

Ispitivanje značajnih čimbenika za biorazgradnju polistirena i poli(vinil-klorida) bakterijom *Delftia acidovorans*

Ružaj, Lucija

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:149:056799>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**



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

Lucija Ružaj

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Ružaj

ISPITIVANJE ZNAČAJNIH ČIMBENIKA ZA BIORAZGRADNJU
POLISTIRENA I POLI(VINIL-KLORIDA) BAKTERIJOM *Delftia*
acidovorans

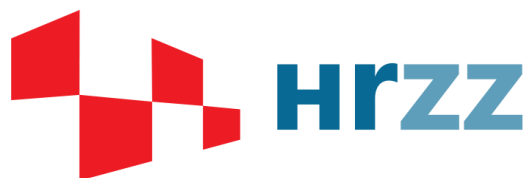
DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

- 1. doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić**
- 2. izv. prof. dr. sc. Šime Ukić**
- 3. dr. sc. Matija Cvetnić**

Zagreb, rujan 2021.



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

ZAHVALA

Veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na pristupačnosti, strpljenju, stručnosti i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Svojom pozitivnošću i predanošću radu uveliko je utjecala na moju motivaciju da ovaj diplomski rad učinim što boljim.

Zahvaljujem se asistentici Martini Miloloži, mag. ing. oecoing., na nesebičnoj pomoći, otvorenosti i savjetima kojima je značajno olakšala i pozitivno obilježila moj boravak u laboratoriju.

Najveće zahvale primaju moji roditelji i brat koji su tijekom 5 godina studiranja bili moja najveća potpora u teškim i u sretnim trenucima. Hvala vam što ste me svojim savjetima i bezuvjetnom ljubavlju stalno pratili, bez vas, ova diploma ne bi bila ostvariva.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima i prijateljicama, posebice Mateji i Sari te svojim prijateljima iz Međimurja koji su već dugi niz godina uz mene, vaša pozitivna i činjenica da se uvijek mogu osloniti na vas uveliko je uljepšala i obilježila moje studentske dane.

Na kraju, ali ne i manje bitnom, zahvaljujem se svojem dečku Nikoli što je u svakom trenutku uz mene i pruža bezuvjetnu podršku neovisno o situaciji.

Veliko HVALA svima!

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. OPĆI DIO | 3 |
| 2.1. Vrste mikroplastike | 3 |
| 2.2. Mikroplastika u okolišu..... | 5 |
| 2.2.1. Mikroplastika u vodenom mediju | 5 |
| 2.2.2. Mikroplastika u tlu..... | 8 |
| 2.2.3. Mikroplastika u zraku | 9 |
| 2.3. Postupci određivanja mikroplastike u okolišu | 9 |
| 2.3.1. FTIR..... | 10 |
| 2.3.2. Raman spektroskopija..... | 12 |
| 2.3.3. SEM | 13 |
| 2.3.4. HPLC | 14 |
| 2.3.5. GS/MS | 14 |
| 2.4. Uklanjanje mikroplastike iz vodenog medija..... | 15 |
| 2.4.1. Abiotička razgradnja..... | 15 |
| 2.4.1.1. Termička razgradnja..... | 15 |
| 2.4.1.2. Mehanička razgradnja | 15 |
| 2.4.1.3. Kemijska razgradnja | 15 |
| 2.4.2. Biotička razgradnja | 17 |
| 2.4.2.1. Mehanizam biorazgradnje..... | 18 |
| 2.4.2.2. Biorazgradnja MP-a primjenom bakterije roda <i>Bacillus</i> | 19 |
| 2.4.2.3. Biorazgradnja MP-a primjenom bakterije roda <i>Rhodococcus</i> | 21 |
| 2.4.2.4. Biorazgradnja MP-a primjenom bakterije roda <i>Pseudomonas</i> | 22 |
| 2.4.2.5. Biorazgradnja MP-a primjenom gljiva | 25 |
| 2.4.2.6. Biorazgradnja MP-a primjenom algi | 27 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 29 |
| 3.1. Materijali..... | 29 |
| 3.1.1. Mikroplastika..... | 29 |
| 3.1.2. Mikroorganizmi | 29 |
| 3.1.3. Kemikalije i mediji | 30 |
| 3.2. Mjerni instrumenti | 32 |
| 3.3. Metoda rada | 33 |
| 3.3.1. Priprema mikroplastike..... | 33 |
| 3.3.2. Priprema bakterijskih suspenzija | 34 |
| 3.3.3. Pokus biorazgradnje prema Taguchi dizajnu..... | 34 |
| 3.3.4. Mjerenje optičke gustoće | 36 |
| 3.3.5. Određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija | 37 |
| 3.3.6. Određivanje TOC i TC vrijednosti | 38 |
| 3.3.7. Ionska kromatografija..... | 38 |
| 3.3.8. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s masenom spektrometrijom 388 | |
| 3.3.9. Određivanje toksičnosti vodene faze provedbom testa toksičnosti s bakterijom <i>Vibrio</i> <i>fischeri</i> | 38 |
| 3.3.10. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama..... | 40 |
| 3.3.11. Određivanje značajnih čimbenika za proces biorazgradnje MP-e primjenom <i>Bacillus subtilis</i> i <i>Delftia acidovarans</i> | 40 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4. | REZULTATI | 41 |
| 4.1. | Određivanje ukupnog broja živih stanica bakterijske kulture | 41 |
| 4.1.1. | Određivanje vrijednosti CFU u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture <i>Bacillus subtilis</i> (P1)..... | 41 |
| 4.1.2. | Određivanje vrijednosti CFU u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture <i>Delftia acidovorans</i> (P2)..... | 43 |
| 4.2. | Vrijednosti TOC-a, TC-a i IC-a | 45 |
| 4.2.1. | Određivanje vrijednosti TOC-a u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture <i>Bacillus subtilis</i> (P1)..... | 45 |
| 4.2.2. | Određivanje vrijednosti TC-a u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture <i>Bacillus subtilis</i> (P1)..... | 46 |
| 4.2.3. | Određivanje vrijednosti IC-a u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture <i>Bacillus subtilis</i> (P1)..... | 47 |
| 4.2.4. | Određivanje vrijednosti TOC-a u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture <i>Delftia acidovorans</i> (P2)..... | 48 |
| 4.2.5. | Određivanje vrijednosti TC-a u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture <i>Delftia acidovorans</i> (P2)..... | 49 |
| 4.2.6. | Određivanje vrijednosti IC-a u pokusu biorazgradnje mikroplastike uz pomoć bakterijske kulture <i>Delftia acidovorans</i> (P2)..... | 50 |
| 4.3. | Određivanje koncentracije aniona i kationa u izuzetim uzorcima | 50 |
| 4.3.1. | Određivanje koncentracije aniona i kationa u pokusu P1..... | 50 |
| 4.3.2. | Određivanje koncentracije aniona i kationa u pokusu P2..... | 51 |
| 4.4. | Rezultati ATR-FTIR spektroskopske analize | 51 |
| 4.5. | Rezultati provedbe tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s masenom spektrometrijom | 54 |
| 4.6. | Određivanje toksičnosti vodene faze provedbom testa toksičnosti s bakterijom <i>Vibrio fischeri</i> | 55 |
| 4.7. | Rezultati statističke analize eksperimentalnih podataka, ANOVA..... | 56 |
| 5. | RASPRAVA..... | 58 |
| 5.1. | Analiza pokusa P1..... | 58 |
| 5.2. | Analiza pokusa P2..... | 63 |
| 5.3. | Usporedba pokusa P1 i P2 | 66 |
| 6. | ZAKLJUČAK..... | 69 |
| 7. | LITERATURA | 71 |

