, P21, P12, P6, što ukazuje da će koncentracija štetnih tvari prisutnih u filtratu nakon provedenih pokusa biorazgradnje PS-a u iznosu od 9,26%, 12,34%, 13,37%, 13,45% izazvati štetni učinak kod 20% populacije bakterije *Vibrio fischeri*. Navedene EC<sub>20</sub> vrijednosti mogu se povezati s CFU vrijednostima dobivenim za PS u pokusima P8, P21, P12, P6 te za SP. Primjećena je razlika između CFU vrijednosti PS-a u navedenim pokusima i kontrolnog pokusa, odnosno SP-a.

Niske vrijednosti EC<sub>20</sub> su očekivane s obzirom da prilikom biorazgradnje MP-a dolazi do potencijalnog otpuštanja aditiva s površine MP-a ili nastanka novih organskih razgradnih produkata, a za koje je u prethodnim istraživanjima potvrđeno da imaju štetan učinak na testni organizam *V. fischeri* [202]. Najviše izmjerene EC<sub>20</sub> vrijednosti su u pokusima P3, P5 i P20, a te vrijednosti ukazuju da je štetni učinak zanemariv, odnosno gotovo da ga i nema. Usporedbom inhibicije rasta pojedinih koncentracija MP-a i različitih veličina čestica ne može se s točnošću uočiti značajniji utjecaj pojedine koncentracije na inhibiciju. Može se zaključiti da je srednja veličina čestica imala značajniji utjecaj na inhibiciju luminiscencije bakterije te se ona povećavala sa smanjenjem koncentracije čestica. Najveću inhibiciju prouzročila je srednja veličina čestica (300-500 μm) s manjom koncentracijom čestica 50 mg/L u iznosu od 65,12%.

## 5. ZAKLJUČAK

Plastični materijali su uglavnom sintetski polimeri sastavljeni od lanaca atoma ugljika s vodikom, kisikom, dušikom, sumporom te su uključeni u svaku domenu ljudskog okruženja. Planeta Zemlja je onečišćena zbog ogromnog povećanja odlaganja plastike koja nije biorazgradiva i nakuplja se u svim sastavnicama okoliša. Fragmentirani ili na drugi način usitnjeni plastični materijali u obliku MP-a ili NP-a stvaraju sve više primjetne probleme u okolišu te postoji mogućnost bioakumulacije MP-a u hranidbenom lancu koji na taj način može dospjeti do ljudskog organizma i potencijalno narušiti zdravlje. Stoga, posljednjih se godina intenzivno radi na rješavanju problema uklanjanja MP-a iz okoliša. Jedan od načina uklanjanja MP-a je i biorazgradnja primjenom mikroorganizama za koje je utvrđeno da mogu razgraditi veći broj plastike zahvaljujući enzimskom djelovanju i metaboličkim aktivnostima. Potrebno je ispitati mogućnost biorazgradnje MP-a uz pomoć mikroorganizama i unaprijediti matematičko modeliranje kinetike biorazgradnje MP-a kako bi se smanjio utjecaj plastike na okoliš. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati optimalne uvjete za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus cereus*. Dizajn eksperimenta se provodio prema **dizajnu punog faktorskog plana (FF)** prema kombinaciji za tri ispitivana čimbenika – **veličina MP-e, koncentracija MP-e, i broj okretaja** – na tri razine (minimalna, srednja i maksimalna vrijednost).

Tijekom trajanja pokusa od **30 dana** pratile su se i promjene fizikalno-kemijskih parametara te je zaključeno sljedeće:

1. Na temelju dobivenih rezultata logaritamske vrijednosti **CFU** u ovisnosti o vremenu, najveći broj izralih kolonija bakterija postigao se **3. i 7. dana**.
2. Najveća CFU vrijednost u odabranom pokusu **P4** postignuta je u **3. danu** i njezina vrijednost iznosi  $1,4 \times 10^8$  st/mL.
3. Pomoću **TOC analize** utvrdilo se povećanje organskog i anorganskog ugljika u **3. i 7. danu**. Dakle, povećanjem vrijednosti CFU-a dolazi do povećanja vrijednosti TOC-a, TC-a i TIC-a u danima u kojima je i biorazgradnja najintenzivnija.
4. Tijekom pokusa su pomoću **LC/MS analize** detektirani, i prema m/z omjerima procijenjeni otpušteni aditivi s površine čestica PS-a.
5. Na temelju promjene intenziteta pikova apsorpcijskih vrpca te broja nastanka novih i nestanka postojećih na **FTIR spektru** PS-a, utvrđeno je da je došlo do narušavanja strukture čestica PS-a.

6. **EC<sub>20</sub> vrijednost** nakon biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus cereusa* u pokusu P4 nije se mogla odrediti. Najveća inhibicija zamijećena je u pokusu P3 u iznosu od 65,12%. Nadalje, može se zaključiti da je srednja veličina čestica imala značajniji utjecaj na inhibiciju luminiscencije bakterije te se ona povećavala sa smanjenjem koncentracije MP čestica.
7. Identificirani su glavni utjecajni čimbenici prema **Taguchi dizajnu**: veličina čestica MP-a, koncentracija MP-a i broj okretaja kako bi se osigurali optimalni uvjeti za rast mikroorganizama i odvijanje procesa biorazgradnje. Prema dobivenom postotku značajnosti, najviše utječe veličina čestica PS-a u iznosu od **48,52%**, zatim slijede broj okretaja i koncentracija MP-a s postotkom značajnosti od **41,31%** odnosno **5,03%**. Rezultati eksperimenata ukazali su da se tijekom procesa biorazgradnje PS-a pH-vrijednost, temperatura i koncentracija otopljenoga kisika nisu značajno mijenjale.
8. Korišten je dizajn **punog faktorskog plana** za određivanje optimalnih uvjeta za biorazgradnju PS-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus cereus*. Optimalni uvjeti za biorazgradnju PS-a pokazali su se **najmanja veličina čestica** (<300 μm), koncentracija od 117,56 mg/L koja gravitira prema **najmanjoj vrijednosti koncentracije** (50 mg/L) i **najmanja vrijednost broja okretaja** (100 o/min). U tim uvjetima statistički koeficijent **R<sup>2</sup>** iznosi 0,9069. Stoga je proces biorazgradnje uspješno primijenjen za biorazgradnju PS-a primjenom *B. cereus*.
9. Ovaj rad jasno je pokazao da se biorazgradnja PS-a primjenom *B. cereus* može **poboljšati optimizacijom ključnih čimbenika biorazgradnje** (veličina, koncentracija i broj okretaja)

