

Ispitivanje značajnih čimbenika za biorazgradnju mikroplastike bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*

Jazbišek, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:149:566852>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-15**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



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

Ivana Jazbišek

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Jazbišek

Ispitivanje značajnih čimbenika za biorazgradnju mikroplastike
bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*

DIPLOMSKI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić
Komentor: doc. dr. sc. Vesna Ocelić Bulatović
Neposredni voditelj: Martina Miloloža, mag. ing. oecoing.

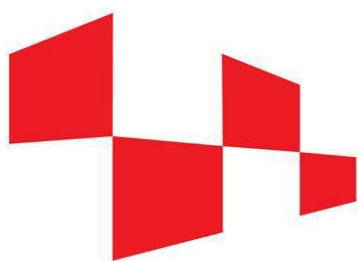
Članovi ispitnog povjerenstva:

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

izv. prof. Šime Ukić

dr. sc. Matija Cvetnić

Zagreb, rujan 2021.



HRZZ

Hrvatska zaklada
za znanost

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

Zahvale

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na strpljivosti, savjetima, pruženoj pomoći, pristupačnosti, ugodnoj radnoj atmosferi i stručnom mentorstvu tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se i asistentici mag. ing. oecoing. Martini Miloloži na pomoći, podršci, pristupačnosti, uloženom trudu, motivaciji, pozitivnom stavu i kvalitetnim razgovorima te prenesenom znanju kako teorijskom tako i praktičnom.

Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Zavoda za industrijsku ekologiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije na dobrom duhu, pomoći i lijepoj riječi te tvrtki Comprehensive Water Technology d.o.o. na omogućenom laboratorijskom radu i korištenju uređaja.

Veliko hvala mojim roditeljima Sandri i Željku, baki Danici, zaručniku Juraju, prijateljima i prijateljicama te ostalim dragim ljudima koji su bili uz mene tijekom fakultetskog obrazovanja te mi pružili bezuvjetnu podršku, motivaciju, ljubav, vjeru i nadu.

I, hvala dragom Bogu jer bez Njega ne bi bilo ništa moguće!

SAŽETAK

Kontinuirana proizvodnja plastičnih proizvoda povećanog opsega te neprikladno rukovanje s plastičnim otpadom rezultirali su nagomilavanjem plastičnog otpada u okolišu koji se s vremenom razlaže na manje čestice. Sve plastične čestice manje od 5 mm nazivaju se mikroplastikom. U svom sastavu mikroplastika uobičajeno sadrži aditive koji poboljšavaju svojstva plastičnih proizvoda. Međutim, kroz godine istraživanja, utvrđeni su njihovi štetni učinci na biocenozi. Stoga je od izuzetne važnosti pronaći učinkovitu metodu uklanjanja mikroplastike iz okoliša.

U ovom radu ispitala se biorazgradnja polistirena (PS) i poli(vinil-klorida) (PVC) primjenom bakterijskih kultura *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* u trajanju od 30 dana. Plan eksperimenata biorazgradnje dizajniran je prema Taguchi metodi prema kojem je ispitano 7 čimbenika: pH-vrijednost, temperatura, veličina MP-a, koncentracija MP-a, broj okretaja i koncentracija dodane glukoze, na dvije razine – min i max vrijednost. Tijekom procesa pratio se broj izraslih stanica bakterija (CFU), koncentracija ukupnog organskog ugljika (TOC), ukupnog ugljika (TC) i anorganskog ugljika (IC), koncentracija aniona i kationa te je provedena HPLC/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).

Dobiveni rezultati ukazuju da je *Bacillus cereus* bolje razgradio PS, a *Pseudomonas alcaligenes* PVC. FTIR spektri PS-a i PVC-a snimljeni prije i nakon biorazgradnje upućuju na nastanak novih funkcionalnih skupina, gubitak postojećih te na smanjenje intenziteta pikova apsorpcijskih vrpca. Značajni čimbenici za biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* su pH-vrijednost, veličina PS-a, broj okretaja, optička gustoća (OG), koncentracija dodane glukoze odnosno pH-vrijednost, temperatura, veličina PVC-a, OG i koncentracija dodane glukoze. Značajni čimbenici za biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* su veličina PS-a, broj okretaja i OG odnosno pH-vrijednost i veličina PVC-a.

Ključne riječi: mikroplastika, biorazgradnja, značajni čimbenici, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas alcaligenes*

SUMMARY

Continuous production of plastic products and unsuitable handling with plastic waste have resulted in accumulation of plastic waste in environment that decomposes to smaller particles with time. Plastic particles smaller than 5 mm are called microplastic. In its composition, microplastic contains additives that improve properties of plastic products. Through years of experiments, their harmful effect on biocoenosis has been determined. It is of great importance to find a successful method of removing microplastics out of the environment.

In this work, the process of biodegradation of polystyrene (PS) and polyvinyl chloride (PVC) with bacteria *Bacillus cereus* and *Pseudomonas alcaligenes* has been conducted for 30 days. Experiment plan of biodegradation was designed by Taguchi method in which 7 factors are tested: pH-value, temperature, size of MP, concentration of MP, number of RPM and concentration of added glucose on two levels- min and max value. During the process, the number of grown bacterial cells (CFU), the concentration of total organic carbon (TOC), total carbon (TC) and inorganic carbon (IC), the concentration of anions and cations were monitored, and HPLC/MS analysis was performed to identify released additives from the surface of MP or the resulting decomposition organic products. Samples are characterized with FTIR-ATR analysis. At the end of the each process of biodegradation, ecotoxicity of filtrate was examined with bacteria *Vibrio fischeri* for determining potential harmful effects on the test organism. Experimental data were processed using statistical variance analysis (ANOVA).

Results indicate that *Bacillus cereus* degraded PS better and *Pseudomonas alcaligenes* PVC. FTIR spectrum of PS and PVC took before and after of biodegradation MP shows development of new functional groups, the loss of the ones existing and reduction of intensity of peaks of absorption bands. Significant factors for biodegradation of PS and PVC with *Bacillus cereus* are pH-value, size of MP, number of RPM, OG and concentration of added glucose respectively pH-value, temperature, size of PVC, OG and concentration of added glucose. Significant factors for biodegradation of PS and PVC with *Pseudomonas alcaligenes* are size of PS, number of RPM and OG respectively pH-value and the size of PVC.

Key words: microplastics, biodegradation, significant factors, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas alcaligenes*

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Mikroplastika	3
2.2. Vrste mikroplastike	6
2.2.1. Polistiren.....	7
2.2.2. Poli(vinil-klorid).....	8
2.3. Svojstva mikroplastike	9
2.3.1. Kemijski sastav i struktura mikroplastike	10
2.3.2. Fizikalna svojstva	11
2.3.3. Mehanička svojstva	12
2.4. Adsorpcija onečišćujućih tvari na površinu mikroplastike	13
2.5. Mikroplastika u okolišu	14
2.5.1. Mikroplastika u vodenim ekosustavima	15
2.5.2. Mikroplastika u tlu	17
2.5.3. Mikroplastika u zraku	18
2.6. Mikroplastika u ljudskom organizmu	18
2.7. Toksičnost mikroplastike.....	22
2.7.1. Ispitivanje ekotoksičnosti primjenom morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	23
2.8. Načini uklanjanja mikroplastike	25
2.8.1. Fizikalno-kemijski procesi uklanjanja mikroplastike.....	26
2.8.2. Biološki procesi uklanjanja mikroplastike	27
2.9. Taguchi dizajn	32
3. EKSPERIMENTALNI DIO	33
3.1. Materijali	33
3.1.1. Mikroplastika.....	33
3.1.2. Bakterijske kulture.....	33
3.1.3. Mediji i kemikalije	34
3.2. Instrumenti i aparatura.....	35
3.3. Metode rada.....	38
3.3.1. Priprema mikroplastike.....	38
3.3.2. Sterilizacija mikroplastike	39
3.3.3. Preduzgoj bakterija <i>Bacillus cereus</i> i <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	39
3.3.4. Pokusi biorazgradnje polistirena i poli(vinil-klorida) pomoću bakterija <i>Bacillus cereus</i> i <i>Pseudomonas alcaligenes</i> prema Taguchi dizajnu.....	40
3.3.5. Primjena analitičkih i instrumentalnih metoda za praćenje biorazgradnje mikroplastike....	43
3.4. Postupak određivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	46
3.5. Određivanje značajnih čimbenika za proces biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama <i>Bacillus cereus</i> i <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	47
4. REZULTATI I RASPRAVA	48
4.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije <i>Bacillus cereus</i> i <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	49
4.1.1. Rezultati promjene CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije <i>Bacillus cereus</i>	49
4.1.2. Rezultati promjene CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	55
4.2. Promjene koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama <i>Bacillus cereus</i> i <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	62
4.2.1. Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom <i>Bacillus cereus</i>	62
4.2.1. Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	65
4.3.2. Promjena koncentracije kationa i aniona tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	70

4.4. Praćenje nastalih razgradnih produkata i/ili otpuštenih aditiva s površine čestica mikroplastike tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC/MS)	72
4.4.1. Maseni spektrometri vodene faze nastale prilikom procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije <i>Bacillus cereus</i>	72
4.4.2. Maseni spektrometri vodene faze nastale prilikom procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	77
4.5. FTIR-ATR analiza mikroplastike	81
4.5.1. Rezultati FTIR-ATR analize mikroplastike polistirena	81
4.5.2. Rezultati FTIR-ATR analize mikroplastike poli(vinil-klorida).....	83
4.6. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	85
4.7. Rezultati statističke analize varijance (ANOVA)	88
5. ZAKLJUČAK.....	93
6. POPIS SIMBOLA I KRATICA	95
7. LITERATURA	98

1. UVOD

Plastika je uobičajena sastavnica svakodnevice ljudskog života poznata od davnina. Međutim, sve bržim razvojem industrije, konstantnim porastom ljudske populacije te povećanjem životnog standarda proizvodnja plastike se je značajno povećala.¹ Ako se nastala plastika pravilno ne zbrine ili reciklira, može završiti u okolišu u kojem ostaje stoljećima razlažući se na manje dijelove pod utjecajem različitih atmosferskih uvjeta. Dijelovi manji od 5 mm definiraju se kao mikroplastika (MP) te predstavljaju razlog za zabrinutost i opasnost po okoliš.¹ Prema studiji objavljenoj 2018. godine dosad je proizvedeno 8,3 milijarde t MP-a od čega 6,3 milijarde t pripada plastičnom otpadu.² Zahvaljujući brojnim prednostima kao što su mala težina, velika izdržljivost, otpornost na različite kemikalije i ekonomska isplativost, plastika je glavni izbor prilikom odabira materijala u raznim industrijskim i gospodarskim sektorima te uslužnim djelatnostima. Samo neke od navedenih djelatnosti različitih grana su: graditeljstvo, transport, ambalaža, proizvodnja električne energije i elektroničkih uređaja, poljoprivreda, medicina i sl.³ Jedan dio MP-a se proizvodi namjerno radi upotrebe u kozmetičkim proizvodima i procesima pjeskarenja dok drugi dio MP-a nastaje nenamjerno kao posljedica razgradnje većih komada plastike uslijed djelovanja različitih okolišnih čimbenika. Primjerice, prilikom korištenja pilinga za tijelo koji služi za čišćenje kože, dolazi do ispiranja MP-a koji putem odvodnje dospijeva na uređaje za obradu otpadnih voda. Nakon obrade otpadnih voda dio MP-a zaostane u obrađenoj vodi koja se ispušta u prirodni recipijent, a drugi dio MP-a zaostane u aktivnom mulju koji se odlaže na poljoprivredna područja. Na taj se način MP-e akumulira u različitim dijelovima ekosustava gdje se teško ili uopće ne razgrađuje te predstavlja potencijalnu opasnost za biljni i životinjski svijet.⁴ Tako je tijekom godina nagomilavanja u okolišu, MP postala velik ekološki problem na globalnoj razini.⁵ Svake godine preko 1 milijun morskih ptica i 100 000 morskih sisavaca uginu uslijed kontinuiranog izlaganja MP-u. 700 morskih vrsta je na rubu izumiranja uključujući havajske tuljane i morske kornjače zahvaljujući gutanju MP-a kao zamjenu za izvor hrane.⁶ Osim na veće sisavce, čestice MP-a utječu i na najsitnije organizme koji se kroz prehrambeni lanac mogu probiti do viših razina. Na taj način MP cirkulira unutar prehrambenog lanca, a na posljeticu dospijeva i u ljudski organizam. Prekomjerno onečišćenje mora MP-om uzorkovalo je nastanak 500 mrtvih zona u kojima je utvrđen nedostatak kisika. Posljedica tomu je migracija morskih organizama na druga područja uslijed čega se narušava ravnoteža morske populacije na tim drugim područjima.⁷ Poznato je da su aditivi koji se koriste prilikom

proizvodnje MP-a kancerogeni i da ometaju hormonski sustav tijela uzrokujući reproduktivne, neurološke i imunološke poremećaje i kod ljudi i kod divljih životinja.⁸ Kod 95% ispitanih osoba u SAD-u pronađena je određena količina bisfenola A (BPA) u mokraći.⁶

Štetno djelovanje različitih vrsta MP-a može se ispitati testovima ekotoksičnosti poput testa s *Vibrio fischeri*⁹, slatkovodnim i morskim algama¹⁰, vodenbuhom *Daphnia magna*¹¹, zebrafish¹², te primjenom različitih crva¹³ ako se ispituje toksičnost tla i sedimenta. S obzirom na to da su navedena štetna djelovanja MP-a na biosferu u kojoj živimo samo jedna u nizu postojećih, nužno je razviti učinkovite metode uklanjanja MP-a iz okoliša. Iako postojeća zakonska regulativa zabranjuje nepropisno odlaganje MP-a u okoliš, ona još uvijek ne propisuje zakone koji definiraju dopuštene količine MP-a u okolišu. Stoga je od izuzetne važnosti definirati koncentraciju MP-a koja je prihvatljiva za okoliš, a sve u svrhu njegove zaštite i zaštite ljudskog zdravlja. Zasad se je kao najučinkovitija metoda uklanjanja MP-a iz okoliša pokazala kombinacija fizikalno-kemijskih i bioloških procesa iako se ti procesi mogu koristiti i odvojeno. Fizikalno-kemijska razgradnja MP-a odnosi se na mehaničke, kemijske i toplinske procese, dok biorazgradnja uključuje primjenu različitih mikroorganizama poput bakterija (rod *Bacillus*¹⁴, *Rhodococcus*¹⁵, *Pseudomonas*¹⁶), gljiva (rod *Aspergillus*¹⁷, *Trichoderma*¹⁸, *Zalerion*¹⁹), u manjem udjelu alge (*Anabaena spiroides*²⁰, *Navicula pupula*²⁰, *Scenedesmus dimorphus*²⁰), razne vrste plijesni (*Aspergillus niger*¹⁷, *Aspergillus tubingensis*¹⁵) i kvasaca (*Penicillium simplicissimu*¹⁹, *Penicillium pinophilum*¹⁹).⁴

U ovom radu provedeni su pokusi biorazgradnje MP-a, polistirena (PS) i poli(vinil-klorida) (PVC) pomoću bakterija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* u svrhu utvrđivanja značajnih čimbenika procesa biorazgradnje. Dizajn eksperimenata kreiran je prema Taguchi metodi prema kojoj je ispitano 7 čimbenika - pH vrijednost, temperatura, broj okretaja, veličina MP-a, koncentracija MP-a, OG i dodatak glukoze, na dvije razine – minimalna i maksimalna vrijednost. Ispitana je i ekotoksičnost filtrata po završetku pokusa primjenom bakterije *Vibrio fischeri*⁹.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mikroplastika

Pojmovi „*mikroplastika*“ i „*makroplastika*“ prvi put se pojavljuju 1968. godine u publikaciji istraživačkog laboratorija za materijale Američkih zračnih snaga. Pojam „*mikroplastika*“ je opisivao manje deformacije plastičnih materijala kao odgovor na vanjsko opterećenje dok se je pojam „*makroplastika*“ koristio za opisivanje većih plastičnih deformacija. Red veličine deformacije mikroplastike odgovarao je rasponu od mikrometra do inča. Otkrićem prisutnosti plastičnih komadića u vodenim ekosustavima 1970. godine pojmovi „*mikroplastika*“ i „*makroplastika*“ dobivaju novo značenje, a to je vrijednost fizičke veličine plastičnih komadića.²¹ Godine 1972. je u svijetu objavljena informacija da ogromne količine malih plastičnih čestica plutaju površinom Sargaškog mora, što je potaknulo razvoj svijesti kod ljudi vezanu za razmjere plastike prisutne u vodenim ekosustavima.²² Međutim, sve do 2004. godine kada su istraživači uveli pojam MP-a za male komadiće plastike prikupljene s plaža i sedimenta u Plymouthu (Ujedinjeno Kraljevstvo), plastika se nije razlikovala prema veličini te je MP-e nazivana plastičnim česticama. Upotreba izraza „*mikroplastika*“ na kraju je usvojena i od strane znanstvene zajednice te ju je Upravljački odbor pomorske Nacionalne uprave za ocean i atmosferu (NOAA, engl. *Steering Committee of the National Oceanic and Atmospheric Administration*) definirao kao komadićima plastike manjim od 5 mm duž najduže dimenzije. Iste je godine prihvaćena i podjela plastike prema veličini čestica.²¹ (Tablica 2.1.)

Tablica 2.1. Podjela plastike prema veličini čestica²¹

Kategorija	Kratica	Veličina čestica
Makroplastika	MAP	≥ 25 mm
Mezoplastika	MEP	< 25 mm – 5 mm
Mikroplastika	MP	< 5 mm – 1 μ m
Nanoplastika	NP	< 1 μ m

Općenito se danas MP-e definira kao bilo koji komad plastike u rasponu veličine od 5 mm do 1 μ m duž svoje najduže dimenzije, a njezin izraz se koristi kao skupni naziv za opisivanje heterogene mješavine plastičnih čestica. Te 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. Osim prema veličini čestica, MP-e se može podijeliti i prema podrijetlu i to na: primarnu i sekundarnu.^{21,23}

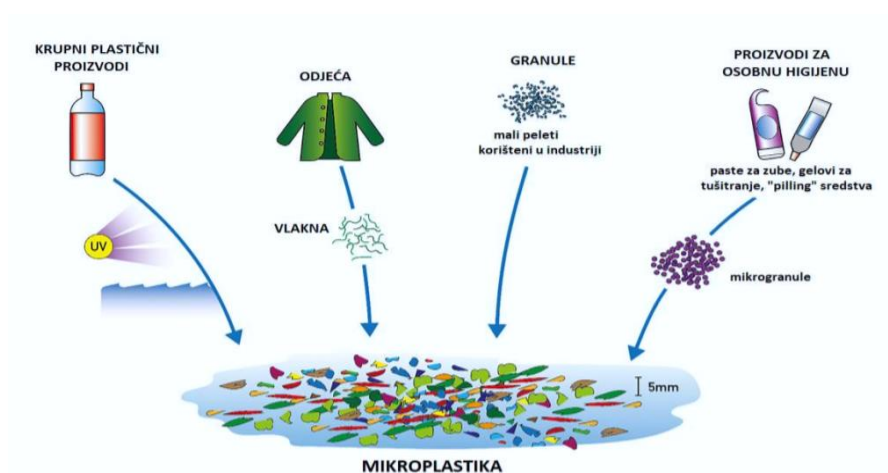
Primarnu mikroplastiku obično čine male sferne mikrokuglice koje su namjerno proizvedene u industriji plastike za upotrebu: u kozmetičkim proizvodima u svrhu olakšane kontrole viskoznosti i stvaranje filma, kao abrazivna sredstva u pilinzima za dubinsko čišćenje kože, u zubnim pastama u svrhu izbjeljivanja zubi te ostalim proizvodima za osobnu njegu. Nadalje, mikrokuglice se koriste i prilikom aktivnosti pjeskarenja.²¹ Na slici 2.1. prikazana je MP prisutna u kozmetičkom proizvodu.



Slika 2.1. MP u kozmetičkom proizvodu.

Drugi oblik primarne MP-e čine male obojene plastične kuglice koje služe kao industrijska sirovina u plastičnoj industriji u procesima topljenja i oblikovanja u veće plastične forme. Ova vrsta plastičnih čestica je također namjerno proizvedena. Stoga, glavni izvor plastičnog onečišćenja u okolišu, ali ne i jedini, predstavljaju upravo ove plastične kuglice koje se upotrebljavaju kao industrijska sirovina. Direktnim izlivanjem vode iz odvodnih cijevi u okoliš dolazi do povećanja koncentracije plastičnih kuglica u okolišu. Drugi izvor plastičnog onečišćenja je nenamjerno oslobađanje MP-a u okoliš npr. putem industrijskih izvora.²¹ U primarnu MP-e ubrajaju se i sintetička vlakna koja se koriste za proizvodnju odjeće. S obzirom na veličinu tekstilne industrije, može se pretpostaviti da su sintetička vlakna drugi po redu najzastupljeniji oblik plastičnog onečišćenja u vodenom okruženju. Tu su činjenicu potvrdili i oporabljivi uzorci sintetičke odjeće iz okoliša pronađeni od strane znanstvenika. Oporabljivi uzorci su rezultat procesa pranja. Jedan komad sintetičke odjeće oslobađa više od

2000 plastičnih vlakana u samo jednom ciklusu pranja.²¹ Put kojim sintetička vlakna dopijevaju u more i oceane gdje se talože, su vodotoci i kanalizacijski sustavi. Stoga ni ne čudi da se tekstilna industrija smatra jednom od većih opasnosti za okoliš.²¹ Osim toga, utvrđeno je da velike količine MP-a mogu proći ravno kroz sabirne filtre na komunalnim uređajima, odnosno zaostati u aktivnom mulju, te ispiranjem dospjeti u podzemne vode te tako onečistiti izvore pitke vode čime se dodatno povećava koncentracija MP-a u okolišu. Kako bi se spriječio dotok novih onečišćujućih tvari u okoliš i regulirala koncentracija postojećih, u pravilnike je neophodno uvesti sustave praćenja koncentracije MP-a te je potrebno zakonski odrediti maksimalno dozvoljenu koncentraciju MP-a u pitkim i otpadnim vodama.²⁴ Na slici 2.2. prikazani su pojedini izvori čestica MP-e te izgled istih.



Slika 2.2. Prikaz pojedinih izvora primarne MP-e pripadajućih oblika čestica koje čine MP.²⁵

Sekundarnu mikroplastiku čine nepravilni komadići plastike nenamjerno nastali kao rezultat razgradnje većih komada plastike poput plastičnih vrećica, boca te užadi i mreža za ribolov. Razgradnja plastike traje određeni vremenski period i inicirana je izlaganjem UV svjetlu i/ili mehaničkim silama (plimni valovi, morske struje i vjetar).²¹ Drugi izvor sekundarne MP-e predstavljaju odbačeni tepisi i mreže protiv grabežljivaca koje zbog svoje vlaknaste prirode mogu ispuštati velike količine plastičnih vlakana u vodu. Procjenjuje se da je prisutnost 18% MP-a u vodi rezultat razgradnje plastičnih užadi i mreža. Osim toga, procijenjeno je i da Europa onečišćenju okoliša sekundarnom MP-e doprinosi između 68 500 i 275 000 tona godišnje.²⁶

2.2. Vrste mikroplastike

MP-e pripada skupini plastičnih materijala tzv. poliplasti koji se prema ponašanju pri povišenim temperaturama mogu podijeliti na plastomere i duromere, ovisno o tome mogu li se višestruko taliti ili ne. Plastomeri imaju linearnu, razgranatu strukturu stoga su skloni višestrukome taljenju i oblikovanju bez promjene kemijske strukture dok se duromeri, nakon što se jednom oblikuju se ne mogu više oblikovati. Razlog tomu je umreženost kemijske strukture duromera.²⁷ Mogućnost oblikovanja plastičnih materijala daje prednost plastici prilikom odabira materijala u odnosu na ostatak materijala jer se njezinim korištenjem smanjuju troškovi i vrijeme proizvodnje čime se olakšava i ubrzava masovna proizvodnja plastičnih proizvoda.²¹ Najpoznatiji plastomeri su: polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), poli(vinil-klorid) (PVC) i poli(etilen tereftalat) (PET) dok se poliesterske, poliakrilne, poliuretanske, polialkilne, epoksi i fenolne smole ubrajaju u najpoznatije duromere.²⁸

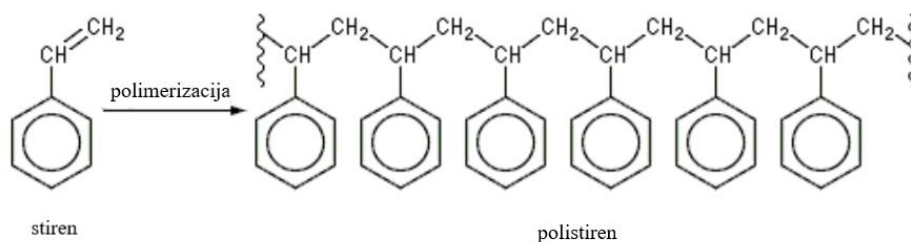
Otprilike oko 90% ukupne proizvodnje plastike u svijetu čine: PE s 36%, PP s 21%, PVC s 12%, poliester (PES), poliuretan (PU) i PS s <10% te PET.^{28,29} U Tablici 2.2. prikazana su fizikalna, kemijska i toplinska svojstva PS-a, PVC-a, PE-a, PP-a i PET-a.

Tablica 2.2. Fizikalna, kemijska i toplinska svojstva MP-a^{28,29}

Polimer	Monomer	Gustoća	Temperatura staklišta	Temperatura tališta	Temperatura raspada
PS	- C ₆ H ₅ CH=CH ₂ -	1,04- 1,06	+1,6	239 – 275	285
PVC	-CH ₂ -CH(Cl)-	1,37- 1,53	+80	103-230	200
PE	-CH ₂ -CH ₂ -	0,90 – 0,98	-75	110 – 138	335
PP	-CH(CH ₃)- CH ₂ -	0,84 – 0,91	-20	120 – 176	328
PET	-O-C(=O)- C ₆ H ₅ -C(=O)- O-CH ₂ -CH ₃	1,33 – 1,46	+0,2	245 – 265	285 – 329

2.2.1. Polistiren

Čisti polistiren je plastomer amorfne strukture koji se dobiva radikalskom polimerizacijom stirena prikazanoj na slici 2.3.^{29,30} Molekulska masa PS-a kreće se od 100 000 do 400 000.³⁵



Slika 2.3. Prikaz dobivanja PS-a radikalskom polimerizacijom stirena³⁰

PS je aromatski polimer u čijoj se strukturi umjesto jednog vodika pojavljuje benzen. PS je kemijski inertan što znači da je otporan na kiseline i lužine. Lako se otapa u kloriranim i aromatskim organskim otapalima poput benzena i toluena.^{29,30} Od mehaničkih svojstava PS-a valja istaknuti visoku čvrstoću (46-55 MPa) i nisku elastičnost (isteže se 3-4 %).³⁰ Dobra električna izolacijska svojstva PS-a rezultat su njegove čiste ugljikovodične prirode, a izolacijske karakteristike zadržava čak i u vlažnim uvjetima.²⁹⁻³¹ 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.³² PS se može pronaći u čvrstom i pjenastom obliku. Jedan od najčešće korištenih polistirenskih proizvoda u pjenastom obliku je stiropor (Slika 2.4. a) čiji je postupak proizvodnje u vlastitom aranžmanu razvila tvrtka Dow Chemical Company 1941. godine.³² Polistirenski otpjenci se najčešće koriste kao ambalažni materijal u svrhu zaštite hrane ili kao punilo u svrhu zaštite proizvoda prilikom njihova transporta. Primjenjuju se i za izradu jednokratnih posuda za pakiranje hrane. Čvrsti oblici PS-a se najčešće upotrebljavaju u medicinske svrhe kao pomoć pri uzgoju tkiva, u obliku raznih epruveta, Petrijevih zdjelica, dijagnostičnih komponenti, raznih medicinskih čašica ili u svakodnevnim predmetima kao što su ambalaža i kućišta na detektorima dima.³² Ključnu ulogu u spašavanju života imaju čvrsti oblici PS-a kao transportna ambalaža za prijevoz organa za transplantaciju (Slika 2.4. b) jer predstavljaju najjednostavnije i najjeftinije rješenje koje zadovoljava potrebne uvjete toplinske izolacije.³²

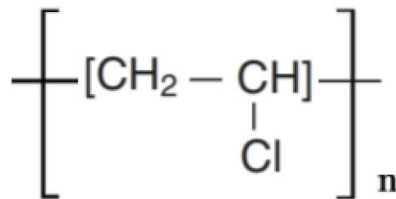
Radi manje učinkovitosti prilikom recikliranja PS-a, utvrđena je smanjena potražnja za njim, u odnosu na PP i PET.³⁴



Slika 2.4. PS u pjenastom obliku kao stiropor³³ (a), u čvrstom obliku kao transportna ambalaža za prijevoz transplatacijskih organa³² (b)

2.2.2. Poli(vinil-klorid)

PVC je dugolančani polimer koji nastaje slobodno-radikalskom polimerizacijom vinil-klorida (Slika 2.5.).³⁵



Slika 2.5. Prikaz kemijske strukture monomera PVC-a²⁹

Komercijalni PVC su amorfni plastomeri s kristalnom fazom koja čini otprilike 10% matriksa.³⁵ PVC je vinilni polimer kojemu je jedan atom vodika zamijenjen atomom klora te posjeduje visoku polarnost jer sadrži 57% mase klora. Visoka polarnost PVC-a omogućuje inkorporaciju različitih aditiva (plastifikatori, modifikatori) u njegovu strukturu u svrhu zadovoljavanja različitih svojstava konačnih proizvoda kao što su: fleksibilnost, elastičnost, otpornost na udarce, sprječavanje rasta mikroba i slično.³⁵⁻³⁷ PVC ima malu gustoću što rezultira relativno niskim troškovima materijala s obzirom na količinu radi čega je ekonomski isplativ.^{36,37} PVC je kemijski inertan prema svim anorganskim otopinama, razrijeđenim

kiselinama, lužinama i alkoholu što ga čini otpornim na koroziju te odličnim materijalom za proizvodnju kanalizacijskih cijevi.³⁸ Najviše se koristi u građevinskoj industriji u obliku PVC stolarije, cijevi, stropnih pločica, raznog namještaja, PVC folija za hidroizolaciju (Slika 2.6. a) i sl.³⁶ U proizvodnji medicinskih i kliničkih plastičnih proizvoda, PVC čini oko 25%. Međutim, u ovom se slučaju postavlja pitanje sigurnosti prilikom njegove upotrebe. U svakodnevici se još koristi i kao sastavni dio odjeće, sintetičke kože te različitih ambalaža za prehrambene (Slika 2.6. b) i druge proizvode. Glavni razlozi široke primjene PVC-a su: niska cijena, trajnost, vodootpornost te jednostavnost obrade i mogućnosti prilagodbe njegovih svojstava širokom rasponu primjene.^{36,37}



Slika 2.6. PVC u obliku folije za hidroizolaciju³⁹ (a) i ambalaže za jaja⁴⁰ (b)

2.3. Svojstva mikroplastike

Općenito su svojstva nekog materijala rezultat odnosa strukture i kemijskog sastava. Stoga se s obzirom na sastav nekog materijala razlikuju fizikalna, kemijska, toplinska, električna, magnetska, mehanička, optička i druga svojstva. Fizička karakterizacija uključuje određivanje veličine, oblika i boje čestica MP-a dok se kemijska karakterizacija temelji na istraživanju sastava MP-a. Za provedbu kemijske karakterizacije MP-a primjenjuju se različite metode i uređaji poput infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR), Ramanova spektroskopija (RS), skeniranje elektronskim mikroskopom (SEM), te tekućinska i plinska kromatografija.²⁹

2.3.1. Kemijski sastav i struktura mikroplastike

Prema kemijskom sastavu plastiku tvore sintetski ili polusintetski organski polimeri plastičnih svojstava, tzv. poliplasti, koji nastaju polimerizacijom monomera ekstrahiranih iz fosilnih goriva poput ugljena, nafte i zemnog plina.⁴¹ Tako dobiveni polimeri u većini slučajeva ne zadovoljavaju u cijelosti potrebe krajnjih potrošača radi neodgovarajućih svojstava plastičnih proizvoda. Stoga se najčešće u svrhu oblikovanja i modifikacije te dobivanja željenih svojstava (fleksibilnost, elastičnost, otpornost na udarce, sprječavanje rasta mikroba i sl.) konačnog plastičnog proizvoda, plastici dodaju različiti aditivi poput plastifikatora, UV stabilizatora, modifikatora, antioksidansa i mnogih drugih.⁴² Najčešći kemijski spojevi koji se dodaju u plastične proizvode su: bisfenol A (BPA), polibromirani difenil eteri (PBDE), ftalati i nonilfenoli.⁸ U studiji provedenoj 2006. godine pokazalo se da su navedeni spojevi štetni kako za vodeni okoliš tako i za ljude te da imaju značajan utjecaj na preživljavanje ispitivanog organizma *Amphibalanus (Balanus)*. Iste je godine studija koja se odnosila na lako reciklirajuću plastiku (PE, PP, PVC, PET i PS) pokazala da se štetni kemijski spojevi iz aditiva lako ispiru s plastične površine stvarajući na njoj prostor za adsorpciju toksičnih tvari iz prirodnog okruženja.^{41,43}

U Tablici 2.3. prikazan je popis izdvojenih vrsta aditiva (bojila, konzervansi, antioksidansi, regulatori kiselosti, stabilizatori, emulgatori, zgušnjivači, tvari za zadržavanje vlage te pojačivači okusa) s odgovarajućim primjerima i njihovim e-brojevima. Navedeni aditivi smatraju se aditivima dvostruke namjene s obzirom na to da se koriste u plastičnim materijalima koji dolaze u direktni kontakt s hranom, a koji su navedeni u zakonodavstvu o prehrambenim aditivima.^{44,45} **Crvenom bojom** su označeni aditivi koje bi svakako trebalo izbjegavati. Aditive označene **žutom bojom** ne bi trebalo često konzumirati, a aditive označene **zelenom bojom** se može konzumirati jer ne ugrožavaju ljudsko zdravlje.

Tablica 2.3. Prikaz prehrambenih aditiva s odgovarajućim e-brojem te pripadajućom vrstom aditiva^{44,45}

Vrsta aditiva	E-broj	Naziv aditiva
Bojila	E100	Kurkumin, Curcumin
	E104	Kinolinsko žuto, Quinoline yellow
	E127	Eritrozin, Erythrosine
Konzervansi	E200	Sorbinska kiselina
	E210	Benzojeva kiselina
	E22	Sumporov dioksid
Antioksidansi, regulatori kiselosti	E300	Askorbinska kiselina
	E330	Limunska kiselina
	E339	Natrijevi fosfati
	E312	Dodecil-galat
Stabilizatori, emulgatori, zgušnjivači, tvari za zadržavanje vlage...	E406	Agar
	E415	Ksantan guma
	E452	Polifosfati
	E412	Guar guma
Pojačivači okusa	E650	Cinkov acetat
	E630	Inozinska kiselina
	E625	Magnezijev glutaminat

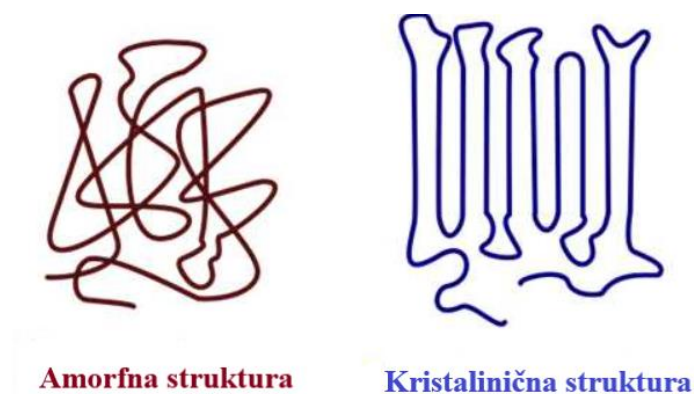
2.3.2. Fizikalna svojstva

Fizikalna svojstva plastike koja su ujedno i najvažniji pokazatelji koji određuju sudbinu i rasprostranjenost MP-a u okolišu, a nakon toga i dostupnost MP-a bioti, su veličina, oblik i gustoća. Primarna MP-e je obično pravilnog većinom sferičnog oblika dok je sekundarna MP-e najčešće nepravilnog oblika i različitih veličina.⁴⁶ Specifična gustoća plastičnih čestica ima širok raspon vrijednosti i razlikuje se ovisno o vrsti polimera i postupku proizvodnje. Gustoća svih vrsta MP-a kreće se u rasponu od $<0,05 \text{ g/cm}^3$ za polistirensku pjenu do $2,1-2,3 \text{ g/cm}^3$ za PET.²³ Gustoća MP-a pokazatelj je koji značajno utječe i na raspodjelu veličine čestica MP-a u okolišu; MP-a manje gustoće od morske vode pluta u površinskom sloju ili je suspendirana u vodenom stupcu-^{47,48}, dok je MP-e veće gustoće koncentrirana u bentonskim sredinama.²³ S obzirom na to da ne postoji univerzalna metoda kojom se sa sigurnošću mogu potvrditi svi pokazatelji fizičke karakterizacije čestica MP-a, znanstvenici najčešće koriste kombinaciju optičke mikroskopije s vizualnom identifikacijom. Kombinacija ovih metoda se koristi radi jednostavnosti, ekonomičnosti i mogućnosti provedbe *in situ* odnosno na mjestu uzorkovanja. No, bez obzira na dobivene rezultate, potrebno je provesti dodatnu analizu već spomenutim

spektroskopskim metoda u svrhu potvrde identifikacije MP-a. Upotreba kemijskih metoda u svrhu identifikacije MP-e se izbjegava jer većinom dolazi do promjene kemijskih svojstava.²³

2.3.3. Mehanička svojstva

Svojstva plastike kao i ostalih polimera određena su monomernim sastavom i duljinom lanca polimera koja utječe na njihovo fizičko stanje. Polimer s duljim molekularnim lancima ima jače intermolekularne Van der Waalsove interakcije što rezultira većom čvrstoćom i žilavošću tog polimera.²⁷ Međutim, koliko god da su svojstva čvrstoće i žilavosti plastike poželjna, s druge strane, koče razgradnju plastike u okolišu te predstavljaju problem i izazov znanstvenoj zajednici koja se bavi s tim problemom.²¹ Dio plastičnih polimera ima djelomično kristalnu (uređenu) strukturu dok preostali dio polimera ima amorfnu strukturu čiju je stabilnost, radi neuređenosti, lako narušiti. Amorfni polimeri se nazivaju još i "staklasti" polimeri dok se polukristalni (semikristalni) polimeri nazivaju i "gumeni" polimeri. Razlika u uređenosti strukture polukristalnih i amorfni polimera prikazana je na slici 2.7.