SAŽETAK

Čestice MP-a jedan su od najvećih onečišćivala okoliša današnjice. Brojna istraživanja dokazala su MP-e ima negativan utjecaj na biljni i životinjski svijet, a posljedično i na čovjeka. Odlikuje ih velika čvrstoća, primjenjivost i izdržljivost te unatoč otkriću različitih načina uklanjanja, još uvijek nije otkriven učinkovit način za njihovo potpuno uklanjanje. Jedan od njih je biorazgradnja, to jest, cijepanje polimera na monomere pomoću mikroorganizama. Istraživanja su pokazala da sposobnost biorazgradnje PS-a i PVC-a imaju različite bakterije te se u ovom radu provelo ispitivanje značajnih čimbenika za biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Bacillus subtilis* i *Delftia acidovorans*. U pokusu je predviđeno 7 čimbenika – pH vrijednost, temperatura, broj okretaja, veličina MP-a, koncentracija MP-a, optička gustoća (OG) i dodatak glukoze, na 2 razine – minimalna i maksimalna vrijednost. Rezultati statističke analize eksperimentalnih podataka pokazuju da biorazgradnji čestica PS-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis* najviše doprinosi optička gustoća (81,72 %) i pH-vrijednost (3,82 %). Značajni čimbenici u biorazgradnji čestica PVC-a bakterijom *Bacillus subtilis* su optička gustoća koja doprinosi 94,33 % i pH-vrijednost s doprinosom od 3,14 %. Biorazgradnji primjenom bakterije *Delftia acidovorans* najviše doprinosi temperatura za razgradnju PS-a (41,67 %) i PVC-a (74,31 %) dok ostali faktori doprinose u puno manjem postotku. Dokazano je da korištene bakterijske kulture imaju sposobnost biorazgradnje čestica PS-a i PVC-a, međutim, vrlo je važno primjeniti uvjete u kojima je biorazgradnja najuspješnija.

Ključne riječi: Mikroplastika; Biorazgradnja; PS; PVC; *Bacillus subtilis*; *Delftia acidovorans*

ABSTRACT

Nowadays, microplastic particles are one of the biggest pollutions and threats to the environment. It has been proven by many scientists that MP particles have negative effects on plants and animals, and therefore on humans. The particles of MP are characterized by exceptional strength, high durability and resistance to external conditions and biodegradation. Although there are numerous studies showing different ways of their degradation, it is almost impossible to degrade them completely. One of the ways is biodegradation, which is the breakdown of polymers into monomers by microorganisms. It has been shown that particles of PS and PVC can be degraded by various bacteria. In this study, *Bacillus subtilis* and *Delftia acidovorans* were used for the degradation of PS and PVC particles. Biodegradation was tested on the basis of 7 factors - pH, temperature, number of revolutions per minute, size of MP particles, concentration of MP, optical density (OD) and addition of glucose, at two levels - minimum and maximum. The results of statistical analysis of the experimental results show that OD (81.72%) and pH (3.82%) contribute the most to the degradation of PS particles by *Bacillus subtilis*. The highest contribution to the degradation of PVC particles by *Bacillus subtilis* is also made by OD (94.33 %) and pH (3.14 %). On the other hand, the highest factor contributing to the degradation of PS and PVC particles by *Delftia acidovorans* is temperature with a percentage of 41.67% for PS and 74.31% for PVC. In this study, it was proved that the bacterial strains *Bacillus subtilis* and *Delftia acidovorans* have the ability to degrade PS and PVC particles, but it is of great importance to choose the right conditions for the highest efficiency.