## 6. LITERATURA

1. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology advances*, 26(3), 246-265.
2. Kamboj, M. (2016). Degradation of plastics for clean environment. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Applied Sciences*, 5(3), 1-10.
3. Shimao, M. (2001). Biodegradation of plastics. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), 242-247.
4. Villarrubia-Gómez, P., Cornell, S. E., & Fabres, J. (2018). Marine plastic pollution as a planetary boundary threat—The drifting piece in the sustainability puzzle. *Marine policy*, 96, 213-220.
5. Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K. O., ... & Tyler, C. R. (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2047-2062.
6. Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Mar Pollute Bull* 62 (8): 1596–1605.
7. Net, S., Sempere, R., Delmont, A., Paluselli, A., & Ouddane, B. (2015). Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. *Environmental Science & Technology*, 49(7), 4019-4035.
8. Suhrhoff, T. J., & Scholz-Böttcher, B. M. (2016). Qualitative impact of salinity, UV radiation and turbulence on leaching of organic plastic additives from four common plastics—A lab experiment. *Marine pollution bulletin*, 102(1), 84-94.
9. Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., & Duflos, G. (2017). Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: a review. *Chemosphere*, 182, 781-793.
10. Mackintosh, C. E., Maldonado, J., Hongwu, J., Hoover, N., Chong, A., Ikonomou, M. G., & Gobas, F. A. (2004). Distribution of phthalate esters in a marine aquatic food web: comparison to polychlorinated biphenyls. *Environmental science & technology*, 38(7), 2011-2020.
11. Borch, J., Ladefoged, O., Hass, U., & Vinggaard, A. M. (2004). Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reproductive toxicology*, 18(1), 53-61.
12. Browne, P., Van Der Wal, L., & Gourmelon, A. (2020). OECD approaches and considerations for regulatory evaluation of endocrine disruptors. *Molecular and cellular endocrinology*, 504, 110675.

13. Koelmans, A. A., Besseling, E., & Foekema, E. M. (2014). Leaching of plastic additives to marine organisms. *Environmental pollution*, 187, 49-54.
14. Klein, S., Dimzon, I. K., Eubeler, J., & Knepper, T. P. (2018). Analysis, occurrence, and degradation of microplastics in the aqueous environment. In *Freshwater microplastics* (pp. 51-67). Springer, Cham.
15. Tokiwa, Y.; Calabia, B.P.; Ugwu, C.U.; Aiba, S. Biodegradability of Plastics. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, 10, 3722-3742.
16. Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y., & Yu, F. (2020). Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. *Science of the Total Environment*, 715, 136968.
17. Arthur, C., Baker, J. E., & Bamford, H. A. (2009). Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris, September 9-11, 2008, University of Washington Tacoma, Tacoma, WA, USA.
18. Clausen, L. P. W., Hansen, O. F. H., Oturai, N. B., Syberg, K., & Hansen, S. F. (2020). Stakeholder analysis with regard to a recent European restriction proposal on microplastics. *PloS one*, 15(6), e0235062.
19. Crawford, C. B., & Quinn, B. (2017). The interactions of microplastics and chemical pollutants. *Microplastic pollutants*, 131-157.
20. 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..
21. Kovochich, M., Liong, M., Parker, J. A., Oh, S. C., Lee, J. P., Xi, L., ... & Unice, K. M. (2021). Chemical mapping of tire and road wear particles for single particle analysis. *Science of The Total Environment*, 757, 144085.
22. Resnick, B. (2019). More than ever, our clothes are made of plastic. Just washing them can pollute the oceans. *Vox*.
23. Lassen, C., Hansen, S. F., Magnusson, K., Norén, F., Hartmann, N. I. B., Jensen, P. R., ... & Brinch, A. (2012). Microplastics-Occurrence, effects and sources of. *Significance*, 2(2).
24. Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment international*, 102, 165-176.
25. Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., ... & Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PloS one*, 9(12), e111913.
26. <https://tvrтка.kaufland.hr/ljudi-okolis/mikroplastika.html> (Slika 2.1.), pristup 27.5.2022.]