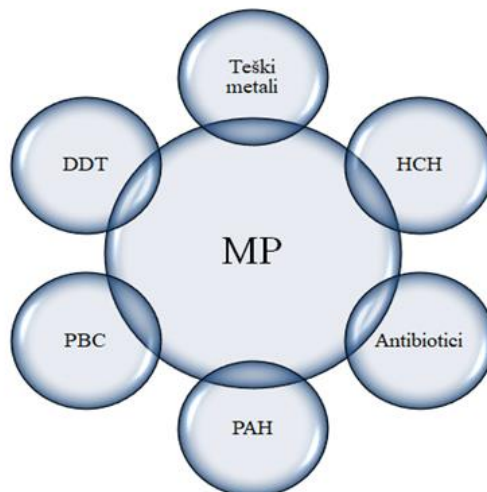


Slika 2.7. Prikaz stanja uređenosti amorfni i semikristaliničnih polimera.

Kristalnost je svojstvo koje govori o strukturnom poretku atoma i molekula, a iz njega proizlaze svojstva gustoće, prozirnosti i tvrdoće pojedinog polimernog materijala. Primjeri amorfne plastike su akrilonitril butadien stiren (ABS), polistiren (PS) i poli(vinil-klorid) (PVC), dok su inženjerski plastični polieter eter keton (PEEK), politetrafluoretilen i PET primjeri su semikristalnih plastičnih polimera.²¹

2.4. Adsorpcija onečišćujućih tvari na površinu mikroplastike

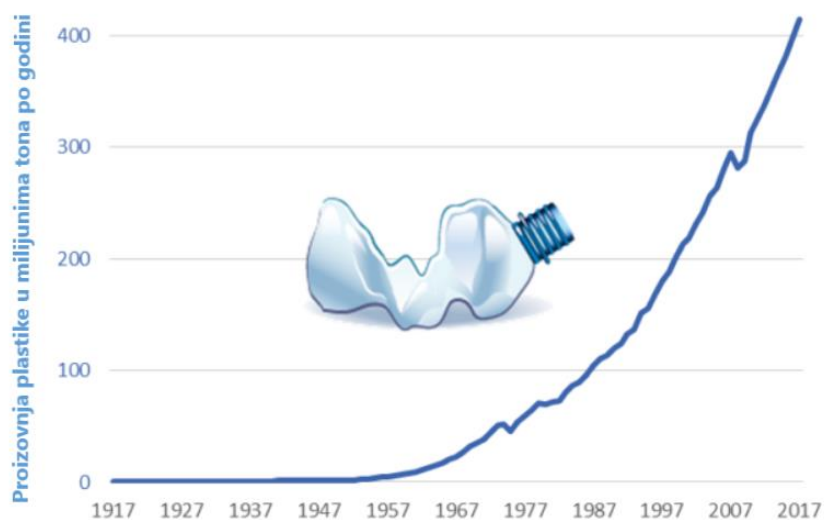
Osim što same po sebi mogu predstavljati opasnost po okoliš i žive organizme, čestice MP-a imaju i sposobnost adsorpcije štetnih tvari na svoju površinu. Sposobnost vezanja štetnih tvari MP-a je jako velika, a najčešće na sebe adsorbiraju teške metale, farmaceutike, poliklorirane bifenile (PBC), policikličke aromatske ugljikovodike (PAH), heksaklorcikloheksane (HCH), diklordifeniltrikloretan (DDT) i pesticide. Navedeni spojevi pripadaju skupini tvari koje se prirodno u većini slučajeva u okolišu neće naći i koje su njemu strane. Ti se spojevi nazivaju ksenobiotici.⁴⁹⁻⁵¹ Adsorpcija štetnih tvari na površinu MP-e ovisi o adsorpcijskom kapacitetu svake pojedine vrste MP-a. Značajan utjecaj na adsorpcijski kapacitet čestica MP-a imaju njihova karakteristična fizikalno-kemijska svojstva poput specifične površine, polarnosti, stupnja kristalnosti i raspodjele veličine pora.⁵¹ Na slici 2.8. prikazani su kemijski spojevi koji imaju sposobnost adsorpcije na površinu mikroplastičnih čestica. Nepolarne molekule će adsorbirati nepolarne onečišćujuće tvari dok će polarne makromolekule poput PVC-a i PET-a adsorbirati polarne onečišćujuće tvari.^{51,52} MP-e niske kristalnosti adsorbirat će više hidrofobnih organskih onečišćujućih tvari od MP-e s većom kristalnosti.⁵¹ Usporedbom najčešće korištenih plastičnih materijala: PE, PP, PS i PVC, utvrđeno je da najveći stupanj kristalnosti ima PE, potom ga slijede PP, PS dok najmanji stupanj kristalnosti ima PVC.⁵¹ Starenjem MP-e propada i razgrađuje se što rezultira povećanjem njezine površine kao posljedica nastanka pukotina. Povećanjem površine MP-a povećava se i adsorpcija onečišćujućih tvari na površini MP-a.^{21,49,53} Osim navedenih fizikalno-kemijskih svojstava, na adsorpciju značajno utječu i okolišni uvjeti u kojima se ona odvija. Primjerice, na adsorpciju onečišćujućih tvari u vodenim ekosustavima značajno utječu salinitet i pH-vrijednost. Povećanjem pH-vrijednosti vode, povećava se i adsorpcija teških metala⁴⁹. Povećanjem saliniteta povećava se adsorpcija onečišćujućih tvari na PE.⁴⁹ Utvrđeno je i da se povećanjem saliniteta povećava i adsorpcija PAH-ova na MP-u. Dosadašnja istraživanja su pokazala da se fenantren kao vrsta PAH-a najbolje adsorbira na PE, potom na PP, a najmanje na PVC. Utvrđeno je i da PS adsorbira više PAH-ova od ostalih ispitanih plastika što se pripisuje aromatskoj skupini na PS-u.⁴¹ Dokazano je da je adsorpcija antibiotika na MP-u u morskoj vodi manja od adsorpcije antibiotika na MP-u u slatkoj vodi.^{2,41}



Slika 2.8. Adsorpcija štetnih tvari na površinu čestica MP-a

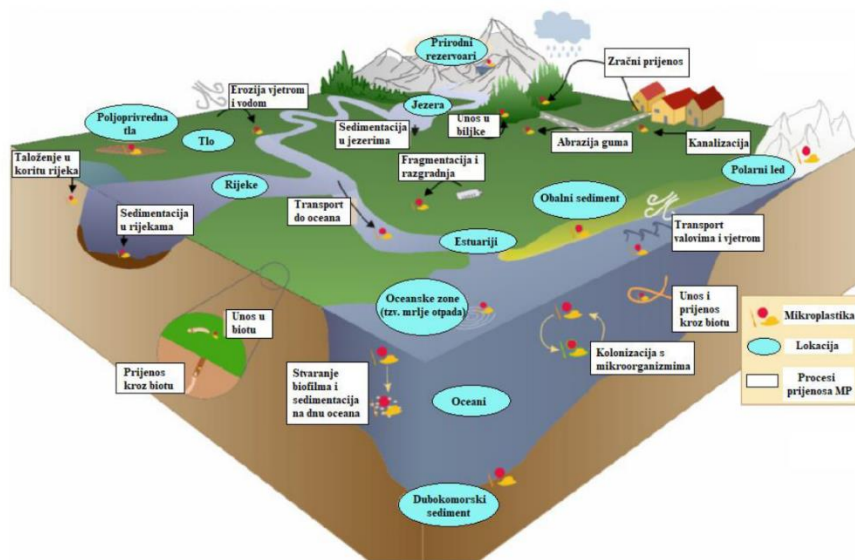
2.5. Mikroplastika u okolišu

Jačanjem industrijalizacije, porast broja stanovništva je značajno ubrzan pri čemu je razvijena i potreba za novim proizvodima.⁵⁴ U tom se je kontekstu među materijalima plastika nametnula kao izbor broj jedan zahvaljujući karakteristikama poput niske cijene, visoke izdržljivosti i lakoće. Upravo ove karakteristike omogućile su brz razvoj i olakšanu proizvodnju novih plastičnih proizvoda. Na slici 2.9. prikazana je globalna proizvodnja plastike u razdoblju od 1917. godine do 2017. godine iz koje se može zaključiti da je u razdoblju od 100 godina proizvodnja plastike značajno porasla i to sa svega par tona na veličinu proporcionalnu megatonama na godišnjoj razini.⁵⁵



Slika 2.9. Prikaz globalne proizvodnje plastike od 1917. godine do 2017. Godine⁵⁵

Upravo taj porast količine proizvedene plastike u razdoblju od 100 godina i daljnja masovna proizvodnja različitih proizvoda plastičnih svojstava doveli su plastiku u poziciju nepoželjnog materijala te glavnog problema od globalne važnosti jer je uočeno da MP neadekvatnim zbrinjavanjem dospijeva u sastavnice svih biosfera (hidrosfera, atmosfera i litosfera) u sve većem i većem obujmu. S vremenom se plastika akumulira u okolišu i razgrađuje pod utjecajem okolišnih čimbenika na sve manje i manje čestice štetno djelujući na okoliš i čovjeka. Na slici 2.10. prikazan je prijenos MP-a između ekosustava unutar biosfere, te najčešća mjesta na kojima se MP-e skuplja.



Slika 2.10. Prikaz prijenosa i mjesta nakupljanja mikroplastike u okolišu.⁵⁶

Najveći udio MP-a pronađen je u vodenim ekosustavima, dok je nešto manji udio čestica MP-a pronađen u litosferi i atmosferi. Međutim, i taj manji udio čestica MP-a je dovoljan da ugrozi biljni i životinjski svijet, a posredno i ljudsko zdravlje.

2.5.1. Mikroplastika u vodenim ekosustavima

Pretpostavlja se da su oceani spremnici 8 milijardi kilograma plastike koja se na godišnjoj razini ispuni u nj što je ekvivalent kamionu za smeće punom plastike koji se svake minute istovari u ocean. Procjenjuje se da će masa plastike do 2050. godine premašiti masu ribe u oceanima.⁶ Novija istraživanja pokazuju da je MP-e pronađena čak i u arktičkom području odnosno ledenjacima.^{21,57} 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.⁵⁵ Kina, koja je najveći proizvođač plastike u Aziji s 29,4%, ima ujedno i najveći

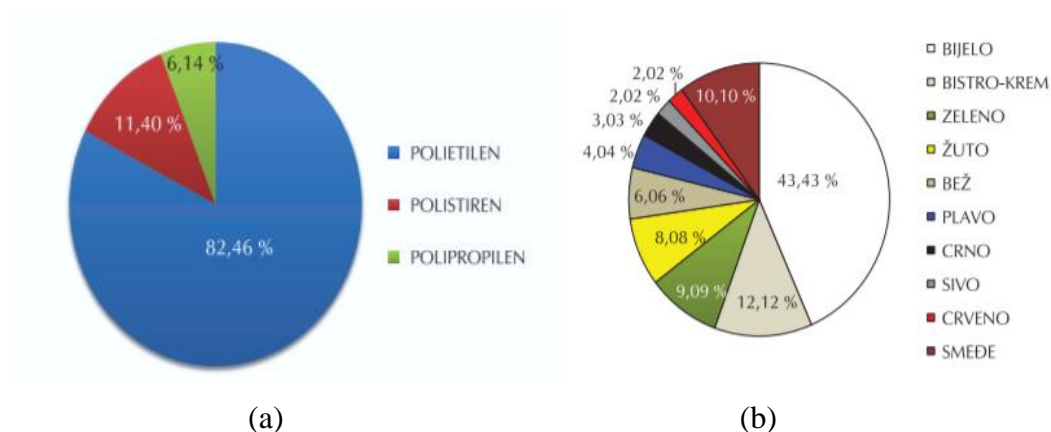
ekološki problem čiji je opseg ugroženosti po okoliš iznimno velik. Istraživanje koje je uključivalo 20 jezera, a ujedno i rijeke Hanjiang i Yangtze pokazuje da koncentracija MP-a u tim vodama varira od 1660 do 8925 čestica po m³.⁵⁸ Dobiveni rezultati tog istraživanja su ujedno i potvrda tvrdnje da je vodeni okoliš Kine najonečišćeniji MP-om u odnosu na ostatak svijeta.⁵⁸ Osim količine MP-a u okolišu, dodatni problemi s kojima se još susreću znanstvenici koji se bave problematikom MP-a su: nerazvijenost standardiziranih analitičkih metoda za identifikaciju i kvantifikaciju MP-a i NP-a u različitim uzorcima te nemogućnost usporedbe podataka dobivenih nestandardiziranim metodama.⁵⁹ MP-a nije problem samo u Aziji već i u čitavom svijetu (Europa, Kanada, SAD). U Tablici 2.4. dan je pregled koncentracija čestica MP-a na određenom području unutar Azije, Europe te Sjeverne i Južne Amerike. Utvrđena je i korelacija između koncentracije MP-a i gustoće naseljenosti pojedinog mjesta. Što je mjesto naseljenije, onečišćenje rijeka i jezera mikroplastičnim česticama je veće. Taj podatak upućuje da antropogeni utjecaj ima veliki značaj za distribuciju MP-a unutar okoliša.⁶⁰ Iz Tablice 2.4. se može uočiti i da su PET, PP, PE i PS najčešća vrsta plastike odbačena u rijekama i jezerima.

Tablica 2.4. Koncentracija MP-a u vodenim ekosustavima diljem svijeta.⁶¹

PODRUČJE		VRSTA MIKROPLASTIKE	KONCENTRACIJA
AZIJA	Dongting Lake, Kina	PET, PP, PS, PE	616.7 – 2316.7 čestica / m ³
	Wuhan, Kina	PET, PP, PE, najlon	1660 – 8925 čestica / m ³
	Vembanad jezero, Indija	PE, PS, PP	258.2 čestica / m ²
EUROPA	Rijeka Antuã, Portugal	PP, PE, PS, PET	58 – 1265 čestica / m ³
	Jezero Chiusi, Italija	-	2.68 – 3.36 čestica / m ³
	Jezero Kallavesi, Finska	PET, PAN, PP, PE	0.27 čestica / m ³
SJEVERNA I JUŽNA AMERIKA	Jezero Winnipeg, Kanada	-	0.053 – 0.748 čestica / m ²
	Rijeka Atoyac, Meksiko	-	833 – 1633 čestica / kg
	Jezero Superior, SAD	PE, PP, PS, PVC	0.037 čestica / m ²

Rezultati istraživanja karakterizacije MP-a u sedimentu plaže Prapatno pokazali su da se otpad s te plaže uglavnom sastoji od PE-a u većem udjelu te PS-a i PE-a u manjem udjelu. (Slika 2.11. a) Od 116 ispitanih uzoraka, 90,52% plastičnih čestica je neprozirno, a ostatak se

pojavljuje u svim osnovnim bojama. (Slika 2.11. b) 52,59% ispitanih plastičnih čestica pripada kategoriji MP-e dok 47,41% otpada na MEP-u.⁶²



Slika 2.11. Udjeli pojedine kategorije mikroplastičnog otpada iz sedimenta plaže Prapratno u ukupnoj površini uzorka (a) i obojanost ispitanih uzoraka izražena u brojčanim udjelima.⁶³

Postoji niz načina kako MP-e dospijeva u vodeni okoliš. Primjerice, prilikom obrade kanalizacijskih otpadnih voda čestice MP-a mogu završiti u površinskim vodama zbog sabirnih filtera koji ne uspiju zaustaviti prolazak MP-a.²¹ Jedan od najvećih izvora MP-a u vodenom okolišu predstavlja biološka obrada otpadnih voda tijekom koje zajednica različitih mikroorganizama koja tvori aktivni mulj koristi MP-e kao izvor hrane. Kako se dio otpadnog mulja zbrinjava odlaganjem na tlo, MP-e može putem njega dospjeti u podzemne vode, pa tako i u izvore pitke vode te ih tako i onečistiti.⁶⁴

2.5.2. Mikroplastika u tlu

Veći dio MP-a koji se nađe u tlu dospijeva iz kanalizacijskog mulja i gnojiva koji se koriste u poljoprivredi.⁶⁵ Procjenjuje se da od 63 000 do 430 000 t MP-a godišnje može dospjeti u obradiva tla primjenom gnojiva u Europi, odnosno od 44 000 do 300 000 t u Sjevernoj Americi.⁶⁶ Drugi dio izvora MP-a u tlu predstavlja razgradnja plastičnih proizvoda koji se nalaze na obradivoj zemlji djelovanjem atmosferskim uvjeta, fragmentacija plastičnog otpada i plastičnih proizvoda na odlagalištima otpada, odlaganje otpada u prirode te navodnjavanje otpadnim vodama.⁶⁵ Rezultati istraživanja⁶⁶ provedenog 2016. godine koji su ovisili o koncentraciji MP-a u tlu i vremenu izlaganja ispitivanih glista *Lumbricus terrestris* pokazuju smanjen rast, smanjenu težinu i povećanu smrtnost kod ovih organizama. U istraživanju zabilježenom u literaturi⁶⁷ utvrđeno je da prisutnost MP-a u tlu utječe i na njegova fizička svojstva kao što su poroznost i struktura. Pretpostavlja se da je tlo jednako velik ekološki

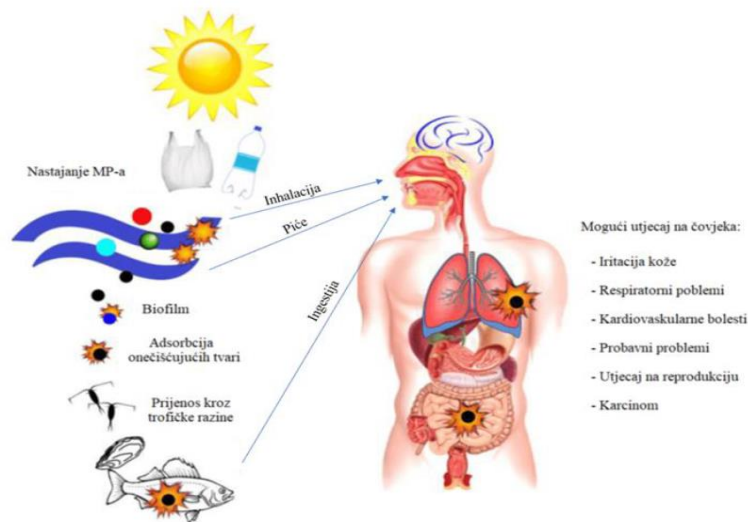
rezervoar MP-a kao što su i oceani. Godine 2018. provedeno je prvo istraživanje o utjecaju čestica MP-a prisutnih unutar i izvan zemlje na biljke. Rezultati su pokazali slabiji rast vegetativnih i reproducibilnih organa pšenice posijane u zemlji u kojoj su se nalazile i mikročestice LDPE-a. Točan razlog sporijeg rasta pšenice u doticaju s česticama MP-a se još uvijek ne zna. Stoga je potrebno provesti još istraživanja kako bi se utvrdila uzročno-posljedična veza sporijeg rasta pšenice i prisutnosti LDPE mikročestica u tlu.⁶⁸

2.5.3. Mikroplastika u zraku

Čestice MP-a su prisutne i u zraku. U zatvorenim prostorijama je detektirana veća koncentracija MP-a u odnosu na otvorene prostore. Rezultati koncentracija MP-a u zatvorenim prostorima su u skladu s očekivanjima s obzirom na to da se na otvorenim prostorima poput okoliša čestice MP-a ne zadržavaju na jednom mjestu radi prijenosa vjetrom.⁶⁹ Glavni izvori MP-a u zraku su čestice iz sintetičke odjeće, erozije sintetičkih guma, građevnog materijala, industrijska emisija te plastični fragmenti iz namještaja.⁷⁰ Međutim, još uvijek je neznatan broj znanstvenih radova o koncentraciji MP-a u zraku zbog ograničenja prilikom detekcije čestica MP-a. Rezultati provedenog istraživanja o količini mikroplastike u 3 apartmana u Aarhusu u Danskoj su pokazali da se u najvećem udjelu pojavljuje PES (59-92%), zatim najlon (0-13%) i PP (0.4-10%).⁷¹

2.6. Mikroplastika u ljudskom organizmu

S obzirom na sveprisutnost MP-a unutar sastavnica ekosustava, MP-e putem hranidbenog lanca prijenosom kroz trofičke razine dospijeva i 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 odnosno unosom određene hrane.⁷² Na slici 2.12. prikazani su putevi putem kojih čovjek unosi MP-e u organizam, reakcije kojima se prijenos MP-a do unutrašnjosti ljudskog organizma i ostvaruje te moguć štetni utjecaj na čovjeka.



Slika 2.12. Izloženost čovjeka MP-u i mogući štetni utjecaji.⁷³

MP-e se zbog svoje malene dimenzije lako prenosi vjetrom u atmosferskom zraku u kojem se mogu naći tekstilna vlakna koja disanjem potencijalno mogu ući u organizam i zaostati u plućima.^{72,74} Kada jednom stigne u pluća, MP-e se može prenijeti u stanice putem difuzije, pasivno ili aktivno. Endotelne stanice koje oblažu unutrašnju površinu srca, krvnih i limfnih žila, aktivno, putem fagocitoze i endocitoze, unose MP-e.⁷⁵ Rezultati istraživanja provedenog u Parizu u urbanom i manje urbanom području pokazali su postojanje različite koncentracije MP-a s prosjekom od 110 ± 96 čestica MP-a/m². Viša koncentracija MP-a je zabilježena u urbanom dijelu grada.⁷²

Brojna istraživanja zabilježila su pojavu MP-a u hrani namijenjenoj ljudskoj prehrani⁷², pa je tako MP-e pronađena u kuhinjskoj soli i šećeru. Procjenjuje se da bi količina MP-a koju osoba unese na godišnjoj bazi konzumiranjem kuhinjske soli mogla iznositi između 37 i 100 čestica u Europi i Kini.⁷⁶ Konzumacijom cjelovitih školjaka ljudi direktno unose mikroplastične čestice u organizam. Posljedica je to načina ishrane školjakaša prema kojoj se jednom dospjele čestice MP-a zadržavaju u probavnom traktu školjakaša te putem hrane unose u ljudski organizam.⁷⁷ Utvrđeno je da se i štetne tvari adsorbirane na MP-e lako desorbiraju u specifičnim uvjetima u životinjskim crijevima, te se i tako mogu prenijeti duž hranidbenog lanca do čovjeka. Otkriveno je i da se stopa desorpcije štetnih tvari adsorbiranih na MP-a povećava do 30 puta u crijevima toplokrvnih životinja u usporedbi sa stopom desorpcije u morskoj vodi ako ljude promatramo kao toplokrvne životinje.⁷⁸

Čestice MP-a su osim u hrani, pronađene i u flaširanoj vodi za piće. Istraživanje na 259 različitih uzoraka boca flaširane vode iz 9 različitih zemalja rezultiralo je detekcijom 10,4

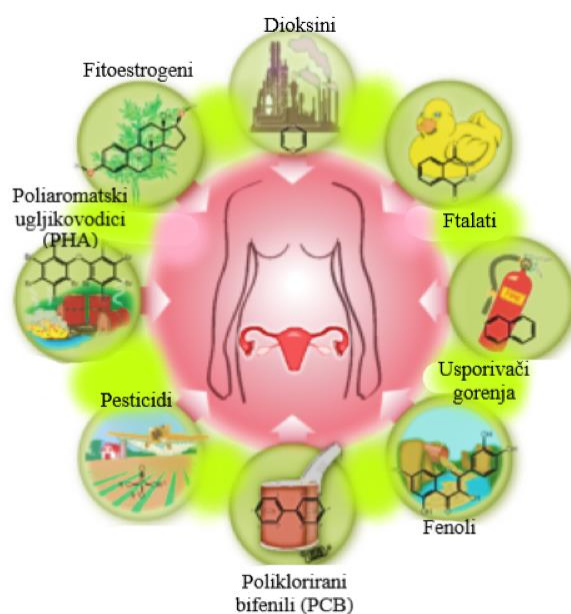
čestica MP-a/L većih od 100 μm i u prosjeku 325 čestica MP-a/L veličine 6.5-100 μm što ukazuje na onečišćenje flaširane vode MP-om. Istraživanje je pokazalo da dio onečišćenja dolazi od izvora vode, a većina dolazi kao posljedica pakiranja.⁷⁹ Jednom kad se nađu u ljudskom organizmu, čestice MP-a se mogu transportirati od gastrointestinalnog trakta do sekundarnih organa poput jetre, bubrega, slezene, srca i mozga na dva načina: limfnim žilama i portalnom cirkulacijom.^{77,80} Studije provedene na miševima čija je anatomija slična ljudskoj, pokazale su da MP-e nakupljena u jetri, bubrezima i crijevima može uzrokovati nekoliko štetnih učinaka, poput poremećaja energetskog i lipidnog metabolizma, oksidativnog stresa i neurotoksičnih reakcija.^{78,81} Istraživanja provedena na štakorima ukazuju da nanočestice PS-a veličine 64 nm dovode do nakupljanja neutrofila i upale pluća, dok mikročestice PVC-a veličine 2 μm izazivaju značajnu citotoksičnost i hemolizu u plućnim stanicama.⁸¹ Dokazano je i da izlaganje česticama PS-a i PE-a koncentracije 0,05 - 10 mg/L može izazvati visoku proizvodnju reaktivnih oksidacijskih vrsta u moždanim i epitelnim ljudskim stanicama.⁸¹ Na slici 2.13. prikazana je MP-e koja je pronađena u ljudskom organizmu kao rezultat studije provedene 2004. godine od strane medicinskih znanstvenika s instituta u Beču.



Slika 2.13. MP-e pronađena u ljudskom organizmu⁸²

Iako je plastika inertan materijal, a ljudsko tijelo ju, kako se čini, filtrira i izlučuje, mnogo je potencijalnih štetnih učinaka MP-a na organizam. Postavlja se i pitanje o mogućnosti dokazivanja prisutnosti MP-a u ljudskoj krvi i limfnoj tekućini, te što se događa u ljudskom tijelu kada se ono u kontinuitetu izlaže česticama MP-a.⁸³ Dosadašnja istraživanja pokazala su da se razlikuju fizički i kemijski učinci MP-a na ljudski organizam. U istraživanjima koji ispituju fizički učinak MP-a pokazano je da je kod pasa nakon ugradnje implantata kuka nađena mala količina PE čestica u alveolama dok je kod miševa od kemijskih učinaka

potvrđena mutagenost, hormonalni poremećaji i imunološki efekti.⁸³⁻⁸⁵ Nadalje, aditivi koji se dodaju prilikom proizvodnje plastike, nisu kemijski vezani za plastične polimere i male su molekulske mase zbog čega postoji velika šansa da dospiju u okolinu.⁸⁶ Najveći problem u organizmu su akumulacijska mjesta MP-a jer predstavljaju izvor štetnih kemijskih aditiva. Velik broj kemijskih aditiva ima štetan utjecaj na čovjekov organizam, pa tako bis(2-etilheksil) ftalat (DEHP) i BPA štetno utječu na reproduktivni sustav. Vinil klorid i butadien imaju kancerogeni učinak dok su benzen i fenol poznati mutageni. Najštetnijim aditivima smatraju se bromirani aditivi koji se koriste kao usporivači gorenja, ftalatni plastifikatori i aditivi za toplinsku stabilizaciju na bazi olova.⁸⁷ Različite vrste plastike imaju i različite koncentracije aditiva, pa tako PVC može sadržavati i do 80 % DEHP-a⁷⁵ za koje je dokazano da imaju sposobnost vezanja na hormone pri čemu ometaju njihov rad tj. da su endogeni disruptori.⁸⁸ Na slici 2.14. prikazani su svi kemijski spojevi za koje je utvrđeno da se ponašaju kao endokrini disruptori odnosno narušavaju hormonalnu ravnotežu živih bića.

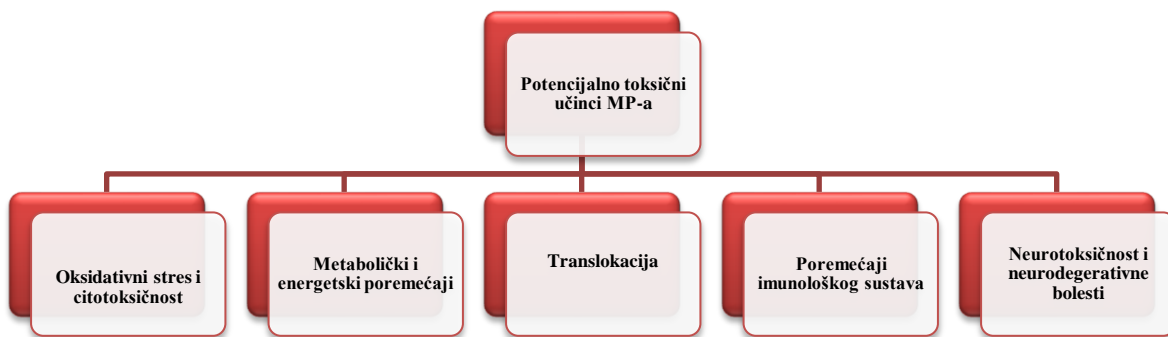


Slika 2.14. Kemijski spojevi kao endokrini disruptori u svakodnevnoj primjeni.⁸⁹

Opasnost predstavljaju i reaktivne kisikove vrste (ROS) koje su uobičajene sastavne molekule plastike, a čiji se broj može značajno povećati pod određenim reakcijskim uvjetima. Zbog velike reaktivnosti ROS-ovi predstavljaju opasnost za žive organizme jer mogu uzrokovati niz oštećenja, a jedno od njih je i oštećenje membrane.⁹⁰

2.7. Toksičnost mikroplastike

Kako se svakim danom utvrđuje prisutnost sve veće količine MP-e u okolišu, nužno je ispitati sve potencijalno štetne učinke koje ona može izazivati u okolišu i živim organizmima. Stoga se u svrhu određivanja štetnog djelovanja potencijalno štetnih tvari na zdravlje ljudi i životinja ili okoliš u cjelini, provode testovi toksičnosti na različitim organizmima poput morske bakterije (*Vibrio fischeri*; ISO 11348:2007⁹¹), kvasca (npr. *Saccharomyces cerevisiae*; ISO 19040-1:2018⁹²), slatkovodnih i morskih algi (OECD 201:1984⁹³) te drugim beskralježnjacima i manjim ribama odnosno njihovim embrijima (ISO 21115:RTgill-W1⁹⁴).⁹⁵ Svi testovi ekotoksičnosti provode se prema ISO i OECD normama. Neke od štetnih svojstava koje se najčešće ispituju su: akutna toksičnost, kronična toksičnost, genotoksičnost, mutagenost, reproduktivna toksičnost, teratogenost i dr.⁹⁶ Na slici 2.15. prikazani su potencijalno toksični učinci MP-a na okoliš i žive organizme.

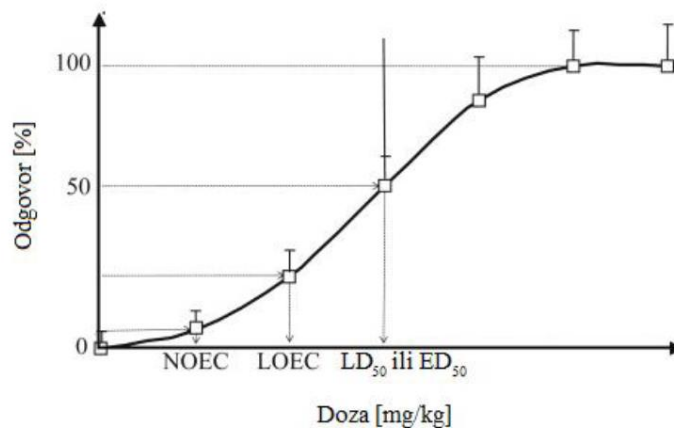


Slika 2.15. Prikaz potencijalno toksičnih štetnih učinaka MP-a na okoliš i žive organizme.⁹⁷

Istraživanjem⁹⁸ je utvrđeno da PS-e čestice promjera 10-100 μm u eksperimentalnoj dozi od približno 500 $\mu\text{g/l}$ nisu značajno citotoksične. Međutim, rezultati su pokazali da manje čestice PS-a ($d=460\text{ nm}$ i $d=1\ \mu\text{m}$) lako prijanjaju na eritrocite radi slabih Van der Waalsovih sila što može dovesti do hemolize. Uočeno je i nakupljanje PS-čestica u citoplazmi no ne i njihov toksičan učinak na citoplazmu. Čestice PS-a nisu uzrokovale ni povećanje izlučivanja histamina što bi dovelo do alergijske reakcije, ali je utvrđeno da mogu izazvati lokalne upale u tkivima i organima.⁹⁹ PVC izgaranjem stvara pare otrovne solne kiseline (HCl) koja ulaskom u čovjekova pluća, može izazvati unutarnje kemijske opekline koje u većim koncentracijama mogu rezultirati i smrću. Izgaranjem PVC-a oslobađa se i Pb kao teški metal koji je sastavni dio stabilizatora te dioksini koji su otrovni čak i u malim količinama. Osim toga, utvrđeno je i štetno djelovanje PVC-a na hormonsku ravnotežu, te ozbiljnije djelovanje

na reprodukciju, razvoj i ponašanje prilikom dugotrajnijeg izlaganja. PVC kao pripadnik grupe organokloriranih spojeva (OCC) ima sposobnost nakupljanja u masnim tkivima koja nisu razgradiva. Stoga se može naći u većim koncentracijama unutar većih razina prehrambenog lanca.¹⁰⁰

Na temelju eksperimentalno dobivenih podataka testova toksičnosti modelira se krivulja doza-odgovor kako bi se identificirala najniža doza ili koncentracija tvari koja se ispituje i koja izaziva prvi učinak, kao i najveća doza ili koncentracija bez učinka. Najniža doza koja izaziva štetni učinak naziva se LOEC (engl. *Lowest Observed Effect Concentration*), a najviša doza koja ne izaziva štetni učinak naziva se NOEC (engl. *No Observed Effect Concentration*).^{96,101} Najčešći cilj ispitivanja toksičnosti je određivanje letalne doze, LD₅₀, (engl. *Lethal dose*) i efektivne koncentracije, ED₅₀, (engl. *Half maximal effective concentration*). LD₅₀ označava dozu tvari koja je uzrokovala smrt kod 50 % jedinki izloženih štetnoj tvari, a ED₅₀ je efektivna koncentracija koja uzrokuje štetan učinak kod 50% ispitivanih jedinki.¹⁰¹ Na slici 2.16. prikazana je općenita krivulja *doza-odgovor* s naznačenim parametrima.

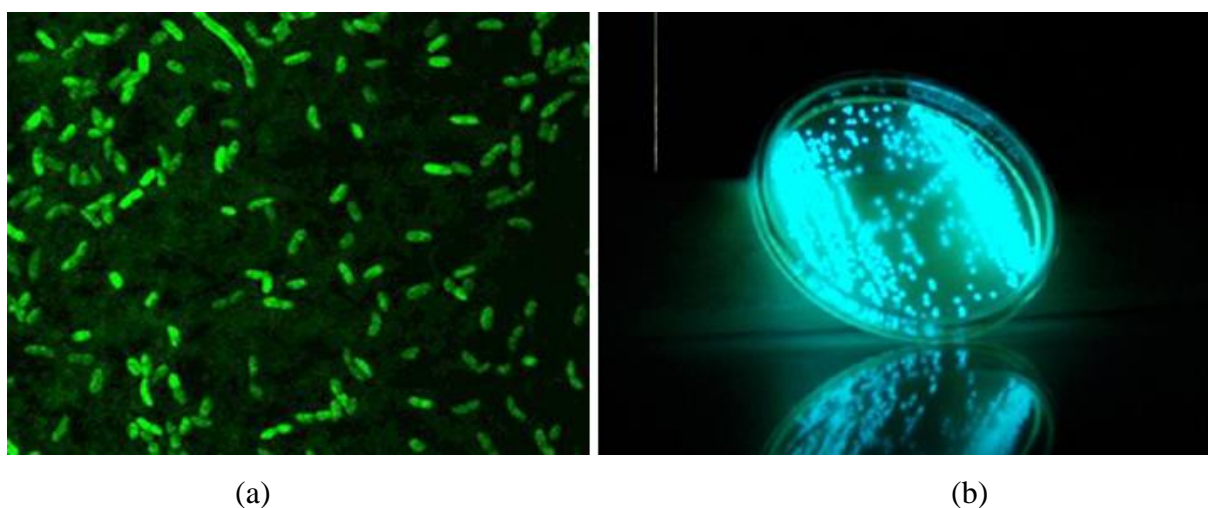


Slika 2.16. Opći izgled krivulje toksičnosti.¹⁰²

2.7.1. Ispitivanje ekotoksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri je gram-negativna, štapičasta, 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 slobodnoživući (planktonski) 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.¹⁰³ Prilikom provedbe testa ekotoksičnosti morska bakterija *Vibrio fischeri* predstavlja bioindikator koji emitira svjetlost ujednačenog intenziteta, danju i noću. Emitiranje svjetlosti bakterije *Vibrio fischeri* je sastavni dio njezinog metabolizma. Mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće je utvrditi svako oštećenje bakterijskog metabolizma nastalog uslijed djelovanja toksične tvari.¹⁰⁴ Na slici 2.17. a prikazan je štapićasti oblik morske bakterije *Vibrio fischeri* dok je na slici 2.18. b prikazano svojstvo luminiscencije radi kojeg se ovi organizmi i upotrebljavaju prilikom ispitivanja svojstva toksičnosti.



Slika 2.17. Štapićasti oblik morske bakterije *Vibrio fischeri* (a) te svojstvo bioluminiscencije koje posjeduju (b).¹⁰⁵

Rezultati ispitivanja¹⁰⁶ toksičnosti suspenzije nanočestica PS-a pokazali su toksično djelovanje na organizme: morsku bakteriju *Vibrio fischeri* ($EC_{50}=21,6\pm 6,1$ mg/L za čestice veličine 26 nm) i *Daphnia magna* ($EC_{50}=22,0\pm 0,7$ mg/L za čestice veličine 26 nm). Za nanočestice PS-a veličine 100 nm nije utvrđena nikakva toksičnost. Nakon razdvajanja suspenzije nanočestica PS-a na vodenu fazu i čestice PS-a, ponovljeni su testovi toksičnosti vodene faze u kojoj je utvrđeno zaostajanje aditiva NaN_3 koji služi kao biocid. Utvrđena je znatno veća toksičnost na testnim organizmima: *Raphidocelis subcapitata* ($EC_{50}=4,97\pm 3,7$ mg/L) i *Daphnia magna* ($EC_{50}=0,05\pm 0,03$ mg/L) kao posljedica prisutnosti NaN_3 u vodenoj fazi. Za morsku bakteriju *Vibrio fischeri* vodena faza se nije pokazala toksičnom. U istraživanju¹⁰⁷ ispitana je toksičnost različitih PVC proizvoda na organizam *Daphnia magna*, te su rezultati prikazani u Tablici 2.5. Od 5 PVC proizvoda, čak njih 4 se pokazalo toksičnim za ovaj testni organizam. Za laboratorijske rukavice je dobivena najviša vrijednost ED_{50} u g/L

nakon 48 h što znači da su izrazito toksične. Za razliku od njih prozorski okvir napravljen od krutog PVC-a nije pokazao nikakvu toksičnost.