Keywords: Microplastic, Biodegradation; PS; PVC; *Bacillus subtilis*; *Delftia acidovorans*

1. UVOD

Plastika se danas koristi u gotovo svim dijelovima svakodnevnog života zahvaljujući niskoj cijeni, maloj težini te velikoj izdržljivosti. Godine 2016. provedeno je istraživanje o godišnjoj proizvodnji plastike i rezultati pokazuju da je 2015. godine proizvedeno 322 milijuna tona plastike u svijetu te rast proizvodnje od 45% u desetogodišnjem rasponu (2005. – 2015.) [1]. Međutim, zbog skoro nemoguće i dugotrajne razgradnje čestica mikroplastike, njena koncentracija porasla je u okolišu što je rezultiralo pridavanjem veće pažnje ovom globalnom problemu. Već 70 – ih godina prošlog stoljeća primjećene su vrlo male plastične čestice u Atlantskom oceanu [2], no veći značaj dobivaju 2004. kada je Thompson za njih prvi puta upotrijebio naziv „mikroplastika“ (MP). [3] Mikroplastiku čine plastične čestice, netopljive u vodi, pravilnih ili nepravilnih oblika veličine od 1 μm do 5 mm te u različite ekosustave dolazi iz primarnih i sekundarnih izvora. [4] Primarne izvore čine čestice koje su sintetizirane za različite namjene iz proizvoda za osobnu njegu i kozmetike, sintetičkih vlakana iz odjeće, zubne paste, a značajna količina dolazi iz primjene zračnih odstranjivača hrđe i boje koji koriste mikročestice poliestera u kombinaciji sa jakim zračnim mlazom. [5] Sekundarni izvor čine čestice nastale raspadanjem većih plastičnih proizvoda djelovanjem fizičkih i bioloških faktora, uključujući UV zrake koje reduciraju strukturni integritet plastike do veličine koja nije vidljiva golim okom. [5] Prilikom brojnih provedenih istraživanja, pronađene su čestice MP-a u svim ekosustavima: vodi, tlu i zraku. Polietilen (PE), polipropilen (PP), poli(etilen-tereftalat) (PET), polistiren (PS), poliamid (najlon) (PA), poli(vinil-klorid) (PVC) vrste su MP-a koje zbog svoje raznovrsne upotrebe imaju najveću vjerojatnost da završe u okolišu. Jednom kad čestice MP-a uđu u okoliš, one negativno djeluju na brojne organizme u različitim staništima što je i potvrđeno brojnim toksikološkim istraživanjima. Ona su provedena na velikim morskim organizmima, primjerice istraživanje provedeno na 50 organizama koji uključuje 10 različitih vrsta dupina i tuljana sa britanske obale upućuje na to da je u svakom organizmu pronađena određena koncentracija MP-a. [6] Također, istraživanja su provedena i na manjim organizmima. Primjerice, kod ribe *Danio rerio* primjećeno je da MP-e ima najveći utjecaj na jetru, crijeva i škrge [7], dok je kod planktona *Daphnie magne* najviše utjecala na sposobnost kretanja i akumulaciju štetnih elemenata poput nikla. [8]

S obzirom da MP-e ima štetne učinke po organizme u okolišu potrebno ju je ukloniti iz okoliša. Postupci koji se najčešće primjenjuju jesu fizikalno – kemijski i biološki procesi, a najučinkovitijim se pokazala njihova kombinacija. Fizikalno – kemijska razgradnja uključuje mehaničke, kemijske i toplinske procese, dok biorazgradnja uključuje razgradnju uz bakterije

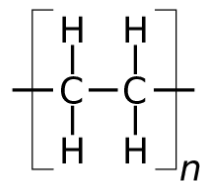
(rod *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*), gljive (rod *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Zalerion*), u manjem udjelu uz alge (*Anabaena spiroides*, *Navicula pupula*, *Scenedesmus dimorphus*), razne vrste plijesni (*Apergillus niger*, *Aspergillus tubingensis* [9] i kvasaca (*Penicillium griseofulvum*, *Penicillium oxalicum*).[10]

U ovom radu provelo se ispitivanje značajnih čimbenika za biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Bacillus subtilis* i *Delftia acidovorans*. Dizajn eksperimenta se provodio prema Taguchi dizajnu koji daje kombinaciju čimbenika na određenim razinama. U ovom pokusu predviđeno je 7 čimbenika – pH vrijednost, temperatura, broj okretaja, veličina MP-a, koncentracija MP-a, optička gustoća (OG) i dodatak glukoze, na 2 razine – minimalna i maksimalna vrijednost.