27. Silva, A. B., Bastos, A. S., Justino, C. I., da Costa, J. P., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. (2018). Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry-A review. *Analytica chimica acta*, *1017*, 1-19.
28. Dris, R., Gasperi, J., Mirande, C., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., & Tassin, B. (2017). A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments. *Environmental pollution*, *221*, 453-458.
29. Gasperi, J., Wright, S. L., Dris, R., Collard, F., Mandin, C., Guerrouache, M., ... & Tassin, B. (2018). Microplastics in air: are we breathing it in?. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, *1*, 1-5.
30. Warheit, D. B., Hart, G. A., Hesterberg, T. W., Collins, J. J., Dyer, W. M., Swaen, G. M. H., ... & Kennedy, G. L. (2001). Potential pulmonary effects of man-made organic fiber (MMOF) dusts. *Critical reviews in toxicology*, *31*(6), 697-736.
31. Wright, S. L., Ulke, J., Font, A., Chan, K. L. A., & Kelly, F. J. (2020). Atmospheric microplastic deposition in an urban environment and an evaluation of transport. *Environment international*, *136*, 105411.
32. Bergmann, M., Mützel, S., Primpke, S., Tekman, M. B., Trachsel, J., & Gerdts, G. (2019). White and wonderful? Microplastics prevail in snow from the Alps to the Arctic. *Science advances*, *5*(8), eaax1157.
33. Lebreton, L., Van Der Zwet, J., Damsteeg, J. W., Slat, B., Andrady, A., & Reisser, J. (2017). River plastic emissions to the world's oceans. *Nature communications*, *8*(1), 1-10.
34. Meijer, L. J., van Emmerik, T., van der Ent, R., Schmidt, C., & Lebreton, L. (2021). More than 1000 rivers account for 80% of global riverine plastic emissions into the ocean. *Science Advances*, *7*(18), eaaz5803.
35. Guo, X., & Wang, J. (2019). The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, *142*, 1-14.
36. Wang, W., Gao, H., Jin, S., Li, R., & Na, G. (2019). The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, *173*, 110-117.
37. Marn, N., Jusup, M., Kooijman, S. A., & Klanjscek, T. (2020). Quantifying impacts of plastic debris on marine wildlife identifies ecological breakpoints. *Ecology Letters*, *23*(10), 1479-1487.
38. [Global plastics production, 1917 to 2050 » Darrin Qualman](#) (pristup 26.6.2022.)
39. Crawford, C. B., & Quinn, B. (2017). The interactions of microplastics and chemical pollutants. *Microplastic pollutants*, 131-157.
40. Issac, M. N., & Kandasubramanian, B. (2021). Effect of microplastics in water and aquatic systems. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(16), 19544-19562.

41. Zhang, K., Xiong, X., Hu, H., Wu, C., Bi, Y., Wu, Y., ... & Liu, J. (2017). Occurrence and characteristics of microplastic pollution in Xiangxi Bay of Three Gorges Reservoir, China. *Environmental science & technology*, 51(7), 3794-3801.
42. Hall Jr, R. O., & Meyer, J. L. (1998). The trophic significance of bacteria in a detritus-based stream food web. *Ecology*, 79(6), 1995-2012.
43. Tutman, P., Bojanić Varezić, D., Prvan, M., Božanić, J., Nazlić, M., Šiljić, J., & Pavičić, M. (2017). Integrirano planiranje u cilju smanjivanja utjecaja morskog otpada–Projekt DeFishGear. In *Konferencija o zaštiti okoliša-Vizije gospodarenja otpadom: knjiga sažetaka* (p. 26).
44. Pellini, G., Gomiero, A., Fortibuoni, T., Ferrà, C., Grati, F., Tasseti, A. N., ... & Scarcella, G. (2018). Characterization of microplastic litter in the gastrointestinal tract of *Solea solea* from the Adriatic Sea. *Environmental pollution*, 234, 943-952.
45. Palatinus, A., Viršek, M. K., Robič, U., Grego, M., Bajt, O., Šiljić, J., ... & Peterlin, M. (2019). Marine litter in the Croatian part of the middle Adriatic Sea: Simultaneous assessment of floating and seabed macro and micro litter abundance and composition. *Marine pollution bulletin*, 139, 427-439.G.
46. Scheurer, M., & Bigalke, M. (2018). Microplastics in Swiss floodplain soils. *Environmental science & technology*, 52(6), 3591-3598.
47. Yang, L., Zhang, Y., Kang, S., Wang, Z., & Wu, C. (2021). Microplastics in soil: A review on methods, occurrence, sources, and potential risk. *Science of the Total Environment*, 780, 146546.
48. Bläsing, M., & Amelung, W. (2018). Plastics in soil: Analytical methods and possible sources. *Science of the total environment*, 612, 422-435.
49. Xu, B., Liu, F., Cryder, Z., Huang, D., Lu, Z., He, Y., ... & Xu, J. (2020). Microplastics in the soil environment: occurrence, risks, interactions and fate—a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(21), 2175-2222.
50. Liu, M., Lu, S., Song, Y., Lei, L., Hu, J., Lv, W., ... & He, D. (2018). Microplastic and mesoplastic pollution in farmland soils in suburbs of Shanghai, China. *Environmental Pollution*, 242, 855-862.
51. de Souza Machado, A. A., Lau, C. W., Till, J., Kloas, W., Lehmann, A., Becker, R., & Rillig, M. C. (2018). Impacts of microplastics on the soil biophysical environment. *Environmental science & technology*, 52(17), 9656-9665.
52. Yang, L., Zhang, Y., Kang, S., Wang, Z., & Wu, C. (2021). Microplastics in soil: A review on methods, occurrence, sources, and potential risk. *Science of the Total Environment*, 780, 146546.