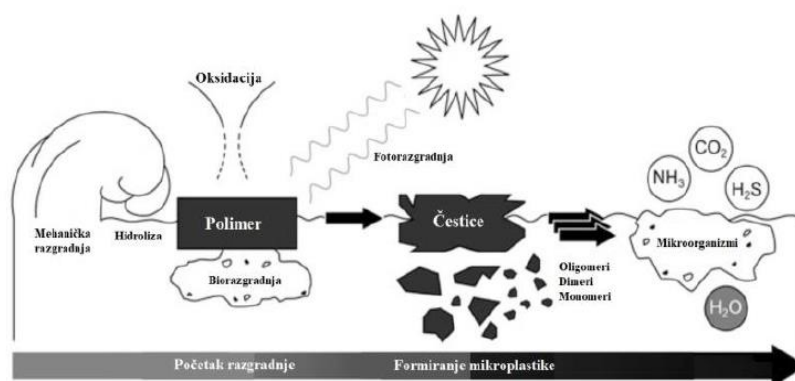
Tablica 2.5. Rezultati istraživanja toksičnosti PVC proizvoda izraženi kao ED₅₀ vrijednosti

107

Vrsta proizvoda	Vrsta PVC-a	ED ₅₀ (g/L), nakon 48h
Prozorski okvir	Kruti PVC	>250
Laboratorijske rukavice	Plastificirani PVC	4
Brodski blatobran	Plastificirani PVC	11
Jastučići za ruke za plutanje	Plastificirani PVC	70
Kabanica	Plastificirani PVC	81

2.8. Načini uklanjanja mikroplastike

Iako se je dugim nizom godina otpornost na okolišne utjecaje kao glavna karakteristika MP-a smatrala vrlinom, danas se smatra najvećom manom. Razlog tomu je masovna proizvodnja MP-a na godišnjoj razini i nagomilavanje plastičnog otpada u okolišu. Velika otpornost rezultira izuzetno niskom razgradnjom i dugim vremenom zadržavanja MP-a u okolišu. Općenito se razgradnja plastičnih materijala može klasificirati kao biotička ili abiotička, ovisno o fizičkim, kemijskim ili biološkim čimbenicima. Tijekom razgradnje se polimeri konvertiraju u manje molekularne jedinice poput oligomera ili monomera i potpuno se mineraliziraju.¹⁰⁸ Najvažniji procesi razgradnje sintetskih polimera mogu se podijeliti na fizikalno – kemijske i biološke procese. Na slici 2.18. prikazan je postupak razgradnje sintetskih polimera.



Slika 2.18. Postupak razgradnje sintetskih polimera.¹⁰⁹

2.8.1. Fizikalno-kemijski procesi uklanjanja mikroplastike

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 PE-a, PP-a, PS-a i PVC-a koji se najčešće koriste u svakodnevnici, otporni su na hidrolizu i enzimsku razgradnju zbog dugog centralnog lanca ugljika.^{109,110}

Mehanička razgradnja je važan proces razgradnje plastike u vodenom okolišu prilikom kojeg se MAP postepeno usitnjava na MP-e i NP-e. Posljedica je to djelovanja sila trenja koje se javljaju tijekom kretanja kroz različita staništa u okolišu. Mehanička razgradnja manjih čestica je puno brža zbog veće specifične površine čestica.¹¹⁰

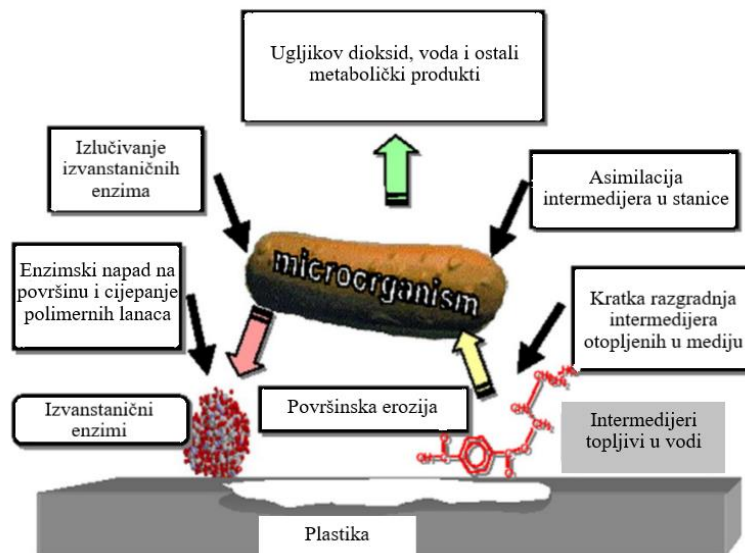
Fotorazgradnja i toplinska razgradnja su neophodne za smanjenje veličina čestica materijala koji imaju duge centralne ugljikove lance (PP, PE, PS i PVC). Stvaranjem anaerobnih uvjeta u dubljim slojevima vode i tla inhibiraju se procesi oksidacijske razgradnje.¹¹⁰ Iz tog razloga plastika zaostaje u vodenom okolišu desetljećima ili stotinama godina. Foto i termički aktivirana oksidativna razgradnja dovodi do pucanja i slabljenja plastike s vremenom zbog čega dolazi do lakšeg raspada plastike na manje čestice prilikom izloženosti abrazivnim ili mehaničkim silama.¹¹⁰ Djelovanjem UV zračenja ili toplinske energije na materijal pod aerobnim uvjetima nastaju slobodni radikali koji pokreću **oksidacijsku razgradnju**. Trajanje oksidacijske razgradnje ovisi o okolišnim uvjetima npr. izloženosti UV-u, temperaturi, sastavu tla, vlazi, kisiku te o kemijskoj strukturi i kristalnosti plastike.¹¹⁰ Do termooksidacijske razgradnje bez potrebe za daljnjim izlaganjem UV zračenju može doći nakon određenog trajanja procesa fotooksidacijske razgradnje.¹¹¹ Proces oksidacijske razgradnje, bez obzira na tip, traju sve dok je sustavu dostupan kisik.¹¹¹ U normalnim uvjetima temperatura u vodenim sustavima nije dovoljno visoka da bi došlo do kemijske promjene. Stoga termička razgradnja nije značajna za razgradnju MP-a u vodenom okolišu kao ni za razgradnju MP-e prisutne u tlu.^{112,113} Eksperimenti provedeni na PE-u i PS-u pokazali su bržu razgradnju MP-e koja se nalazi na vodenoj površini u usporedbi s plastikom koja je djelomično ili potpuno potopljena. Ovakva brzina razgradnje MP-e prisutna u vodenim ekosustavima povezana je s opadajućim intenzitetom svjetlosti te manjom brzinom fotooksidacije.¹¹⁴ Razgradnja plastičnih materijala u okolišu najčešće započinje fotooksidacijom, a na kraju slijedi kemijska oksidacija koja uključuje upotrebu različitih kemikalija prilikom obrade MP-a.^{70,115} U većini se slučajeva najčešće koristi 10 % - 30 %

otopina vodikovog peroksida (H_2O_2) ili peroksid pomiješan s kiselinama poput sumporne kiseline (H_2SO_4).¹¹⁶

2.8.2. Biološki procesi uklanjanja mikroplastike

Biorazgradnja je proces kojim se organske tvari razgrađuju pomoću živih organizama na manje molekule. Ova se vrsta razgradnje smatra podvrstom razgradnje prilikom koje dolazi do promjene svojstava polimera kao rezultat cijepanja kemijskih veza uslijed djelovanja bioloških reakcija. Najznačajniju ulogu u biorazgradnji plastike, neovisno radi li se o prirodnoj ili sintetskoj, imaju mikroorganizmi odnosno gljive i bakterije.¹¹⁷ Ako se za razgradnju ili detoksikaciju onečišćivala u nekom okolišu koriste gljive ili bakterije radi se o procesu bioremedijacije.¹¹⁸ Jedno od ograničenja prilikom razgradnje plastike predstavlja veličina polimera jer makromolekule ne mogu slobodno difundirati kroz staničnu membranu.¹¹⁷ Stoga, da bi se polimer mogao biološki razgraditi, prvo se treba pretvoriti u manje fragmente, monome ili dimere, koji se dalje potom razgrađuju do krajnjih produkata. Razgradnju polimernih makromolekula do manjih molekula može izazvati niz fizikalnih faktora kao što su promjena temperature, vlažnost polimera ili prisutnost enzima koji su neophodni za biorazgradnju plastike pomoću mikroorganizama. Mikroorganizmi stvaraju dva tipa enzima koji sudjeluju u procesu biorazgradnje i čija je prisutnost neophodna za biorazgradnju. To su ekstracelularne i intracelularne depolimeraze.¹¹⁹ 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_2O , CO_2 i/ili CH_4 pomoću intracelularnih enzima. Najčešći oblik reakcije depolimerizacije je hidroliza.^{117,119} Biorazgradnja plastike se odvija u aerobnim uvjetima, u sedimentu i odlagalištima otpada u anaerobnim uvjetima dok se u kompostu i tlu odvija u djelomično aerobnim i djelomično anaerobnim uvjetima. Rezultat aerobne razgradnje su molekule CO_2 i H_2O dok je rezultat anaerobne razgradnje, uz CO_2 i H_2O , CH_4 .⁹⁷ Proces biorazgradnje odvija se u nekoliko koraka: formacija biofilma, kolonizacija, biofragmentacija, asimilacija i mineralizacija.¹²⁰ Općeniti mehanizam biološke razgradnje plastike prikazan je na slici 2.19. Kako bi nastao biofilm, čestica MP-a dolazi u kontakt s vodom, a djelovanjem vode na površinu nastaje prikladna površina za formiranje biofilma. Mehaničkim i kemijskim djelovanjem površina puca i nastaju udubljenja nakon čega slijedi naknadna kolonizacija.¹²⁰ Po završetku kolonizacije površine mikročestice, mikroorganizmi

pomoću odgovarajućih enzima razgrađuju MP-e do oligomera, dimera i monomera. Ukoliko prilikom biorazgradnje nastanu male molekule koje mogu proći kroz staničnu membranu mikroorganizama dolazi do procesa asimilacije u kojem one služe kao izvor ugljika i energije.¹¹⁷



Slika 2.19. Opći mehanizam biorazgradnje plastike u aerobnim uvjetima.¹¹⁷

2.8.2.1. Čimbenici koji utječu na proces biorazgradnje mikroplastike

Na slici 2.20. dan je pregled čimbenika o kojima značajno ovisi uspješnost procesa biorazgradnje plastike. Povećanjem molekulske mase polimera naglo se smanjuje njegova topivost, pa tako i mogućnost njegove mikrobiološke razgradnje. Razlog tome je što bakterije mogu asimilirati samo otopljene supstrate koji prolaze kroz njihovu membranu. PES-i s više bočnih lanaca manje su podložni bakterijskoj asimilaciji u odnosu na one bez bočnih lanaca. Polimeri s višom temperaturom taljenja imaju manju biorazgradivost.¹²¹ Hidrolitička razgradnja polimera ovisi o njegovim površinskim karakteristikama tj. hidrofилnosti i hidrofobnosti. Hidrofobne plastike kao što je PE nisu podložne bakteriološkoj razgradnji jer ne omogućuju pristup hidrolitičkim enzimima. S druge strane, hidrofилne plastike poput PE-a polimeriziranog sa škrobom omogućuju kolonizaciju bakterija i na njihovim hidrofилnim dijelovima. Stoga je moguća i hidrolitička razgradnja takve vrste PE-a.¹²⁶



Slika 2.20. Čimbenici koji utječu na proces biorazgradnje.^{121,123,124,125}

Rasprostranjenost i zastupljenost različitih organizama u prirodi te optimalni uvjeti u kojima oni rastu (pH, temperatura, vlažnost, količina kisika, nutrijenti potrebni za rast itd.) su jedni od ključnih faktora za učinkovitost mikrobiološke razgradnje. Što je veći broj mikroorganizama, bolja je biorazgradnja polimera, pa tako i plastike. Dokazano je da se učinkovitost biorazgradnje plastike povećava postojanjem zajednice nekoliko različitih vrsta mikroorganizama na jednom mjestu. Tako jedna vrsta bakterija razlaže polimer do monomera dok druga vrsta taj monomer koristi i pretvara ga u još jednostavnije molekule koje pak treća vrsta mikroorganizama koristi kao supstrat za svoj rast i razmnožavanje.¹¹⁷ Primjer takve mikrobiološke zajednice su *P. putida* VM15A i *Pseudomonas* sp. VM15 C koje obitavajući u istom mediju žive u simbiotskom odnosu radi kojeg posjeduju sposobnost biorazgradnje poli(vinil-alkohola) (PVA). Međutim, da bi bakterija *Pseudomonas* sp. VM15C iskoristila PVA-a kao izvor ugljika, potreban joj je faktor rasta pirolokinolin kinon (PQQ).¹²⁷ Rezultati ispitivanja biorazgradnje PP-a pomoću mikrobne zajednice gljive *Aspergillus niger* i bakterija *Pseudomonas* I *Vibrio* pokazali su da je došlo do smanjenja viskoznosti PP-a te stvaranja novih karbonil i karboksil skupina što je potvrda za uspješno provedenu biorazgradnju. Utvrđeno je i da metabolički enzimi mikroorganizama uglavnom napadaju amorfne dijelove polimera jer su u tim dijelovima molekule slabije povezane, pa su i

podložnije mikrobiološkoj razgradnji. Stoga je za zaključiti da je stupanj kristalnosti od velikog značaja za učinkovit proces biorazgradnje plastike pomoću mikroorganizama.¹¹⁷ Nadalje, okolišni čimbenici kao što su visoka vlažnost i temperatura mogu potaknuti mikrobiološki uzrokovanu hidrolizu. Optimalna aktivnost enzima esteraze bakterije *Pseudomonas chlororaphis* koji sudjeluje u procesu biorazgradnje primijećena je pri pH-vrijednosti 8,5 dok za proteazu optimalna pH-vrijednost iznosi 7.¹⁰⁸ Navedeni primjeri su samo maleni dio rezultata eksperimentalnih istraživanja znanstvene zajednice koja se bavi tematikom biorazgradnje MP-a i značajnih čimbenika koji utječu na ovaj proces. S obzirom na broj čimbenika koji utječu na ovaj proces, može se zaključiti da se radi o vrlo složenom procesu koji zahtjeva pomno i detaljno ispitivanje.¹¹⁷

2.8.2.2. Bakteriološka razgradnja plastike

Brojne bakterijske vrste razgrađuju polimere smanjujuću njihovu molekulsku masu i uzrokujući promjene u morfološkoj i kemijskoj strukturi. Prilikom bakteriološke razgradnje polimeri služe kao glavni izvor ugljika u mediju s minimalnom količinom nutrijenata. Mehanizam biorazgradnje temelji se na mikrobiološkom potencijalu odnosno enzimima. Eksperimentalna istraživanja pokazala su sposobnost biorazgradnje plastike više bakterijskih rodova kao što su *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Enterobacter* i *Streptomyces*.¹⁵

Prvo od niza dosad provedenih istraživanja o bakteriološkoj biorazgradnji MP-a provedeno je 2013. godine, a svakim danom je broj provedenih istraživanja sve veći i veći. Profesor sa sveučilišta u Indiji, Patil R. C. je 2018. godine proveo istraživanje o potencijalnoj mogućnosti razgradnje PE-a pomoću različitih vrsta mikroorganizama.¹²⁹ Rezultati su pokazali da tijekom mjesec dana inkubacije u hranjivom bujonu s PE filmom, bakterije *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida* i *Pseudomonas fluorescenes* smanjuju masu PE filma za 14 %, 18 % i 22 % što ukazuje na to da su ove bakterije sposobne razgraditi PE. FTIR analiza je pokazala da je proces kidanja C-C veze brz, te da PE postaje izvor ugljika ovim bakterijama nakon što PE film prvotno razgrade na manje produkte.¹²⁹ Rezultati istraživanja¹³⁰ su pokazali da se tijekom mjesec dana inkubacije masa PE filma smanjuje za 16,2 % što ukazuje na to da i bakterija *Pseudomonas alcaligenes* ima sposobnost razgradnje PE filma. Utvrđeno je da *Pseudomonas* spp. ima sustav koji inicira stvaranje određenih enzima poput serin hidrolaze, esteraze i lipaze, a koji su korisni u metabolizmu izvora ugljika.¹³⁰ Pokazano je da *Bacillus cereus* može razgraditi 0,003 g PP-a dnevno dok *Sporosarcina globispora* razgrađuje 0,002 g dnevno PS-a.¹³¹ *Bacillus subtilis* ima sposobnost razgradnje ne samo PE-a već i PS-a te PET-a.^{129,132}

Tijekom biorazgradnje PS-a i PET-a, *Bacillus subtilis* uzrokuje smanjenje mase PS-a za 20 % te PET-a za 74,59 %.¹³² Sposobnost razgradnje PS-a utvrđena je još kod bakterija *Pseudomonas alcaligenes* i *Staphylococcus aureus* dok se PET može razgraditi još i bakterijama roda *Staphylococcus* točnije pomoću bakterija *Staphylococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*.¹³² Kučić i dr. (2020) su u svom rada prilikom istraživanja mogućnosti razgradnje različite vrste plastike pomoću mikroorganizama utvrdili da od tri vrste ispitivanih bakterijskih kultura najveću sposobnost razgradnje PS-a i LDPE-a pokazuje mješovita kultura *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus* sp., a potom slijedi *B. subtilis* pa *B. cereus*.¹³³ Provedena FTIR analiza nakon pokusa biorazgradnje koji je trajao 22 dana potvrdio je prethodno izvedene zaključke, a PS se je pokazao dostupnijim za razgradnju u odnosu na LDPE.¹³³ Nadalje, utvrđeno je da bakterije, osim plastike i njezinih podvrsta, mogu razgraditi i aditive koji se mogu pronaći u kemijskom sastavu svakodnevno korištene plastike, a koji u većini slučajeva završe u okolišu. Tako je utvrđeno da se BPA prisutan u vodenom okolišu može razgraditi neprilagođenim bakterijskim kulturama *Pseudomonas aeruginosa* BSW, *Pseudomonas putida* i *Streptomyces* sp.¹³⁴ Unutar 4 sata *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Pseudomonas putida* razgradile su 25 % BPA dok je *Streptomyces* sp. razgradio 35 %. *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. najbolje su razgradile BPA u vodi pri pH vrijednosti 7,3.¹³⁴ Biorazgradnji BPA u vodi sa *Streptomycesom* sp. odnosno *Pseudomonas aeruginosom* BSW najbolje je pogodovala optička gustoća(OG) vrijednosti 0,2 odnosno 0,3, te je postotak razgradnje iznosio 65 % odnosno 44 %. Pri koncentraciji BPA od 5 mg dm⁻³ odnosno 7,5 mg dm⁻³ biorazgradnja ovim dvjema bakterijama pokazala se je najučinkovitijom te je iznosila 57 %.¹³⁴ Nadalje, biorazgradnja BPA u vodi s navedenim bakterijama bila je najveća u prvih pola sata do sat vremena provođenja pokusa, a najučinkovitije uklanjanje od 52 % postignuto je pri temperaturi od 35 °C.¹³⁴ Navedeni rezultati istraživanja pokazuju kako su u okolišu za razgradnju kako plastike tako i aditiva ključni okolišni čimbenici poput pH-vrijednosti, temperature, početne koncentracije supstrata i sl.

Novija istraživanja¹³⁵ predviđaju enzime koji razgrađuju PS s najvećim potencijalom za depolimerizaciju koji uključuju citokrome P450, alkan-hidroksilaze i monooksigenaze. Smatra se da oni mogu imati ključnu ulogu u prekidu C-C veza glavnog lanca PS-a te da prsten-hidroksilirajući dioksigenaza može razbiti bočni lanac PS-a, ali i više doprinijeti oksidaciji aromatskih spojeva nastalih raspadanjem PS-a. Ovi enzimi nalaze se u organizmima redova Proteobacteria, Actinobacteria, Bacterioidia i Firmicutes koji uključuju rodove poput *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Ruminococcus* i dr. Točnu identifikaciju bakterija s ovim enzimima treba još ispitati.

Tablica 2.6. Prikaz rezultata dosadašnjih istraživanja biorazgradnje različitih vrsta MP-a.

Vrsta polimera	Bakterija	Gubitak mase polimera tijekom biorazgradnje	Vrijeme inkubacije	Literatura
PE	<i>Bacillus subtilis</i>	14 %	1 mjesec	129
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	16,2 %	1 mjesec	130
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	22 %	1 mjesec	129
	<i>Pseudomonas putida</i>	18 %	1 mjesec	129
PP	<i>Bacillus cereus</i>	12 %	40 dana	131
	<i>Sporosacrina globispora</i>	11 %	40 dana	131
PS	<i>Bacillus subtilis</i>	20 %	1 mjesec	132
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	5 %	1 mjesec	132
	<i>Staphylococcus aureus</i>	4,76 %	1 mjesec	132
PET	<i>Bacillus subtilis</i>	74,59 %	1 mjesec	132
	<i>Staphylococcus pyogenes</i>	3,85 %	1 mjesec	132
	<i>Staphylococcus aureus</i>	8,75 %	1 mjesec	132

2.9. Taguchi dizajn

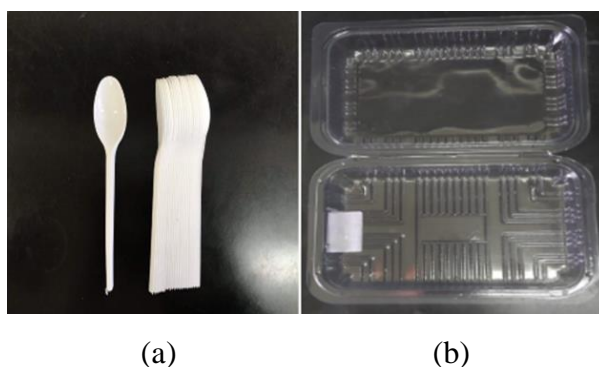
Taguchi metodu za dizajniranje eksperimenata prilikom znanstvenih istraživanja predstavio je 1950-ih i 1960-ih godina Genichi Taguchi. Ova je metoda primjenjiva na širok spektar problema u elektroničkoj i automobilskoj industriji, prilikom razvoja fotografija i u mnogim drugim industrijama koje su bile ključan faktor u razvoju japanskog gospodarstva. Dizajniranje eksperimenata Taguchi metodom temelji se na polaznim idejama standardnog statističkog dizajna pokusa (SDOE ili DOE) s obzirom na to da konvencionalna optimizacija dizajna ne zadovoljava uvijek željene ciljeve. Prednosti ove metode su: ekonomičnost jer smanjuje broj eksperimenata koji se provode, optimizacija procesa i laboratorijskih istraživanja, poboljšanje produktivnosti istraživanja i razvojnih aktivnosti te smanjenje i varijabilnost odzivne varijable.¹³⁶

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroplastika

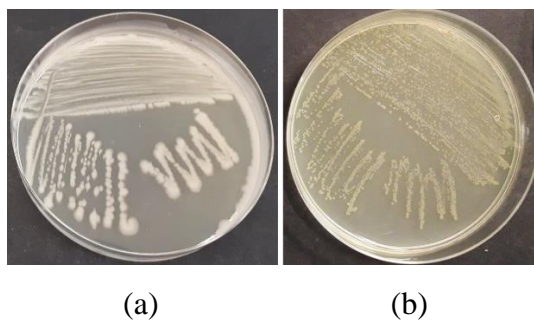
U ovom eksperimentu korištene su dvije vrste mikroplastike: PS dobiven usitnjavanjem jednokratnih žlica i PVC dobiven usitnjavanjem jednokratne ambalaže. Veličine čestica MP-a iznosile su: $<300\ \mu\text{m}$ i $500\text{-}700\ \mu\text{m}$. (Slika 3.1)



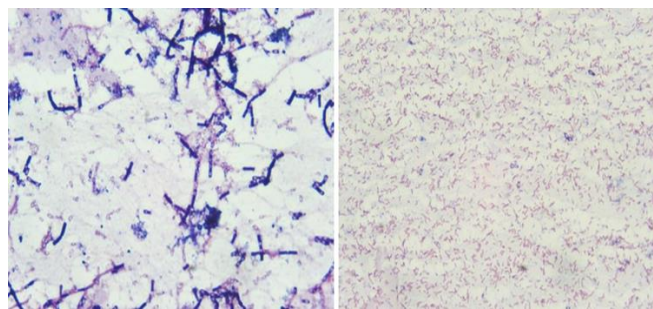
Slika 3.1. Jednokratke žlice za jelo od PS-a (a) i ambalaža za pakiranje hrane od PVC-a (b).

3.1.2. Bakterijske kulture

Proces biorazgradnje PS-a i PVC-a provodio se primjenom bakterijskih kultura *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* pohranjenih u zbirci mikroorganizama na Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Bakterijske kulture *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* izolirane su iz aktivnog mulja nastalog prilikom pročišćavanja komunalnih otpadnih voda, te iz riječnog sedimenta. Precijepljene bakterijske kulture *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* prikazane su na slici 3.2. a) i b), dok je na slici 3.3.a) i b) prikazana morfologija bakterijskih kultura snimljena mikroskopom pri povećanju od 1000 x.



Slika 3.2. Fotografski snimak izraslih bakterijskih kultura *Bacillus cereus* (a) i *Pseudomonas alcaligenes* (b) dobivene tehnikom iscrpljivanja na hranjivom agaru (HA).



(a)

(b)

Slika 3.3. Mikrofotografije bakterijskih kultura *Bacillus cereus* (a) i *Pseudomonas alcaligenes* (b) obojane po Gramu snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000×.

3.1.3. Mediji i kemikalije

➤ Hranjiva podloga

Za uzgoj bakterijskih kultura pripravljena je 1 L hranjivog agara (HA) prema recepturi koja je preuzeta od proizvođača Biolife Manual, Ingaf, Italija 1991. Tako pripravljena otopina HA je dobro homogenizirana, zagrijana do vrenja i sterilizirana 15 minuta u autoklavu pri 121 °C i 1,1 atm.

➤ Etanol

Za sterilizaciju MP-e korištena je 70%-tna otopina etanola prethodno pripravljena u odmjerneju tikvici od 1000 mL tako da je menzutom odmjereno 730 mL etanola ($\omega=96\%$, $M=46,07$ g/mol, $\rho=0,805$ kg/L) i stavljeno u tikvicu koja je potom nadopunjena do oznake deioniziranom vodom.

➤ Mineralni medij

Za biorazgradnju MP-e pripravljeno je po 2 L mineralog medija pH-vrijednosti 6 i 8. pH-vrijednost mineralnog medija podešavala se s 1 M KOH ili 1 M H₂SO₄. Točan sastav mineralnog medija koji je korišten za pripremu bakterijske suspenzije prikazan je u Tablici 3.1.¹³⁷ Upotrebom mineralnog medija osigurani su minimalni uvjeti za rast bakterija.

➤ Fiziološka otopina

0,9 % fiziološka otopina korištena je za pripremu decimalnih razrjeđenja.

Tablica 3.1. Sastav mineralnog medija.¹³⁷

Kemijski spoj	γ / mg/L
K_2HPO_4	12,5
KH_2PO_4	3,8
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,1
H_3BO_3	0,232
$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	0,174
$FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \times 6 H_2O$	0,116
$Co(NO_3)_2 \times 6 H_2O$	0,096
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4 H_2O$	0,022
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	0,008
$MnSO_4 \times 4 H_2O$	0,008

Priprema otopina za određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterijske kulture *V. fischeri*

➤ Otopina za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture *Vibrio fischeri* koja je pripravljena otapanjem 20 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 0,5 g $CaCl_2$, 0,2 g $MgSO_4$, 0,5 mL glicerola, 10 g glukoze i 10 g rafinoze u 1 litri deionizirane vode. Tako pripravljena 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 pripravljena otapanjem 2 g NaCl-a u 100 mL deionizirane vode pri čemu pH-vrijednost mora biti u rasponu od 6,8 do 7,2.

3.2. Instrumenti i aparatura

Za vaganje uzoraka i soli koristile su se analitičke vage KERN ALJ 220-4NM i Sartorius GM 6101 koje su prikazane na slikama 3.4. a i 3.4. b.



(a)

(b)

Slika 3.4. Analitička vaga KERN ALJ 220-4NM (a) i analitička vaga Sartorius GM 6101 (b). Miješanje uzoraka provedeno je na rotacijskim tresilicama LAUDA-GFL Gesellschaft model 3005, Njemačka (Slika 3.5. a) i PSU-10 i Orbital Shaker (slika 3.5. b)).



(a)

(b)

Slika 3.5. Rotacijska tresilica LAUDA-GFL Gesellschaft model 3005, Njemačka (a) i PSU-10i Orbital Shaker (b)

pH-vrijednost i temperatura pratila se je pomoću prijenosnog uređaja WTW Multimetar 3430. Optička gustoća određena je spektrofotometrom HACH, DR2400, SAD. Prilikom provedbe eksperimenata suspenzije mikroorganizama homogenizirane su na homogenizatoru REAX top (Slika 3.6).

Vlažna sterilizacija hranjivih podloga te čistog i nečistog staklenog posuđa provedena je u autoklavu Sutjeska, Jugoslavija prikazanom na slici 3.7.



(a)

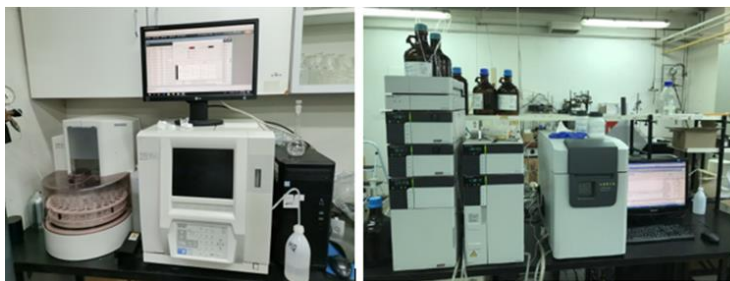
(b)

Slika 3.6. WTW Multimetar 3430 s elektrodama za mjerenje pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika (a), spektrofotometar HACH, DR2400, SAD za mjerenje OG (u sredini), homogenizator (b).



Slika 3.7. Autoklav Sutjeska, Jugoslavija.

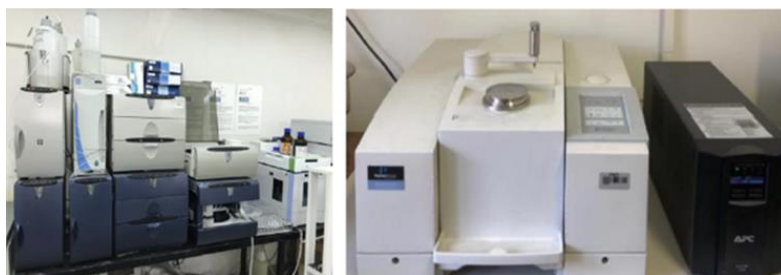
Kvalitativna i kvantitativna analiza provedena je na uređajima prikazanim na slikama 3.8. i 3.9., a koji se nalaze na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u firmi CWT - *Comprehensive Water Technology*.



(a)

(b)

Slika 3.8. TOC-V_{CSH} Shimadzu uređaj (a) i HPLC uređaj (b).



(a)

(b)

Slika 3.9. Uređaj za ionsku kromatografiju (a) i FTIR-ATR spektrometar (b).

Ukupni organski ugljik (TOC), organski ugljik (TC) i anorganski ugljik (IC) određeni su pomoću uređaja TOC-V_{CSH}, Shimadzu (slika 3.9. a). Uređajem za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU, uzorci su razdvojeni po masi pri čemu su na ionskom kromatografu, DIONEX ICS SERIES, AS – DV, detektirani ioni odnosno anioni i kationi (slika 3.10. a). PS i PVC okarakterizirani su infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom tj. FTIR-ATR spektrometrom, PerkinElmer, Spectrum One (slika 3.10. b).

Za filtraciju sterilizirane mikroplastike koristio se vakuumski filter lijevak (Slika 3.10).



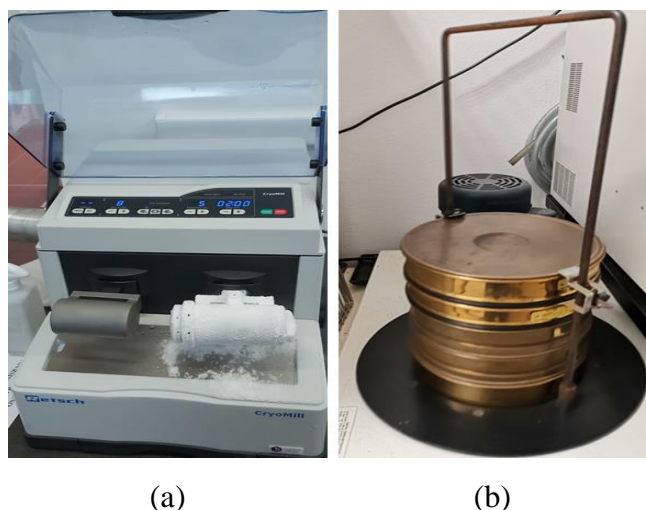
Slika 3.10. Membranska filtracija mikroplastike pomoću vakuuskog filter lijevka.

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprema mikroplastike

Za ispitivanje značajnih čimbenika procesa biorazgradnje MP-a pomoću bakterija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* korišteni su PS i PVC koji se u svakodnevici koriste u obliku jednokratnog pribora za jelo, odnosno ambalaže za pakiranje hrane. Polimerni proizvodi su prvo usitnjeni na manje komade škarama, a potom na sitnije čestice na

Kriomlinu (Slika 3.11. a). Kriomlin je uređaj za usitnjavanje uzoraka s tekućim dušikom koji služi za termostatiranje. Metoda mljevenja uzoraka na kriomlinu je jednostavnija i brža u odnosu na metodu mljevenja sa suhim ledom, a princip rada je sljedeći: na uređaju se podesi broj i frekvencija udaraca te vrijeme trešnje. U utor metalnog spremnika unutar kriomlina stavi se plastika koja se pomoću tekućeg dušika dopremljenog putem cijevi zaledi. Tako zaleđena plastika se uslijed trešnje i udaraca kuglice unutar spremnika usitnjava. Dobivene čestice MP-a su osušene i prosijane na mehaničkom situ (slika 3.11. b) u svrhu dobivanja frakcija <math><300\ \mu\text{m}</math> i $500\text{-}700\ \mu\text{m}$.



Slika 3.11. Kriomlin (a) i mehaničko sito (b).

3.3.2. Sterilizacija mikroplastike

Prije provedbe pokusa biorazgradnje MP je sterilizirana u 70%-tnom etanolu kako bi se uklonile potencijalno postojeće nečistoće na površini MP-a. Sterilizirane čestice MP-e su zatim stavljene na rotacijsku tresilicu 15 minuta na 160 o/min, a potom su i filtrirane kroz membranski filter veličine pora $0,45\ \mu\text{m}$.

3.3.3. Preduzgoj bakterija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*

24 sata prije postavljanja eksperimenta proveden je preduzgoj bakterijskih kultura, *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*, u svrhu postizanja što boljeg rasta mikroorganizama, odnosno izostavljanja faze prilagodbe samih mikroorganizama na okolinu u kojoj trebaju rasti. Izrasle bakterijske kulture *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* upotrebene su za pripremu bakterijskih suspenzija tako da su Pasteur pipetom sastrugane s površine hranjive podloge te pomoću mineralnog medija prenesene u sterilnu tikvicu. Pripremljene bakterijske

suspenzije su homogenizirane i iskorištene za postavljanje pokusa biorazgradnje MP-a pomoću navednih mikroorganizama.

3.3.4. Pokusi biorazgradnje polistirena i poli(vinil-klorida) pomoću bakterija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* prema Taguchi dizajnu

Plan pokusa biorazgradnje MP-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* dizajniran je prema Taguchi dizajnu L₈ ortogonalnog plana koji daje kombinaciju 7 čimbenika na dvije razine u svrhu ispitivanja i utvrđivanja značajnih čimbenika procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a. Prema Taguchi dizajnu, ispitan je utjecaj 7 čimbenika na proces biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* – pH-vrijednost, temperatura, broj okretaja, veličina MP-e, koncentracije MP-e, OG i dodatak glukoze na dvije razine – minimalna i maksimalna vrijednost. Dobivena matrica prema Taguchi dizajnu koja predstavlja kombinaciju čimbenika na dvije razine za svaki pokus prikazana je u tablicama: Tablica 3.2. i Tablica 3.3.

U svrhu ispitivanja značajnih čimbenika procesa biorazgradnje MP-a primjenom bakterijskih kultura *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* tijekom 30 dana provedeno je 16 pokusa na 4 rotacijske tresilice pri čemu se pratio utjecaj čimbenika pri 15 °C i 25 °C te 100 o/min i 200 o/min. Sastav tikvica pojedinog pokusa činili su: mineralni medij pH-vrijednosti 6 ili 8, suspenzija mikroorganizama – *Bacillus cereus* ili *Pseudomonas alcaligenes* OG vrijednosti 0,1 ili 0,5, te MP – PS ili PVC veličine čestica 500-710 μm ili <300 μm i koncentracije 1000 ili 10 mg/L. U pojedine pokuse dodano je i 0,0001 mg/L glukoze. Provođenjem pokusa navedenih u tablicama: Tablica 3.2. i Tablica 3.3. ispitana je određena kombinacija čimebnika dobivenih prema Taguchi metodi. Usporedno s navedenih 16 pokusa, provedena su još 4 pokusa u svrhu kontrole rasta mikroorganizama u određenim uvjetima. U točno određenim vremenskim intervalima (0., 3, 7., 14., 21. i 30. dan) izuziman je uzorak određenog volumena te je određena optička gustoća, OG, i broj živih stanica bakterija (CFU). Na početku i na kraju svakog eksperimenta određena je pH vrijednost. Provedene su i TOC analiza, ionska kromatografija, HPLC/MS analiza, FTIR-ATR analiza te je ispitana ekotoksičnost filtrata bakterijskih suspenzija prije i poslije procesa biorazgradnje pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*.

Tablica 3.2. L₈ ortogonalni plan pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* dobiven prema Taguchi dizajnu.

Vrsta mikroplastike	Pokus	T / °C	Broj okretaja / o/min	pH-vrijednost / -	Veličina MP / μm	γ(MP) / mg/L	OG / -	γ (glukoza) / mg/L
PS	B1-1	15 °C	100	8	500-710	1000	0,5	0
	B3-1	15 °C	100	6	<300	10	0,1	0
	B1-2	15 °C	200	6	<300	1000	0,5	0,0001
	B4-2	15 °C	200	8	500-710	10	0,1	0,0001
	B1-3	25 °C	100	6	500-710	10	0,5	0,0001
	B3-3	25 °C	100	8	<300	1000	0,1	0,0001
	B1-4	25 °C	200	6	500-710	1000	0,1	0
	B3-4	25 °C	200	8	<300	10	0,5	0
PVC	B2-1	15 °C	100	8	500-710	1000	0,5	0
	B4-1	15 °C	100	6	<300	10	0,1	0
	B2-2	15 °C	200	6	<300	1000	0,5	0,0001
	B3-2	15 °C	200	8	500-710	10	0,1	0,0001
	B2-3	25 °C	100	6	500-710	10	0,5	0,0001
	B4-3	25 °C	100	8	<300	1000	0,1	0,0001
	B2-4	25 °C	200	6	500-710	1000	0,1	0,0001
	B4-4	25 °C	200	8	<300	10	0,1	0,0001

Tablica 3.3. L₈ ortogonalni plan pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* dobiven prema Taguchi dizajnu.