2. OPĆI DIO

2.1. Vrste mikroplastike

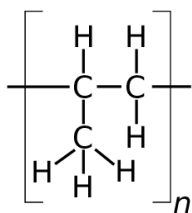
Otprilike 90% ukupne plastike u svijetu čini PE, PP, PVC, PS, PET i PA, oni se masovno proizvode i njihove mikročestice najčešće završavaju u okolišu.[11] S obzirom na njihova fizikalno – kemijska svojstva i raznovrsnu primjenu u velikom opsegu industrija, gotovo je nemoguće pronaći proizvod koji ne sadrži barem jedan od navedenih polimera. PE je najkorišteniji polimer današnjice te nastaje procesom polimerizacije etilena (Slika 1.)



Slika 1. Ponavljajuća jedinica polietilena.[12]

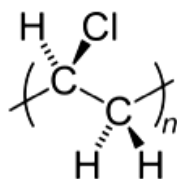
PE se sastoji se od velikog broja molekula većinom linearne strukture u obliku dugačkih niti te se prema molekularnoj građi i svojstvima razlikuje polietilen niske gustoće (LDPE) i polietilen niske gustoće (HDPE). Elastičan je, mekan, proziran, nepolarne strukture te u usporedbi s ostalim termoplastičnim materijalima, ima nižu temperaturu tališta (110 – 130 °C). LDPE i HDPE vrlo su kemijski otporni, to jest, ne raspadaju se u doticaju s jakim kiselinama i bazama. Međutim, otapaju se u aromatskim ugljikovodicima pri visokim temperaturama, primjerice toluenu i ksilenu.[13] Kombinacija ovih karakteristika čini PE idealnim materijalom za upotrebu u različitim industrijama, a najviše se koristi u pakiranju, za proizvodnju plastičnih vrećica i boca, užadi, opreme za ribolov, mreža za poljoprivredu i cijevi.[14]

PP-e je termoplastični polimer polimeriziran iz propilena te dolazi u obliku praška ili granula (Slika 2.) Karakterizira ga viša temperatura taljenja (160°C) od polietilena, ali i manja otpornost na niske temperature. Budući da se ne otapa u organskim otapalima na sobnoj temperaturi i ima dobra mehanička svojstva, koristi se za proizvodnju cijevi, laboratorijskog posuđa i kontejnera. Često se pri sintezi polipropilena dodaju različiti aditivi kako bi se zaštitio polimer prilikom proizvodnje i poboljšale karakteristike konačnog proizvoda. [15]



Slika 2. Ponavljajuća jedinica polipropilena. [12]

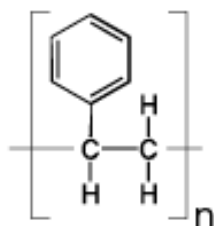
PVC-e je dugolančani polimer nastao slobodno – radikalnom polimerizacijom monomera vinil klorida (Slika 3.). Komercijalni PVC-e polimeri su amorfni, ali imaju i kristalnu fazu koja čini otprilike 10 % matriksa. Najčešće se miješa s drugim aditivima i prerađuje kako bi se formirale male granule ili kocke zato što nije stabilan na višim temperaturama, a raspada se na temperaturama iznad 160°C. PVC-e odlikuje niska cijena, velika primjenjivost, dobra izolacijska svojstva, izdržljivost i otpornost na abraziju.



Slika 3. Ponavljajuća jedinica poli(vinil-klorida). [16]

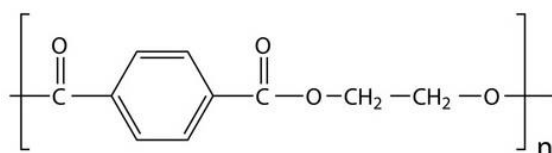
PVC-e je kemijski inertan prema svim anorganskim otopinama, razrijeđenim kiselinama, lužinama i alkoholu što ga čini otpornim na koroziju i odličnim materijalom za proizvodnju kanalizacionih cijevi. Osim toga, neke od mnogih primjena PVC-a su: proizvodnja prozorskih okvira, boca, vodootpornih prsluka za ribolov, kablova, žičnih izolatora i cijevi za transfuziju krvi. [17]

PS-e je vrsta plastike koja se dobiva iz nafte, a baziran je na monomeru stirenu (Slika 4.). Najvažnije vrste PS-a su obični, žilavi i pjenasti. Obični PS-e je proziran, lake bojivosti, male udarne žilavosti, tvrd, ali krhak i nastaje radikalnom polimerizacijom stirena, većinom u masi ili vodenoj suspenziji. Žilavi PS dvofazni je sustav PS-a i fino dispergiranih čestica elastomera (najčešće polibutadiena) koji materijalu daje veliku žilavost te se najviše koristi za izradu dijelova uređaja, kućanskih preparata i kao ambalaža. [15] Pjenasti PS, poznatiji kao stiropor, proizvodi se impregniranjem polistirena lakohlapljivim kapljevinama, koje zagrijavanjem ekspandiraju i stvaraju ćelijastu strukturu materijala. Izvanredan je materijal za toplinsku i zvučnu izolaciju, za ambalažu robe osjetljive na udarce te za izradu plovki. [18]



Slika 4. Ponavljajuća jedinica polistirena.[19]