53. Godwin, A. D. (2017). Applied plastics engineering handbook. *William Andrew Applied Science Publishers*.
54. [www.messe-duesseldorf.de/md/en/about\\_us/aboarhives\\_newsarchiv\\_trade\\_show](http://www.messe-duesseldorf.de/md/en/about_us/aboarhives_newsarchiv_trade_show) (Pristup 2.6. 2022.)
55. Pfaendner, R. (2006). How will additives shape the future of plastics?. *Polymer degradation and stability*, 91(9), 2249-2256.
56. Combey, M. (1972). Plasticisers, Stabilisers, and Fillers.
57. Pfaendner, R. (2013). Polymer additives. *Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing*, 225-247.
58. Pospisil, J., & Klemchuk, P. P. (1990). *Oxidation inhibition in organic materials*.
59. Billmeyer, F. W. (1984). *Textbook of polymer science*. John Wiley & Sons.
60. Smith, S. H., & Taylor, L. T. (2002). Extraction of various additives from polystyrene and their subsequent analysis. *Chromatographia*, 56(3-4), 165–169.
61. Grossman, R. F., & Lutz Jr, J. T. (Eds.). (2000). *Polymer modifiers and additives*. CRC Press.
62. Alaei, M., Arias, P., Sjödin, A., & Bergman, Å. (2003). An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment international*, 29(6), 683-689.
63. Ašmonaitė, G., Sundh, H., Asker, N., & Carney Almroth, B. (2018). Rainbow trout maintain intestinal transport and barrier functions following exposure to polystyrene microplastics. *Environmental science & technology*, 52(24), 14392-14401.
64. Jacob, H., Gilson, A., Lanctôt, C., Besson, M., Metian, M., & Lecchini, D. (2019). No effect of polystyrene microplastics on foraging activity and survival in a post-larvae coral-reef fish, *Acanthurus triostegus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 102(4), 457-461.
65. Mattsson, K., Ekvall, M. T., Hansson, L. A., Linse, S., Malmendal, A., & Cedervall, T. (2015). Altered behavior, physiology, and metabolism in fish exposed to polystyrene nanoparticles. *Environmental science & technology*, 49(1), 553-561.
66. Mattsson, K., Johnson, E. V., Malmendal, A., Linse, S., Hansson, L. A., & Cedervall, T. (2017). Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Scientific reports*, 7(1), 1-7. nanoparticles delivered through the food chain. *Sci. Rep.* 2017, 7, 11452.
67. Chen, Q., Gundlach, M., Yang, S., Jiang, J., Velki, M., Yin, D., & Hollert, H. (2017). Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. *Science of the total environment*, 584, 1022-1031.



68. Wang, J., Li, Y., Lu, L., Zheng, M., Zhang, X., Tian, H., ... & Ru, S. (2019). Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Environmental Pollution*, 254, 113024.
69. Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., & Jin, Y. (2018). Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Science of the Total Environment*, 631, 449-458.
70. Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., ... & Ren, H. (2016). Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental science & technology*, 50(7), 4054-4060.
71. Yin, L., Liu, H., Cui, H., Chen, B., Li, L., & Wu, F. (2019). Impacts of polystyrene microplastics on the behavior and metabolism in a marine demersal teleost, black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Journal of hazardous materials*, 380, 120861.
72. Zhu, M., Chernick, M., Rittschof, D., & Hinton, D. E. (2020). Chronic dietary exposure to polystyrene microplastics in maturing Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 220, 105396.
73. Yang, H., Xiong, H., Mi, K., Xue, W., Wei, W., & Zhang, Y. (2020). Toxicity comparison of nano-sized and micron-sized microplastics to Goldfish *Carassius auratus* Larvae. *Journal of hazardous materials*, 388, 122058.
74. Choi, J. S., Hong, S. H., & Park, J. W. (2020). Evaluation of microplastic toxicity in accordance with different sizes and exposure times in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Marine environmental research*, 153, 104838.
75. Yong, C. Q. Y., Valiyaveetil, S., & Tang, B. L. (2020). Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(05), 1509.
76. Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2013). Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current biology*, 23(23), 2388-2392.
77. Lahimer, M. C., Ayed, N., Horriche, J., & Belgaied, S. (2017). Characterization of plastic packaging additives: food contact, stability and toxicity. *Arabian journal of chemistry*, 10, S1938-S1954.
78. Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin*, 62(12), 2588-2597.
79. Granum, P. E., & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology letters*, 157(2), 223-228.

80. Silva, A. B., Costa, M. F., & Duarte, A. C. (2018). Biotechnology advances for dealing with environmental pollution by micro (nano) plastics: lessons on theory and practices. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 30-35.
81. Azam, F. (1982). Measurement of growth of bacteria in the sea and the regulation of growth by environmental conditions.
82. Han, J., Zhang, L., Wang, S., Yang, G., Zhao, L., & Pan, K. (2016). Co-culturing bacteria and microalgae in organic carbon containing medium. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 23(1), 1-9.
83. Booth, A. M., Hansen, B. H., Frenzel, M., Johnsen, H., & Altin, D. (2016). Uptake and toxicity of methacrylate-based nanoplastic particles in aquatic organisms. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(7), 1641-1649.
84. Gagné, F. (2017). Toxicity and disruption of quorum sensing in *Vibrio fisheri* by environmental chemicals: Impacts of selected contaminants and microplastics. *Journal of Xenobiotics*, 7(1), 7101.
85. Davarpanah, E., & Guilhermino, L. (2015). Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 167, 269-275.
86. Koelmans, A. A., Besseling, E., & Shim, W. J. (2015). Nanoplastics in the aquatic environment. Critical review. *Marine anthropogenic litter*, 325-340.
87. Sjollema, S. B., Redondo-Hasselerharm, P., Leslie, H. A., Kraak, M. H., & Vethaak, A. D. (2016). Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth?. *Aquatic toxicology*, 170, 259-261.
88. Pérez, P., Fernández, E., & Beiras, R. (2010). Use of fast repetition rate fluorometry on detection and assessment of PAH toxicity on microalgae. *Water, Air, & Soil Pollution*, 209(1), 345-356.
89. Kaeding, A. J., Ast, J. C., Pearce, M. M., Urbanczyk, H., Kimura, S., Endo, H., ... & Dunlap, P. V. (2007). Phylogenetic diversity and cosymbiosis in the bioluminescent symbioses of "Photobacterium mandapamensis". *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10), 3173-3182.
90. Girotti, S., Ferri, E. N., Fumo, M. G., & Maiolini, E. (2008). Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. *Analytica chimica acta*, 608(1), 2-29.
91. Dunn, A. K., Rader, B. A., Stabb, E. V., & Mandel, M. J. (2015). Regulation of bioluminescence in *Photobacterium leiognathi* strain KNH6. *Journal of bacteriology*, 197(23), 3676-3685.