Vrsta mikroplastike	Pokus	T / °C	Broj okretaja / o/min	pH-vrijednost / -	Veličina MP / μm	γ(MP) / mg/L	OG / -	γ (glukoza) / mg/L
PS	P1-1	15 °C	100	8	500-710	1000	0,5	0
	P2-1	15 °C	100	6	<300	10	0,1	0
	P1-2	15 °C	200	6	<300	1000	0,5	0,0001
	P2-2	15 °C	200	8	500-710	10	0,1	0,0001
	P1-3	25 °C	100	6	500-710	10	0,5	0,0001
	P2-3	25 °C	100	8	<300	1000	0,1	0,0001
	P1-4	25 °C	200	6	500-710	1000	0,1	0
	P2-4	25 °C	200	8	<300	10	0,5	0
PVC	P3-1	15 °C	100	8	500-710	1000	0,5	0
	P4-1	15 °C	100	6	<300	10	0,1	0
	P3-2	15 °C	200	6	<300	1000	0,5	0,0001
	P4-2	15 °C	200	8	500-710	10	0,1	0,0001
	P3-3	25 °C	100	6	500-710	10	0,5	0,0001
	P4-3	25 °C	100	8	<300	1000	0,1	0,0001
	P3-4	25 °C	200	6	500-710	1000	0,1	0
	P4-4	25 °C	200	8	<300	10	0,1	0

3.3.5. Primjena analitičkih i instrumentalnih metoda za praćenje biorazgradnje mikroplastike

3.3.5.1. Određivanje broja živih stanica bakterija (CFU)

Za određivanje točnog broja izraslih kolonija bakterija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* pripremljena su decimalna razrjeđenja od 10^{-5} do 10^{-6} . Broj izraslih kolonija bakterija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* izraženog pomoću CFU – *Colony-forming Unit* određen je ukupno šest puta tijekom trajanja pokusa. Postupak određivanja CFU sastoji se od inokulacije 1 mL prethodno pripremljenog razrjeđenja (10^{-5} ili 10^{-6}) 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 brojni raspon od 30 do 300, dok se CFU vrijednost računa prema formuli¹³⁸:

$$\text{CFU / (jed./mL)} = \frac{(\text{broj izraslih kolonija})}{\text{volumen upotrebljenog uzorka}} * \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad (1)$$

3.3.5.2. TOC analiza – određivanje ukupnog organskog ugljika, ukupnog ugljika i anorganskog ugljika

Za određivanje TOC-a (engl. *Total Organic Carbon*) izuzeto je 0,5 mL uzorka koji je potom profiltriran pomoću injekcije s okruglim filterom promjera 0,45 µm (Slika 3.12).



Slika 3.12. Prikaz injekcije s filterima promjera 0,45 µm.

Isti postupak proveden je i za TC-a (engl. *Total Carbon*), dok je IC (engl. *Inorganic Carbon*) izračunat iz razlike TC-a i TOC-a. Za TOC analizu korišten je TOC-V_{CSH}, Shimadzu uređaj. Postupak određivanja TOC-a sastojao se od izuzimanja 0,5 mL uzorka u staklene bočice u

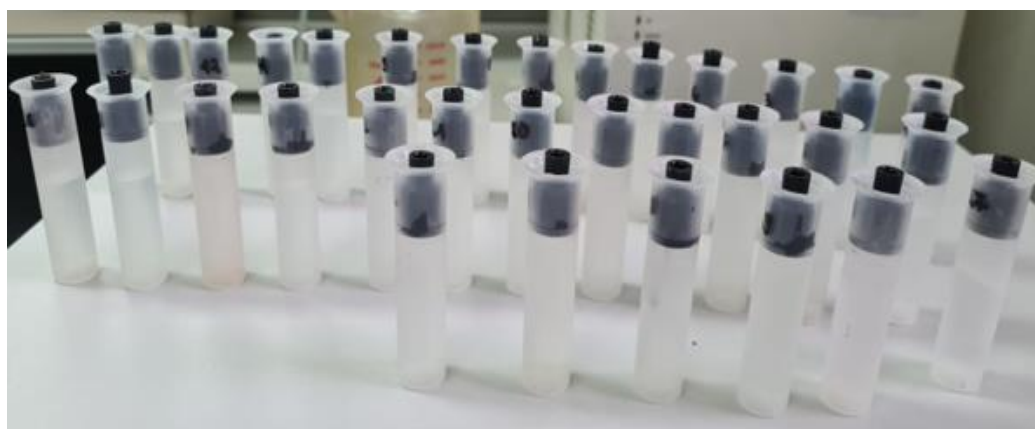
koje je dodano 9,5 mL deionizirane vode kako bi ukupan volumen iznosio 10 mL. U staklenu bočicu s uzorkom za mjerenje TOC-a dodano je i 3 kapi H₂SO₄ u svrhu neutralizacije anorganskog ugljika. Drugom setu bočica s izuzetim uzorcima istog volumena iz kojih se mjeri TC, kiselina se ne dodaje.

3.3.5.3. Ionska kromatografija

U svrhu određivanja koncentracije kationa i aniona (Slika 3.13) provedena je ionska kromatografija. Koncentracija kationa i aniona određena je pomoću Dionex ICS 3000 dualnog sustava s potisnutom vodljivošću. Uzorci su prije stavljanja na ionski kromatograf filtrirani kroz okrugli filter promjera 0,45 µm.

Za određivanje kationa (Li⁺, Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺) korištena je Dionex CS16 kolona s pripadajućom pretkolonom termostatiranom na 30 °C. Mobilna faza je 30 mM MSA s protokom od 1,0 mL/min. Signal se supresira kationskim supresorom (ThermoScientific™ Dionex™ CSRS™ ULTRA Cation Self Regeneration Suppressor (4 mm), Autosuppression Recycle mode, podešene struje supresora: 65 mA) tokom cijelog vremena trajanja analize. Tijekom ukupnog vremena trajanje analize odnosno 20 minuta eluiraju svi kationi.

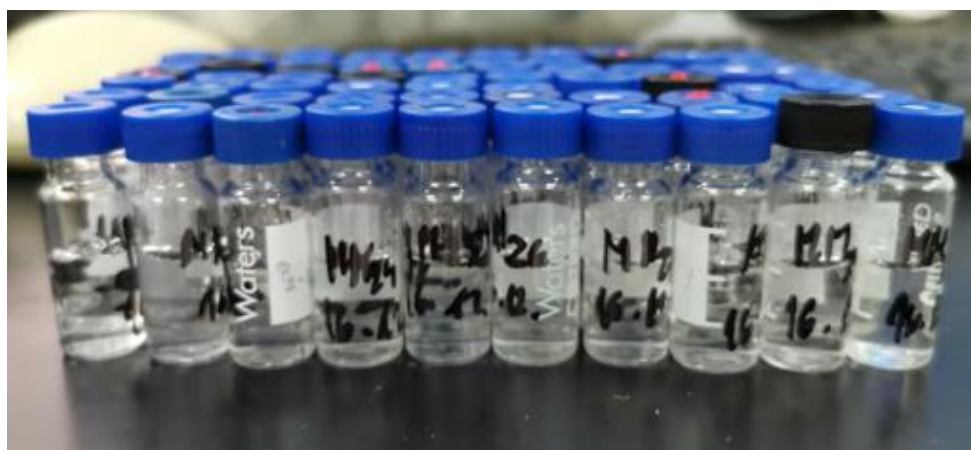
Anioni (F⁻, Cl⁻, NO₂⁻, Br⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻) su određeni u anionskom sustavu s AS 22 kolonom s pripadajućom pretkolonom termostatiranoj na 30 °C. Mobilna faza je karbonatni pufer (4,5 mM Na₂CO₃ i 1,4 mM NaHCO₃) dok je protok 1,2 mL/min. Signal se supresira anionskim supresorom (ThermoScientific™ Dionex™ AERS™ 500 Anion Electrolytic Regenerating Suppressor, Recycle mode, podešene struje supresora: 31 mA).



Slika 3.13. Pripremljeni uzorci u vijalama za ionsku kromatografiju.

3.3.5.4. HPLC/MS analiza – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i masena spektrometrija

HPLC/MS analiza ili tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti/masena spektrometrija provedena je u svrhu detekcije potencijalno nastalih razgradnih produkata točnije aditiva. (Slika 3.14) Prilikom HPLC/MS analize korištene su dvije pumpe za podešavanje protoka mobilne faze (0,1% mravlje kiseline + MiliQ i acetonitril/metanol) vrijednosti 0,5 cm³/min. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 10 µL. S obzirom da se ne zna točan sastav uzorka, korištena je HPLC metoda bez kolone.



3.14. Pripremljeni uzorci za HPLC/MS analizu.

3.3.5.5. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (FTIR analiza)

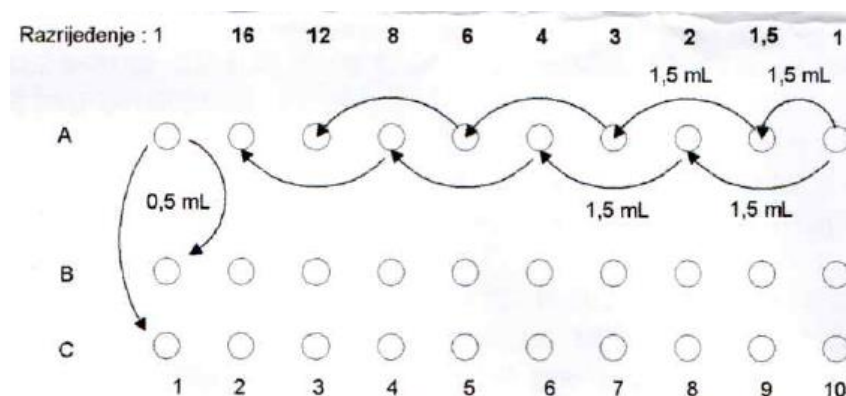
U svrhu provjere funkcionalnih skupina u kemijskoj strukturi PS-a i PVC-a provedena je FTIR-ATR analiza nakon biorazgradnje MP-a. Ova analiza provedena je i prije provedbe pokusa biorazgradnje MP-a u svrhu određivanja karakterističnih funkcionalnih skupina u kemijskoj strukturi PVC-a i PS-a. Rezultat FTIR-ATR analize je odgovarajući spektar okarakteriziranog polimera s pripadajućim karakterističnim funkcionalnim skupinama koje se nalaze u kemijskoj strukturi tog polimera. Ovisno o rezultatima, FTIR-ATR analizom moguće je i potvrditi da je uistinu došlo do biorazgradnje MP-a. FTIR analiza ne zahtjeva posebnu pripremu uzorka već je dovoljno čvrsti uzorak polimera staviti na površinu kristala tako da prekiva u cijelini.

3.4. Postupak određivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*

Za ispitivanje ekotoksičnosti filtrata bakterijskih suspenzija PS-a i PVC-a pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* korišten je filtrat bakterijske suspenzije PS-a odnosno PVC-a, resuspenzija bakterije *Vibrio fischeri* i 2%-tna otopina NaCl-a. pH-vrijednost filtrata je prema uputama za korištenje luminometra LUMIStox 300, uređaja za određivanje ekotoksičnosti, iznosila između 6 i 8,5. Bakterijska resuspenzija pripravljena je na način da se ušicom mikrobiološke eze zahvatilo malo čiste kulture morske bakterije *Vibrio fischeri* te se ju resuspendiralo u epruveti napunjenoj 2/3 otopinom za resuspenziju. Tako pripravljena bakterijska resuspenzija termostatirana je 15 minuta u termostatu na 15 °C radi prilagodbe bakterijske kulture uvjetima u novoj okolini. Prije provođenja samog testa ekotoksičnosti izmjerena je relativna luminiscencija bakterijske suspenzije *Vibrio fischeri* (*Screening test*) 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.

Linerarni niz

1. U prvu kivetu stavi se 2/3 kivete 2%-tne otopine 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 3.15.
3. U sve ostale kivete B i C niza stavi se po 0,5 mL inokuluma.
- 4.



Slika 3.15. Prikaz provedbe testa toksičnosti pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* prema linearnom nizu.

Rezultati ispitivanja bioaktivnosti morske bakterije *Vibrio fischeri* prije i poslije izloženosti filtrata bakterijskih suspenzija PS-a i PVC-a su vrijednosti EC_{20} i EC_{50} koje ukazuju na veću ili manju toksičnost ispitivanog uzorka filtrata bakterijskih suspenzija, odnosno mineralnog medija koji služi kao kontrola. Eksperimentalni rezultat je i vrijednost faktora, f , koji mora biti oko 1 (0,6 do 1,3). Testovi ekotoksičnosti provedeni su na luminometru LUMIStox 300 koji dolazi u kombinaciji s termometrom LUMIStherm, Hach-Lange GmbH, a koji se koristi u svrhu termostatiranja. Na slici 3.16. prikazani su luminometar LUMIStox 300 i termometar LUMIStherm, Hach-Lange GmbH.



Slika 3.16. Luminometar LUMIStox 300 i termometar LUMIStherm, Hach-Lange GmbH.

3.5. Određivanje značajnih čimbenika za proces biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*

Tijekom provedbe pokusa biorazgradnje mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* praćena je vrijednost ukupnog broja živih stanica, CFU, dok se je prilikom statističke obrade eksperimentalnih podataka kao odziv (engl. *Response*) koristila vrijednost log CFU. Pomoću programa *Design Expert 7.0 SAD* i statističke analize eksperimentalnih podataka *ANOVA* određeni su značajni čimbenici za provedene procese biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*. S obzirom na doprinos (engl. *contribution*) i p-vrijednost svakog ispitivanog čimbenika određeni su značajni čimbenici za proces biorazgradnje ispitivanih MP-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Iako je danas nezamislivo funkcionirati bez plastike koja je zauzela svoje mjesto u svim dijelovima industrije i društva stvarajući ugodan život te doprinoseći održivom razvoju, zahvaljujući maloj masi, velikoj izdržljivosti i niskoj cijeni sve se više o njoj stvara negativna slika.¹³⁹ Razlog tomu je neprikladno i neodgovorno rukovanje ljudi s plastičnim otpadom koji se sve više nagomilava u okolišu kako se njezina masovna proizvodnja na godišnjoj razini povećava.¹³⁹ Postavljena su i pitanja potencijalnih štetnih učinaka koje plastika može izazvati u okolišu te imati na životinjski svijet i čovjeka prenoseći se kroz hranidbeni lanac do njega. Stoga, kako plastika ne bi ostala zabilježena kao najveća onečišćujuća tvar našeg planeta, važno je što prije naći način kako ju učinkovito ukloniti iz okoliša. Osim toga, važno je i donijeti mjere za sprječavanje odlaganja plastičnog otpada u okoliš koje će biti propisane od strane zakonodavstva.¹³⁹ Kao jedna od potencijalnih metoda za učinkovito uklanjanje plastike iz okoliša pokazala se je biorazgradnja primjenom bakterija koja se temelji na iskorištavanju enzimskog potencijala i metaboličkim aktivnostima mikroba.¹⁴⁰ Za odvijanje bioloških reakcija u kojima sudjeluju enzimi koji su po kemijskoj strukturi proteini ključno je zadovoljiti fiziološke uvjete u kojima je aktivnost enzima najveća dok je za metaboličke reakcije ključno osigurati izvor hranjivih tvari.¹⁴⁰ Fiziološki uvjeti podrazumijevaju postizanje uvjeta što sličnijim uvjetima u biološkoj stanici, a to su optimalna pH-vrijednost, optimalna temperatura itd.¹⁴¹

U ovom su se radu proveli eksperimenti biorazgradnje mikroplastičnih čestica PVC-a i PS-a pomoću mikroorganizama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* s ciljem utvrđivanja značajnih čimbenika koji utječu na ovaj proces. Tijekom 30 dana ispita se utjecaj pH-vrijednosti, temperature, veličine i koncentracije MP-a, broja okretaja, OG bakterijske suspenzije i koncentracije glukoze na minimalnoj i maksimalnoj vrijednosti. Temperatura je za svaki eksperiment na početku podešena na određenu vrijednost dok se pH-vrijednost u pokusima tijekom 30 dana nije značajnije mijenjala. Stoga su glavni pokazatelji biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterija: broj stanica izraslih bakterijskih kolonija izražen po mililitru (CFU), TOC analiza, HPLC/MS analiza, ionska kromatografija te FTIR analiza. Određena je i ekotoksičnost filtrata po završetku svakog eksperimenta u svrhu utvrđivanja njihove potencijalne toksičnosti. Statističkom obradom u programu *Design Experiments* prema Taguchi metodi obrađeni su eksperimentalni podaci biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* te su utvrđeni značajni čimbenici ovog procesa.

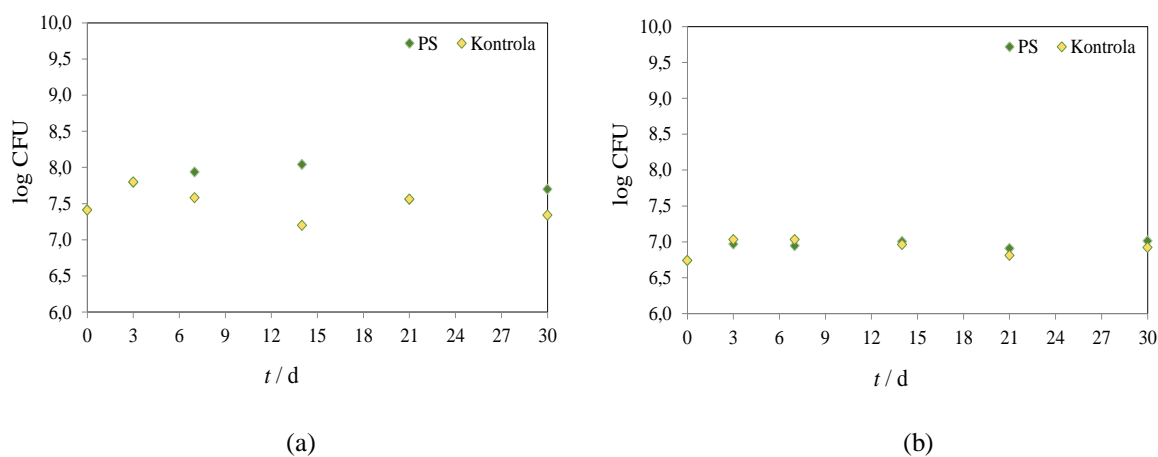
4.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*

Općenito, CFU vrijednost predstavlja broj izraslih bakterijskih kolonija izraženih po mililitru, a koristi se za mikrobiološku dijagnostiku unutar nekog sustava.^{138,142} U ovom je radu CFU vrijednost služila kao parametar za praćenje tijeka biorazgradnje polimera PS-a i PVC-a pomoću mikroorganizama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* tijekom 30 dana trajanja eksperimenta.

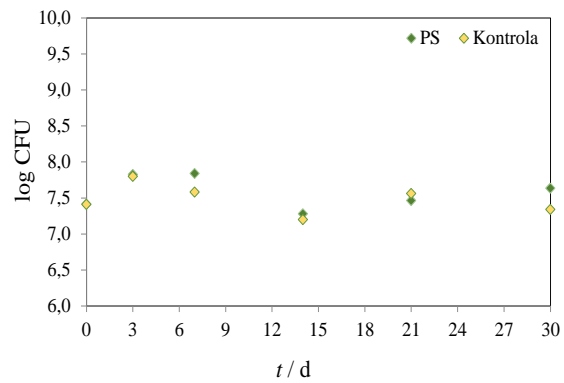
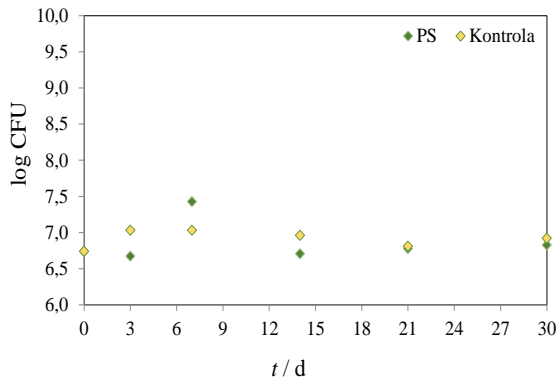
4.1.1. Rezultati promjene CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije *Bacillus cereus*

Na slikama 4.1.-4.4. prikazana je biorazgradnja PS-a pomoću bakterije *Bacillus cereus* tijekom 30 dana praćena preko CFU vrijednosti. Ovisno o eksperimentalnim uvjetima najveći broj izraslih kolonija prilikom biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus* postignut je već u 3. danu u pokusima B1-3, B3-3 i B3-4 u vrijednosti od $7,4 \times 10^7$ st/mL, $1,38 \times 10^7$ st/mL odnosno $5,6 \times 10^7$ st/mL. Broj kolonija u 0. danu za pokuse B1-3 i B3-4 iznosio je $2,6 \times 10^7$ st/mL, dok je za pokus B3-3 iznosio $5,50 \times 10^6$ st/mL. Bakterijsko razmnožavanje od 0. do 3. dana u ovim pokusima upućuje da je proces preduzgoja uspješno proveden te da bakterijskoj kulturi *Bacillus cereus* nije bilo potrebno vrijeme prilagodbe na novonastale uvjete. Pokusi B1-3, B3-3 i B3-4 prikazani su na slikama 4.3. a i b te 4.4. a. Početak postepenog smanjenja broja kolonija *Bacillus cereus* uočen je u 7. danu u pokusima B1-3 i B3-4. S druge strane, u pokusu B3-3 broj kolonija se minimalno smanjio, a kako je vrijeme odmicalo, oscilirao je više-manje oko jednake vrijednosti, što upućuje na uspostavljanje stacionarne faze bakterijskog rasta¹³⁸ prikazane na slici 4.3. b. Tijekom stacionarne faze rasta neprestano se odvija energetski metabolizam; sintetiziraju se i komercijalno važni produkti biosinteze kao npr. enzimi i antibiotici.¹³⁸ Usporedbom pokusa koji je predstavljao kontrolu (SP), a koji nije sadržavao MP-e, i pokusa B3-3, u kojemu je MP-e bila prisutna, uočena je neznatna razlika u broju izraslih kolonija. Shodno navedenom može se zaključiti da je u ovom slučaju došlo do minimalnog iskorištavanja PS-a kao supstrata. Pretpostavlja se da eksperimentalni uvjeti nisu odgovarali bakteriji *Bacillus cereus* da bi u većoj mjeri iskoristila PS kao supstrat. U 7. danu najveći broj izraslih kolonija postignut je u pokusima B1-2 i B4-2 u vrijednosti od $2,67 \times 10^7$ st/mL i $6,9 \times 10^7$ st/mL, dok je u 14. danu najveći broj izraslih kolonija postignut u pokusima B1-1 i B3-1 u vrijednosti od $1,1 \times 10^8$ st/mL, $1,1 \times 10^7$ st/mL. Iako je u 14. danu CFU vrijednost *Bacillus cereusa* prilikom biorazgradnje PS-a u pokusu B1-4 bila velika i iznosila

5,9 x 10⁷ st/mL, najveća CFU vrijednost u ovom pokusu postignuta je u 30. danu i iznosila je 8,3 x 10⁷ st/mL. Pokusi B1-2 i B4-2 prikazani su na **slikama 4.2. a i b**, a pokusi B1-1, B3-1 i B1-4 na **slikama 4.1. a i b** te **4.4. a**. Nakon što su se bakterijske kulture *Bacillus cereus* u pokusu B1-2 prilagodile ispitivanim uvjetima uslijedio je eksponencijalni rast bakterija čija pojava ukazuje da prisutnost PS-a potiče rast ovih mikroorganizama¹³⁸. Nagli pad broja bakterija u pokusu B1-2 nakon kojeg CFU vrijednost je oscilirala oko jednake brojke do završetka pokusa, primijećen je u 14. danu. Bakterijske kulture *Bacillus cereus* u pokusu biorazgradnje PS-a B1-4 prikazanom na **slici 4.4. a** blago rastu tijekom prvih 7 dana što se vidi iz postepenog povećanja CFU vrijednosti. Nakon 7. dana dolazi do naglog rasta bakterija *Bacillus cereus* dok je nagli pad CFU vrijednosti primijećen u 21. danu. Međutim, u ovom slučaju, nakon 21. dana, dolazi do ponovnog bakterijskog rasta *Bacillus cereus* zahvaljujući endosporama koje ove bakterije posjeduju, a koje im omogućuju preživljavanje nepovoljnih uvjeta i prilagodbu na iste.¹³⁸ U 30. danu je i biorazgradnja PS-a u pokusu B1-4 bakterijom *Bacillus cereus* najintenzivnija. To je rezultat najveće razlike u CFU vrijednosti dobivene prilikom biorazgradnje PS-a u pokusu B1-4 i SP-a.



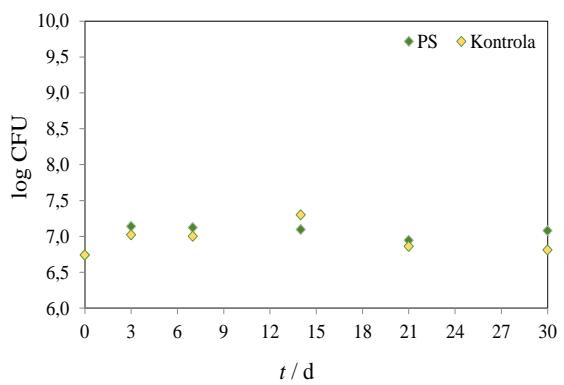
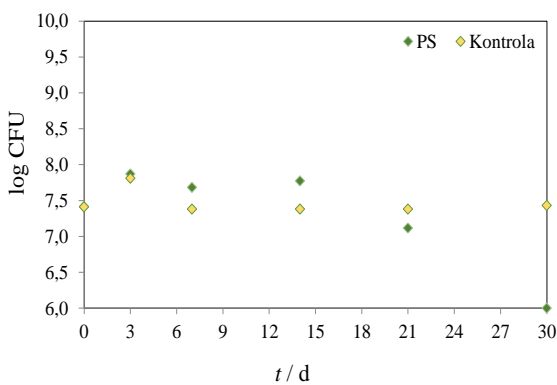
Slika 4.1. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus cereus* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: B1-1 (a) i B3-1 (b).



(a)

(b)

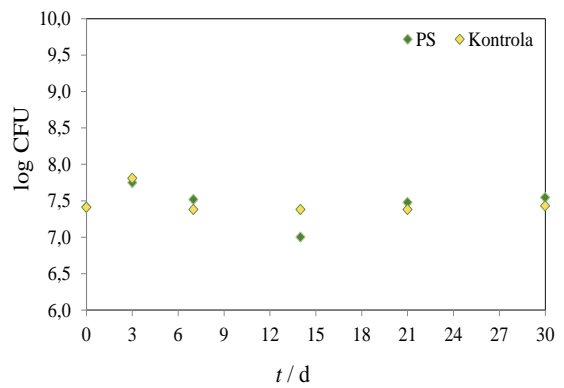
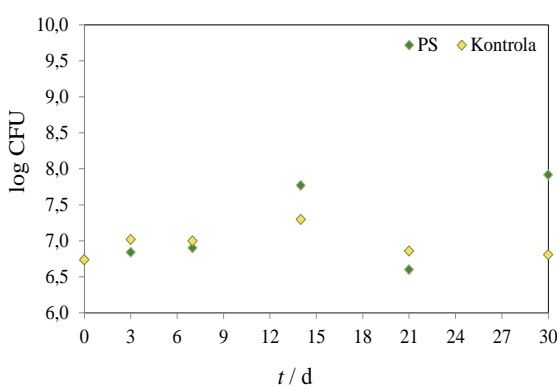
Slika 4.2. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus cereus* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: B1-2 (a) i B4-2 (b).



(a)

(b)

Slika 4.3. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus cereus* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: B1-3 (a) i B3-3 (b).



(a)

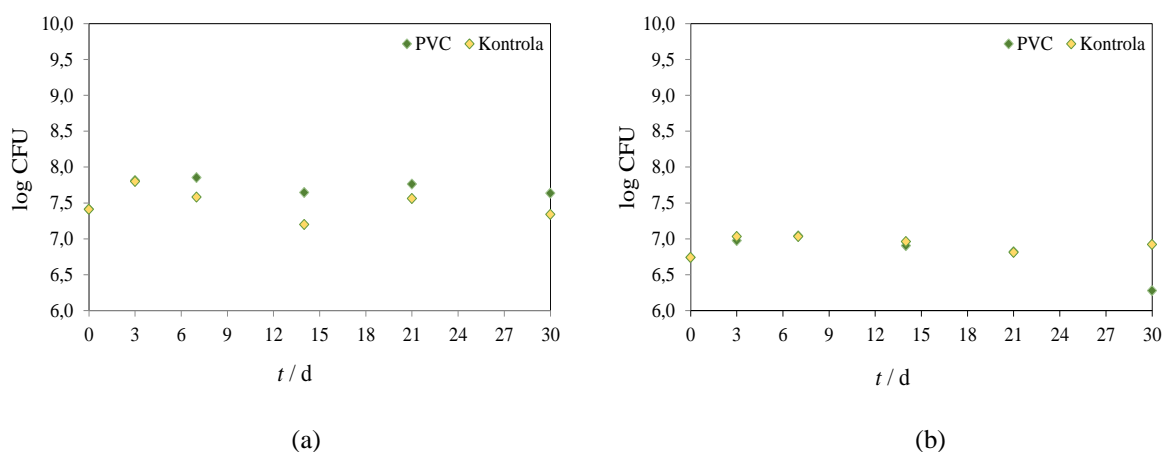
(b)

Slika 4.4. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus cereus* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: B1-4 (a) i B3-4 (b).

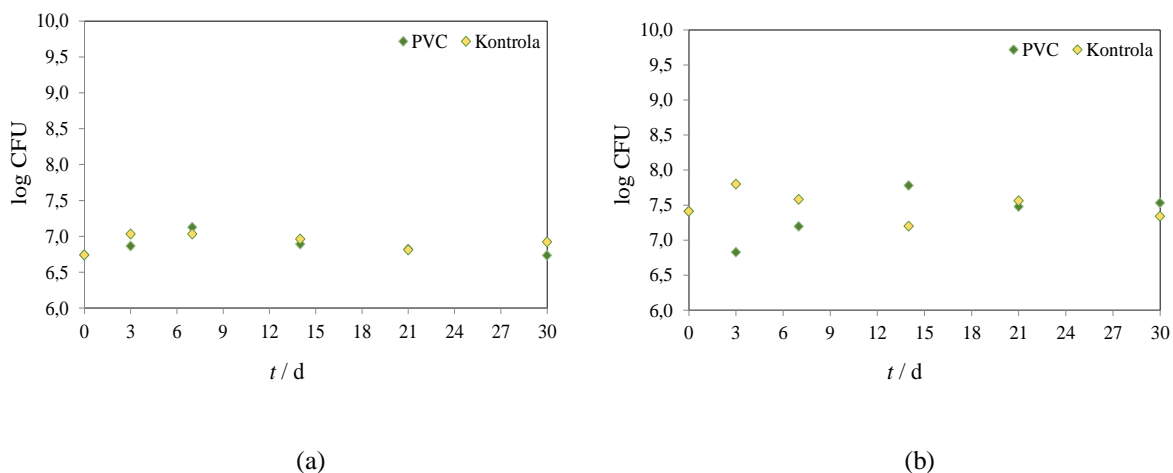
Od svih provedenih pokusa biorazgradnje PS-a bakterijama *Bacillus cereus* s obzirom na najvišu CFU vrijednost najznačajnijim se je pokazao pokus B1-1. U prilog tome ide i najveća razlika CFU vrijednosti dobivene u ovom pokusu i kontrolom pokusu odnosno SP. Ta razlika ukazuje na to da je PS iskorišten kao supstrat za rast i razmnožavanje te da je došlo do njegove biorazgradnje. Iako se na temelju hidrofobnog karaktera PS-a koji ga čini otpornim na hidrolizu vjeruje da je PS nerazgradiv¹⁴², i ovo istraživanje, kao i brojna druga^{131,132,135} potvrđuje mogućnost njegove biorazgradnje primjenom bakterijske kulture *Bacillus cereus*. Auta i dr. (2017) su *in vitro* biorazgradnjom utvrdili da od mikroorganizama izoliranih iz okoliša šume mangrove samo *Bacillus cereus* i *Bacillus gottheilii* koriste odgovarajuću enzimsku aktivnost za biorazgradnju PE-a, PS-a i PET-a.¹⁴³ Nakon 40 dana biorazgradnje bakterijom *Bacillus cereus* smanjenje mase mikroplastičnih čestica PE-a, PET i PS-a iznosilo je 1,6 %, 6,6 % i 7,4 % dok je smanjenje mase mikroplastičnih čestica PE-a, PET i PS-a bakterijom *Bacillus gottheilii* iznosilo 6,2 %, 3,0 % i 5,8 %. Za zaključiti je da je PS u odnosu na PE i PET bio dostupniji bakteriji *Bacillus cereus* za biorazgradnju. No, treba uzeti u obzir da veće smanjenje mase mikroplastičnih čestica PS-a u ovom istraživanju može biti i rezultat izlaganja ispitivanih polimera UV zračenju prije pokusa biorazgradnje, a na koje je PS kao spoj koji sadrži aromatsku skupinu, jako osjetljiv.¹⁴³

Na **slikama 4.5.-4.8.** prikazana je biorazgradnja PVC-a pomoću bakterije *Bacillus cereus* tijekom 30 dana praćena preko CFU vrijednosti. Prilikom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* najveći broj izraslih kolonija, ovisno o eksperimentalnim uvjetima, postignut je već u 3. danu u pokusima B2-3, B4-3, B2-4 i B4-4 u vrijednosti od $7,5 \times 10^7$ st/mL, $3,3 \times 10^7$ st/mL, $7,5 \times 10^7$ st/mL i $2,3 \times 10^7$ st/mL. S druge strane, početni broj kolonija (0. dan) za pokuse B2-3 i B2-4 je iznosio $2,6 \times 10^7$ st/mL, dok je za pokuse B4-3 i B4-4 iznosio $5,50 \times 10^6$ st/mL. Razlika između broja izraslih kolonija u 0. i 3. danu u pokusima: B2-3, B4-3, B2-4 i B4-4 ukazuje na to da je došlo do postepenog ili naglog povećanja broja bakterija *Bacillus cereus* ovisno o eksperimentalnim uvjetima, a samim time i da je preduzgoj uspješno proveden. Značajnije smanjenje broja izraslih bakterijskih kolonija u ovim pokusima uočeno je u 7. danu. U pokusima B2-3, B2-4 i B4-4 došlo je do sekundarnog rasta mikroorganizama s obzirom na to da *Bacillus cereus* posjeduje endospore koje mu omogućuju prilagodbu na nepovoljne uvjete.¹³⁸ Pokusi B2-3 i B4-3 prikazani su na **slikama 4.7. a i b**, dok su pokusi B2-4 i B4-4 prikazani na **slikama 4.8. a i b**. U 7. danu postignuta je maksimalna CFU vrijednost u pokusima B2-1, B4-1 i B2-2 u iznosu od $7,1 \times 10^7$ st/mL, $1,1 \times 10^7$ st/mL i $1,33 \times 10^7$ st/mL. S obzirom na početni broj kolonija, $2,6 \times 10^7$ st/mL ili $5,50 \times 10^6$ st/mL, koji ovisi o OG pojedinog sustava, i u ovim je pokusima došlo do postepenog ili naglog povećanja broja

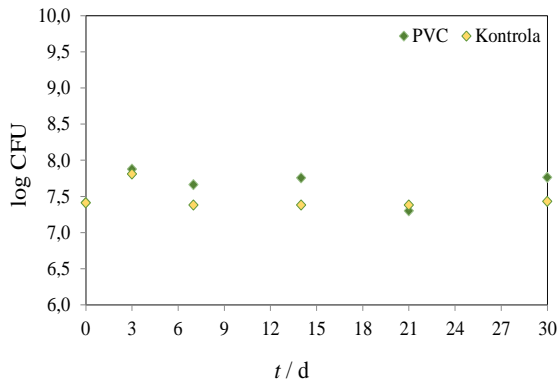
bakterija *Bacillus cereus* sukladno ispitivanim uvjetima. Zaključak je da je i u ovim pokusima preduzgoj uspješno proveden. Međutim, razlika između postignute CFU vrijednosti u pokusima B4-1 te B2-2 i SP-a je neznatna što znači da je došlo do minimalnog iskorištavanja PVC-a kao supstrata, dok je ta razlika između PVC-a u pokusu B2-1 i SP-a značajnija, što znači da je PVC barem djelomično iskorišten kao izvor ugljika i energije. Na **slikama 4.5. a i b** prikazani su pokusi B2-1 i B4-1, dok je na **slici 4.6. a** prikazan pokus B2-2. U pokusu B3-2 maksimalna CFU vrijednost postignuta je tek u 14. danu u iznosu od $6,00 \times 10^7$ st/mL. Iako je CFU vrijednost u ovom pokusu u 3. danu naglo pala, od tog dana došlo je i do uspostavljanja eksponencijalne faze rasta bakterijske kulture *Bacillus cereus*. Pokus B3-2 prikazan je na **slici 4.6. b**.



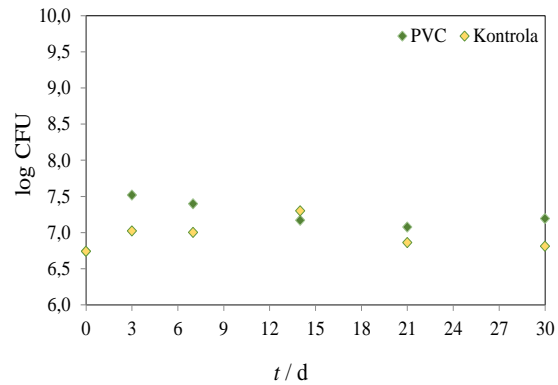
Slika 4.5. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus cereus* tijekom biorazgradnje PVC-a za pokuse: B2-1 (a) i B4-1 (b).



Slika 4.6. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus cereus* tijekom biorazgradnje PVC-a za pokuse: B2-2 (a) i B3-2 (b).