PET nastaje stupnjevitom polimerizacijom tereftalne kiseline (ili njezinih estera) i etilenglikola u toljevini. Za razliku od prethodno spomenutih polimera čiju strukturu čini ugljikovodična baza i vezani različiti supstituenti, bazu PET-a čini veza ugljik-kisik-ugljik od kojih je jedan od ugljika dio karbonilne skupine (Slika 5). Najviše se koristi kao sintetsko vlakno, konstrukcijski materijal u elektrotehnici, za izradu filmova i folija te veliku primjenu ima u proizvodnji boca za vodu i gaziranih pića. [20]



Slika 5. Ponavljajuća jedinica poli(etilen-tereftalata). [21]

2.2. Mikroplastika u okolišu

Tijekom provedbe brojnih istraživanja o prisutnosti čestica MP-a u okolišu, dokazano je da se ona nalazi u svim biosferama; u hidrosferi, koja sadrži najveći udio MP-a te u litosferi i atmosferi, koje sadržavaju nešto manje čestica MP-a, ali dovoljno da uzrokuju štetu biljnom i životinjskom svijetu, a posljedično i ljudskom zdravlju.

2.2.1. Mikroplastika u vodenom mediju

Čestice MP-a koje nisu u potpunosti zaustavljene pomoću filtera tijekom obrade kanalizacijskih otpadnih voda završit će u površinskim vodama, a samim time i u morima i oceanima.[22] Mnogi čimbenici utječu na koncentraciju MP-a u vodama, a najvažniji od njih su vjetrovi, struje, gustoća čestica, blizina gusto naseljenih područja i način obrade otpadnih voda.²² Velike koncentracije MP-a pronađene su u područjima razvijene akvakulture, uključujući estuarije i luke. To je najviše uzrokovano starim mrežama za lovljenje ribe i užadi koje sadrže plastična vlakna koja se zbog svoje veličine ne mogu ukloniti. Sljedeći veliki

problem pojave MP-a u slatkim i slanim vodama je to što se na njima stvori mikrobiološki film sastavljen od bakterija, gljiva i alga te on značajno može promijeniti fizikalna i kemijska svojstva MP-a. Naime, biofilm je važan izvor hrane za brojne organizme te ukoliko oni konzumiraju čestice MP-a misleći da je to hrana, mogu se pojaviti ozbiljne posljedice. [23]

Kina kao najveći proizvođač plastike u svijetu [1] svake godine bori se s postupno rastućim i ozbiljnim ekološkim problemom prisutnosti čestica MP-a u okolišu. To dokazuje i istraživanje provedeno 2017. u gradu Wuhanu, ekonomskom, kulturnom i edukacijskom centru središnje Kine s populacijom od preko 10 milijuna.[24] Međutim, brz ekonomski rast i rast populacije i urbanizacije od 1970. – ih u Kini negativno se odrazio na ekološko zdravlje vodenih površina. Istraživanje koje je uključivalo 20 jezera i rijeke Hanjiang i Yangtze pokazuje da koncentracija MP-a varira od 1660 do 8925 čestica po m^3 iz čega se zaključuje da se najviša koncentracija MP-a u vodama nalazi upravo u Kini. [23] Jedan od velikih problema sa kojim se susreću znanstvenici diljem svijeta koji proučavaju problem MP-a u okolišu je nerazvijenost standardiziranih analitičkih metoda za identifikaciju i kvantifikaciju mikro i nanoplastike u različitim uzorcima što može dovesti do problema kod uspoređivanja podataka. [25]

Međutim, MP-e nije problem samo u Aziji, već i u različitim dijelovima Europe, Kanade i Sjedinjenih Američkih Država. U tablici 1. prikazana je koncentracija MP-a u jezerima i rijekama diljem svijeta, a podaci pokazuju da se veća koncentracija povezuje s većom gustoćom naseljenosti što upućuje na to da je utjecaj čovjeka veoma važan kod distribucije MP-e. Turizam značajno pridonosi onečišćenju mora te je dokazano da preko 200 milijuna turista koji svake godine u ljetnim mjesecima posjete Sredozemno more uzrokuje povećanje morskog otpada od 40%. [26] Količina MP-a u Sredozemlju na rekordnoj je razini s 1,25 milijuna komada po km^2 te utječe čak i na sediment oceana gdje koncentracija od 10 000 po kilometru predstavlja jednu od najviših u svijetu prema čemu Sredozemno more s razlogom dobiva ime “plastična zamka”. [27]

Godine 2018. provedeno je istraživanje s ciljem detekcije metala (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni) na plastičnim peletama koji su pronađeni u uzorcima sedimenta skupljenih na pješčanim plažama Zaglavu i Milni na otoku Viru. [28] Rezultati pokazuju da se u uzorku volumena od 3965 mL nalaze 92 čestice peleta. Važno je spomenuti da je koncentracija metala pronađena na plastičnim peletama veća od koncentracije metala pronađene u uzorcima morske vode sakupljene iz priobalnog područja. Koncentracije u uzorcima s česticama MP-a iznose ($ng L^{-1}$): 8.50 (Cd), 338 (Ni), 423 (Ni), 182 (Pb) i 722 (Zn) i one su za otprilike dva do tri reda veličine veća od koncentracije metala u uzorcima morske vode bez čestica MP-a. Rezultati su