92. Ruby, E. G., & McFall-Ngai, M. J. (1999). Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri*. *Trends in microbiology*, 7(10), 414-420.
93. Borojević, T., Ašperger, D., & Dolar, D. (2018). Određivanje toksičnosti ksenobiotika u vodi. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 67(13 (special issue)), P135-P142.
94. Ruby, E. G., Urbanowski, M., Campbell, J., Dunn, A., Faini, M., Gunsalus, R., ... & Greenberg, E. P. (2005). Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 3004-3009.
95. Kučić-Grgić, D., Skripta iz laboratorijskih vježbi iz kolegija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2021./2022.
96. Heinlaan, M., Kasemets, K., Aruoja, V., Blinova, I., Bondarenko, O., Lukjanova, A., ... & Kahru, A. (2020). Hazard evaluation of polystyrene nanoplastic with nine bioassays did not show particle-specific acute toxicity. *Science of the Total Environment*, 707, 136073.
97. Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., & Tassin, B. (2016). Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment?. *Marine pollution bulletin*, 104(1-2), 290-293.
98. Wu, P., Huang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Zhang, Y., He, F., ... & Gao, B. (2019). Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics. *Ecotoxicology and environmental safety*, 184, 109612.
99. Leslie, H. A., Van Velzen, M. J., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment international*, 163, 107199.
100. Fleury, J. B., & Baulin, V. A. (2021). Microplastics destabilize lipid membranes by mechanical stretching. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(31), e2104610118.
101. Kim, J. S., Lee, H. J., Kim, S. K., & Kim, H. J. (2018). Global pattern of microplastics (MPs) in commercial food-grade salts: sea salt as an indicator of seawater MP pollution. *Environmental science & technology*, 52(21), 12819-12828.
102. Yong, C. Q. Y., Valiyaveetil, S., & Tang, B. L. (2020). Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(05), 1509.
103. Deng, Y., Zhang, Y., Lemos, B., & Ren, H. (2017). Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.

104. Wu, P., Huang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Zhang, Y., He, F., ... & Gao, B. (2019). Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics. *Ecotoxicology and environmental safety*, 184, 109612.
105. <https://plasticfoodservicefacts.com/Safety-of-Styrene-Based-Polymers-for-Food-Contact> (pristup: 20.7.2022)
106. Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International journal of molecular sciences*, 10(9), 3722-3742.
107. Kratofil Krehula, Lj., Degradacija i modifikacija polimera, 4. Predavanje: Modifikacije polimera, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016/2017.
108. Wypych, G., (2012). "PS polystyrene". *Handbook of Polymers*. pp. 541–7.
109. Al-Malaika, S., Axtell, F., Rothon, R., & Gilbert, M. (2017). Additives for Plastics, ; Brydson's Plastics Materials.
110. Bedeniković, Z. (2017). *Razvoj plastične ambalaže za pakiranje medicinskog proizvoda* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture).
111. Wypych, G., & Pionteck, J. (2016). *Handbook of antistatics*. Elsevier.
112. Yang, Y., Yang, J., Wu, W. M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., ... & Jiang, L. (2015). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests. *Environmental science & technology*, 49(20), 12080-12086.
113. <http://www.bioenergyconsult.com/tag/environmental-impacts-of-eps-foam/Rubio> MR. [Recycling of EPS](#) (dostupno 25.7.2022.)
114. <https://eu.usatoday.com/story/news/nation/2013/12/21/polystyrene-foam-ban/4141835/> (dostupno 25.7.2022.)
115. Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Current opinion in biotechnology*, 22(3), 422-426.
116. Blair Espinoza, R. M. (2019). *Microplastics in wastewater treatment systems and receiving waters* (Doctoral dissertation, University of Glasgow).
117. Shahnawaz, M., Sangale, M. K., & Ade, A. B. (2019). Bioremediation technology for plastic waste.
118. Sol, D., Laca, A., Laca, A., & Díaz, M. (2020). Approaching the environmental problem of microplastics: Importance of WWTP treatments. *Science of the Total Environment*, 740, 140016.
119. Gong, J., Duan, N., & Zhao, X. (2012). Evolutionary engineering of *Phaffia rhodozyma* for astaxanthin-overproducing strain. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 6(2), 174-178.

120. Pathak, V. M. (2017). Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 1-31.
121. Rajandas, H., Parimannan, S., Sathasivam, K., Ravichandran, M., & Yin, L. S. (2012). A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. *Polymer Testing*, 31(8), 1094-1099.
122. Sharma, A., & Sharma, A. (2004). Degradation assessment of low density polythene (LDP) and polythene (PP) by an indigenous isolate of *Pseudomonas stutzeri*.
123. Roy, P. K., Titus, S., Surekha, P., Tulsi, E., Deshmukh, C., & Rajagopal, C. (2008). Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polymer degradation and stability*, 93(10), 1917-1922.
124. Mor, R., & Sivan, A. (2008). Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *Biodegradation*, 19(6), 851-858.
125. Iwata, T., Doi, Y., Tanaka, T., Akehata, T., Shiromo, M., & Teramachi, S. (1997). Enzymatic degradation and adsorption on poly [(R)-3-hydroxybutyrate] single crystals with two types of extracellular PHB depolymerases from *Comamonas acidovorans* YM1609 and *Alcaligenes faecalis* T1. *Macromolecules*, 30(18), 5290-5296.
126. Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., & Fava, F. (2019). Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. *New biotechnology*, 52, 35-41.
127. Kumari, A., Chaudhary, D. R., & Jha, B. (2019). Destabilization of polyethylene and polyvinylchloride structure by marine bacterial strain. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(2), 1507-1516.
128. Skariyachan, S., Patil, A. A., Shankar, A., Manjunath, M., Bachappanavar, N., & Kiran, S. (2018). Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants. *Polymer Degradation and Stability*, 149, 52-68.
129. Habib, S., Iruthayam, A., Abd Shukor, M. Y., Alias, S. A., Smykla, J., & Yasid, N. A. (2020). Biodeterioration of untreated polypropylene microplastic particles by Antarctic bacteria. *Polymers*, 12(11), 2616.
130. Müller, R. J., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K., & Deckwer, W. D. (2005). Enzymatic degradation of poly (ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. *Macromolecular rapid communications*, 26(17), 1400-1405.
131. Saminathan, P., Sripriya, A., Nalini, K., Sivakumar, T., & Thangapandian, V. (2014). Biodegradation of plastics by *Pseudomonas putida* isolated from garden soil samples. *J Adv Bot Zool*, 1(3), 34-38.