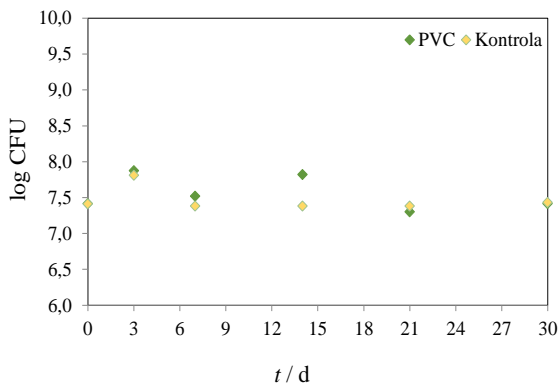


(a)

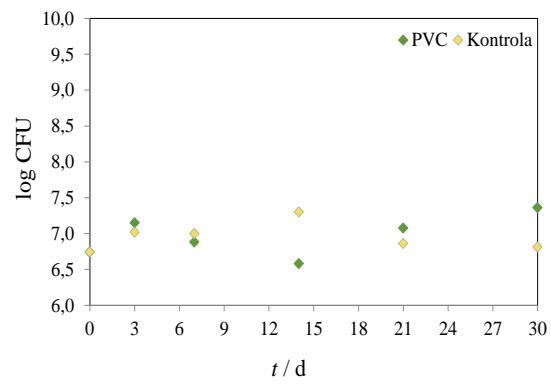


(b)

Slika 4.7. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus cereus* tijekom biorazgradnje PVC-a za pokuse: B2-3 (a) i B4-3 (b).



(a)



(b)

Slika 4.8. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus cereus* tijekom biorazgradnje PVC-a za pokuse: B2-4 (a) i B4-4 (b).

Iako je najveća postignuta CFU vrijednost *Bacillus cereus* prilikom biorazgradnje PVC-a ($CFU = 7,5 \times 10^7$ st/mL) u dva pokusa: B2-3 i B2-4, najznačajnijim pokusom se pokazao pokus B4-3. Najveća CFU vrijednost u pokusu B4-3 također je postignuta u 3. danu kao i u prethodno navedena dva pokusa. Međutim, njezina vrijednost iznosi $3,3 \times 10^7$ st/mL. No, bez obzira na nju, najveća razlika između CFU vrijednosti *Bacillus cereus* za uzorak PVC-a i SP-a, a koja općenito ukazuje na intenzitet biorazgradnje, postignuta je upravo u pokusu B4-3 i to u 3., 7. 21. i 30. danu. Stoga je i biorazgradnja PVC-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* najintenzivnija u pokusu B4-3. Nadalje, iz razlike CFU vrijednosti *Bacillus cereus* za uzorak PVC-a u pokusima B2-3 i B2-4, i SP-a također je vidljivo da dolazi do biorazgradnje

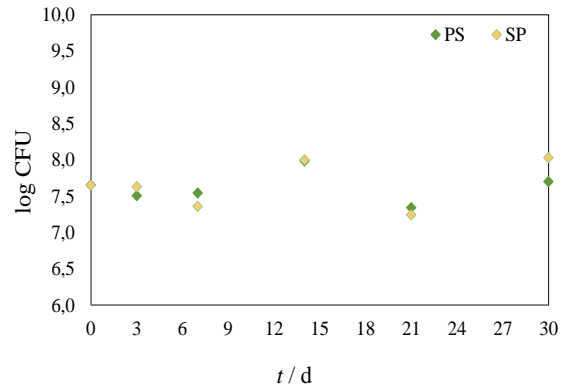
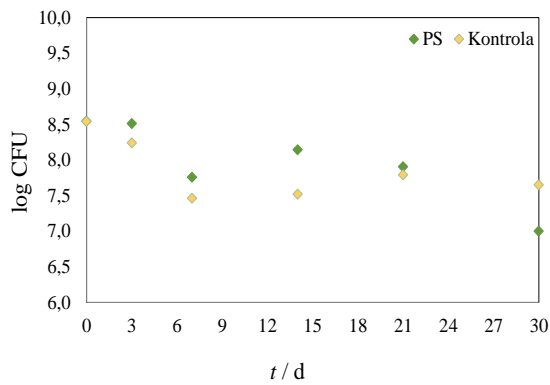
mikroplastičnih čestica iako je u ovim slučajevima biorazgradnje manje intenzivna. Stoga, ovakvi rezultati potvrđuju da je došlo do biorazgradnje PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* što značajno doprinosi proširenju znanja o biorazgradnji PVC-a primjenom bakterija, s obzirom da je do danas provedeno malo istraživanja koja se bave biorazgradnjom PVC-a primjenom bakterija.¹⁰⁰ Rezultati istraživanja provedenog 2008. godine pokazali su učinkovitost morske bakterije identificirane kao *Bacillus* spp. u biorazgradnji PVC-a, a izraženi su preko smanjenja mase PVC-a.¹⁴⁴ Tijekom 90 dana inkubacije svakih 15 dana određivano je smanjenje mase PVC-a te je utvrđeno da kada je PVC jedini izvor ugljika njegovo smanjenje mase iznosi 0.08 ± 0.02 , 0.17 ± 0.04 , 0.28 ± 0.02 , 0.34 ± 0.17 , 0.32 ± 0.09 %, nakon 15, 30, 45, 75 i 90 dana inkubacije. Na temelju ovih rezultata zaključeno je da se morske bakterije identificirane kao *Bacillus* spp. mogu koristiti za destabilizaciju plastične strukture čije atome ovi mikroorganizmi koriste kao izvor ugljika za energijski metabolizam.¹⁴⁴

Broj kolonija bakterijske kulture *Bacillus cereus* se u odnosu na početni broj kolonija tijekom 30 dana povećao u svim provedenim pokusima biorazgradnje PS-a i PVC-a. Utvrđeno je da se u kraćem roku postiže maksimalna CFU vrijednost kod pokusa pri sobnoj temperaturi tj. 25 °C. Iz cijelog seta provedenih pokusa biorazgradnje PVC-a i PS-a bakterijskom kulturom *Bacillus cereus* može se pretpostaviti da veće čestice MP-a (500-710 µm) kao i njihova viša koncentracija (1000 mg/L) te dodatak glukoze u koncentraciji od 0,1 g/L doprinose rastu i razmnožavanju bakterijskih kultura *Bacillus cereus* neovisno pri kojoj se temperaturi pokus provodi, koja je brzina miješanja te koja je OG ili pH-vrijednost. Razlog tomu je veća količina hranjivih tvari koja je na raspolaganju jer se u ovim slučajevima i PS i PVC koriste kao izvor ugljika i energije, a ne samo hranjive tvari iz mineralnog medija. Usporedbom CFU vrijednosti za pokuse biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus* u odnosu na CFU vrijednosti za pokuse biorazgradnje PVC-a ovom istom bakterijom, utvrđeno je da je biorazgradnja PS-a intenzivnija u odnosu na biorazgradnju PVC-a.

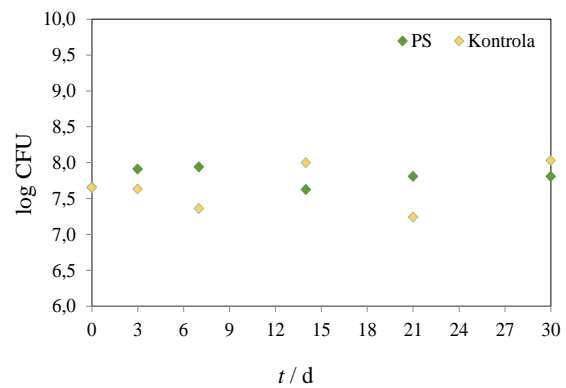
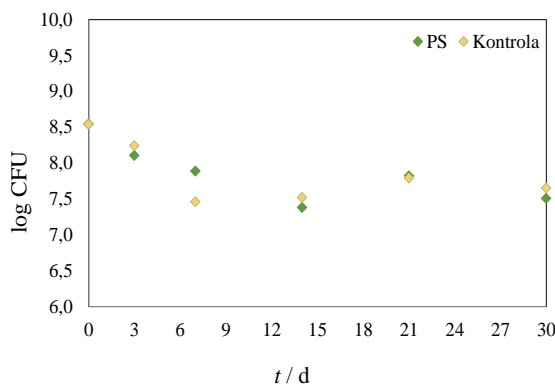
4.1.2. Rezultati promjene CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*

Na slikama 4.9.-4.12. prikazana je biorazgradnja PS-a pomoću bakterije *Pseudomonas alcaligenes* tijekom 30 dana praćena preko CFU vrijednosti. Najveći broj izraslih kolonija u setu provedenih pokusa biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* postignut je u 21. danu u pokusu P1-4 i iznosi $1,4 \times 10^8$ st/mL (slika 4.12. a). U pokusima P2-2 i P2-3 najveći broj izraslih kolonija postignut je u 7. danu u iznosu od $8,7 \times 10^7$ st/mL i $6,5 \times 10^7$ st/mL, dok je u 14. danu postignut u pokusu P2-1 i iznosi $9,7 \times 10^7$ st/mL (slike 4.10. b, 4.11.

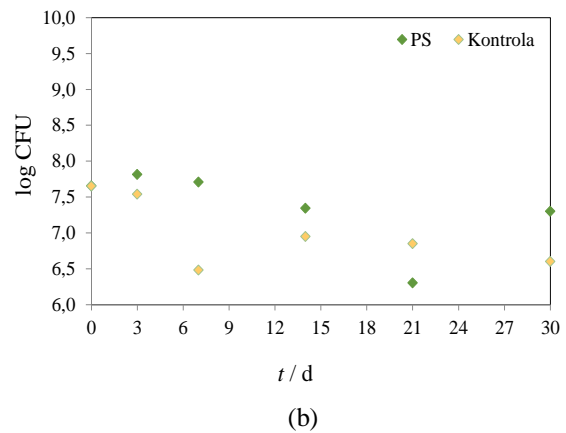
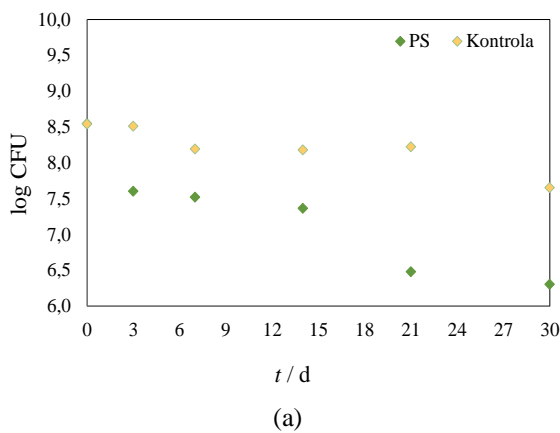
b i 4.9. b). Shodno navedenom, može se zaključiti da se PS u pokusu P1-4 najbolje razgradio bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* bez obzira na dužu prilagodbu na ispitivane uvjete. Iskorištavanje PS-a kao supstrata započelo je u 3. danu u pokusima P2-2 i P3-2, dok je u pokusu P1-4 započeto tek u 7. danu. No, u odnosu na pokuse P2-2 i P3-2, iskorištavanje PS-a kao supstrata najviše je u razdoblju od 21. do 30. dana, što se očituje kao najviša razlika između CFU vrijednosti ovog pokusa i CFU vrijednosti kontrolnog pokusa. Velika razlika u CFU vrijednosti između kontrolnog pokusa i P1-4 pokusa u odnosu na ostatak provedenih pokusa biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* potvrđuju da je došlo do biorazgradnje PS-a pomoću ove bakterije što je u skladu s objavljenom literaturom¹⁴⁵. Najintenzivnija biorazgradnja PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu P1-4 postignuta je u 30. danu. Prema istraživanju¹⁴⁶, PS se može razgraditi i bakterijama: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* te pomoću gljive *Aspergillus niger*. Tijekom mjesec dana inkubacije smanjenje mase plastičnih čestica PS-a bilo je najveće primjenom bakterije *Bacillus subtilis* i iznosilo je 20 %. Kao što je već spomenuto u poglavlju 2.8.2.2. PS se može razgraditi i primjenom bakterije *Bacillus cereus*¹⁴³ te *Bacillus sp.*¹⁴⁷, ali i mješovitom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus sp.* za koju se pretpostavlja da će najbolje razgraditi PS radi kombinacije enzima koji posjeduje.¹³³ PS se biorazgradnjom može razgraditi do spojeva poput stirena, toluena i benzena koji se mogu metabolizirati u bakteriji *Pseudomonas sp.*^{100,149} Galgali i dr. (2002.) pokazali su da se biorazgradnjom s *Pseudomonas sp.* NCIM2220 mogu razgraditi i heteropolimeri PS-a s maleinskim anhidridom usidrenim s malim količinama laktoze, saharoze ili glukoze.¹⁵⁰ Prema literaturi¹⁵¹ i snažan PS sastavljen od mješavine PS-a i polibutadiena razgrađuje se primjenom bakterijske vrste *Pseudomonas sp.* pri čemu je smanjenje mase visokotlačne PS folije iznosilo svega 10 %. Pokusi biorazgradnje PS-a (P1-1, P1-2, P1-3 i P2-4) bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* o kojima će biti kasnije riječ, a čija je maksimalna CFU vrijednost postignuta već u 0. danu prikazani su na slikama **4.9. a**, **4.10. a** i **b**, i **4.12.** redom kojim su navedeni.



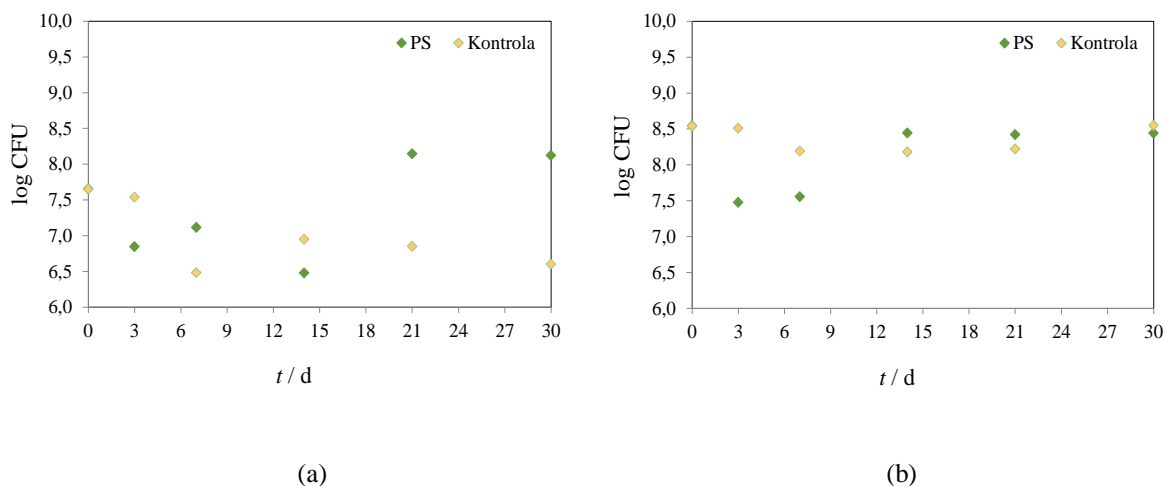
Slika 4.9. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas alcaligenes* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: P1-1 (a) i P2-1 (b).



Slika 4.10. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas alcaligenes* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: P1-2 (a) i P2-2 (b).

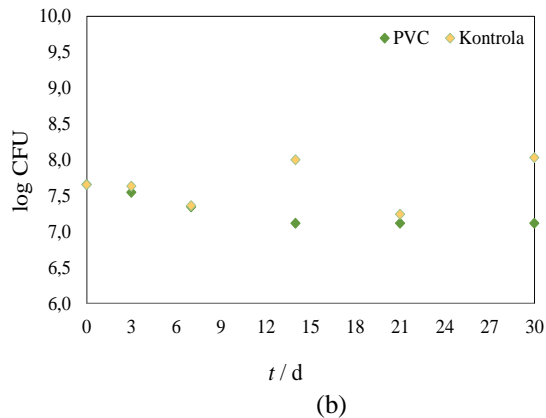
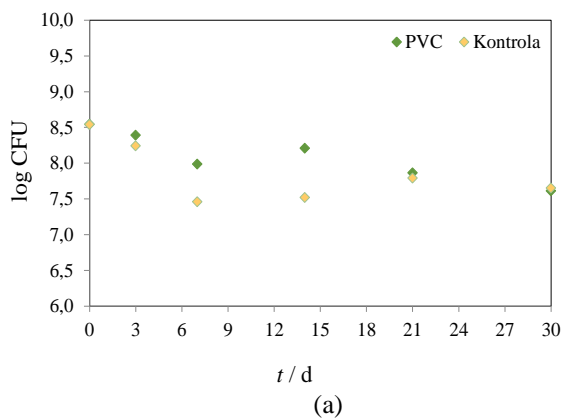


Slika 4.11. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas alcaligenes* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: P1-3 (a) i P2-3 (b).

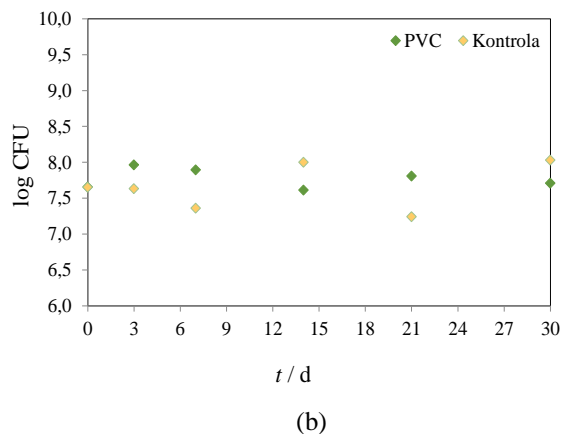
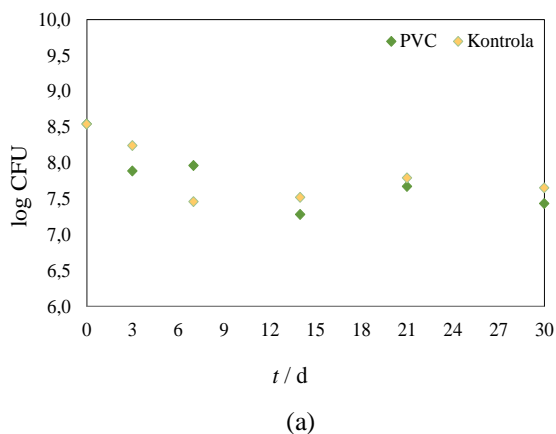


Slika 4.12. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas alcaligenes* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: P1-4 (a) i P2-4 (b).

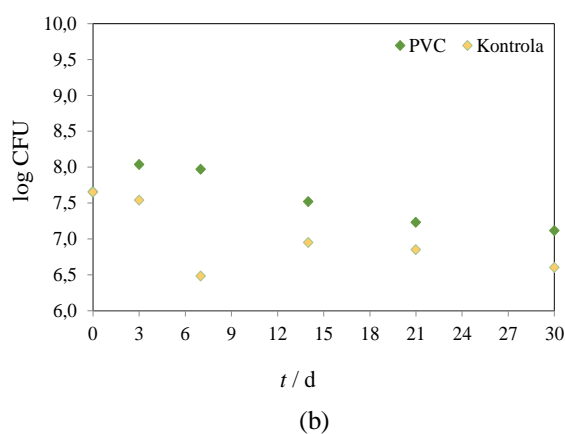
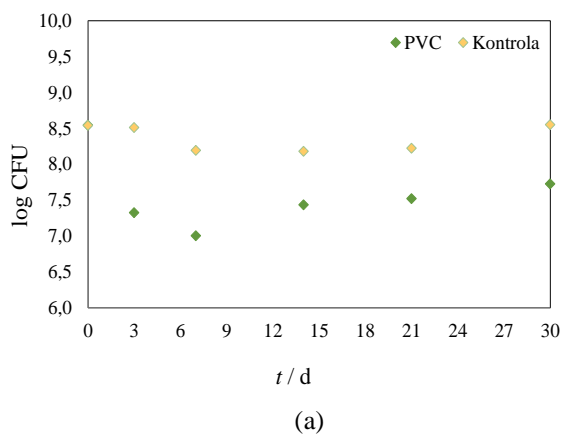
Na slikama 4.13.-4.16. prikazana je biorazgradnja PVC-a pomoću bakterije *Pseudomonas alcaligenes* tijekom 30 dana praćena preko CFU vrijednosti. Ovisno o eksperimentalnim uvjetima najveći broj izraslih bakterijskih kolonija postignut je već u 3. danu te je iznosio $1,09 \times 10^8$ st/mL (pokus P4-3, slika 4.15. b). U 7. danu najveći broj izraslih kolonija iznosio je $9,2 \times 10^7$ st/mL (pokus P4-2), dok u 14. danu $1,41 \times 10^8$ st/mL (pokus P3-4), slike 4.14. b i 4.16. a. Na temelju najviše maksimalne CFU vrijednosti najznačajniji pokus biorazgradnje PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* je P3-4. Biorazgradnja PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* je u pokusu P3-4 započela već u 7. danu, a trajala je skroz do 30. dana kada je bila najintenzivnija. Uvidom u bakterijske krivulje rasta pokusa: P3-1, P4-2, P4-3 i P3-4 uočeno je da već od 3. dana dolazi do iskorištavanja PVC-a kao izvora ugljika. Stoga se može pretpostaviti da PVC potiče rast i razmnožavanje bakterija *Pseudomonas alcaligenes*. Najveća razlika u CFU vrijednosti između pokusa P3-4 i SP-a u odnosu na razlike CFU vrijednosti preostalih pokusa i njihovih kontrola, potvrđuje najveći značaj ovog pokusa. S obzirom na rast bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes* koji je započeo od 0. dana u sva tri pokusa, preduzgoj je uspješno proveden. Pokusi: P3-1, P4-1, P3-2, P3-3 i P4-4 u kojima tijekom procesa biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes* nije došlo do porasta već do smanjenja CFU vrijednosti prikazani su na slikama 4.13. a i b, 4.14. a, 4.15. a i 4.16. b.



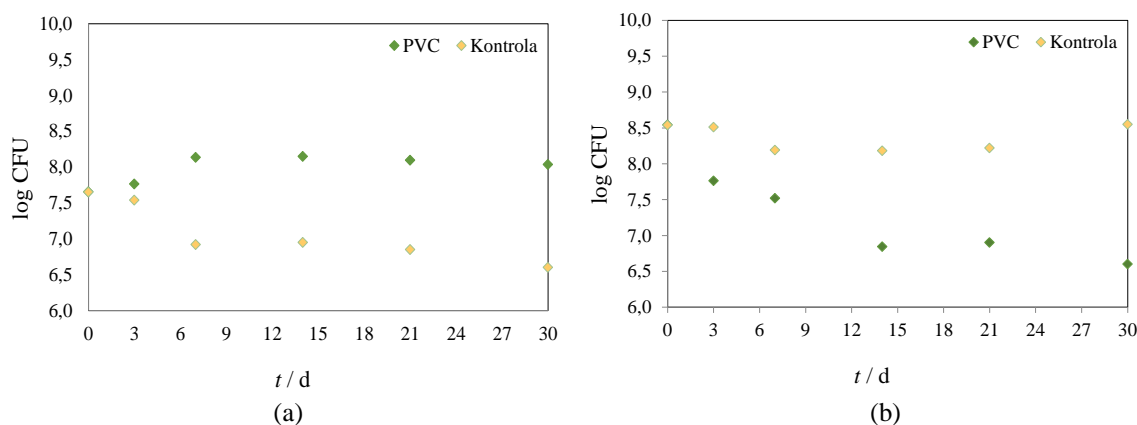
Slika 4.13. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas alcaligenes* tijekom biorazgradnje PVC-a za pokuse: P3-1 (a) i P4-1 (b).



Slika 4.14. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas alcaligenes* tijekom biorazgradnje PVC-a za pokus: P3-2 (a) i P4-2 (b).



Slika 4.15. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas alcaligenes* tijekom biorazgradnje PVC-a za pokuse: P3-3 (a) i P4-3 (b).



Slika 4.16. Promjena CFU vrijednosti bakterije *Pseudomonas alcaligenes* tijekom biorazgradnje PVC-a za pokuse: P3-4 (a) i P4-4 (b).

Početni broj kolonija tj. broj kolonija izraslih u 0. danu u pokusima biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*: P1-1, P3-1, P4-1, P1-2, P3-2, P1-3, P3-3, P2-4 i P4-4, veći je od broja izraslih kolonija u svih 30 dana tijekom trajanja ovih pokusa. Stoga se može zaključiti da tijekom procesa biorazgradnje u ovim pokusima nije došlo do povećanja CFU vrijednosti. Vrijednost OG-a je u pokusu P4-1 iznosila 0,1 dok je u svim ostalim prethodno navedenim pokusima, OG iznosila 0,5. Kod svih pokusa čija je vrijednost OG-a 0,5, bez obzira radi li se o biorazgradnji PS-a ili PVC-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*, došlo je do blažeg ili strmijeg pada broja izraslih kolonija nakon 0. dana. S druge strane, kod većine pokusa (P2-1, P2-2, P4-2, P2-3, P3-3, P1-4 i P3-4) čija je OG vrijednost 0,1 došlo je do rasta mikroorganizama nakon 0. dana. Za pretpostaviti je da su tijekom preduzgoja u pokusima s OG vrijednošću 0,5 bakterije iskoristile sve ili veliku većinu raspoloživih hranjivih tvari koje su im omogućile brzi rast i razmnožavanje, a što je uzrokovalo i njihov najveći broj već u 0. danu pokusa.¹³⁸ Kao posljedica nedostatka hranjivih tvari i eventualne dulje prilagodbe na novonastale uvjete, uočen je smanjeni broj bakterija *Pseudomonas alcaligenes* nakon 0. dana. Najveći pad CFU vrijednosti uočen je već u 3. danu u pokusu P3-3 i P2-4, dok je u 7. danu uočen u pokusima P3-1 i P3-3. Krivulje bakterijskog rasta bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes* tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a u pokusima P1-1 i P3-1, a čiji su eksperimentalni uvjeti jednaki, pokazuju sličan trend. No, razlikuju se prema CFU vrijednosti koja je viša za uzorak PVC-a u 7., 14. i 30. danu. Stoga je

u tom slučaju i biorazgradnja PVC-a intenzivnija u odnosu na biorazgradnju PS-a. Iako se je sve do 7. dana broj izraslih bakterijskih kultura *Pseudomonas alcaligenesa* smanjivao, nakon 7. dana došlo je do ponovnog rasta i razmnožavanja ovih bakterijskih kultura sve do 14. dana. Stoga se može pretpostaviti da su PS i PVC iskorišteni kao izvor ugljika i energije za metaboličke aktivnosti bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes* tijekom procesa biorazgradnje. Ovu pretpostavku potvrđuje i značajna razlika između CFU vrijednosti uzoraka PS-a te PVC-a i SP-a u pokusima P1-1 i P3-1, a koja ukazuje na to da je do iskorišavanja PS-a i PVC-a kao supstrata uistinu i došlo. Nasuprot tome, razlika između CFU vrijednosti SP-a i CFU vrijednosti PS-a i PVC-a u pokusima P1-3, P3-3 i P4-4 je jako velika i ide u korist SP-u. Stoga se može pretpostaviti da u ovim pokusima PS i PVC nisu iskorišteni kao izvor ugljika i energije, a osim njih nisu niti iskorištene u potpunosti hranjive tvari iz mineralnog medija. U 14. danu najveći pad CFU vrijednosti zabilježen je u pokusima P4-1, P1-2, P2-2, P3-2, P4-2, P1-4, a u 21. danu u pokusima: P4-1 i P2-3. Zadnji dan pokusa (30. dan) najveći pad CFU vrijednosti zabilježen je u pokusima: P1-1, P1-3, P4-3 i P4-4.

Usporedbom CFU vrijednosti za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* utvrđeno je da je PVC-e bio dostupniji ovoj bakteriji za biorazgradnju, odnosno da je PVC-e bolje razgrađen ovom bakterijom nego PS-e. S jedne strane s obzirom da je PVC-e, kao i PP-e, jako hidrofoban i otporan na kemijsku abraziju nije bilo za očekivati da će biorazgradnja PVC-a biti bolja u odnosu na PS¹⁰⁰. No, s druge strane, kemijska struktura PVC-a manje je složena u odnosu na PS-e koji u svojoj strukturi sadrži aromatsku skupinu, pa ovakav rezultat niti ne čudi.¹⁰⁰ Do danas je utvrđen maleni broj mikroorganizama koji mogu razgraditi PVC, a jedan od njih je bakterija *Pseudomonas putida* koja koristi monomer PVC-a, vinil klorid, kao izvor ugljika.¹⁵² Prilikom metaboličkih aktivnosti, za vrijeme biorazgradnje PVC-a, ova bakterija koristi potencijal vlastitog enzima, alken monoooksigenaze. Pokazalo se je da i *Pseudomonas chlororaphis* može razgraditi PVC.¹⁵² Osim bakterija, PVC mogu razgraditi i bijele gljive, članovi grupe *Basidiomycota*.¹⁵³ Dodatno, usporedbom procesa biorazgradnje PS-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*, utvrđeno je da se PS bolje razgrađuje bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*. Posljedica je to većih CFU vrijednosti ovih bakterijskih kultura u odnosu na CFU vrijednosti bakterijskih kultura *Bacillus cereus*. Ovakve rezultate dodatno potvrđuju i veće razlike između CFU vrijednosti dobivene za uzorak PS-a i SP-a u pokusu P1-4, a koji se je od svih provedenih pokusa biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenesa* pokazao najznačajnijim. Nadalje, usporedbom CFU vrijednosti ovih dviju bakterija dobivenih prilikom biorazgradnje PVC-a u najznačajnijim pokusima: B4-3 i P3-4, utvrđeno je da su veće CFU

vrijednosti kod bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes*. Osim toga, i razlika između CFU vrijednosti ovih bakterijskih kultura dobivene u pokusu P3-4 i SP-u je znatno veća u 7., 14., 21. i 30. danu u odnosu na razliku između CFU vrijednosti bakterijske kulture *Bacillus cereus* i SP-a. Stoga se može pretpostaviti da je biorazgradnja PVC-a puno intenzivnija primjenom bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes*.

4.2. Promjene koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*

4.2.1. Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus*

Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom pokusa biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus* u pokusima B1-1 i B1-3 prikazana je u **tablici 4.1.** dok je za biorazgradnju PVC-a ovom istom bakterijom, u pokusima B2-3 i B4-3, promjena koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a prikazana u **tablici 4.2.** Koncentracija TOC-a u pokusima biorazgradnje PS-a, B1-1 i B1-3, i u pokusu biorazgradnje PVC-a, B2-3, raste sve do 14. dana nakon kojeg se njezina vrijednost smanjuje sve do završetka ovih pokusa. S obzirom da mikroorganizmi za rast i razmnožavanje koriste ugljik kao izvor hranjivih tvari, očekivalo se da će povećanjem CFU vrijednosti doći do pada koncentracije TOC-a. Međutim, to se nije dogodilo. Kako se TOC vrijednost prema literaturi¹⁵⁴ definira kao materijal dobiven raspadajućom vegetacijom, bakterijskim rastom i metaboličkim aktivnostima živih organizama ili kemikalija, 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.¹⁵⁵ No, da bi se to moglo reći sa sigurnošću, potrebno je provesti HPLC/MS i FTIR analizu u svrhu potvrde novonastalih spojeva čije se pojedine funkcionalne skupine razlikuju u odnosu na funkcionalne skupine PS-a. Kako trend ponašanja IC vrijednosti prati trend ponašanja TOC-a, najznačajnija vrijednost koncentracije anorganskog ugljika postignuta je upravo u 14. danu. Osim toga, kako se IC veže uz razvijanje CO₂ kao jednog od produkata biorazgradnje¹⁵⁵, pretpostavlja se da je upravo u 14. danu biorazgradnja PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* najintenzivnija. Stoga ni ne čudi da ako je biorazgradnja MP-a u pokusima B1-1, B1-3 i B2-3 najintenzivnija u 14. danu, da je i vrijednost TOC-a najviša jer, kako je već spomenuto, prilikom biorazgradnje može doći do otpuštanja aditiva s površine MP-a ili nastanka novih razgradnih organskih produkata. U prilog pretpostavci da je biorazgradnja PS-a i PVC-a najintenzivnija u 14. danu ide i postojanje najveće razlike između

CFU vrijednosti ovih uzoraka MP-a i SP-a upravo u ovom danu. Razlika između CFU vrijednosti, a koja je jedna od potvrda da je do biorazgradnje i došlo, prikazana je na **slikama 4.1. a, 4.3. a, 4.5. a i 4.7. a** u *poglavljju 4.1.1.* S druge strane, prilikom biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* u pokusu B4-3, promjene koncentracije TOC-a, TC-a i IC-a ne prate nikakav pravilan trend ponašanja već do 7. dana rastu, pa padaju do 14. dana nakon kojeg opet rastu. Promjena koncentracije ukupnog organskog ugljika raste sve do 30. dana kada postiže svoju maksimalnu vrijednost. Ovaj porast je očekivan s obzirom na postojanje veće razlike između CFU vrijednosti PVC-a i SP-a koja ukazuje da dolazi do biorazgradnje PVC-a bakterijama *Bacillus cereus*. Kako je već više puta spomenuto, porast promjene TOC-a povezuje se s otpuštanjem aditiva s površine mikroplastičnih čestica PVC-a ili nastankom novih razgradnih organskih produkata. Najviše vrijednosti TC-a i IC-a postignute su u 14. danu pri čemu se povećanje IC-a veže s nastankom CO₂ prilikom biorazgradnje PVC-a.

Koncentracija TC-a u 3., 7., 14, 21. i 30. danu je u odnosu na početnu koncentraciju TC-a veća u svim provedenim pokusima biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus*. Porast i smanjenje koncentracije ukupnog ugljika prati trend ponašanja TOC-a i IC-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 anorganski¹⁵⁴.

Usporedbom koncentracija IC vrijednosti izračunatih iz razlike TC-a i TOC-a dobivenih prilikom biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus*, uočeno je da su IC vrijednosti u većem broju pokusa više za biorazgradnju PS-a. Ovaj rezultat je potvrda pretpostavci definiranoj u *poglavljju 4.1.1.*, a koja govori o tome da je biorazgradnja PS-a intenzivnija u odnosu na biorazgradnju PVC-a. U prilog tome idu i više CFU vrijednosti bakterija *Bacillus cereus* dobivene kod PS-a u odnosu na PVC.

Tablica 4.1. Koncentracija TOC-a, TC-a i IC-a za pokuse biorazgradnje PS-a, B1-1 i B1-3, bakterijom *Bacillus cereus* pri $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

PS												
t/dan	TOC/mg/L		TC/mg/L		IC/mg/L		TOC/mg/L		TC/mg/L		IC/mg/L	
	B1-1	SP	B1-1	SP	B1-1	SP	B1-3	SP	B1-3	SP	B1-3	SP
0	5,48	5,48	8,33	8,33	2,85	2,85	5,48	5,48	8,33	8,33	2,85	2,85
3	6,53	5,97	10,06	9,00	3,53	3,03	7,52	5,97	11,51	9,00	3,99	3,03
7	8,75	7,41	14,36	13,22	5,61	5,81	9,93	7,41	16,92	13,22	6,99	5,81
14	28,08	10,71	42,78	19,07	14,70	8,36	24,37	10,71	36,97	19,07	12,60	8,36
21	27,98	6,63	39,54	12,95	11,56	6,32	17,37	6,63	28,74	12,95	11,37	6,32
30	27,54	8,18	38,02	18,91	10,48	10,73	14,68	8,18	25,36	18,91	10,68	10,73

Tablica 4.2. Koncentracija TOC-a, TC-a i IC-a za pokuse biorazgradnje PVC-a, B2-3 i B3-4, bakterijom *Bacillus cereus* pri $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

PVC												
t/dan	TOC/mg/L		TC/mg/L		IC/mg/L		TOC/mg/L		TC/mg/L		IC/mg/L	
	B2-3	SP	B2-3	SP	B2-3	SP	B4-3	SP	B4-3	SP	B4-3	SP
0	5,48	5,48	8,33	8,33	2,85	2,85	3,31	3,31	3,78	3,78	0,47	0,47
3	6,65	5,97	9,96	9	3,31	3,03	5,42	3,13	6,72	3,56	1,30	0,43
7	9,32	7,41	15,81	13,22	6,49	5,81	11,40	4,16	18,13	5,76	6,73	1,60
14	17,06	10,71	28,83	19,07	13,37	8,36	10,58	15,96	15,83	24,85	5,25	8,89
21	12,66	6,63	24,25	12,95	11,59	6,32	14,97	10,08	22,30	14,14	7,33	4,06
30	15,46	8,18	26,93	18,91	9,87	10,73	15,64	7,14	20,76	12,41	5,12	5,27

4.2.1. Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*

Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom pokusa biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* u pokusima P2-1 i P1-4 prikazana je u **tablici 4.3.** dok je promjena koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a prilikom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* u pokusima P4-3 i P3-4 prikazana u **tablici 4.4.** Koncentracija ukupnog organskog ugljika raste sve do 14. dana u pokusima biorazgradnje PS-a, P2-1 i P4-1 te u pokusu P4-3 koji se odnosi na biorazgradnju PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*. U drugom pokusu biorazgradnje PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*, P3-4, vrijednost TOC-a raste sve do 7. dana. Nakon 7. odnosno 14. dana u ovim pokusima dolazi do pada koncentracije TOC-a. Nadalje, TOC vrijednosti su u svim danima, izuzev nultog dana, u pokusu P2-1, veće za SP nego za uzorak PS. Ta razlika u TOC vrijednosti između SP-a i PS-a u pokusu P2-1 vidno je značajnija u 3. i 7. danu. Pretpostavlja se da je ovakav rezultat posljedica faze prilagodbe bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes* na ispitivane uvjete. U preostala tri pokusa biorazgradnje PS-a odnosno PVC-a izmjerene TOC vrijednosti su u većini dana veće u odnosu na TOC vrijednosti SP-a.

Promjena koncentracije IC-a prati trend ponašanja TC-a tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* u ova četiri pokusa. Stoga su najviše koncentracije TC-a i IC-a postignute u 7. danu u pokusima P2-1, P4-3 i P3-4, dok su u pokusu P1-4 najviše vrijednosti TC-a i IC-a postignute u 14. danu. Najviša vrijednost IC-a ukazuje na najintenzivniju biorazgradnju. Broj živih bakterijskih stanica u pokusu P2-1 prilikom biorazgradnje PS-a u odnosu na broj živih bakterijskih stanica SP-a najveći je u 14. danu, dok je u pokusu P3-4 tijekom biorazgradnje PVC-a razlika između broja živih bakterijskih stanica izraslih u ovom pokusu i SP-u najveća u 7. danu. I razlika između TOC-a i IC-a je ovim pokusima najveća u 7., odnosno 14. danu, što dodatno potvrđuje da je biorazgradnja PS-a u pokusu P2-1, i PVC-a u pokusu P4-3, najintenzivnija u 14. danu, dok je u pokusu P3-4 najintenzivnija u 7. danu. Dakle, može se zaključiti da bakterijska kultura *Pseudomonas alcaligenes* u najvećoj mjeri iskorištava PS, odnosno PVC, kao supstrat u danima u kojima je i biorazgradnja najintenzivnija. IC je u pokusu P4-3 najveći u 7. danu, što je u skladu s očekivanjima jer je broj živih bakterijskih stanica u ovom pokusu u odnosu na broj živih bakterijskih stanica SP-a znatno veći u ovom danu, što rezultira najintenzivnijom biorazgradnjom PVC-a prilikom provedbe ovog pokusa. U pokusu P1-4 najveća vrijednosti IC-a postignuta je u 14. danu, dok je najviša razlika između CFU vrijednost za uzorak PS i

kontrolni pokus postignuta u 30. danu. Međutim, razlika između broja živih stanica PS-a i SP-a u 21. i 30. danu u pokusu P1-4 se ne razlikuje znatno, pa se može zaključiti da je ona najbolja u ova dva dana i da su nijanse u vrijednostima koje upućuje na to da je biorazgradnja bolja u 30. danu u odnosu na 21. dan.