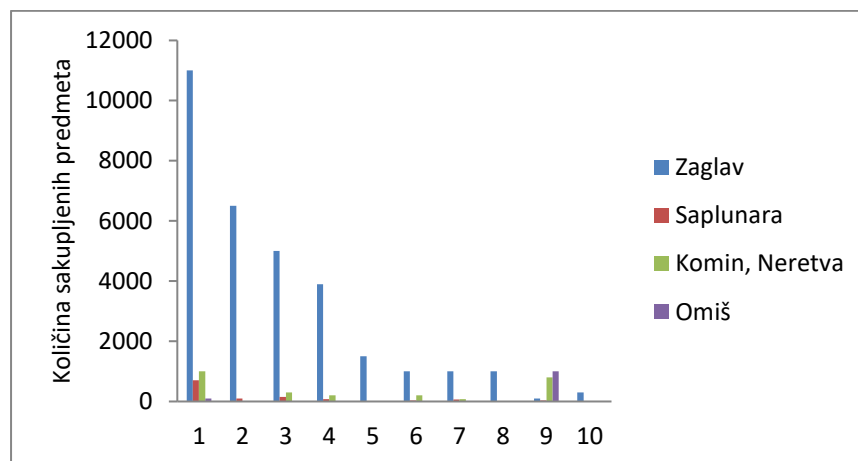
usporedivi s dobivenim rezultatima u istraživanju koje je proveo Holmes o koncentraciji metala na plastičnim peletima sa nekoliko lokacija u Engleskoj. [29]

Tablica 1. Koncentracija MP-a u različitim dijelovima svijeta. [27]

| | PODRUČJE | VRSTA MIKROPLASTIKE | KONCENTRACIJA |
|------------------------------|--------------------------|---------------------|---|
| AZIJA | Dongting Lake, Kina | PET, PP, PS, PE | 616.70 – 2316.70 čestica / m ³ |
| | Wuhan, Kina | PET, PP, PE, najlon | 1660,00 – 8925,00 čestica / m ³ |
| | Vembanad jezero, Indija | PE, PS, PP | 258,00 čestica / m ² |
| EUROPA | Rijeka Antuã, Portugal | PP, PE, PS, PET | 58,00 – 1265,00 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 JUŽNA AMERIKA | Jezero Winnipeg, Kanada | - | 0,05 – 0,75 čestica / m ² |
| | Rijeka Atoyac, Meksiko | - | 833,00 – 1633,00 čestica / kg |
| | Jezero Superior, SAD | PE, PP, PS, PVC | 0,03 čestica / m ² |

DeFishGear (engl. „*Derelict Fishing Gear Management System in the Adriatic Region*“) je projekt koji se bavi širim kontekstom problematike morskog otpada te se u sklopu njega provode projektne aktivnosti koje uključuju zemlje Jadransko-Jonske regije (Sloveniju, Italiju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu, Crnu Goru, Albaniju i Grčku) kojima je cilj smanjiti otpad u Jadranskom moru. U sklopu tog projekta provedeno je istraživanje o količini i sastavu MP-a u uzorcima uzetih s površine mora, riječnih ušća, iz sedimenata na plažama te iz želudaca riba u području gdje se odvijaju ribolovne aktivnosti.[30] Rezultati istraživanja pokazuju da dolazi do porasta koncentracije MP-a nakon turističke sezone, posebice na plaži Bačvice u Splitu koja predstavlja jednu od najpopularnijih turističkih plaža u tom području. Kao posljedice jakih južnih vjetrova i valova te otvorenog mora, na plaži Zaglav u jesen se uočava znatno povećanje koncentracije MP-a (4200 čestica/kg sedimenta) u odnosu na početak ljeta (870 čestica/kg sedimenta).[30] Na slici 6. prikazani su najučestaliji predmeti pronađeni u sakupljenom otpadu

iz mora te se vidi da su to komadići plastike i stiropora veličine 2,5 – 50 cm, štapići za uši i plastični čepovi svih namjena. Opušci od cigareta, koji inače na svjetskoj razini zauzimaju visoko mjesto na ljestvici kategorije otpada u moru, bili su relativno malobrojni na plažama Zaglav i Saplunara koje su udaljenije od kopna i gdje smeće uglavnom dopijeva morskim strujama s otvorenog mora. Nasuprot tome, zbog turističke namjene gradske plaže u Omišu i one u Kominu na ušću Neretve, opušci cigareta jedni su od najbrojnijih sakupljenih predmeta usprkos tome što se u sezoni redovito čiste.



Slika 6. Najučestaliji predmeti morskog otpada sakupljenog na plažama Zaglav na Visu, Saplunara na Mljetu, Punta u Omišu i Komin na ušću Neretve (1- Komadići plastike 2,5 – 50 cm, 2 – komadići stiropora 2,5 – 50 cm, 3 – Štapići za uši, 4 – Plastični čepovi (boce za piće), 5 – plastični čepovi (neodređeni), 6 – Paketi čipsa i omoti slatkiša, 7 – Slamke i mješalice, 8 – Plastični čepovi (kemikalije, sredstva za čišćenje), 9 – Opušci i filteri cigareta, 10 – Komadići stakla i keramika > 2,5 cm. [30]