132. Kopečný, J., & Williams, A. G. (1988). Synergism of rumen microbial hydrolases during degradation of plant polymers. *Folia microbiologica*, 33(3), 208-212.
133. Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 382-398.
134. Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2000). Brock biology of microorganisms, Pearson Education. Inc. USA. Halaman, 144(172), 713.
135. Drobniowski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews*, 6(4), 324-338.
136. Granum, P. E., & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology letters*, 157(2), 223-228.
137. Wijman, J. G., de Leeuw, P. P., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and environmental microbiology*, 73(5), 1481-1488.
138. Kamar, R., Gohar, M., Jéhanno, I., Réjasse, A., Kallassy, M., Lereclus, D., ... & Ramarao, N. (2013). Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis. *Journal of clinical microbiology*, 51(1), 320-323.
139. <https://textbookofbacteriology.net/B.cereus.html> (Slika 2.10.) (Pristup 21.5.2022.)
140. Suresh, B., Maruthamuthu, S., Palanisamy, N., Ragunathan, R., Pandiyaraj, K. N., & Muralidharan, V. S. (2011). Investigation on biodegradability of polyethylene by *Bacillus cereus* strain Ma-Su isolated from compost soil. *Int Res J Microbiol*, 2, 292-302.
141. Sun, J., Dai, X., Wang, Q., van Loosdrecht, M. C., & Ni, B. J. (2019). Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. *Water research*, 152, 21-37.
142. Nizzetto, L., Futter, M., & Langaas, S. (2016). Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin?.
143. Hou, L., Kumar, D., Yoo, C. G., Gitsov, I., & Majumder, E. L. W. (2021). Conversion and removal strategies for microplastics in wastewater treatment plants and landfills. *Chemical Engineering Journal*, 406, 126715.
144. Mintenig, S. M., Int-Veen, I., Löder, M. G., Primpke, S., & Gerdt, G. (2017). Identification of microplastic in effluents of waste water treatment plants using focal plane array-based micro-Fourier-transform infrared imaging. *Water research*, 108, 365-372.
145. Rummel, C. D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kühnel, D., & Schmitt-Jansen, M. (2017). Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment. *Environmental science & technology letters*, 4(7), 258-267.
146. Ghatge, S., Yang, Y., Ahn, J. H., & Hur, H. G. (2020). Biodegradation of polyethylene: a brief review. *Applied Biological Chemistry*, 63(1), 1-14.

147. Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environmental science & technology*, 45(21), 9175-9179.
148. Blair, R. M., Waldron, S., & Gauchotte-Lindsay, C. (2019). Average daily flow of microplastics through a tertiary wastewater treatment plant over a ten-month period. *Water Research*, 163, 114909.
149. Poerio, T., Piacentini, E., & Mazzei, R. (2019). Membrane processes for microplastic removal. *Molecules*, 24(22), 4148.
150. Ziajahromi, S., Neale, P. A., Rintoul, L., & Leusch, F. D. (2017). Wastewater treatment plants as a pathway for microplastics: development of a new approach to sample wastewater-based microplastics. *Water research*, 112, 93-99.
151. Zhou, P., Ren, W., Nie, G., Li, X., Duan, X., Zhang, Y., & Wang, S. (2020). Fast and Long-Lasting Iron (III) Reduction by Boron Toward Green and Accelerated Fenton Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(38), 16517-16526.
152. Lang, M., Yu, X., Liu, J., Xia, T., Wang, T., Jia, H., & Guo, X. (2020). Fenton aging significantly affects the heavy metal adsorption capacity of polystyrene microplastics. *Science of the Total Environment*, 722, 137762.
153. Duoerkun, G., Zhang, Y., Shi, Z., Shen, X., Cao, W., Liu, T., ... & Zhang, L. (2020). Construction of n-TiO<sub>2</sub>/p-Ag<sub>2</sub>O junction on carbon fiber cloth with Vis-NIR photoresponse as a filter-membrane-shaped photocatalyst. *Advanced Fiber Materials*, 2(1), 13-23.
154. Sun, Y., Mwanjewe, J. B., Wangatia, L. M., Zabihi, F., Nedeljković, J., & Yang, S. (2020). Enhanced photocatalytic performance of surface-modified TiO<sub>2</sub> nanofibers with rhodizonic acid. *Advanced Fiber Materials*, 2(2), 118-122.
155. Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., & Sakharkar, K. R. (2012). Biodegradation of low density polythene (LDPE) by Pseudomonas species. *Indian journal of microbiology*, 52(3), 411-419.
156. Duraković, S., Primjenjena mikrobiologija, Durieux, Zagreb, 1996.
157. Lusher, A., Hollman, P., & Mendoza-Hill, J. (2017). *Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety*. FAO.
158. Wu, Q., Xu, Y., Yao, Z., Liu, A., & Shi, G. (2010). Supercapacitors based on flexible graphene/polyaniline nanofiber composite films. *ACS nano*, 4(4), 1963-1970.
159. Alimi, O. S., Farner Budarz, J., Hernandez, L. M., & Tufenkji, N. (2018). Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. *Environmental science & technology*, 52(4), 1704-1724.