Usporedbom koncentracija IC-vrijednosti za biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* pretpostavlja se da je PVC bio dostupniji za biorazgradnju. Pretpostavka se temelji na puno višim izračunatim IC vrijednostima za većinu pokusa biorazgradnje PVC-a. Ova je pretpostavka u skladu s očekivanim s obzirom da PS u odnosu na PVC unutar svoje kemijske strukture ima aromatsku skupinu koja ga čini teže dostupnim za biorazgradnju.^{29,30} Dodatno u prilog argumentima o kemijskoj strukturi ide i viša kristalnost PS-a u odnosu na PVC zbog čega je PVC lakše razgraditi u odnosu na PS.⁵¹

Tablica 4.3. Koncentracija TOC-a, TC-a i IC-a za pokuse biorazgradnje PS-a, P2-1 i P1-4 te kontrolnog pokusa, SP, bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* pri $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

PS												
t/dan	TOC/mg/L		TC/mg/L		IC/mg/L		TOC/mg/L		TC/mg/L		IC/mg/L	
	P2-1	SP	P2-1	SP	P2-1	SP	P1-4	SP	P1-4	SP	P1-4	SP
0	12,28	12,28	9,71	9,71	6,43	6,43	12,28	12,28	9,71	9,71	5,48	5,48
3	7,26	45,85	13,79	36,5	6,54	6,22	51,10	45,85	44,37	36,5	5,87	5,10
7	59,15	112,35	90,55	113,9	31,40	1,55	57,15	112,35	51,35	113,9	7,80	1,55
14	56,95	67,75	66,50	63,85	9,55	8,63	82,00	67,75	92,45	63,85	10,45	5,89
21	24,18	52,3	27,67	37,24	3,50	6,89	54,95	52,30	42,67	37,24	10,24	5,62
30	20,21	50,20	20,37	30,15	5,01	5,96	50,74	50,41	40,12	30,21	9,78	4,97

Tablica 4.4. Koncentracija TOC-a, TC-a i IC-a za pokuse biorazgradnje PVC-a, P4-3 i P3-4, te kontrolnog pokusa, SP, bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* pri $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

PVC												
t/dan	TOC/mg/L		TC/mg/L		IC/mg/L		TOC/mg/L		TC/mg/L		IC/mg/L	
	P4-3	SP	P4-3	SP	P4-3	SP	P3-4	SP	P3-4	SP	P3-4	SP
0	12,28	12,28	9,71	9,71	6,52	6,52	12,28	12,28	9,71	9,71	7,45	7,45
3	52,60	53,6	44,48	41,28	15,17	20,53	29,29	53,6	45,02	41,28	15,73	12,36
7	58,15	54,85	127,50	105,20	69,35	50,35	178,70	54,85	210,30	105,20	31,60	50,35
14	81,40	68,35	96,80	88,65	15,40	20,3	80,35	68,35	83,95	88,65	3,60	20,3
21	48,08	44,73	40,44	51,40	10,86	6,67	45,82	44,73	47,13	51,40	1,30	6,67
30	40,14	40,35	40,15	50,23	10,43	11,29	30,27	39,71	41,84	49,32	1,89	5,78

4.3. Promjena koncentracije kationa i aniona tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*

Tijekom trajanja pokusa biorazgradnje mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* određena je promjena koncentracije aniona (PO_4^{3-} i SO_4^{2-}) i kationa (K^+). Neki ioni su produkti biorazgradnje, a neki ioni potječu od mineralnog medija čiji je sastav detaljno opisan u **tablici 3.1.** u poglavlju 3.1.3.

4.3.1. Promjena koncentracije kationa i aniona tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus*

U **tablicama 4.5.** i **4.6.** prikazane su promjene koncentracije kationa (K^+) i aniona (PO_4^{3-} i SO_4^{2-}) tijekom biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus* u pokusima B1-1 i B1-3. Promjene koncentracije kationa (K^+) i aniona (PO_4^{3-} i SO_4^{2-}) tijekom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* u pokusima B2-3 i B4-3 prikazane su u **tablicama 4.7.** i **4.8.** Promjene su se pratile u uzorcima SP-a (u kojem nije bilo MP-a) te PS-a i PVC-a. U svim uzorcima je u najvišoj koncentraciji bio prisutan fosfatni anion (PO_4^{3-}) koji je ključan za metaboličke aktivnosti bakterijskih stanica jer sudjeluje u sintezi nukleinskih kiselina i ATP-a.¹³⁸ Koncentracija fosfatnog iona (PO_4^{3-}) u uzorcima PS-a i PVC-a u pokusima B1-1, B1-3 odnosno B2-3 raste sve do 14. dana nakon kojeg se više ili manje smanjuje sve do 21. dana. Smanjenje koncentracije fosfatnog iona (PO_4^{3-}) posljedica je smanjenja CFU vrijednosti tj. odumiranja živih bakterijskih stanica. Nakon 21. dana koncentracija fosfata opet raste sve do posljednjeg dana trajanja pokusa. Najviša koncentracija fosfatnog iona (PO_4^{3-}) za uzorke PS-a u pokusima B1-1 i B3-1 može se povezati s najintenzivnijom biorazgradnjom PS-a u 14. danu. Prilikom biorazgradnje potencijalno se otpuštaju aditivi s površine MP-a poput deterdženata koji u svom sastavu uobičajeno sadrže fosfate.¹⁵⁶ Najintenzivnija biorazgradnja mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a rezultat je najveće razlike između CFU vrijednosti za uzorke PS-a te PVC-a i SP-a, a koje su uvrđene u *poglavljima 4.1.1.* i *4.1.2.* S druge strane, koncentracija fosfata u pokusu P4-3, raste od nultog dana, pa sve do posljednjeg, kada je njezina vrijednost i najviša. Prilikom provođenja kontrolnih pokusa, SP, koncentracija fosfatnog iona (PO_4^{3-}) se u pokusima B1-1, B3-1 i B2-3 značajno smanjuje u 3. danu jer ga *Bacillus cereus* iskorištava kao hranjivu tvar prilikom rasta.¹³⁸ Nakon 3. dana dolazi do ponovnog rasta koncentracije ovog iona u uzorcima SP. Nadalje, visoke vrijednosti koncentracije fosfatnog iona (PO_4^{3-}) prati i koncentracija kalijeva iona (K^+). Razlog tomu je njihova međusobna ovisnost koja je posljedica sudjelovanja ovih iona u održavanju staničnih uvjeta tj. homeostaze unutar bakterijske stanice.¹³⁸ Kalijev ion utječe na protok fosfata u

bakterijskoj stanici.¹³⁸ Značajnije promjene u koncentraciji kalijeva iona (K^+) tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a, izuzev značajnog pada u 7. danu, nema. Pad koncentracije kalijeva iona (K^+) pripisuje se bakterijskom iskorištavanju ovog iona kao hranjive tvari prilikom početka ili za vrijeme biorazgradnje PS-a, odnosno PVC-a. Za uzorak SP također nema značajnije promjene koncentracije kalijeva iona (K^+) izuzev u 3. danu kada je opet došlo do značajnog pada koncentracije ovog iona koji se pripisuje bakterijskom iskorištavanju kalijeva iona (K^+) kao hranjive tvari. Promjena koncentracije sulfatnih iona (SO_4^{2-}) u odnosu na promjenu koncentracije fosfatnog iona, PO_4^{3-} , i kalijeva iona, K^+ , je znatno manja te ne pokazuje pravilan trend ponašanja. Najznačajniji pad koncentracija sulfata utvrđen je u 3. danu i za uzorke PS-a i PVC-a i za uzorak SP. Razlog tomu je korištenje sulfata kao hranjive tvari prilikom rasta i razmnožavanje bakterijskih kultura koje su općenito odgovorni za sintezu određenih aminokiselina.¹³⁸ U 21. danu koncentracija sulfata za uzorak SP je veća od koncentracije sulfata za PS i PVC dok je u svim ostalim danima manja.

Tablica 4.5. Promjena koncentracije kationa (K^+) i aniona (PO_4^{3-} i SO_4^{2-}) u pokusu SP i pokusu B1-1 tijekom biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus* pri $T = 15\text{ }^\circ\text{C}$

t/ dan	Kation		Anion			
	$\gamma(K^+, B1-1)$ / mg/L	$\gamma(K^+, SP)$ / mg/L	$\gamma(PO_4^{3-}, B1-1)$ / mg/L	$\gamma(PO_4^{3-}, SP)$ / mg/L	$\gamma(SO_4^{2-}, B1-1)$ / mg/L	$\gamma(SO_4^{2-}, SP)$ / mg/L
0	304,13	304,13	517,78	517,78	12,20	12,20
3	296,39	5,30	542,94	5,67	12,14	0,15
7	352,84	153,77	788,36	340,91	54,22	6,51
14	298,81	274,35	987,13	856,92	28,39	22,10
21	380,64	329,29	900,83	882,79	27,05	62,58
30	382,03	338,83	906,86	1024,16	33,11	25,04

Tablica 4.6. Promjena koncentracije kationa (K^+) i aniona (PO_4^{3-} i SO_4^{2-}) u pokusu SP i pokusu tijekom biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus* pri $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$

t/dan	Kation		Anion			
	$\gamma(K^+, B1-3)$ / mg/L	$\gamma(K^+, SP)$ / mg/L	$\gamma(PO_4^{3-}, B1-3)$ / mg/L	$\gamma(PO_4^{3-}, SP)$ / mg/L	$\gamma(SO_4^{2-}, B1-3)$ / mg/L	$\gamma(SO_4^{2-}, SP)$ / mg/L
0	304,13	304,13	517,78	517,78	12,20	12,20
3	240,61	5,30	518,74	5,67	0,26	0,15
7	3,43	153,76	1152,41	340,91	13,87	6,51
14	385,21	274,35	1259,89	856,92	30,51	22,10
21	326,85	329,29	678,49	882,79	1,97	62,58
30	411,20	338,83	1212,16	1024,16	27,49	25,04

Tablica 4.7. Promjena koncentracije kationa (K^+) i aniona (PO_4^{3-} i SO_4^{2-}) u pokusu SP i pokusu B2-3 tijekom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* pri $T = 15\text{ }^\circ\text{C}$

t/dan	Kation		Anion			
	$\gamma(K^+, B2-3)$ / mg/L	$\gamma(K^+, SP)$ / mg/L	$\gamma(PO_4^{3-}, B2-3)$ / mg/L	$\gamma(PO_4^{3-}, SP)$ / mg/L	$\gamma(SO_4^{2-}, B2-3)$ / mg/L	$\gamma(SO_4^{2-}, SP)$ / mg/L
0	304,13	304,13	517,78	517,78	12,20	12,20
3	266,79	5,30	574,22	5,67	9,65	0,15
7	3,07	153,76	1071,23	340,91	12,25	6,51
14	370,39	274,35	1176,35	856,92	27,39	22,10
21	286,23	329,29	910,95	882,79	23,04	62,58
30	369,86	338,83	1132,03	1024,16	25,05	25,05

Tablica 4.8. Promjena koncentracije kationa (K^+) i aniona (PO_4^{3-} i SO_4^{2-}) u pokusu SP i pokusu B4-3 tijekom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* pri $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$

t/dan	Kation		Anion			
	$\gamma(K^+, B4-3)$ / mg/L	$\gamma(K^+, SP)$ / mg/L	$\gamma(PO_4^{3-}, B4-3)$ / mg/L	$\gamma(PO_4^{3-}, SP)$ / mg/L	$\gamma(SO_4^{2-}, B4-3)$ / mg/L	$\gamma(SO_4^{2-}, SP)$ / mg/L
0	334,26	334,26	639,20	639,20	9,28	9,28
3	129,61	303,48	249,70	643,25	6,27	20,09
7	0,92	1,41	799,59	1020,27	15,16	22,40
14	282,64	337,34	848,75	1023,98	26,11	33,43
21	323,73	363,60	988,57	1133,70	30,94	37,64
30	426,22	436,64	1250,93	n.a.	39,14	2367,41

4.3.2. Promjena koncentracije kationa i aniona tijekom pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*

Promjene koncentracije kalijeva, K^+ , i kalcijeva, Ca^{2+} , iona tijekom biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* prikazane su u **tablicama 4.9.** i **4.10.** dok su promjene koncentracije kalijeva, K^+ , i kalcijeva, Ca^{2+} , iona tijekom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* prikazane u **tablicama 4.11.** i **4.12.** U svim uzorcima zabilježena je najviša koncentracija kalijeva iona, K^+ , koji kao i kalcijev, Ca^{2+} , ion prilikom bakterijskog rasta i razmnožavanje služi kao anorganski kofaktor (najčešće mineral) za određene enzime te sudjeluje u nekim biokemijskim reakcijama.¹³⁸ U odnosu na koncentraciju kalijeva iona, koncentracija kalcijeva iona je značajno niža. Vrijednosti koncentracija oba iona ne prate pravilan trend ponašanja. Koncentracija kalijeva iona u pokusima P2-3 i P1-4 biorazgradnje PS-a najniža je u 7., odnosno 30. danu. U tim je danima i razlika između CFU vrijednosti uzoraka PS-a i SP-a najveća, pa je stoga i biorazgradnja najintenzivnija. Promjena koncentracije kalcijeva iona je u pokusu P1-4 biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas*

alcaligenes najmanja u 21. danu, u kojem je i CFU vrijednost najviša. S druge strane, prilikom biorazgradnje PVC-a u pokusima P4-3 i P3-4 koncentracija i kalijeva i kalcijeva iona je najmanja u 7., odnosno 30. danu, u kojem je i razlika između broja živih bakterijskih stanica u pokusima biorazgradnje PVC-a i SP-a najveća. Stoga se može zaključiti da su i kalijev i kalcijev ion iskorišteni kao hranjive tvari ili za rast i razmnožavanje bakterijskih kultura prije biorazgradnje ili za biorazgradnju.

Tablica 4.9. Promjena koncentracije aniona kationa (K^+) u pokusu P2-3 i pokusu SP tijekom biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* pri $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$

t/dan	Kation			
	$\gamma(K^+, P2-3) / \text{mg/L}$	$\gamma(K^+, SP) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{Ca}^{2+}, P2-3) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{Ca}^{2+}, SP) / \text{mg/L}$
0	136,17	136,17	1,00	1,00
3	25,98	282,76	0,30	3,62
7	2,63	1,95	n.a.	4,13
14	393,99	16,34	17,92	0,06
21	377,99	16,13	5,28	2,15
30	5,05	1,16	0,24	3,70

Tablica 4.10. Promjena koncentracije aniona (PO_4^{3-} i SO_4^{2-}) i kationa (K^+) u pokusu P1-4 i pokusu SP tijekom biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* pri $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$

t/dan	Kation			
	$\gamma(K^+, P1-4) / \text{mg/L}$	$\gamma(K^+, SP) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{Ca}^{2+}, P1-4) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{Ca}^{2+}, SP) / \text{mg/L}$
0	136,17	136,17	1,00	1,00
3	443,18	282,76	7,78	3,62
7	8,11	1,95	0,18	4,13
14	34,64	16,34	0,96	0,07
21	15,00	16,13	0,04	2,15
30	3,97	242,15	0,23	3,70

Tablica 4.11. Promjena koncentracije kationa (K^+ i Ca^{2+}) u pokusu, P4-3 i kontrolnom pokusu, SP, tijekom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* pri $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$

t/dan	Kation			
	$\gamma(K^+, P4-3) / \text{mg/L}$	$\gamma(K^+, SP) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{Ca}^{2+}, P4-3) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{Ca}^{2+}, SP) / \text{mg/L}$
0	136,17	136,17	1,00	1,00
3	17,79	282,76	0,47	3,62
7	4,18	1,95	0,11	4,13
14	25,43	16,34	0,42	0,07
21	394,59	16,13	1,46	2,15
30	4,69	1,16	0,58	3,70

Tablica 4.12. Promjena koncentracije kationa (K^+ i Ca^{2+}) u pokusu, P3-4 i pokusu SP tijekom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* pri $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$

t/dan	Kation			
	$\gamma(\text{K}^+, \text{P3-4}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+, \text{SP}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{Ca}^{2+}, \text{P3-4}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{Ca}^{2+}, \text{SP}) / \text{mg/L}$
0	136,17	136,17	1,00	1,00
3	466,26	282,76	2,17	3,62
7	22,48	1,95	1,05	4,13
14	31,39	16,34	3,30	0,07
21	317,80	16,13	1,74	2,15
30	2,63	242,15	0,52	3,70

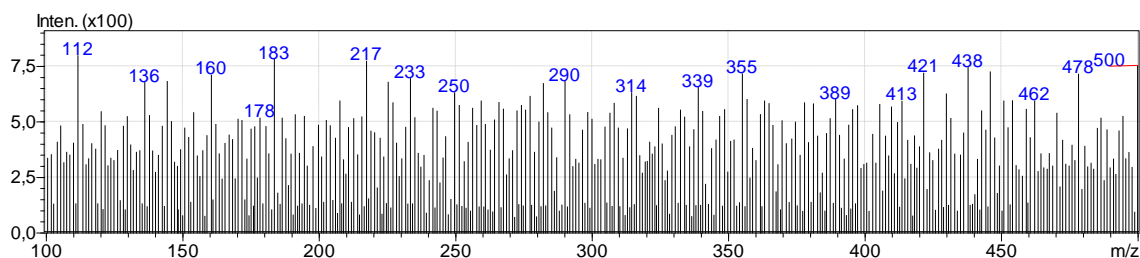
4.4. Praćenje nastalih razgradnih produkata i/ili otpuštenih aditiva s površine čestica mikroplastike tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC/MS)

Na slikama 4.17-4.21. prikazani su maseni spektri SP-a, PS-a i PVC-a dobiveni analizom na HPCL/MS uređaju. Analiza je provedena kako je opisano u poglavlju 3.3.5.4., a proces biorazgradnje PS-a i PVC-a proveden je bakterijskim kulturama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*. U nastavku su prikazani rezultati za najznačajnije pokuse biorazgradnje PS-a, B1-1 i P1-4 odnosno PVC-a, B4-3 i P3-4, primjenom bakterija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*.

4.4.1. Maseni spektrometri vodene faze nastale prilikom procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije *Bacillus cereus*

Na slikama 4.17.-4.22 prikazani su maseni spektri uzoraka SP, PS i PVC u 0. i 3. danu. Snimljen je i maseni spektar mineralnog medija. Usporedbom tog spektra sa spektrima uzoraka utvrđeno je koji pikovi pripadaju određenom uzorku.

U 0. danu pokusa biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus cereus* dobiven je maseni spektar prikazan na slici 4.17. Pikovi su podjednake inteziteta. Prema literaturi¹⁵⁷ izdvojeni su oni pikovi kod kojih je došlo do otpuštanja aditiva tijekom procesa kao što je prikazano u tablici 4.13.



Slika 4.17. Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* u 0. danu.

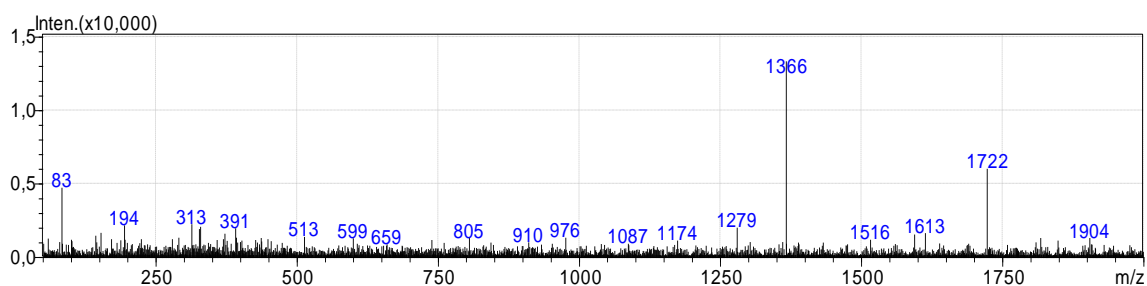
Kako je vidljivo iz tablice 4.13. kemijski sastav PS-a sadrži mnogo aditiva od kojih su u najvećoj mjeri polietilen glikol (PEG) te različiti deterdženti. Iako se od strane FDA (engl.

Food and Drug Administration), PEG smatra sigurnim za ljude i okoliš, u posljednje se vrijeme često 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.¹⁵⁸ Prema Ministarstvu zdravstva Republike Hrvatske, pod deterdžentima se podrazumijevaju sve tvari i smjese koje sadrže sapune i/ili druge površinski aktivne tvari namijenjene za procese pranja i čišćenja.¹⁵⁹ 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.¹⁶⁰ Nadalje, deterdženti sadrže i fosfate koji, iako su zabranjeni u članicama EU, u nekim zemljama se i dalje koriste pri čemu mogu izazivati dijareju i mučnine kod ljudi. Osim toga, fosfati značajno doprinose onečišćenju okoliša jer potiču eutrofikaciju čije su posljedice nedostatak svjetla, kisika i ostalih hranjivih tvari koji sudjeluju u procesu fotosinteze, a ključni su za normalno odvijanje života u vodenim ekosustavima.¹⁶⁰

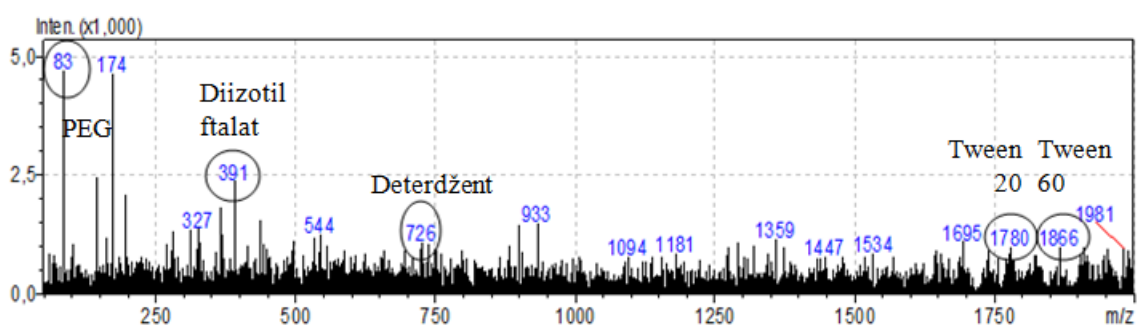
Tablica 4.13. Ionski oblik i ime spoja identificiranih u 0. danu biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* za pokuse B1-1 i B4-3.¹⁵⁷

m/z omjer	Forma iona	Spoj
112	$[A_2B+H]^+$	$[C_2H_4O]_nH_2O$ PEG, polietilen glikol
160	$[M-CH_3OH+H]^+$	$C_{10}H_{10}O_4$ Dimetil ftalat, plastifikator
217	$[A_4B+Na]^+$	$[C_2H_4O]_nH_2O$ PEG, polietilen glikol
355	$[M-Cl]^+$	$C_{22}H_{47}N_2$ Palmitamidopropil-trimonijev klorid, aditivi za proizvode za osobnu njegu
438	$[A_9B+Na]^+$	$[C_2H_4O]_nH_2O$ PEG, polietilen glikol
478	$[AB_6+H]^+$	$[C_{14}H_{22}O][C_2H_4O]_n$ Deterdžent
500	$[AB_6+Na]^+$	$[C_{14}H_{22}O][C_2H_4O]_n$ Deterdžent

Na **slici 4.18.** prikazan je maseni spektar SP-a u 14. danu. Maseni spektar PS-a, također snimljen u 14. danu, prikazan je na **slici 4.19.** S obzirom da je biorazgradnja PS-a bakterijom *Bacillus cereus* u pokusu B1-1 najintenzivnija u 14. danu, te da u tom danu dolazi i do porasta TOC-a, u ovom radu su prikazani maseni spektri PS-a i SP-a snimljeni upravo u 14. danu. Dodatan razlog je i očekivanje da u tom periodu dolazi do otpuštanja aditiva s površine MP-a i/ili nastanka novih razgradnih organskih produkata.



Slika 4.18. Maseni spektrometar za SP u 14. danu.

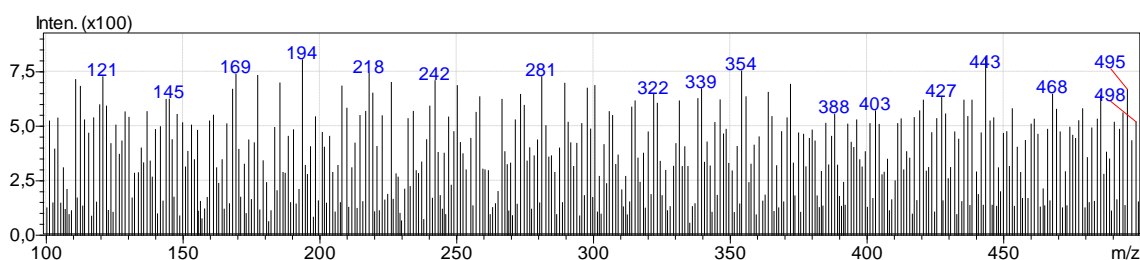


Slika 4.19. Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* u 14. danu za pokus B1-1.

Usporedbom masenih spektara SP-a i PS-a u 14. danu uočeno je da nije došlo do nikakve promjene pri pikovima 391 i 83. Ovi pikovi odgovaraju ionskim oblicima $[M+H]^+$ i $[A_1B+Na]^+$. $[M+H]^+$ ionski oblik odgovara plastifikatoru, diizotil ftalatu, karakterističnom aditivu za PS¹⁶¹, dok ionski oblik $[A_1B+Na]^+$ odgovara PEG-u. Međutim, u odnosu na masene spektre PS-a u 0. danu, u 14. danu za SP i PS uočeno je smanjenje m/z omjera s 413 na 391, odnosno s 112 na 83. Smanjenje m/z omjera upućuje da je došlo do biorazgradnje mikroplastičnih čestica PS-a. Ovakav rezultat je u skladu s razlikom između CFU vrijednosti PS-a u pokusu B1-1 i SP-a, a koja je u 14. danu najveća. U tom danu je i biorazgradnja PS-a bakterijom *Bacillus cereus* najintenzivnija. Osim smanjenja m/z omjera, došlo je i do smanjenja intenziteta ovih pikova. Kemijska formula diizotil ftalata je $C_{24}H_{38}O_4$, dok je kemijska formula PEG-a $[C_2H_4O]_nH_2O$. Daljnjom usporedbom masenih spektara SP-a i PS-a

u 14. danu utvrđeno je da je tijekom biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus* došlo do nestanka pikova na spektru PS-a u rasponu od 250 do 500, a koji na spektru SP-a odgovaraju ionskim oblicima $[A_{10}B+H]^+$, $[A_{14}B+Na]^+$ i $[A_{17}B+K]^+$. Prvi ionski oblik pripada polipropilen glikolu kemijske formule $[C_3H_8O]_nH_2O$, dok druga dva pripadaju PEG-u čija je kemijska formula $[C_2H_4O]_nH_2O$. S druge strane, usporedbom masenih spektara PS-a u 0. i 14. danu ovi se ionski oblici pojavljuju i u 0. danu. Međutim, niže su vrijednosti m/z omjera i viših intenziteta pikova. Kod PS-a je u 14. danu primjećen novi pik pri 726 ionskog oblika $[AB_{11}+Na]^+$ i kemijske formule $[C_{15}H_{24}O][C_2H_4O]_n$, a koji pripada skupini deterdženata. Može se pretpostaviti da se radi o otpuštenom aditivu s površine PS-a, a što je u skladu s visokom vrijednosti koncentracije TOC-a ($\gamma = 28,08$ mg/L) izmjerene u 14. danu prilikom biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus*. O razmatranju visokih vrijednosti TOC-a bilo je riječi u poglavlju 4.2.1. Nadalje, pri vrijednostima 1780 i 1866 na masenom spektru PS-a uočeni su novi pikovi. Vrijednosti m/z omjera 1780 i 1866 pripadaju jednakom ionskom obliku $[AB_{32}+Na]^+$ kemijskih formula $[C_{18}H_{34}O_6][C_2H_4O]_n$ i $[C_{24}H_{46}O_8][C_2H_4O]_n$ te se nazivaju Tween (20) odnosno Tween (60). Oba ova spoja pripadaju skupini surfaktanata tj. površinski aktivnim tvarima bez kojih pranje i čišćenje deterdžentima ne bi bilo moguće. Sinonimi ovih spojeva su polietilen glikol sorbitan monolaurat i polietilen glikol sorbitan monostearat.^{162,163} Na masenim spektrima SP-a i PS-a javljaju se pikovi koji odgovaraju deterdžentima. No, razlikuju se prema vrijednosti m/z omjera. Kod PS-a su m/z omjeri za deterdžente veći u odnosu na m/z omjere kod SP-a.

Nadalje, u 0. danu pokusa biorazgradnje PVC-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus cereus* dobiven je maseni spektar prikazan na slici 4.20. Pikovi su podjednakog inteziteta. Prema literaturi¹⁵⁷ izdvojeni su oni pikovi kod kojih je došlo do otpuštanja aditiva ili promjene u m/z omjeru kao što je prikazano u tablici 4.14. Kao što je vidljivo iz tablice, većina pikova odgovara ionskim oblicima deterdženata.



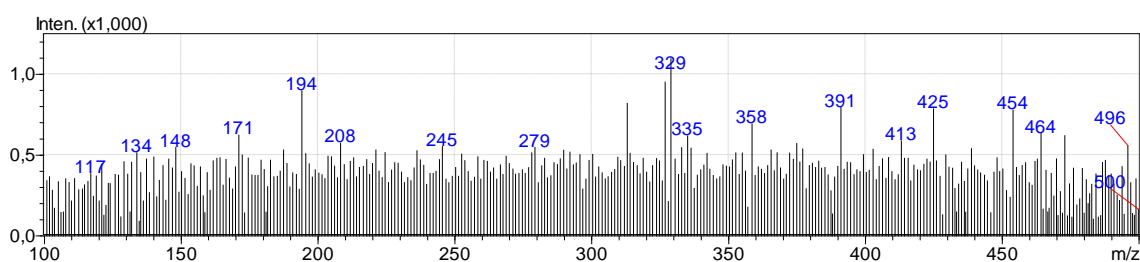
Slika 4.20. Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* u 0. danu.

Tablica 4.14. Ionski oblik i ime spoja identificiranih u 0. danu biorazgradnje PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* za pokus B4-3.¹⁵⁷

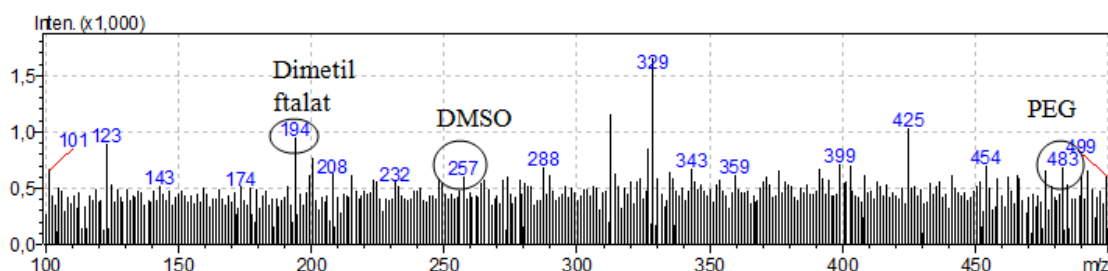
m/z omjer	Forma iona	Spoj
218	$[A_4B+Na]^+$	$[C_2H_4O]_nH_2O$ Polietilen glikol, PEG
242	M^+	$C_{16}H_{35}N$ Tetrabutilamonij, TBA, pufer
354	$[AB+H]^+$	$[C_{15}H_{24}O][C_2H_4O]_n$ Deterdžent
403	$[AB_4+Na]^+$	$[C_{14}H_{22}O][C_2H_4O]_n$ Deterdžent
443	$[AB_5+H]^+$	$[C_{15}H_{24}O][C_2H_4O]_n$ Deterdžent
468	$[AB_6+H]^+$	$[C_{14}H_{22}O][C_2H_4O]_n$ Deterdžent
495	$[M-Cl]^+$	$C_{34}H_{72}NCl$ Dipalmitil dimetilamonij klorid, katalizator, dodatak za proizvode za osobnu njegu

Na slikama 4.21. i 4.22. prikazani su maseni spektri SP-a i PVC-a u 3. danu tijekom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Bacillus cereus*. Prilikom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* u 3. danu na masenom spektru SP-a uočena je pojava novih pikova u odnosu na 0. dan za PVC. m/z omjeri ovih pikova iznose 391 i 413 te pripadaju skupini diizotil ftalata. Kemijska formula im je jednaka te glasi $C_{24}H_{38}O_4$ dok su im ionski oblici različiti te pripadaju ionskim formama $[M+H]^+$ i $[M+Na]^+$. Međutim, usporedbom masenih spektara za SP i PVC u 3. danu biorazgradnje, utvrđeno je da ovi m/z omjeri ne postoje kod PVC-a. Stoga bi se moglo pretpostaviti da je došlo do njihova razlaganja na manje strukturne jedinice prilikom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Bacillus cereus*. Osim toga, na masenim spektrima SP-a i PVC-a u 3. danu biorazgradnje primjećena je i pojava m/z omjera 413 koji također odgovara diizotil ftalatu. S obzirom da se taj m/z omjer jednakih vrijednosti nalazi na oba masena spektra snimljena u 3 danu, pretpostavlja se da je prilikom biorazgradnje PVC-a došlo do otpuštanja diizotil ftalata s površine mikroplastičnih čestica PVC-a. Diizotil ftalat je plastifikator koji se uobičajeno kao aditiv dodaje PVC-u u svrhu poboljšanja njegovih plastičnih svojstava.¹⁶⁴ Pri m/z omjeru 194 na masenim spektrima PVC-a u 0. i 3. danu te SP-a u 3. danu identificiran je još jedan ftalat, dimetil ftalat koji se također kao plastifikator dodaje PVC-u prilikom proizvodnje različitih proizvoda od ovog materijala.¹⁶⁴ Kod ovog pika

nije došlo do nikakve promjene prilikom biorazgradnje PVC-a. Pik m/z omjera 495 kojem odgovara ionski oblik $[M-Cl]^+$ i kemijska formula $C_{34}H_{72}NCl$ identificiran je u 0. danu na masenom spektru PVC-a, ali ne i u 3. danu. Spoj kemijske formule $C_{34}H_{72}NCl$ zove se dipalmitil dimetilamonij klorid te se koristi kao dodatak za proizvode za osobnu njegu. Također nije identificiran niti na masenom spektru SP-a u 3. danu. Pretpostavlja se da je došlo do njegove razgradnje prilikom biorazgradnje PVC-a. Nadalje, niti m/z omjeri 242 i 354 koji pripadaju tetrabutilamoniju i deterdžentu nisu identificirani u 3. danu na masenom spektru PVC-a. S druge strane, u 3. danu za PVC identificiran je novi pik pri 257 koji odgovara ionskom obliku $[M_3+Na]^+$ kemijske formule C_2H_6OS , a naziva se dimetilsulfoksid. Ovaj se spoj najčešće koristi kao otapalo. Kod m/z omjera 483 u 3. danu biorazgradnje PVC-a identificiran je novi pik koji pripada spoju PEG, a čiji je ionski oblik $[A_{10}B+Na]^+$.



Slika 4.21. Maseni spektrometar za SP u 3. danu.



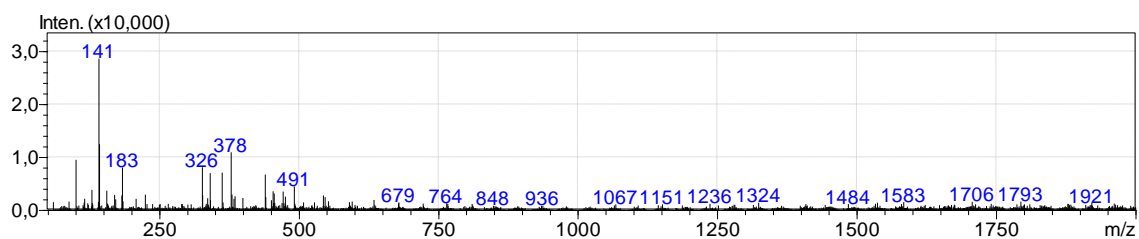
Slika 4.22. Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* u 3. danu za pokus B4-3.

4.4.2. Maseni spektrometri vodene faze nastale prilikom procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*

Na slikama 4.23.-4.26. prikazani su maseni spektrometri uzoraka SP, PS i PVC u 0. i 30. danu. Snimljen je i maseni spektar mineralnog medija. Usporedbom tog spektra sa spektrima uzoraka utvrđeno je koji pikovi pripadaju određenom uzorku. Maseni spektrometri PS-a i

PVC-a snimljeni u 30. danu prikazani su, jer je u tom danu i biorazgradnja mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* bila najintenzivnija.

Slika 4.23. prikazuje maseni spektrometar PS-a u 0. danu prilikom njegove biorazgradnje bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*. Većina m/z omjera s određenom vrijednošću pika za PS u 0. danu je minimalno ili neznatno promijenjena u odnosu na iste za PS u 30. danu. m/z omjeri PS-a i PVC-a u 0. danu kod kojih je došlo do promjena tijekom biorazgradnje ovih MP-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* u pokusima P1-4 i P3-4 prikazani su u **tablici 4.15**.



Slika 4.23. Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* u 0. danu.