2.2.2. Mikroplastika u tlu

Usprkos tome što je problematika MP-a u tlu manje istražena, sve više istraživanja pokazuje da MP-e pokazuje ozbiljnu prijetnju biljkama, usjevu i organizmima koje žive u tlu. Naime, velik udio MP-a koji se nađe u tlu dolazi iz kanalizacijskog mulja i gnojiva koji se koriste u poljoprivredi. [31] Druge izvore čine: razgradnja plastičnih proizvoda koji se nalaze na obradivoj zemlji pod utjecajem vremena, fragmentacija plastičnog otpada i plastičnih proizvoda na odlagalištima otpada, odlaganje otpada u prirodu te navodnjavanje otpadnim vodama. [32] Jednom kad se čestice MP-a nađu u tlu, teško ih je ukloniti te akumuliranjem utječu na rast, bioraznolikost i razmnožavanje organizama koje žive u tlu. Godine 2018. Qi i

sur. proveli su prvo istraživanje o utjecaju čestica MP-a na rast pšenice. Primjećen je slabiji rast vegetativnih i reproducibilnih organa biljke unutar i izvan zemlje u koju su bile ukomponirane mikročestice PE male gustoće. Međutim, potrebno je provesti detaljnija istraživanja kako bi se otkrio točan razlog sporijeg rasta biljke u doticaju s MP-om. [33] Istraživanje dokazuje da čestice MP-a mogu značajno utjecati na rast i količinu usjeva što posljedično predstavlja problem za čovjeka koji se njima hrani.

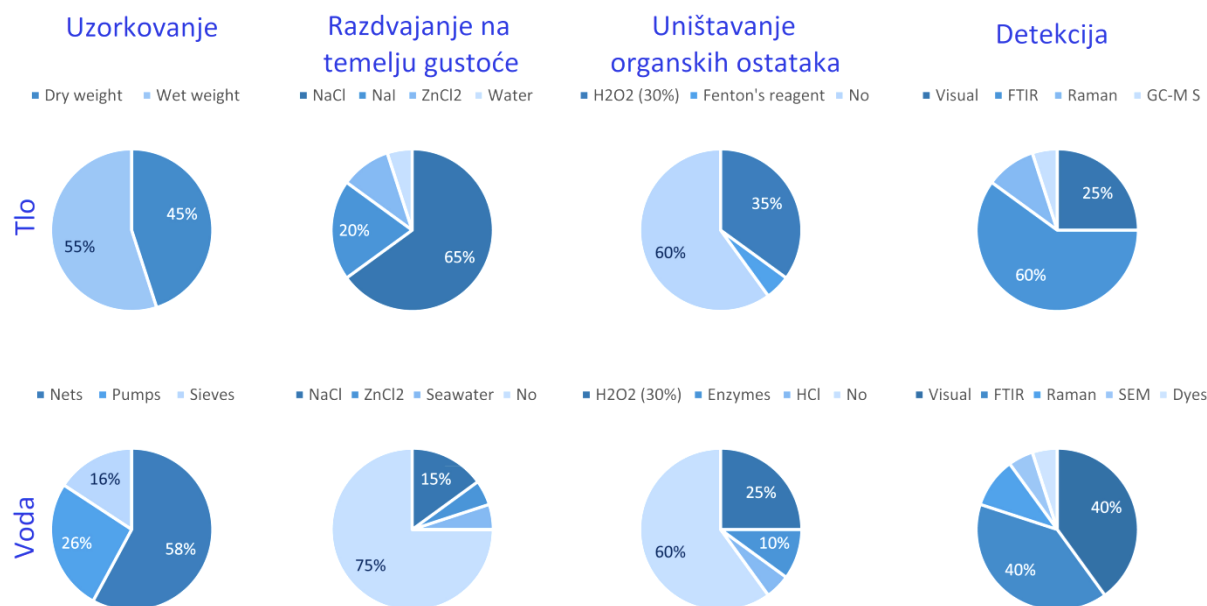
2.2.3. Mikroplastika u zraku

Činjenicu da je MP-e sveprisutna i predstavlja veliki problem čovječanstvu i okolišu dokazuju mnogobrojna istraživanja u kojem je pronađena nezanemariva količina MP-a u zraku. Istraživanja pokazuju da je veća koncentracija MP-a pronađena u zatvorenim prostorijama u odnosu na okoliš što je i očekivano s obzirom na to da se čestice lakše prenose vjetrom u otvorenom prostoru. [34] Glavni izvori MP-a u zraku su čestice iz sintetičke odjeće, erozije sintetičkih guma, građevni materijal, industrijska emisija te plastični fragmenti iz namještaja.[35] Međutim, još uvijek je jako malo znanstvenih radova o koncentraciji MP-a u zraku zbog ograničenja u detekciji čestica MP-a. Vianello i sur. proveli su istraživanje o količini MP-a u 3 apartmana u Aarhusu u Danskoj te rezultati pokazuju da se u najvećem udjelu pojavljuje poliester (59-92%), zatim najlon (0-13%) i polipropilen (0.4-10%).[36]