160. Scalenghe, R. (2018). Resource or waste? A perspective of plastics degradation in soil with a focus on end-of-life options. *Heliyon*, 4(12), e00941.
161. Gong, J., Kong, T., Li, Y., Li, Q., Li, Z., & Zhang, J. (2018). Biodegradation of microplastic derived from poly (ethylene terephthalate) with bacterial whole-cell biocatalysts. *Polymers*, 10(12), 1326.
162. Rech, S., Macaya-Caquilpán, V., Pantoja, J. F., Rivadeneira, M. M., Madariaga, D. J., & Thiel, M. (2014). Rivers as a source of marine litter—a study from the SE Pacific. *Marine pollution bulletin*, 82(1-2), 66-75.
163. Wu, P., Huang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Zhang, Y., He, F., ... & Gao, B. (2019). Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics. *Ecotoxicology and environmental safety*, 184, 109612.
164. Keswani, A., Oliver, D. M., Gutierrez, T., & Quilliam, R. S. (2016). Microbial hitchhikers on marine plastic debris: human exposure risks at bathing waters and beach environments. *Marine environmental research*, 118, 10-19.
165. Gu, J. D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International biodeterioration & biodegradation*, 52(2), 69-91.
166. Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, 169(1-3), 1-15.
167. Pauli, N. C., Petermann, J. S., Lott, C., & Weber, M. (2017). Macrofouling communities and the degradation of plastic bags in the sea: an in situ experiment. *Royal Society open science*, 4(10), 170549.
168. Rummel, C. D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kühnel, D., & Schmitt-Jansen, M. (2017). Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment. *Environmental science & technology letters*, 4(7), 258-267.
169. Kim, H. W., Jo, J. H., Kim, Y. B., Le, T. K., Cho, C. W., Yun, C. H., ... & Yeom, S. J. (2021). Biodegradation of polystyrene by bacteria from the soil in common environments. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 126239.
170. Stabnikova, O., Stabnikov, V., Marinin, A., Klavins, M., & Vaseashta, A. (2022). The role of microplastics biofilm in accumulation of trace metals in aquatic environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(7), 1-16.
171. Salaberria, I., Nadvornik-Vincent, C., Monticelli, G., Altin, D., & Booth, A. M. (2020). Microplastic dispersal behavior in a novel overhead stirring aqueous exposure system. *Marine Pollution Bulletin*, 157, 111328.
172. Goldman, E., & Green, L. H. (Eds.). (2015). *Practical handbook of microbiology*. CRC press.



173. Frenzel, E., Kranzler, M., Stark, T. D., Hofmann, T., & Ehling-Schulz, M. (2015). The endospore-forming pathogen *Bacillus cereus* exploits a small colony variant-based diversification strategy in response to aminoglycoside exposure. *MBio*, 6(6), e01172-15.
174. <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores/>(pristup: 6.5.2022.)
175. Mols, M., Pier, I., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2009). The impact of oxygen availability on stress survival and radical formation of *Bacillus cereus*. *International journal of food microbiology*, 135(3), 303-311.
176. Couvert, O., Divanac'h, M. L., Lochardet, A., Thuault, D., & Huchet, V. (2019). Modelling the effect of oxygen concentration on bacterial growth rates. *Food microbiology*, 77, 21-25.
177. Baez, A., & Shiloach, J. (2014). Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds. *Microbial cell factories*, 13(1), 1-7.
178. Przemieniecki, S. W., Kosewska, A., Ciesielski, S., & Kosewska, O. (2020). Changes in the gut microbiome and enzymatic profile of *Tenebrio molitor* larvae biodegrading cellulose, polyethylene and polystyrene waste. *Environmental Pollution*, 256, 113265.
179. Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?. *Microbial biotechnology*, 10(6), 1308-1322.
180. Xu, J., Cui, Z., Nie, K., Cao, H., Jiang, M., Xu, H., ... & Liu, L. (2019). A quantum mechanism study of the C-C bond cleavage to predict the bio-catalytic polyethylene degradation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 489.
181. Andrić, J. (2007). *Metodologija konceptualnog projektiranja brodskih konstrukcija s interakcijom trup-nadgrađe* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture).
182. Marinković, R., & Jurković, Z. (2011). UPRAVLJANJE PROMJENAMA PRIMJENOM TAGUCHI METODE. *Ekonomski Vjesnik*, 24(1).
183. Barrado, E., Vega, M., Pardo, R., Grande, P., & Del Valle, J. L. (1996). Optimisation of a purification method for metal-containing wastewater by use of a Taguchi experimental design. *Water Research*, 30(10), 2309-2314.
184. <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, pristup: (6.8.2022.)
185. Ukrainczyk, M. (2010). Planiranje pokusa u industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 5(3-4), 96-105.
186. Shafee, N., Aris, S. N., Rahman, R. N. Z. A., Basri, M., & Salleh, A. B. (2005). Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146. *J Appl Sci Res*, 1(1), 1-8.
187. Lawson, J. (2010). *Design and Analysis of Experiments with SAS*. Chapman and Hall/CRC.