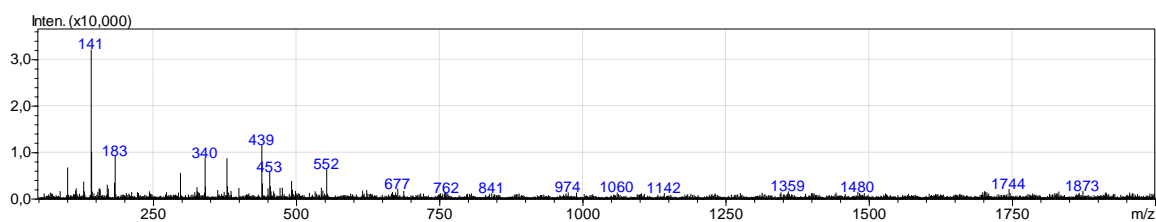
U **tablici 4.15.** navedeni su ionski oblici s pripadajućim imenima i vrijednostima m/z omjera kod kojih je došlo do promjena tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a u 0. danu. Najveći dio aditiva u ovom slučaju čine deterdženti o čijem je utjecaju na okoliš i ljudsko zdravlje bilo govora u *poglavlju 4.4.1.*

Tablica 4.15. Ionski oblik i ime spoja identificiranih u 0. danu biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* za pokuse P1-4 i B3-4 .^{157,158}

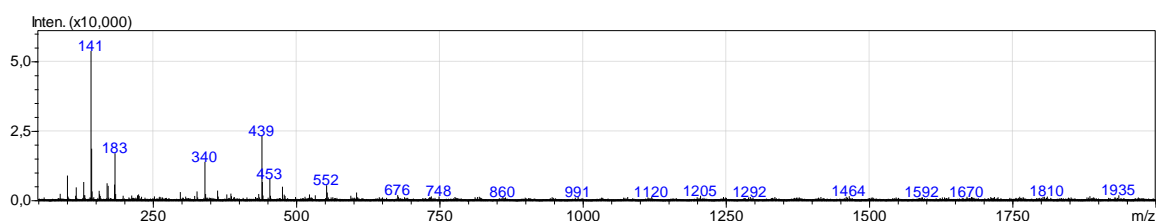
m/z omjer	Forma iona	Spoj
326	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P Trifenil fosfat, TPP
378	[AB ₃ +Na] ⁺	[C ₁₅ H ₂₄ O][C ₂ H ₄ O] _n Deterdžent
491	[AB ₆ +Na] ⁺	[C ₁₄ H ₂₂ O][C ₂ H ₄ O] _n Deterdžent
764	[A ₁₇ B+H] ⁺	[C ₂ H ₄ O] _n H ₂ O Polietilen glikol, PEG
1067	[AB ₁₄ +Na] ⁺	[C ₂₄ H ₄₄ O ₆][C ₂ H ₄ O] _n Tween (80)

Na **sluci 4.24.** prikazan je maseni spektrometar SP-a u 30. danu koji služi kao usporedba, dok je maseni spektrometar za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* u 30. danu za pokus P1-4 prikazan na **sluci 4.25.** Usporedbom masenih spektara PS-a u 0. i 30. danu uočen je nestanak pika u 30. danu na masenom spektrometru PS-a, a čija vrijednost m/z omjera u 0. danu za PS iznosi 326. Ovom piku odgovara ionski oblik [M+H]⁺ kemijske formule C₁₈H₁₅O₄P, a identificiran je kao trifenil fosfat ili TPP. Pri vrijednostima m/z omjera 453 i 552 u 30. danu se i kod SP-a i kod PS-a pojavljuju pikovi koji ne postoje u 0. danu na masenom spektru PS-a. m/z omjer 453 odgovara ionskom obliku [A₉B+K]⁺ kemijske formule [C₂H₄O]_nH₂O, a identificiran je kao PEG dok m/z omjer iznosa 552 odgovara ionskom obliku [AB₇+Na]⁺ kemijske formule [C₁₅H₂₄O][C₂H₄O]_n te je identificiran kao deterdžent. Pojava ovog deterdženta u 30. danu je posljedica otpuštanja aditiva s površine PS-a. U 0. danu za PS se pri vrijednosti m/z omjera 1067 javlja pik za koji je nakon identifikacije utvrđeno da pripada skupini Tween-a ionskog oblika [AB₁₄+Na]⁺ kemijske formule [C₂₄H₄₄O₆][C₂H₄O]_n. S druge strane, ovaj ionski oblik nije detektiran u 30. danu na masenom spektru PS-a. Kako je već spomenuto u *poglavlju 4.4.1.* ionski oblici Tween-a pripadaju površinski aktivnim tvarima tzv. tenzidima koji smanjuju površinsku napetost kapljevine.¹⁶⁵ Stoga se može prepostaviti da je prilikom biorazgradnje PS-a došlo i do pucanja veza unutar deterdženata te njegova razlaganja na primarne strukturne jedinice. Na masenom spektru PS-a u 30. danu uočeni su novi pikovi pri m/z omjerima 1292 i 1592, a koji pripadaju

skupini Tween-a. Ovim surfaktantima odgovaraju ionski oblici $[AB_{21}+Na]^+$ i $[AB_{26}+Na]^+$ kemijskih formula $[C_{18}H_{34}O_6][C_2H_4O]_n$ i $[C_{24}H_{44}O_6][C_2H_4O]_n$. m/z omjere 1670, 1810 i 1935 PS-a u 30. danu prema literaturi¹⁵⁷ nije moguće identificirati.

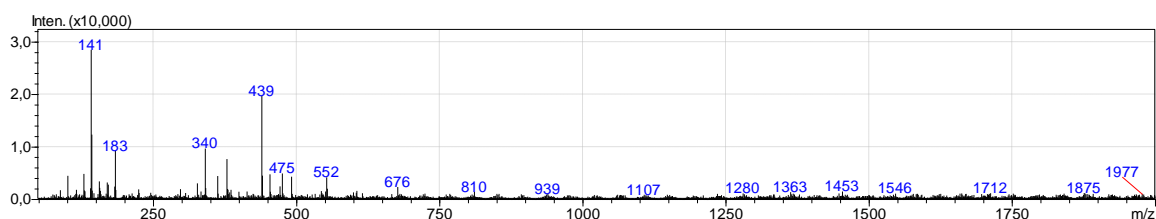


Slika 4.24. Maseni spektrometar za SP u 30. danu.



Slika 4.25. Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* u 30. danu za pokus P1-4.

Na **slici 4.26.** prikazan je maseni spektrometar za proces biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* u 30. danu za pokus P3-4. U 30. danu na masenom spektrometru nisu detektirani nikakvi novi pikovi m/z omjera već samo promjene već postojećih pikova. Prema literaturi¹⁵⁷ nije bilo moguće identificirati kojem ionskom obliku i kemijskoj formuli pripadaju m/z omjeri 475, 810, 1875 i 1977. S druge strane, u 30. danu za PVC uočen je nestanak pikova m/z omjera 764 i 1067 koji su uočeni u 0. danu na masenom spektrometru PVC-a. Navedeni m/z omjeri odgovaraju ionskim oblicima $[A_{17}B+H]^+$ i $[AB_{14}+Na]^+$ kemijskih formula $[C_2H_4O]_nH_2O$ i $[C_{24}H_{44}O_6][C_2H_4O]_n$. Osim toga, u 30. danu za uzorak PVC nije detektiran niti m/z omjer 326, a koji odgovara trifenil fosfatu. Taj m/z omjer ne postoji niti na masenom spektru SP-a u 30. danu. Stoga se može pretpostaviti da je tijekom biorazgradnje PVC-a došlo do iskorištavanja fosfata kao hranjivih tvari. Nadalje, m/z omjeri deterdženata 378 i 491, a koji su detektirani u 0. danu za PVC, u 30. danu se smanjuju na vrijednosti 340 odnosno 439 pri čemu intenzitet pikova raste. Na temelju m/z omjera pikova može se zaključiti da je došlo do smanjenja mase deterdženata kao posljedica pucanja veza unutar deterdženata prilikom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*.



Slika 4.26. Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* u 30. danu za pokus P3-4.

4.5. FTIR-ATR analiza mikroplastike

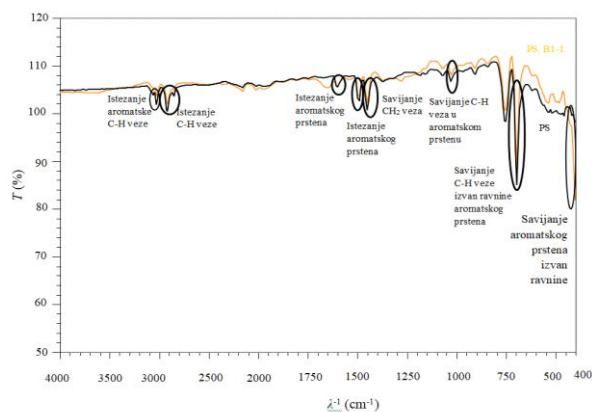
FTIR-ATR analiza materijala provedena neposredno prije provedbe pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* pokazala je da se radi o PS-u odnosno PVC-u. Spektri PS-a i PVC-a prikazani su na slikama 4.27.-4.30. te su označeni kao PS odnosno PVC. Ova analiza provedena je i na kraju pokusa biorazgradnje PS-a odnosno PVC-a u svrhu utvrđivanja potencijalno nastalih promjena u funkcionalnim skupinama koje karakteriziraju kemijsku strukturu ovih polimera. FTIR-ATR analiza provedena je prema opisu navedenom u poglavlju 3.3.5.5.

4.5.1. Rezultati FTIR-ATR analize mikroplastike polistirena

Spektri PS-a prije i poslije njegove biorazgradnje primjenom bakterije *Bacillus cereus* u pokusu B1-1 odnosno primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu P1-4 prikazani su na slikama 4.27. i 4.28. Prema literaturi¹⁶⁶ spektar PS-a karakterizira pik pri oko 3024 cm^{-1} koji pripada C-H istežanju aromatske skupine te pik pri 2847 cm^{-1} koji odgovara C-H istežanju. Pikovi pri 1601 cm^{-1} i 1492 cm^{-1} karakteristični su za istežanje aromatskog prstena, dok pik na 1451 cm^{-1} odnosno 1027 cm^{-1} predstavlja CH_2 savijanje odnosno savijanje C-H veza u aromatskom prstenu. Pik pri 694 cm^{-1} odgovara savijanju C-H veze izvan ravnine aromatskog prstena, dok pik pri 537 odgovara savijanju aromatskog prstena izvan ravnine. Savijanje aromatske skupine vidljivo je kod pika valne duljine $\sim 850\text{ cm}^{-1}$, a prema literaturi¹⁶⁷ odgovara piku $\sim 900\text{ cm}^{-1}$ koji je karakterističan za savijanje C-H vezu izvan ravnine aromatskog prstena.

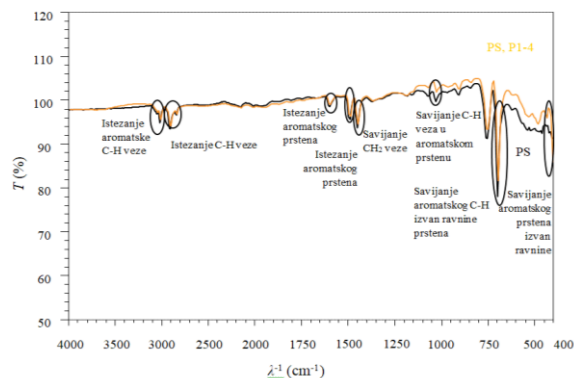
Na slici 4.27. prikazan je spektar za PS nakon biorazgradnje bakterijom *Bacillus cereus* u pokusu B1-1 te je utvrđeno da je većina pikova karakterističnih za PS i dalje prisutna. Međutim, intenzitet pojedinih pikova je, više ili manje, smanjen. Najizraženije smanjenje intenziteta vidljivo je kod pikova pri 3024 cm^{-1} , 2847 cm^{-1} , 1027 cm^{-1} , $\sim 900\text{ cm}^{-1}$ te $\sim 850\text{ cm}^{-1}$. Osim smanjenja intenziteta, došlo je i do stvaranja novih pikova i to pri $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ koji

odgovara istezanju veza C=O skupine koja potječe od ketona. Stvaranje karbonilnih skupina, koje najčešće pripada ketonima, jedan je od učestalih pokazatelja da je došlo do biorazgradnje MP-a konkretno u ovom slučaju PS-a.¹⁶⁸ Novi pik koji odgovara C-H istezanju pojavljuje se pri $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$. Njegova pojava dodatna je potvrda da je zaista došlo do biorazgradnje PS-a odnosno cijepanja njegova polimernog lanca manje dijelove. Oko 1250 cm^{-1} također se javlja novi pik koji prema literaturi¹⁶⁷ odgovara vibraciji skeleta C-C veze. Do značajnije promjene došlo je i kod pika valne duljine $\sim 1050\text{ cm}^{-1}$, a koji odgovara CO-O-CO kod aldehida.



Slika 4.27. FTIR spektar snimljen za PS prije biorazgradnje i nakon biorazgradnje bakterijom *Bacillus cereus* u pokusu B1-1.

FTIR spektar PS-a snimljen nakon biorazgradnje bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu P1-4 prikazan je na slici 4.28. S obzirom na FTIR spektar biorazgradnje PS-a s *Bacillus cereusom*, u ovom je slučaju vidljivo puno manje promjena. Bolja prilagođenost *Bacillus cereusa* na PS vidljiva je i kod promjena CFU vrijednosti koje su za PS veće nego za SP. Kako je već spomenuto u poglavlju 4.1.1. razlika između CFU vrijednosti PS-a i SP-a, a koja ide u korist PS-a, potvrđuje da su mikroplastične čestice PS-a iskorištene kao izvor ugljika. U odnosu na CFU vrijednosti *Bacillus cereusa* prilikom biorazgradnje PS-a kod koje je došlo do povećanja ove vrijednosti otpočetak provedbe pokusa, CFU vrijednost u pokusu P1-4 prilikom biorazgradnje PS-a bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* je oscilirala sve do 21. dana. Najznačajnija promjena u intenzitetu apsorpcijskih vrpca također je vidljiva pri 1027 cm^{-1} , $\sim 900\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 850\text{ cm}^{-1}$. Nadalje, došlo je i do malenog pomaka u valnoj duljini ovih vrijednosti kod PS-a nakon biorazgradnje u odnosu na prije biorazgradnje. Manje promjene uočljive su i kod pika vrijednosti 694 cm^{-1} koji odgovara savijanju C-H veza u aromatskom prstenu. Uočena je i promjena intenziteta pika pri 1150 cm^{-1} koji odgovara C-O vezi. U ovom slučaju nije utvrđen niti jedan novonastali pik.



Slika 4.28. FTIR spektar snimljen za PS prije biorazgradnje i nakon biorazgradnje bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu P1-4.

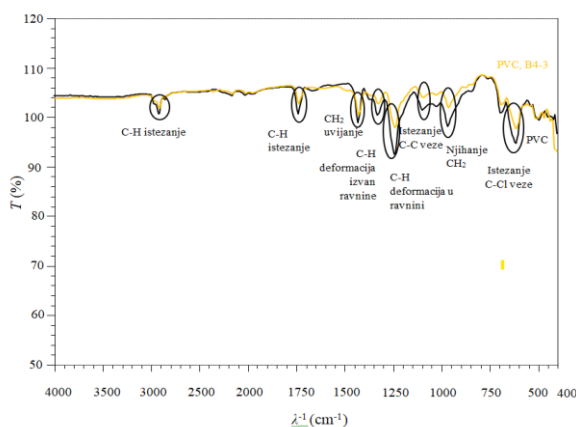
Usporedbom FTIR spektara PS-a prilikom biorazgradnje bakterijskom kulturom *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* utvrđeno je da je biorazgradnja PS-a učinkovitija primjenom bakterije *Bacillus cereus*.

4.5.2. Rezultati FTIR-ATR analize mikroplastike poli(vinil-klorida)

Spektri PVC-a prije i poslije njegove biorazgradnje primjenom bakterije *Bacillus cereus* u pokusu B4-3, odnosno primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu P3-4 prikazani su na slikama 4.29. i 4.30. Prema literaturi¹⁶⁷, spektar PVC-a karakteriziraju pikovi na 2920 cm⁻¹, 2849 cm⁻¹ i 1736 cm⁻¹ koji odgovaraju simetričnom C-H istezanju. Ovaj spektar karakterizira još i pik pri 1427 cm⁻¹ koji odgovara CH₂ uvijanju dok je pri valnoj duljini od 1331 cm⁻¹ karakterističan pik za C-H deformaciju izvan ravnine. Nadalje, na 1255 cm⁻¹ slijedi pik koji odgovara C-H deformaciji u ravnini. Vrijednost pika 1099 cm⁻¹ odgovara istezanju C-C veze dok pik 966 cm⁻¹ odgovara njihanju CH₂. Pik na 616 cm⁻¹ predstavlja istezanje C-Cl veze.

Na slici 4.29. prikazan je FTIR spektar PVC-a snimljen nakon njegove biorazgradnje bakterijom *Bacillus cereus*. Također, na istoj slici je prikazan i FTIR spektar snimljen prije provebe, pokusa B4-3, biorazgradnje PVC-a bakterijom *Bacillus cereus*. Usporedbom tih dvaju FTIR spektara uočeno je da je došlo do najizraženijih promjena u intenzitetu pikova na 1736 cm⁻¹, 1331 cm⁻¹, 1255 cm⁻¹, 1099 cm⁻¹, 966 cm⁻¹ i 616 cm⁻¹. Manje promjene u intenzitetu vidljive su i kod pikova na 1755 cm⁻¹ i 1427 cm⁻¹. Na spektru PVC-a snimljenom nakon njegove biorazgradnje bakterijom *Bacillus cereus* uočen je nastanak nekoliko novih apsorpcijskih vrpca. Pri vrijednosti valne duljine ~2350 cm⁻¹ uočena je karakteristična

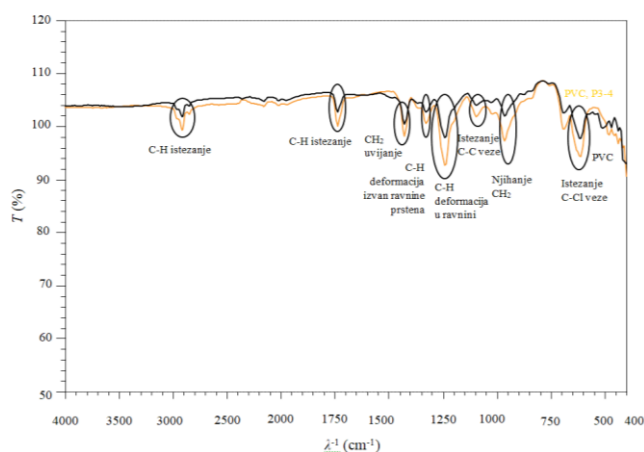
apsorpcijska vrpca za CO₂. Nastanak CO₂ dokaz je da je do biorazgradnje PVC-a uistinu i došlo. Na ~1630 cm⁻¹ identificiran je pik koji pripada rastezanju C=C veze dok je apsorpcijska vrpca savijanja metilenske C-H veze uočena pri ~1480 cm⁻¹. Pik vrijednosti ~870 cm⁻¹ odgovara istezanju O-C-O.¹⁶⁷



Slika 4.29. FTIR spektar snimljen za PVC prije biorazgradnje i nakon biorazgradnje bakterijom *Bacillus cereus* te u pokusu B4-3.

Na slici 4.30. prikazan je FTIR spektar PVC-a prije i nakon biorazgradnje u pokusu P3-4 primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*. I u ovom slučaju je došlo do smanjenja intenziteta te pojave novih ili nestanka postojećih pikova koji odgovaraju FTIR spektru PVC-a prije biorazgradnje. Do najznačajnije promjene intenziteta pikova došlo je kod pikova 2920 cm⁻¹, 2849 cm⁻¹ i 1736 cm⁻¹, a koji su karakteristični za PVC materijal. Nadalje, najznačajnije promjene intenziteta uočljive su još i kod pikova 1427 cm⁻¹, 1331 cm⁻¹, 1255 cm⁻¹ i 616 cm⁻¹. Ovi pikovi odgovaraju redom vibracijama CH₂, CHCl i C-Cl. Značajna promjena intenziteta vidljiva je i pri valnim duljinama 700 cm⁻¹ i 616 cm⁻¹ koje se odnose na istezanje C-Cl veze, ali i pri valnoj duljini 966 cm⁻¹ koja odgovara njihanju CH₂. Pri vrijednosti valne duljine ~2350 cm⁻¹ uočena je pojava nove apsorpcijske vrpce karakteristične za CO₂. Nastanak CO₂ dokaz je da je do biorazgradnje PVC-a uistinu i došlo. Uz to, novi pik se javlja i pri ~1670 cm⁻¹, a odgovara istezanju C=C veze. Promjene u intenzitetu pikova i pojava novih, znak su pojave procesa dehidrokloriranja i naknadnog stvaranja dvostrukih veza. S obzirom na način istezanja C-O veze pri 1050 cm⁻¹ kao i na način C-H deformacije C-H veze pri 1255 cm⁻¹ odnosno 1331 cm⁻¹, ovi se pikovi mogu pripisati terc-butilnim skupinama koje zamjenjuju Cl atome tvoreći etere. Kada su osigurani oksidacijski uvjeti, terminalne dvostruke veze konjugiranih sustava mogu s relativnom lakoćom uhvatiti kisik stvarajući keton ili može

zaostati epoksid koji će se dodatkom vode pretvoriti u diol. Pik na 1736 cm^{-1} je indicacija za takvu ketonsku skupinu. Kao i kod FTIR spektra PVC-a nakon njegove biorazgradnje primjenom bakterije *Bacillus cereus*, i u ovom slučaju je uočen je pik pri $\sim 880\text{ cm}^{-1}$ koji odgovara istezanju O-C-O. Apsorpcijske vrpce vibracija istezanja C-Cl skupine na 700 cm^{-1} i 616 cm^{-1} karakteristične su isključivo za PVC te se mogu uočiti samo pri većemu udjelu PVC-a ($>80\text{ mas.}\%$). Uklanjanjem ovih vrpca, uklanjaju se i atomi klora iz PVC-a što rezultira smanjenjem njihovog broja u kemijskoj strukturi PVC-a. Sukladno tome, očekuje se i slabljenje intermolekularnih interakcija.¹⁶⁹



Slika 4.30. FTIR spektar snimljen za PVC **prije biorazgradnje** i **nakon biorazgradnje** bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* te **u pokusu P3-4**.

Usporedbom FTIR spektara PVC-a prilikom biorazgradnje bakterijskom kulturom *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* utvrđeno je da je biorazgradnja PVC-a učinkovitija primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*.

4.6. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije

Vibrio fischeri

Ispitivanje ekotoksičnosti filtrata bakterijskih suspenzija 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. Ekotoksičnost filtrata ispitana je nakon provedenih pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*, a postupak samog ispitivanja opisan je u *poglavlju 3.4*. U **tablici 4.16.** i **4.17.** prikazani su rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata bakterijske suspenzije *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* upotrebljenih za biorazgradnju PS-a i PVC-a.

Rezultati su izraženi preko EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti, a toksični učinak svakog uzorka procijenjen je kao jedinica toksičnosti (TU) koja je izračunata prema formuli: $TU / \% = (1/EC_{50}) * 100 \%$.¹⁷⁰

Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata bakterijske suspenzije bakterija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* provedenog pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* pokazuju najniže izmjerene EC₂₀ vrijednosti u pokusima B3-1 i P2-4. Ovi rezultati prikazani su u **tablici 4.16**. EC₂₀ se prema literaturi¹⁷¹ definira kao koncentracija tvari koja rezultira 20 %-tnim štetnim učinkom na ispitivanu populaciju. Općenito, što je ova vrijednost manja, štetni učinak je veći. Konkretno, to bi, s obzirom na najniže izmjerene EC₂₀ vrijednosti u pokusima B3-1 i P2-4, značilo da će koncentracija štetnih tvari prisutnih u filtratu nakon provedenih pokusa biorazgradnje PS-a u iznosu od 6,13% odnosno 6,28 % izazvati štetni učinak kod 20 % populacije bakterije *Vibrio fischeri*. Niske vrijednosti EC₂₀ uočene su još i u pokusima P1-3 i P2-3, a koji se odnose na biorazgradnju PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*. Ove EC₂₀ vrijednosti mogu se povezati s CFU vrijednostima dobivenim za PS u pokusima P2-3 i P2-4 te za SP. Razlika između CFU vrijednosti PS-a u ovim pokusima i kontrolnog pokusa je velika, a 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 već u prethodnim istraživanjima potvrđeno da imaju štetnu učinak na testni organizam *V. fischeri*, niske vrijednosti EC₂₀ su očekivane.¹⁷² S druge strane, visoke vrijednosti EC₂₀ izmjerene za pokuse B1-1, B1-4, P1-1 i P2-2 ukazuju da je štetni učinak zanemariv, odnosno gotovo da ga i nema. Nadalje, TU predstavlja relativnu toksičnost. Prema literaturi¹⁷⁰ vrijednost TU-a se kategorizira kao: <1 % = netoksično; 1-40 % = otrovno; 40-100 % = vrlo otrovno; >100 % = izuzetno otrovno.¹⁷⁰ Prema izračunatim TU vrijednostima filtrati dobiveni nakon pokusa biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus cereus* u pokusima: B3-1, B1-2, B4-2, B1-3, B1-4 i B3-4 imaju toksičan učinak na izloženi testni organizam *Vibrio fischeri*. Nakon biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*, prema izračunatim TU vrijednostima, ispitani filtrati pokusa P2-1, P1-2, P1-3, P2-3, P1-4 i P2-4 pokazali su se toksičnim za testni organizam *Vibrio fischeri*. Najveći toksični učinak na morsku bakteriju *Vibrio fischeri* uočen je u pokusu B3-4 i P2-4. Usporedbom EC₂₀ vrijednosti za pokuse biorazgradnje PS-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*, utvrđeno je da su u većem broju pokusa biorazgradnje PS-a bakterijama *Pseudomonas alcaligenes* EC₂₀ vrijednosti niže. Nadalje, i izračunate niske TU vrijednosti za pokuse u kojima se ispitivala ekotoksičnost filtrata prilikom biorazgradnje PS-a, pokazuju da bakterija *Pseudomonas alcaligenes* uspješnije razgrađuje PS u odnosu na *Bacillus cereus*. Ova pretpostavka je usko povezana s

analizama promjena ukupnog broja živih stanica bakterija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* tijekom biorazgradnje PS-a, a čiji su rezultati opisani u poglavljima 4.3.1. i 4.3.2. Naime, razlika između CFU vrijednosti PS-a i SP-a prilikom biorazgradnje PS-a bakterijama *Pseudomonas alcaligenes* je znatno veća u odnosu na razliku između CFU vrijednosti PS-a i SP-a prilikom biorazgradnje PS-a *Bacillus cereusom*. Ta razlika u CFU vrijednosti je ujedno i pokazatelj da je biorazgradnja PS-a *Pseudomonas alcaligenesom* puno intenzivnija u odnosu na biorazgradnju s *Bacillus cereusom*. Dodatno, u prilog tome i ide veći broj izraslih kolonija bakterija *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu P1-4, u odnosu na broj izraslih kolonija bakterija *Bacillus cereus* u pokusu B1-1. Povećani broj izraslih kolonija dodatno potvrđuje kako je do biorazgradnje uistinu došlo i da je PS iskorišten kao supstrat prilikom bakterijskog rasta i razmnožavanja.

Tablica 4.16. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata bakterijske suspenzije prilikom biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*.

Pokus	EC ₂₀ (B)	EC ₅₀ (B)	TU(B)	EC ₂₀ (P)	EC ₅₀ (P)	TU(P)
B1-1; P1-1	24,18	*	*	76,92	*	*
B3-1; P2-1	6,13	22,83	4,38	55,49	73,43	1,36
B1-2; P1-2	9,72	19,31	5,18	13,79	63,13	1,58
B4-2; P2-2	18,15	38,52	2,60	90,91	*	*
B1-3; P1-3	15,79	36,13	2,77	7,48	26,32	3,80
B3-3; P2-3	17,86	*	*	7,53	68,75	1,45
B1-4; P1-4	20,67	33,87	2,95	30,01	43,62	2,29
B3-4; P2-4	21,41	47,28	2,12	6,28	90,00	1,11

Prema EC₂₀ vrijednostima određenim tijekom ispitivanja ekotoksičnosti filtrata dobivenih filtracijom bakterijskih suspenzija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* nakon provedenih pokusa biorazgradnje PVC-a, utvrđeno je da su najniže EC₂₀ vrijednosti dobivene u pokusima B4-1, B2-3 i P3-2. Ovi rezultati prikazani su u **tablici 4.17**. S obzirom na veliku razliku CFU vrijednosti PVC-a u pokusu B2-3 i SP-a, a koja potvrđuje da je došlo do biorazgradnje PVC-a, niske EC₂₀ vrijednosti su u skladu s očekivanim jer, kako je već više puta spomenuto, prilikom biorazgradnje dolazi do otpuštanja aditiva s površine MP-a ili nastanka novih organskih razgradnih produkata čije je štetno djelovanje već ranije utvrđeno.¹⁷² EC₂₀ vrijednost dobivena u pokusu B2-3 iznosi 5,29 % što znači da će ova koncentracija izazvati štetni učinak kod 20 % izložene populacije *Vibrio fischeri*. S druge strane, najviše EC₂₀ vrijednosti izmjerene su u pokusima B2-2 i B4-3 te P3-1 i P4-3. Prema

izračunatim TU vrijednostima toksični učinak na morsku bakteriju *Vibrio fischeri* utvrđen je u pokusima B2-1, B4-1, B3-2, B2-3 i B4-3, B4-4 za biorazgradnju PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* te u pokusima P4-1, P3-2, P4-2, P3-3, P3-4 i P4-4 za biorazgradnju PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*. EC₂₀ vrijednosti su u većini pokusa biorazgradnje PVC-a *Bacillus cereusom* u prosjeku od 2 od 6 puta manje u odnosu na EC₂₀ vrijednosti dobivene u pokusima biorazgradnje PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*. Stoga bi se moglo pretpostaviti da je biorazgradnja PVC-a intenzivnija primjenom bakterije *Bacillus cereus* u odnosu na *Pseudomonas alcaligenes*. Izračunate TU vrijednosti za pokuse biorazgradnje PVC-a dvjema bakterijama su jako slične te nije moguće odrediti koja bakterija uspješnije razgrađuje PVC.

Tablica 4.17. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata bakterijske suspenzije prilikom biorazgradnje PVC-a *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*.

Pokus	EC ₂₀ (B)	EC ₅₀ (B)	TU(B)	EC ₂₀ (P)	EC ₅₀ (P)	TU(P)
B2-1; P3-1	7,96	36,06	2,77	48,76	*	*
B4-1; P4-1	5,48	24,22	4,13	30,92	40,01	2,50
B2-2; P3-2	22,13	*	*	14,85	35,06	2,85
B3-2; P4-2	15,63	39,87	2,51	43,58	20,68	4,84
B2-3; P3-3	5,29	23,95	4,18	26,29	52,11	1,92
B4-3; P4-3	22,99	71,39	1,40	80,13	*	*
B2-4; P3-4	31,28	*	*	35,60	20,19	4,95
B4-4; P4-4	28,82	36,31	2,75	83,33	80,00	1,25

4.7. Rezultati statističke analize varijance (ANOVA)

Eksperimentalni rezultati pokusa čiji je plan napravljen u programskom paketu *Design Expert* 7.0 prema Taguchi metodi analizirani su utvrđivanjem utjecaja određenog faktora na odgovor ovisno o tome koji se faktor razine promatra. Pomoću Taguchi metode optimiran je proces provedbe pokusa, a analizom varijance (ANOVA) provjeren je utjecaj na odziv sustava pri promjeni čimbenika.¹⁷³ Rezultati analize varijance prikazani su u **tablicama 4.18.** i **4.19.**

U **tablici 4.18.** prikazani su značajni čimbenici s pripadajućim doprinosom za procese biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*. Za biorazgradnju PS-a bakterijom *Bacillus cereus* značajnim čimbenicima pokazali su se pH-vrijednost, veličina PS-a, broj okretaja, OG i dodatak glukoze određene koncentracije. Utvrđeno je da najveći doprinos od svih dobivenih značajnih čimbenika ima pH-vrijednost koja je ključna za metabolizam biokemijskih reakcija¹³⁸ Njezin doprinosi iznosi 20,63 %, a prati ga veličina PS-a s 14,15 %. Nadalje, za biorazgradnju PVC-a bakterijom *Bacillus cereus*

značajnim čimbenicima su se pokazali pH-vrijednost, temperatura, veličina PVC-a, OG i dodatak glukoze određene koncentracije. Od svih utvrđenih značajnih čimbenika, najveći utjecaj ima veličina mikroplastičnih čestica PVC-a s doprinosom od 55,31 %. Ovaj rezultat je potvrda za pretpostavku iz *poglavlja 4.1.1.*, a koja se odnosi na to da veličina MP-a znatno doprinosi iskorištavanju MP-a kao supstrata te da veće mikroplastične čestice bolje doprinose rastu i razmnožavanju mikroorganizama, pa tako i biorazgradnji. Najveći doprinos, čak 53,21 %, prilikom biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* ima broj okretaja. Naime, brojem okretaja se regulira brzina miješanja koja omogućuje bolju aeraciju sustava osiguravajući tako dovoljnu koncentraciju otopljenog kisika kao izvor hranjivih tvari bakterijama, a koji je neophodan za rast i razmnožavanje bakterija.¹⁷⁴ Osim broja okretaja, značajnim čimbenicima su se pokazali i veličina mikroplastičnih čestica PS-a te OG. Doprinos ovih dvaju čimbenika je podjednak. Veličina PVC-a se je pokazala i najznačajnijim faktorom prilikom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*. Iznos njezina doprinosa je 62,25 %. U ovom se je slučaju značajnim pokazala i još pH-vrijednost. Nadalje, usporedbom značajnih čimbenika biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* utvrđeno je da se kod svih procesa navedenih u **tablici 4.18.** kao značajni čimbenik pojavljuje veličina MP-a.

Tablica 4.18. Značajni čimbenici s pripadajućim doprinosom za procese biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*.

Mikroorganizam	Polimer	Značajni čimbenici	Doprinos / %
<i>Bacillus cereus</i>	PS	pH-vrijednost	20,63
		Veličina MP / μm	14,15
		Broj okretaja / o/min	4,85
		OG / -	7,92
		Koncentracija glukoze / g/L	33,27
	PVC	pH-vrijednost	16,88
		Temperatura / $^{\circ}\text{C}$	17,32
		Veličina MP / μm	55,31
		OG / -	8,25
		Koncentracija glukoze / g/L	2,02
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	PS	Veličina MP / μm	15,78
		Broj okretaja / o/min	53,75
		OG / -	15,21
	PVC	pH-vrijednost	14,85
		Veličina MP / μm	62,25

U **tablici 4.19.** prikazane su eksperimentalne vrijednosti parametara provedene analize varijance (ANOVA) za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*. Parametre ANOVE uključuju: standardna devijacija, značenje, koeficijent varijacije (C.V.), koeficijent determinacije (R^2), prilagođeni R^2 , predviđeni R^2 i odgovarajuća preciznost. Standardna devijacija, σ , se općenito koristi za kvantificiranje iznosa varijacije ili disperzije vrijednosti skupa podataka. Što je ova vrijednost manja, podaci su manje raspršeni i bliži očekivanim vrijednostima.¹⁷⁵ Najmanja vrijednost standardne devijacije iznosi 0,025 i dobivena je za biorazgradnju PS-a *Bacillus cereusom* dok najveća iznosi 0,230 i dobivena je za biorazgradnju PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*. Značaj i valjanost modela procijenjeni su koeficijentom determinacije R^2 . Poželjno bi bilo da je 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 očekivanih rezultata.¹⁷⁶ Osim toga, ova vrijednost omogućuje i bolje razumijevanje vrsta interakcija između testnih varijabli u svrhu određivanja optimalnih uvjeta.¹⁷⁶ Vrijednosti koeficijenta determinacije R^2 su u

pokusima biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* gotovo jednake 1 što znači da je slaganje između eksperimentalnih i očekivanih podataka odlično. S druge strane, vrijednosti R^2 su za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* nešto niže i iznose 0,9603, odnosno 0,9662. Ovakvi rezultati upućuju na manje dobro slaganje između podataka. Međutim, s obzirom da se koeficijent determinacije povećava svakim unosom nove neovisne varijable¹⁷⁷, ne može se zaključiti da su slaganja eksperimentalnih podataka s očekivanim podacima nužno bolja prilikom biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* u odnosu na biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*. Unos novih neovisnih varijabli u sustav može lažno signalizirati o dobrom slaganju eksperimentalnih i očekivanih podataka.¹⁷⁷ Stoga je određen i prilagođeni R^2 . Prilagođeni R^2 se unosom nove varijable u sustav koja poboljšava model, povećava. Ako se u sustav unosi neovisna varijabla dolazi do smanjenja ove vrijednosti.¹⁷⁷ Dobivene vrijednosti prilagođenog R^2 i u ovom slučaju upućuje da je slaganje između eksperimentalnih i očekivanih podataka bolja kod biorazgradnje MP-a *Bacillus cereusom* u odnosu na *Pseudomonas alcaligenes*. U odnosu na vrijednosti R^2 , vrijednosti prilagođenog R^2 su se minimalno smanjile za pokuse biorazgradnje MP-a bakterijom *Bacillus cereus*, dok su se za biorazgradnju MP-a *Pseudomonas alcaligenesom* ove vrijednosti nešto više smanjile. Statistički je određen i prilagođeni R^2 koji se upotrebljava za usporedbu prikladnosti regresijskih modela koji sadrže različite brojeve neovisnih varijabli. Prilagođeni R^2 se prilagođava broju pojmova u modelu te se povećava tek kad neki od pojmova zaista poboljšava model. Ako pojam ne poboljšava model za dovoljnu količinu, ova vrijednost se smanjuje.¹⁷⁷ Prema statistički dobivenim vrijednostima prilagođenog R^2 prikazanim u **tablici 4.19.** razlika između vrijednosti ovog parametra za biorazgradnju PS-a i PVC-a *Pseudomonas alcaligenesom* je značajno pala u odnosu na biorazgradnju mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a *Bacillus cereusom*. Posljedica je to postojanja većeg broja neovisnih varijabli u pokusima s bakterijom *Pseudomonas alcaligenes*. Odgovarajućom preciznošću mjeri se odnos signala prema šumu.¹⁷⁶ Prema literaturi¹⁷⁶ poželjno je da je ova vrijednost >4 . Statistički dobivene vrijednosti odgovarajuće preciznosti su za sva 4 pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* veće od 4 što znači da su modeli odgovarajućeg signala te se mogu dalje koristiti¹⁷⁶. Koeficijent varijacije (CV) je statistička mjera disperzije podatkovnih točaka u nizu podataka oko srednje vrijednosti te predstavlja omjer standardne devijacije i srednje vrijednosti.¹⁷⁸ CV vrijednosti za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a *Bacillus cereusom* iznose 0,34 i 0,60 dok za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a *Pseudomonas alcaligenesom* iznose 3,02 i 2,21. Ovakve CV

vrijednosti su u skladu sa svim dosad dobivenim vrijednostima analiziranih parametara prilikom provedbe ANOVE, a čije vrijednosti idu na stranu biorazgradnje PS-a i PVC-a *Bacillus cereusom*.

Tablica 4.19. Eksperimentalne vrijednosti parametara analize varijance (ANOVA) za biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*.