188. Nolan, D., & Speed, T. P. (2001). *Stat labs: Mathematical statistics through applications*. Springer Science & Business Media.
189. Bisutti, I., Hilke, I., & Raessler, M. (2004). Determination of total organic carbon—an overview of current methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(10-11), 716-726.
190. Orhan, Y., Hrenovic, J., & Buyukgungor, H. (2004). Biodegradation of plastic compost bags under controlled soil conditions. *Acta Chimica Slovenica*, 51(3), 579-588.
191. Roe, C. P., & Brass, P. D. (1955). The effect of aliphatic detergents on the mechanical stability of polystyrene latex. *Journal of Colloid Science*, 10(2), 194-205.
192. <https://www.in-portal.hr/in-portal-news/vijesti/6106/alarmantno-opasnekemikalije-u-komercijalnim-deterdzentima-koje-truju-vas-i-vasu-obitelji> (pristup 5.5. 2022.)
193. Li, D., Jiang, Y., Lv, S., Liu, X., Gu, J., Chen, Q., & Zhang, Y. (2018). Preparation of plasticized poly (lactic acid) and its influence on the properties of composite materials. *PLoS One*, 13(3), e0193520.
194. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dioctylphthalate#section=Information%20Sources> (pristup 18.6.2022.)
195. Rowdhwal, S. S. S., & Chen, J. (2018). Toxic effects of di-2-ethylhexyl phthalate: an overview. *BioMed research international*, 2018.
196. Wenande, E., & Garvey, L. H. (2016). Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review. *Clinical & Experimental Allergy*, 46(7), 907-922.
197. Tanaka, K., Takada, H., Ikenaka, Y., Nakayama, S. M., & Ishizuka, M. (2020). Occurrence and concentrations of chemical additives in plastic fragments on a beach on the island of Kauai, Hawaii. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110732.
198. Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. A. (2014). *Introduction to spectroscopy*. Cengage learning. Infrared Spectroscopy, USA, 13-101.
199. Kaczmarek, H., Świątek, M., & Kamińska, A. (2004). Modification of polystyrene and poly (vinyl chloride) for the purpose of obtaining packaging materials degradable in the natural environment. *Polymer degradation and stability*, 83(1), 35-45.
200. Strotmann, U., Pastor Flores, D., Konrad, O., & Gendig, C. (2020). Bacterial toxicity testing: Modification and evaluation of the luminescent bacteria test and the respiration inhibition test. *Processes*, 8(11), 1349.
201. Kučić-Grgić, D., Ekotoksikologija, 5. predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2019./2020.
202. Wei, S., Wang, F., Chen, Y., Lan, T., & Zhang, S. (2018). The joint toxicity effect of five antibiotics and dibutyl phthalate to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(26), 26504-26511.

## 7. POPIS OZNAKA I SIMBOLA

$\omega$  - maseni udio, %  
 $M$  – molarna masa, g/mol  
 $\rho$  – gustoća, kg/L  
 $\gamma$  – masena koncentracija, g/L  
 $T$  – temperatura, °C  
CFU – broj živih stanica bakterija stanica/ mL  
MP - mikroplastika  
NP - nanoplastka  
MAP – makroplastika  
MEP – mezoplastika  
PVC – poli(vinil-klorid)  
PS – polistiren  
PE – polietilen  
PP – polipropilen  
PET – poli(etilen tereftalat)  
PES – poliester  
PU – poliuretan  
PA – poliamid  
FTIR-ATR – Fourierova infracrvena spektroskopija (engl. Fourier-transform infrared spectroscopy)  
SEM - pretražna elektronska mikroskopija (engl. Scanning Electron Microscopy)  
DSC – diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. Differential Scanning Calorimetry)  
TGA – termogravimetrijska analiza (engl. Thermogravimetric Analysis)  
BPA – bisfenol (A)  
PBC – poliklorirani bifenili  
PAH – policiklički aromatski ugljikovodici  
LDPE – polietilen niske gustoće  
HDPE – polietilen visoke gustoće  
DEHP – bis(2-etilheksil ftalat)  
ROS - reaktivne kisikove vrste  
DDT – diklordifeniltrikloretan  
HCH - heksaklorocikloheksan  
ISO – Međunarodna organizacija za normizaciju (engl. International Organization for Standardization)  
OECD – Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (engl. Organisation for Economic Cooperation and Development)  
CWT – Opsežna tehnologija voda (engl. Comprehensive Water Technology); *spin-off* tvrtka  
HCl – solna kiselina  
EC<sub>50</sub> - efektivna koncentracija koja izaziva štetni učinak kod 50% ispitanih testnih organizama  
EC<sub>20</sub> – efektivna koncentracija koja izaziva štetni učinak kod 20% ispitanih testnih organizama  
UV zračenje – ultraljubičasto zračenje  
OG – optička gustoća  
HA – hranjivi agar  
SO<sub>4</sub>•<sup>2-</sup> - sulfatni radikal  
HO• - hidroksilni radikal  
O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> -superoksid

TOC - ukupni organski ugljik  
 TC – ukupni ugljik  
 TIC - anorganski ugljik  
 SP – slijepa proba  
 HPLC/ MS – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti/masena spektrometrija  
 GC/ MS – plinska kromatografija/ masena spektrometrija  
 GPC – gel permeacijska kromatografija (engl. Gel permeation chromatography )  
 AFM – mikroskopija atomskih sila  
 NMR – nuklearna magnetska rezonancija  
 EDS – energetska disperzivna rendgenska spektroskopija  
 MFI – indeks tečenja taline (engl. Melt Flow Index)  
 DTA – diferencijalna toplinska analiza (engl. Differential Thermal Analysis)  
 ATP – adenzin trifosfat  
 PEG - polietilen glikol  
 C.V. – koeficijent varijacije, (engl. Coefficient of variation)  
 $\sigma$  - Standardna devijacija  
 $R^2$  – koeficijent determinacije, (engl. Coefficient of determination)  
 $V_R$  – radni volumen  
 MM – mineralni medij  
 ZV – zavisna varijabla  
 NV – nezavisna varijabla  
 $H_0$  – nulta hipoteza  
 SLS – natrijev lauril sulfat  
 SLES – natrijev lauret sulfat  
 DOP – dioktil ftalat  
 MEHP – monoesterski ftalati  
 EPS – ekspanzirani poliester  
 HIPS – polistiren visokog utjecaja  
 FMN – flavin-mononukleotid  
 NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat  
 NOX – NADP-oksidaza  
 TCA – ciklus trikarboksilne kiseline  
 BPK – biološka potrošnja kisika  
 K- konstanta brzine uklanjanja  
 CV – kristal violet  
 ANOVA – statistička analiza varijance  
 NOAA – Nacionalna uprava za oceane i atmosferu SAD-a  
 WWTP-s – uređaji za obradu otpadnih voda (engl. Wastewater treatment plants)  
 MF – mikrofiltracija  
 UF – ultrafiltracija  
 RO – reverzna osmoza  
 DM – dinamičke membrane  
 POP-s – postojana organska onečišćivala (engl. Organic Pollutants)  
 AOP-s – napredni oksidacijski procesi (engl. Advanced oxidation processes)