Mikroorganizam	Polimer	σ	Meana	C.V ./ %	R^2	Prilagođeni R^2	Predviđeni R^2	Odgovarajuća preciznost
<i>Bacillus cereus</i>	PS	0,025	7,28	0,34	0,9996	0,9973	0,9756	58,746
	PVC	0,043	7,24	0,60	0,9979	0,9925	0,9656	39,599
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	PS	0,230	7,46	3,02	0,9603	0,9073	0,7176	11,398
	PVC	0,16	7,42	2,21	0,9662	0,9211	0,7594	12,363

5. ZAKLJUČAK

Kako plastika ne bi ostala zapamćena kao najveća onečišćujuća tvar u povijesti Zemlje već kao revolucionarni materijal koji je omogućio napredak kako industriji tako i društvu, posljednjih se godina intenzivno radi na rješavanju problema učinkovitog uklanjanja plastike iz okoliša. Jedna od metoda uklanjanja je i biorazgradnja primjenom mikroorganizama za koje je utvrđeno da mogu razgraditi veći broj plastike zahvaljujući enzimskom potencijalu i metaboličkim aktivnostima. Biorazgradnja se smatra ekološki prihvatljivom postupkom, te zanimljivim pristupom za rješavanje problema plastičnog otpada. Stoga su u ovom radu provedeni procesi biorazgradnje mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a primjenom bakterija *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* u svrhu utvrđivanja značajnih čimbenika za ove procese. Tijekom trajanja pokusa od 30 dana pratile su se i promjene fizikalno-kemijskih parametara te je zaključeno sljedeće:

- ✓ pH-vrijednost se tijekom 30 dana u procesima biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* nije značajnije mijenjala.
- ✓ Do biorazgradnje PS-a ili PVC-a došlo je u pokusima u kojima je razlika između CFU vrijednosti PS-a ili PVC-a i SP-a značajna. Ta razlika ukazuje da su bakterijske kulture *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* iskoristile PS odnosno PVC kao izvor ugljika.
- ✓ Kod procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus* utvrđeno je da se u kraćem roku postiže maksimalna CFU vrijednost pri $T = 25\text{ °C}$.
- ✓ Biorazgradnja PS-a bakterijama *Bacillus cereus* je intenzivnija u odnosu na biorazgradnju PVC-a što je potvrđeno višim koncentracijama IC-a.
- ✓ Biorazgradnja PVC-a bakterijama *Pseudomonas alcaligenes* je intenzivnija u odnosu na biorazgradnju PS-a što je potvrđeno višim koncentracijama IC-a.

-
- ✓ Maseni spektri PS-a i PVC-a snimljeni u danima najintenzivnije biorazgradnje primjenom *Bacillus cereusa* i *Pseudomonas alcaligenesa* pokazuju da je došlo do nestanka pojedinih ionskih oblika kao posljedica biorazgradnje PS-a i PVC-a te do nastanka novih ionskih oblika kao posljedica otpuštanja aditiva s površine mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a.
 - ✓ Na temelju promjene intenziteta pikova apsorpcijskih vrpca te broja nastanka novih i nestanka postojećih na FTIR spektrima PS-a i PVC-a, utvrđeno je da je biorazgradnja PS-a učinkovitija primjenom bakterije *Bacillus cereus* dok je primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* učinkovitija biorazgradnja PVC-a.
 - ✓ EC_{20} vrijednosti dobivene nakon biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus cereusa* i *Pseudomonas alcaligenesa* niže su za biorazgradnju bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* dok su EC_{20} vrijednosti za biorazgradnju PVC-a bakterijama *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes* niže za biorazgradnju bakterijom *Bacillus cereus*.
 - ✓ Značajni čimbenici za biorazgradnju PS-a bakterijom *Bacillus cereus* su: pH-vrijednost, veličina PS-a, broj okretaja, OG, koncentracija dodane glukoze dok su za biorazgradnju PVC-a ovom istom bakterijom značajni čimbenici su: pH-vrijednost, temperatura, veličina PVC-a, OG i koncentracija dodane glukoze.
 - ✓ Značajni čimbenici za biorazgradnju PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* su veličina PS-a, broj okretaja i OG dok su značajni čimbenici za biorazgradnju PVC-a ovom istom bakterijom pH-vrijednost i veličina PVC-a.
 - ✓ Koeficijent determinacije, R^2 , za biorazgradnju PS-a bakterijom *Bacillus cereus* iznosi 0,9996 dok za biorazgradnju PVC-a iznosi 0,9979.
 - ✓ Koeficijent determinacije, R^2 , za biorazgradnju PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* iznosi 0,9603 dok za biorazgradnju PVC-a iznosi 0,9662.
 - ✓ Statističkom analizom varijance (ANOVA) utvrđeno je bolje slaganje između eksperimentalnih i očekivanih rezultata kod pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus cereus*.

6. POPIS SIMBOLA I KRATICA

Simboli i mjerne jedinice

ω - maseni udio, %

M – molarna masa, g/mol

ρ – gustoća, kg/L

γ – masena koncentracija, g/L

d – promjer, nm

Kratice

MP - mikroplastika

PVC – poli(vinil-klorid)

PS – polistiren

PE – polietilen

PP – polipropilen

PET – poli(etilen tereftalat)

PES – poliester

PU – poliuretan

FTIR-ATR – Fourierova infracrvena spektroskopija s prigušenom totalnom refleksijom

RS – Ramanova spektroskopija

SEM – skeniranje elektronskim mikroskopom

BPA – bisfenol (A)

PBDE – polibromirani difenil eteri

ABS – akrilonitril butadien stiren

PEEK – plastični polieter eter keton

PBC – poliklorirani bifenili

PAH – policiklički aromatski ugljikovodici

HCH – heksaklorcikloheksan

DDT – diklordifeniltrikloretan

PAN – poliakrilonitril

LDPE – polietilen niske gustoće

DEHP – bis(2-etilheksil ftalat)

ROS - reaktivne kisikove vrste

ISO – Međunarodna organizacija za normizaciju, engl. *International Organization for Standardization*

OECD – Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj, engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*

HCl – solna kiselina

OCC – organoklorirani spojevi

LOEC – najniža koncentracija štetne tvari koja izaziva štetni učinak, engl. *Lowest Observed Effect Concentration*)

NOEC – najniža koncentracija štetne tvari koja ne izaziva štetni učinak, engl. *No Observed Effect Concentration*

LD₅₀ – letalna doza štetne tvari, engl. *Lethal dose*

ED₅₀ - efektivna koncentracija štetne tvari koja izaziva štetni učinak kod 50% ispitanih testnih organizama, engl. *Half maximal effective concentration*

EC₂₀ – efektivna koncentracija koja izaziva štetni učinak kod 20% ispitanih testnih organizama

UV zračenje – ultraljubičasto zračenje

H₂O₂ – vodikov peroksid

H₂SO₄ – sumporna kiselina

CO₂ – ugljikov dioksid

H₂O - voda

CH₄ – metan

PVA – poli(vinil-alkohol)

PQQ – pirolokinolin kinon

OG – optička gustoća

SDOE – statistički dizajn eksperimenata, engl. *Statistical Design of Experiments*

DOE – dizajn eksperimenata, engl. *Design od Experiments*

HA – hranjivi agar

KOH – kalijev hidroksid

NaCl – natrijev klorid

KH₂PO₄ – kalijev dihidrogenfosfat

CaCl₂ – kalcijev klorid

MgSO₄ – magnezijev sulfat

TOC - ukupni organski ugljik
TC – ukupni ugljik
IC - anorganski ugljik
CFU – broj živih stanica bakterija
SP – slijepa proba
HPLC/MS – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti/masena spektrometrija
Li⁺ - litijev ion
Na⁺ - natrijev ion
NH₄⁺ - amonijev ion
K⁺ - kalijev ion
Mg²⁺ - magnezijev ion
Ca²⁺ - kalcijev ion
F - fluoridni ion
Cl⁻ - kloridni ion
NO₂⁻ - nitritni ion
Br⁻ - bromidni ion
NO₃⁻ - nitratni ion
PO₄³⁻ - fosfatni ion
SO₄²⁻ - sulfatni ion
ATP – adenzin trifosfat
PEG - polietilen glikol
FDA – Uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)
SLS - natrijeva lauril sulfata
SLES - natrijeva lauret sulfata
EU – Europska Unija
TBA - tetrabutilamonij
TPP - trifenil fosfat
C.V. – koeficijent varijacije, (engl. *Coefficient of variation*)
σ - Standardna devijacija
R² – koeficijent determinacije, (engl. *Coefficient of determination*)

Indeksi

°C – Celzijev stupanj

7. LITERATURA

1. Alimba, C. G., Faggi, C., Microplastics in the marine environment: current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile, *Environmental Toxicology and Pharmacology* **68** (2019) 61–74.
2. <https://www.nationalgeographic.com/science/article/plastic-produced-recycling-waste-ocean-trash-debris-environment> pristup 14. lipnja 2021. godine Wastewater Treatment, *American Journal of Analytical Chemistry* **5** (2014) 828-837.
3. <https://www.condorferries.co.uk/plastic-in-the-ocean-statistics> pristup 15. lipnja 2021. godine
4. Shim, W. J., Hong, S. H., Eo, S., Marine Microplastics: Abundance, Distribution, and Composition u *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*, Amsterdam **238** (2018) 894-902.
5. Walpitagama, M., Carve, M., Douek, A. M., Trestrail, C., Bai, Y., Kaslin, J., Wlodkowic, D., Additives migrating from 3D-printed plastic induce developmental toxicity and neuro-behavioural alterations in early life zebrafish (*Danio rerio*) *Aquatic Toxicology* **213** (2019) 105227.
6. Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Iqbal, M., *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review, *Science of The Total Environment* **626** (2018) 1295–1309.
7. Das, R. N., Roy, K., Predictive modeling studies for the ecotoxicity of ionic liquids towards the green algae *Scenedesmus vacuolatus*, *Chemosphere* **104** (2014) 170–176.
8. Lee, B. Y., Choi, B. S., Kim, M. S., Park, J. C., Jeong, C. B., Han, J., Lee, J. S., The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*: A potential use for freshwater molecular ecotoxicology, *Aquatic Toxicology* **210** (2019) 69–84.
9. Nishimura, Y., Inoue, A., Sasagawa, S., Koiwa, J., Kawaguchi, K., Kawase, R., Maruyama, T., Kim, S., Tanaka, T., Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing, *Congenital Anomalies* **56** (2016) 18–27.
13. Li, M., Yang, Y., Xie, J., Xu, G., Yu, Y., In-vivo and in-vitro tests to assess toxic mechanisms of nano ZnO to earthworms, *Science of The Total Environment* **687** (2019) 71-76.
14. Park, S. Y., Kim, C., G., Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site, *Chemosphere* **222** (2019) 527-533.

-
15. Yuan, J., Ma, J., Yiran, S., Zhou, T., Zhao, Y., Yu, F., Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics, *Sci. Total Environ.* 715 (2020)1-9.
 16. Das, G., Bordoloi, N. K., Rai, S. K., Mukherjee, A. K., Karak, N., Biodegradable and biocompatible epoxidized vegetable oil modified thermostable poly(vinyl chloride): thermal and performance characteristics post biodegradation with *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp., *J. Hazard. Mater* **209-210** (2012) 434 – 442.
 17. Esmaceli, A., Pourbabaee, A. A., Alikhani, H. A., Shabani, F., Esmaceli, E., Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in soil, *PLoS One* **8(9)** (2013) e71720.
 18. Munir, E., Harefa, R. S. M., Priyani, N., Suryanto, D., Plastic degrading fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* isolated from local landfill soil in Medan, *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* **126** (2018) 1-7.
 19. Klein, S., Dimzon, I. K., Eubeler, J., Knepper, T. P., Analysis, Occurrence, and Degradation of Microplastics in the Aqueous Environment, Freshwater Microplastics, *Hdb. Env. Chem.* **58** (2017) 51-67.
 20. Kumar, R., V., Kanna, G. R. Elumalai, S., Biodegradation of Polyethylene by Green Photosynthetic Microalgae, *J Bioremediat Biodegrad*, **8(1)** (2017) 1-8.
 21. Crawford, C. B., Quinn, B., Microplastics, standardisation and spatial distribution i The interactions of microplastics and chemical pollutants, u: *Microplastic Pollutants*, Amsterdam (2017) 101–130, 131–157.
 22. Carpenter, E. J., Smith, K. L., Plastics on the Sargasso Sea surface, *Science* **175** (1972) 1240–1241.
 23. Chubarenko, I., Bagaev, A., Zobkov, M., Esiukova, E., On some physical and dynamical properties of microplastic particles in marine environment, *Marine Pollution Bulletin* **108** (2016) 105–112.
 24. Sun, J., Dai, X., Wang, Q., van Loosdrecht, M. C. M., Ni, B. J., Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal, *Water Research* **152** (2019) 21–37.
 25. Saroglia, M., Gai, F., Labra, M., Rivolo, P., Prearo, M., Terova, G., ACQUACOLTURA INTENSIVA E PLASTICHE: UN PROBLEMA CONTROLLABILE?, *Aqua farm*, Pordenone, Italy (2019) 13-14.
 26. Sherrington, C., Darrah, C., Hann, S., Cole, G., Corbin, M., Microplastics in Cosmetics Products u Study to support the development of measures to combat a range of marine litter sources, Report for the European Commission DG Environment (2016) 201-292.

-
27. Rogić, A., Čatić, I., Godec, D., Polimeri i polimerne tvorevine, Zagreb, 2008.
 28. Andrady, A.L., Microplastics in the marine environment, *Mar. Pollut. Bul.*, **62** (2011) 1596-1605.
 29. Bule, K., Ekotoksikološki učinci mikroplastike na okolišne organizme, rad za Rektorovu nagradu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020.
 30. Kratofil Krehula, Lj., Degradacija i modifikacija polimera, 4. Predavanje: Modifikacije polimera, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016/2017.
 31. Satterthwaite, K., Plastics Based on Styrene u: Gilbert, M., *Brydson's Plastics Materials* (2017) 61–62, 311–328.
 32. Bedeniković, Z., Razvoj plastične ambalaže za pakiranje medicinskog proizvoda, diplomski rad, Fakultet strojastva i brodogradnje, Zagreb, 2017.
 33. <https://pravimajstor.hr/katalog/45240288/stiropor-xps-3-cm> pristup 29. svibnja 2021. godine
 34. McKeen, L. W., Plastics Used in Medical Devices u: Modjarrad, K., Ebnesajjad, S., *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices* (2014) 21–53.
 35. Leadbitter, J., Polyvinyl Chloride (PVC) for Food Packaging Applications u *Packaging Materials*, , ILSI Europe Report Series, Belgija, 2015.
 36. Akovali, G., Plastic materials: polyvinyl chloride (PVC), u: Pacheco-Torgal, F., Jalali, S., Fucic, A., *Toxicity of Building Materials*, Turska (2012) 23–53.
 37. Sastri, V. R., Commodity Thermoplastics, u: Sastri, V. R., *Plastics in Medical Devices*, (2010) 73–119.
 38. Blackley, D. C., Plasticised Polyvinyl Chloride (PVC) u *Synthetic Rubbers: Their Chemistry and Technology* (1983) 244–269.
 39. <https://www.multivario.hr/proizvod/mekane-prozirne-pvc-folije-polikristal/> pristup 23. svibnja 2021. godine
 40. <https://www.jeftinije.hr/Proizvod/2817230/nesortirano/nesortirano-ostalo/ostalo-nesortirano/pvc-ambalaza-za-jaja-mat-bijela> pristup 23. svibnja 2021. godine
 41. Nguyen, T., Evaluation of environmental conditions on the sorption of PAHs onto synthetic and natural fibres, Master's thesis in Environmental Toxicology and Chemistry, Norwegian University of Science and Technology, Norveška, 2019.
 42. Cherif Lahimer, M., Ayed, N., Horriche, J., Belgaied, S., Characterization of plastic packaging additives: Food contact, stability and toxicity, *Arabian Journal of Chemistry* **10** (2017) 1938–1954.

-
43. Li, H. X., Getzinger, G. J., Ferguson, P. L., Orihuela, B., Zhu, M., Rittschof, D., Effects of toxic leachate from commercial plastics on larval survival and settlement of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*, *Environmental Science & Technology*, **50** (2016) 924–931.
44. https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/expert-groups/scientific-committees/scientific-committee-food-archive_en pristup 25. svibnja 2021. godine.
45. https://e-brojevi.udd.hr/e_brojevi.htm pristup 25. svibnja 2021. godine.
46. Rodríguez-Seijo, A., Pereira, R., Morphological and Physical Characterization of Microplastics, *Comprehensive Analytical Chemistry* **75** (2017) 49–66.
47. Kukulka, T., Proskurowski, G., Morét-Ferguson, S., Meyer, D.W., Law, K.L., The effect of wind mixing on the vertical distribution of buoyant plastic debris, *Geophys. Res. Lett.* **39**(7) (2012) 1-6.
48. Isobe, A., Kubo, K., Tamura, Y., Kako, S., Nakashima, E., Selective transport of microplastics and mesoplastics by drifting in coastal waters, *Mar. Pollut. Bull.*, **89** (2014) 324–330.
49. Silva, A. B., Costa, M. F., Duarte, A. C., Biotechnology advances for dealing with environmental pollution by micro(nano)plastics: Lessons on theory and practices, *Current Opinion in Environmental Science & Health* **1** (2018) 30–35.
50. Barletta, M., Lima, A. R. A., Costa, M. F., Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries, *Science of The Total Environment* **651** (2019) 1199–1218.
51. Li, J., Zhang, K., Zhang, H., Adsorption of antibiotics on microplastics, *Environmental Pollution* **237** (2018) 460–467.
52. Chang, S., Zhou, X., Xing, Z., Tu, T. Probing polarity of flame retardants and correlating with interaction between flame retardants and PET fiber, *Journal of Colloid and Interface Science* **498** (2017) 343–350.
53. Rochman, C. M., Hentschel, B. T., Teh, S. J., Long-Term Sorption of Metals Is Similar among Plastic Types: Implications for Plastic Debris in Aquatic Environments, *PLoS ONE* **9**(1) (2014) 1–9.
54. Laskar, N., Kumar, U., Plastics and microplastics: A threat to environment, *Environmental Technology & Innovation* **14** (2019) 100352.
55. <https://www.darrinqualman.com/global-plastics-production/> pristup 27. svibnja 2021. godine.

-
56. Waldschläger, K., Lechthaler, S., Stauch, G., Schüttrumpf, H., The way of microplastic through the environment – Application of the source-pathway-receptor model (review), *Science of the Total Environment* **713** (2020) 1-20.
57. He, P., Chen, L., Shao, L., Zhang, H., Lü, F., Municipal solid waste (MSW) landfill: A source of microplastics? -Evidence of microplastics in landfill leachate, *Water Research* **159** (2019) 38–45.
58. Hall, R.O., Meyer, J. L., The trophic significance of bacteria in a detritus-based stream food web, *Ecology* **79** (1998) 1995-2012.
59. Zhang, K., Shi, H., Peng, J., Wang, Y., Xiong, X., Wu, C., Microplastic pollution in China's inland water systems: A review of findings, methods, characteristics, effects, and management, *Science of The Total Environment* **630** (2018) 1641–1653.
60. Galgani, F., Barnes, D., Deudero, S., Marine litter in the Mediterranean and Black Seas – Executive Summary, *Marine litter in the Mediterranean and Black Seas* **46** (2014) 7-20.
61. Galgani, F., Leaute, J., Moguedet, P., Litter on the Sea Floor Along European Coasts, *Marine Pollution Bulletin* **40** (2000) 516-527.
62. A. Bobanović, Karakterizacija mikroplastičnog otpada iz sedimenta hrvatskih plaža, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2019.
63. Erceg, M., Tutman, P., Bojanić Varezić, D., Bobanović, A. Karakterizacija mikroplastike u sedimentu plaže Prapratno, *Kem. Ind.* **69** (5-6) (2020) 253–260.
64. Wu, P., Huang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Zhang, Y., He, F., Chen, H., Quan, G., Yan, J., Li, T., Gao, B., Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **184** (2019) 1-16.
65. Blaesing, M., Amelung, W., Plastics in soil: Analytical methods and possible sources, *Sci. Total Environ.* **612** (2018) 422-435.
66. Lwanga, E. H., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salánki, T., van der Ploeg, M., Besseling, E., Koelmans, A. A., Geissen, V., Microplastics in the Terrestrial Ecosystem: Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae), *Environ. Sci. Technol.* **50**(5) (2016) 2685-2691.
67. Murphy, J., Additives for Plastics Handbook, Elsevier, 2001.
68. . Qi, Y., Yang, X., Pelaez, A. M., Huerta Lwanga, E., Beriot, N., Macro- and microplastics in soil-plant system: Effects of plastic mulch film residues on wheat (*Triticum aestivum*) growth, *Science of The Total Environment* **645** (2018), 1048–1056.
69. Zhang, Q., Zhao, Y., Du, F., Cai, H., Microplastic fallout in different indoor environments, *Environ. Sci. Technol.* **54** (2020) 6530-6539.
-

-
70. Dris, R., Gasperi, J., Mirande, C., Mandin, A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments, *Environ. Pollut.* **221** (2017) 453-458.
71. Vianello, A., Jensen, R.L., Liu, L., Vollertsen, J., Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a Breathing Thermal, *Manikin. Sci. Rep.* **9** (2019) 8670.
72. Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C., Tassin, B., Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment?, *Marine Pollution Bulletin* **104** (2016) 1–2.
73. Carbery, M., O'Connor, W., Palanisami, T., Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health, *Environment International* **115** (2018) 400–409.
74. Gasperi, J., Wright, S. L., Dris, R., Collard, F., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., Kelly, F. J., Tassin, B., Microplastics in air: Are we breathing it in? *In Current Opinion in Environmental Science and Health* **1** (2018) 1-5.
75. Deville, S., Penjweini, R., Smisdom, N., Notelaers, K., Nelissen, I., Hooyberghs, J., Ameloot, M., Intracellular dynamics and fate of polystyrene nanoparticles in A549 Lung epithelial cells monitored by image (cross-) correlation spectroscopy and single particle tracking, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1853** (10) (2015) 2411-2419.
76. Jayabalan, J., Mani, G., Krishnan, N., Pernabas, J., Devadoss, J. M., Jang, H. T., Green biogenic synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Pseudomonas putida* culture and its In vitro antibacterial and anti-biofilm activity, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **21** (2019) 1-9.
77. Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Heyder, J., Gehr, P., Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells, *Environmental Health Perspectives* **113** (2005) 1555-1560.
78. Yu, Q., Hu, X., Yang, B., Zhang, G., Wang, J., Ling W., Distribution, abundance and risks of microplastics in the environment, *Chemosphere* **249** (2020) 1-12.
79. Mason, S. A., Welch, V. G., Neratko, J., Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water, *Frontiers in Chemistry* **6** (2018) 1-11.
80. Kreyling, Wolfgang G., Semmler-Behnke, M., Seitz, J., Scymczak, W., Wenk, A., Mayer, P., Takenaka, S., Oberdrster, G., Size dependence of the translocation of inhaled 20 iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs, *Inhalation Toxicology* **21** (2009) 55–60.

-
81. Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T., Environmental exposure to microplastics: an overview on possible human health effects, *Science of The Total Environment* **702** (2019) 1-32.
82. <http://www.glas.hr/380037/16/Mikroplastika-pronadjena-u-ljudskom-tijelu> pristup 29. svibnja 2021. godine.
83. Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., Toxic potential of materials at the nanolevel, *In Science* **311** (2006) 622-627.
84. Bakir, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions, *Environmental Pollution* **185** (2014) 16-23.
85. Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., Thompson, R. C., Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Environmental Science and Technology* **42** (2008) 5026-5031.
86. Lithner, D., Larsson, A., Dave, G., Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition, *Sci. Total. Environ.* **409** (2011) 3309-3324.
87. Tickner, J. A., Schettler, T., Guidotti, T., McCally, M., Rossi, M., Health risks posed by use of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: A critical review, *American Journal of Industrial Medicine* **39** (2001) 100-111.
88. Mariana, M., Feiteiro, J., Verde, I., Cairrao, E., The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review, *Environment International* **94** (2016) 758-776.
89. <https://recipe-cpsa.com/endokrini-disruptori-u-kozmetickim-proizvodima/> pristup 29. svibnja 2021. godine.
90. Kapetanović, L., Utjecaj mikroplastike na okoliš i ljudsko zdravlje, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, završni-seminarski rad, Zagreb, 2020.
91. International-Standard (ISO 11348), Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test), 2007.
92. International-Standard (ISO 19040-1), Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water — Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*), 2018.
93. OECD, Guideline for Testing of Chemicals, 201. Alga, Growth Inhibition Test, 1984.

-
94. International-Standard (ISO 21115), Water quality — determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1), 2019.
95. Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Schnekenburger, J., Kanno, J. Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo, *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials* **3** (2017) 51–82.
96. Worth, A. P., Types of Toxicity and Applications of Toxicity Testing, u: M. Balls, R. Combes, A. P. Worth, *The History of Alternative Test Methods in Toxicology*, London (2019) 7–10.
97. <https://ecologycenter.org/factsheets/adverse-health-effects-of-plastics/> pristup 30. svibnja 2021. godine
98. Lin, Y.-S. & Haynes, C. L. Impacts of mesoporous silica nanoparticle size, pore ordering, and pore integrity on hemolytic activity, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 4834–4842.
99. Hwang, J., Choi, D., Han, S., Jung, S. Y., Choi, J., Hong, J., Potential toxicity of polystyrene microplastic particles, *Scientific Reports* **10** (2020) 7391.
100. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* **26** (2008) 246 – 265.
101. Eaton, D. L., Gilbert, S. G., Principles of Toxicology i Faustman, E. M., Omenn, G. S., Risk Assessmentu, u: Klaassen, C. D., *Toxicology*, 8th **133** (2013) 13–49.
102. Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C., Predictive Ecotoxicology and Environmental Assessment, *Aquatic Ecotoxicology* **19** (2015) 463–496.
103. Ruby, E.G., McFall-Ngai, M.J., Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri*, *Trends Microbiol.* **7**(10) (1999) 414–420.
104. Borojević, T., Ašperger, D., Dolar, D. Određivanje toksičnosti ksenobiotika u vodi, *Kem. Ind.* **67**(13) (2018) 135-142.
105. Perović, K., Određivanje toksičnosti antiparazitika i antibiotika u vodi bakterijama *Vibrio fischeri*, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.
106. Heinlaan, M., Kasemets, K., Aruoja, V., Blinova, I., Bondarenko, O., Lukjanova, A., Khosrovyan, A., Kurvet, I., Pullertis, M., Sihtmäe, M., Vasiliev, G., Vija, H., Kahru, A., Hazard evaluation of polystyrene nanoplastic with nine bioassays did not show particle-specific acute toxicity, *Science of the Total Environment* **707** (2020) 1-7.
107. Lithner, D., Nordensvan, I., Dave, G., Comparative acute toxicity of leachates from plastic products made of polypropylene, polyethylene, PVC, acrylonitrile–butadiene–styrene, and epoxy to *Daphnia magna*, *Environ Sci Pollut Res* **19** (2012) 1763–1772.

-
108. Eubeler, J. P., Zok, S., Bernhard, M., Knepper, T. P., Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures, *TrAC Trends Anal. Chem.* **28** (9) (2009) 1057 – 1072.
109. Klein, S., Dimzon, I.K., Eubeler, J., Knepper, T.P., Analysis, Occurrence, and Degradation of Microplastics in the Aqueous Environment u *Freshwater Microplastics*, Hdb. Env. Chem. **58** (2017) 51-67.
110. Ng, E. L., Huerta Lwanga, E., Eldridge, S. M., Johnston, P., Hu, H-W., Geissen, V., Chen, D., An overview of microplastic and nanoplastic pollution in agroecosystems, *Sci. Total Environ.* **627** (2018) 1377 – 1388.
111. Andrady, A. L., Pegram, J. E., Song, Y., Studies on enhanced degradable plastics. II. Weathering of enhanced photodegradable polyethylenes under marine and freshwater floating exposure, *J. Environ. Polym. Degrad.* **1**(2) (1993) 117 – 126.
112. Anderson, D. A., Freeman, E. S., The kinetics of the thermal degradation of polystyrene and polyethylene, *J. Polym. Sci.* **54** (159) (1961) 253 – 260.
113. McNeill, I. C., Leiper, H. A., Degradation studies of some polyesters and polycarbonates-2. Polylactide: degradation under isothermal conditions, thermal degradation mechanism and photolysis of the polymer, *Polym. Degrad. Stab.* **11**(4) (1985) 309 – 326.
114. Kooi, M., Besseling, E., Kroeze, C., van Wezel, A. P., Koelmans, A. A., Modeling the fate and transport of plastic debris in freshwaters: review and guidance u: *Freshwater Microplastics*, Hdb. Env. Chem. **58** (2017) 125-152.
115. Zhao, S., Danley, M., Ward, J. E., Li, D., Mincer, T. J., An approach for extraction, characterization and quantitation of microplastic in natural marine snow using Raman microscopy, *Anal. Methods* **9** (9) (2017) 1470 – 1478.
116. Imhof, H. K., Schmid, J., Niessner, R., Ivleva, N. P., Laforsch, C., A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments, *Limnol Oceanogr. Meth.* **10** (7) (2012) 524 – 537.
117. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* **26** (2008) 246 – 265.
118. Nester, E. W., Anderson, D. G., Evans Roberts Jr., C., Pearsall, N. N., Nester, M. T., Microbiology: a human perspective, 4th edition, McGraw – Hill Companies Inc, United States **104** (2004) 797.
119. Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., Aiba, S., Biodegradability of plastics, *International Journal of Molecular Sciences* **10** (2009) 3722 – 3742.

-
120. Rummel, C. D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kuhnel, D., Schmitt-Jansen, M., Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment, *Environ Sci Technol* **4** (2017) 259–267.
121. Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., Aiba, S., Biodegradability of plastics, *International Journal of Molecular Sciences* **10** (2009) 3722 – 3742.
122. Rummel, C. D., Jahnke, A., Gorokhova, E., Kuhnel, D., Schmitt-Jansen, M., Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment, *Environ Sci Technol* **4** (2017) 259–267.
123. <https://velikirecnik.com/2016/12/27/mikroorganizmi/> pristup 5. lipnja 2021. godine.
124. <http://www.vistpro.com/hr/proizvodi/polimeri> pristup 5. lipnja 2021. godine.
125. <https://hr.sodiummedia.com/4168922-nutrient-media-in-microbiology> pristup 5. lipnja 2021. godine.
126. Orhan, Y., Hrenović, J., Büyükgüngör, H., Biodegradation of plastic compost bags under controlled soil conditions, *Acta Chim. Slov.* **51** (2004) 579 – 588.
127. Shima, M., Biodegradation of plastics, *Curr Opin Biotechnol* **12** (2001) 242–247.
128. Alshehri, F., Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms, *Journal of Applied & Environmental Microbiology* **5** (2017) 8-19.
129. Patil, R. C., Screening and Characterization of Plastic Degrading Bacteria from Garbage Soil, *British Journal of Environmental Sciences* **6**(4) (2018) 33-40.
130. Begum, M. A., Varalakshmi, B., Umamageswari, K., Biodegradation of Polythene Bag using Bacteria Isolated from Soil, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **4**(11) (2015) 674-80.
131. Helen, A. S., Uche, E. C., Hamid, F.S., Screening of Polyethylene Degradation Potential of Bacteria Isolated from Mangrove Ecosystems in Peninsular Malaysia, *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* **7**(4) (2017) 245-251.
132. Asmita, K., Shubhamsingh, T., Tejashree, S., Isolation of Plastic Degrading Microorganisms from Soil Samples Collected at Various Locations in Mumbai, India, *International Research of Environmental Sciences* **4**(3) (2015) 77-85.
133. Kovačević, A., Utjecaj fizikalno – kemijskih parametara na biorazgradnju mikroplastike, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020.
134. Kovačević, A., Lovrinčić, E., Biorazgradnja bisfenola A u vodi, rad za Rektorovu nagradu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2018.

-
135. Hou, L., Majumder, E. L. W., Potential for and Distribution of Enzymatic Biodegradation of Polystyrene by Environmental Microorganisms, *Materials* **14**(3) (2021) 503.
136. Silva, M. B., Carneiro, L., M., Alves Silva, J. P., dos Santos Oliveira, I., Filho, H. J. I., de Oliveira Almeida, C. R., An Application of the Taguchi Method (Robust Design) to Environmental Engineering: Evaluating Advanced Oxidative Processes in Polyester-Resin Wastewater Treatment, *American Journal of Analytical Chemistry* **5** (2014) 828-837.
137. Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Kishore Sakharkar, M., Lim, C. S., Sakharkar, K. R., Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species, *Indian. J. Microbiol.* **52**(3) (2012) 411 – 419.
138. Duraković, S., Primjenjena mikrobiologija, Durieux, Zagreb, 1996.
139. Rujnić-Sokele, M., Plastični otpad – globalni ekološki problem, *Polimeri* **36** (1-2) (2015) 35-37.
140. Shahnawaz, M., Sangale, M. K., Ade, A. B., Bacteria as Key Players of Plastic Bioremediation u Bioremediation Technology for Plastic Waste, 5. Poglavlje, , Springer, India, (2019) 46-67.
141. Findrik Blažević, Z., Bioreakcijska tehnika I, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
142. Vuleta, H., Mikrobiološka dijagnostika infekcija u jedinicama intenzivnog liječenja, diplomski rad, Medicinski fakultet, Zagreb, 2015.
143. Ho, B. T., Roberts, T. K., Lucas, S., An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach, *Critical Reviews in Biotechnology* **38** (2018) 308-320.
143. Auta, H.S., Emenike, C.U., Fauziah, S.H., Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions, *Environment International*, **102** (2017), 165 – 176.
144. Kumari, A., Chaudhary, D. R., & Jha, Destabilization of polyethylene and polyvinylchloride structure by marine bacterial strain, *Environmental Science and Pollution Research* **26**(2) (2019) 1507-1516.
145. Wilkes, R.A., Aristilde, L., Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges, *J. Appl. Microbiol.* **123**(3) (2017) 582 – 593.

-
146. Asmita K, Shubhamsingh T, Tejashree S., Isolation of Plastic Degrading Microorganisms from Soil Samples Collected at Various Locations in Mumbai, India, *International Research of Environmental Sciences* **4**(3) (2015) 77-85.
147. Ali Abu Hamrah, S. A., A study on biodegradation of plastic by using microorganisms isolated from different soil samples, *Int. j. appl. res.* **5**(5) (2019) 258 – 260.
148. Gewert, B., Plassmann, M. M., MacLeod, M., Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment, *Environ. Sci.: Processes Impacts* **17** (2015) 1513-1521.
149. Devi, R. S., Kannan, V. R., Natarajan K., Nivas, D., Kannan, K., Chandru, S., Antony, A. R., The role of microbes in plastic degradation u: Environmental Waste Management (2015) 341-370.
150. Galgali, P., Varma, A. J., Puntambekar, U. S., Gokhale, D. V., Tokiwa, Y., Fan, H., Hiraguri, Y., Kurane, R. et al., Towards biodegradable polyolefins: strategy of anchoring minute quantities of monosaccharides and disaccharides onto functionalized polystyrene, and their effect on facilitating polymer biodegradation, *Chem Commun* **33** (2002) 2884-2885.
151. Mohan, A. J., Sekhar, V. C., Bhaskar, T., Nampoothiri, K. M., Microbial assisted shigh impact polystyrene (HIPS) degradation, *Bioresour Technol* **213** (2016) 204-2017.
152. Muthukumar, A., Veerappapillai, S., Biodegradation of Plastics – A Brief Review, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **31**(2) (2015) 204-209.
153. Klrbas, Z., Keskin, N., Güner, A. Biodegradation of Polyvinylchloride (PVC) by White Rot Fungi, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **63** (1999) 335-342.
154. Visco, G., Campanella, L., Nobili, V., Organic carbons and TOC in waters: an overview of the international norm for its measurements, *Microchemical Journal* **79** (2005) 185–191.
155. Bisutti, I., Hilke, I., Raessler, M., Determination of total organic carbon – an overview of current methods, *TrAC* **23** (2004) 10 – 11.
156. Papić, S., Deterdženti, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
157. Keller, B., Sui, J., Young, A. B., Whittal, R. M., Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* **627**(1) (2008) 71-81.
-

-
158. Wenande, E., Garvey, L. H., Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review, *Clinical and Experimental Allergy* **46**(7) (2016) 907–22.
159. <https://zdravlje.gov.hr/o-ministarstvu/djelokrug-1297/javnozdravstvena-zastita/predmeti-opce-uporabe-1358/deterdzentima-1898/1898> pristup 15. kolovoza 2021. godine.
160. <https://www.in-portal.hr/in-portal-news/vijesti/6106/alarmantno-opasne-kemikalije-u-komercijalnim-deterdzentima-koje-truju-vas-i-vasu-obitelj> pristup 15. kolovoza 2021. godine.
161. Shen, H. Y., Simultaneous screening and determination eight phthalates in plastic products for food use by sonication-assisted extraction/GC-MS methods, *Elsevier* (2005) 734–739.
162. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sial/p1379> pristup 15. kolovoza 2021. godine.
163. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/p1629> pristup 15. kolovoza 2021. godine.
164. Kawamura, Y., Tagai, C., Maehara, T., Yamada, T., Additives in Polyvinyl Chloride and Polyvinylidene Chloride Products, *Food Hygiene and Safety Science* **40** (1999) 274-284.
165. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=60824> pristup 16. kolovoza 2021. godine.
166. Jung, M. R., Horgen, F. D., Orski, S. V., Rodriguez, C. V., Beers, K. L., Balazs, G. H., Jones, T. T., Work, T. M., Brignac, K. C., Royer, S.-J., Hyrenbach, K. D., Jensen, B. A., Lynch, J. M., Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms, *Marine Pollution Bulletin* **127** (2018) 704–716.
167. Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., Ragadhita, R., How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material, *Indonesian Journal of Science & Technology* **4**(1) (2019) 97-118.
168. Subramani, M., Sepperumal, U., FTIR analysis of bacterial mediated chemical changes in Polystyrene foam, *Ann. Biol. Res.* **7**(5) (2016) 55 – 61.
169. Park, E. J., Lee, S. Y., Canlier, A., & Hwang, T. S., Controlled Dehydrochlorination of Poly(vinyl chloride) for Fabrication of Membranes with Polyacetylene-Like Structure: XPS Analysis and Ion Exchange Membrane Discussion, *Macromolecular Research* **27** (2019) 33-47.

-
170. Ledda, C., Rapisarda, V., Bracci, M., Proietti, L., Professional exposure to basaltic rock dust: assessment by the *Vibrio fischeri* ecotoxicological test, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* **8**(23) (2013) 1-5.
171. Kučić-Grgić, D., Ekotoksikologija, 5. predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2019./2020.
172. Wei, S., Wang, F., Chen, Y., Lan, T., & Zhang, S., The joint toxicity effect of five antibiotics and dibutyl phthalate to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*), *Environmental Science and Pollution Research*, **25** (2018) 26504-26511.
173. Crnjac, M., Gjedlum, N., Bilić, B., The application of Taguchi method for choosing the optimal table construction, International conference “Mechanical Technologies and Structural Materials”, MTSM2017, Split, 21-22.09.2017.
174. Vrsalović Presečki, A., Bioreakcijska tehnika II, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2013.
175. Bland, J. M., Altman, D. G., Statistics notes; measurement error, *BMJ* **312** (1996) 1654.
176. Kizhakedathil, M. P. J., Chandrasekaran, S. D., Media optimization for extracellular amylase production by *Pseudomonas balearica* vitps19 using response surface methodology, *Frontiers in Biology* **13**(2) (2018) 123-129.
177. <https://statisticsbyjim.com/regression/interpret-adjusted-r-squared-predicted-r-squared-regression/> pristup 19. kolovoza 2021. godine.
178. <https://www.investopedia.com/terms/c/coefficientofvariation.asp> pristup 19. kolovoza 2021. godine