2.3. Postupci određivanja mikroplastike u okolišu

Dokazivanje da su čestice MP-a prisutne u svim sustavima u okolišu, potaklo je brojne znanstvenike da se krenu baviti istraživanjem MP-om što rezultira stalno rastućim brojem znanstvenih radova te tematike. Naravno, kako bi istraživanja bila što učinkovitija, potrebno je sakupiti i identificirati vrstu MP-a. Međutim, nedostatak univerzalne i validirane metode za određivanje MP-a vodi do različitih analitičkih pristupa, što uzorkuje različitu interpretaciju i značajno onemogućava uspoređivanje dobivenih rezultata.[37] Godine 2018. provedeno je istraživanje u kojem su sakupljeni podaci o uzorkovanju i određivanju MP-a u 49 znanstvenih radova u svrhu sumiranja najrelevantnijih metoda kako bi se zorno prikazao izbor i nedostaci različitih analitičkih metoda za određivanje MP-a u okolišu.[38] Rezultati su prikazani na slici 7. te se iz prikaza može zaključiti da je prvi korak u određivanju uzorkovanje koje se u vodenim uzorcima provodi uz pomoć mreža, sita i pumpi, dok kod sedimentnih taloga vrlo važnu ulogu ima dubina i mjesto uzorkovanja. Sljedeći korak u određivanju MP-a je separiranje iz vode i sedimentnog uzorka. Čestice MP-a lako se filtriraju iz vode, dok se čestice MP-a u talozima najčešće separiraju na temelju razlike u gustoći. Naime, u otopini velike gustoće, čestice plutaju

na površini, dok se ostale čestice talože na dno. Da bi se pripremila otopina velike gustoće koriste se razne soli poput NaCl, NaI i ZnCl₂. [38]



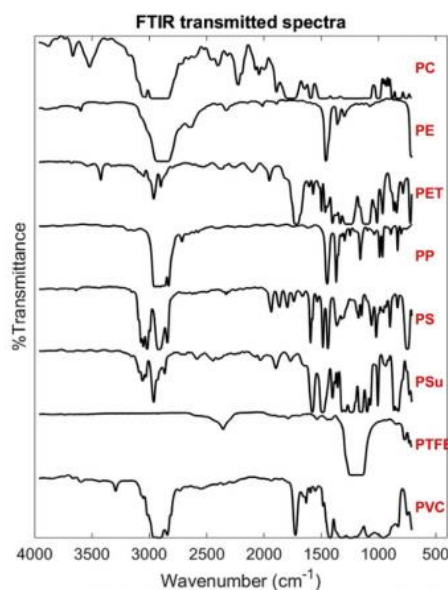
Slika 7. Najučestaliji postupci sakupljanja i određivanja čestice MP-a. [37]

Nadalje, organski ostaci predstavljaju problem kod određivanja MP-a zato što su često zamijenjeni za MP-e (tamniji fragmenti alga) te time uzrokuju netočno određivanje koncentracije MP-a. Upravo iz tog razloga, organski fragmenti moraju se ukloniti. I u vodenim i taložnim uzorcima, fragmenti se najviše uklanjaju uz H₂O₂, zatim uz Fentonov reagens (H₂O₂ za željezovim (II) ionima), HNO₃, HCl i KOH.[37] Međutim, korištenje jakih kiselina može utjecati na raspadanje polimera koji imaju slabu rezistentnost na kiseline te se u tom slučaju koriste enzimi. Naime, za razgradnju koristi se smjesa enzima (lipaza, amilaza, proteinaza, celulaza), a sam postupak je skup i vrlo dugotrajan. [38]

2.3.1. FTIR

Kod određivanja MP-a najveći udio zauzima vizualno identificiranje i FTIR metoda. Naime, FTIR je metoda infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama koja je široko raspostranjena u organskoj sintezi, detekciji polimera, farmaceutskoj industriji, petrokemijskom inženjerstvu i analizi hrane. [39] Temeljena je na utvrđivanju strukture molekule pomoću njezine mogućnosti apsorpcije infracrvenog zračenja. Molekula apsorbira zračenje specifičnih valnih duljina kada je izložena zračenju što uzrokuje promjenu dipolnog

momenta te transformaciju vibracijske energije iz osnovnog u pobuđeno stanje. Analizom infracrvenog spektra može se odrediti struktura molekule (Slika 8.). [39]



Slika 8. FTIR spektar najučestalijih vrsta MP-e. [40]

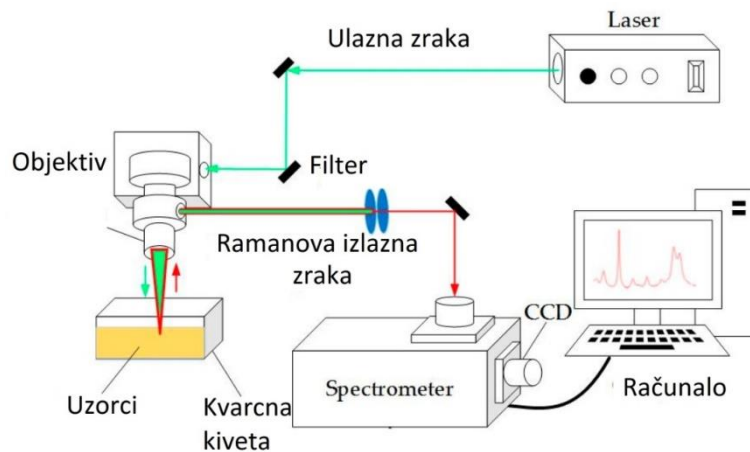
FTIR spektrometar je uređaj koji se sastoji od izvora zračenja, interferometra, uzorka, detektora, zrcala i računala. Uređaj radi na principu da zračenje koje proizlazi iz izvora kroz interferometer do detektora generira informaciju koja se konvertira u digitalni signal koji dolazi do računala gdje se provodi Fourierova transformacija. Glavna razlika između FTIR spektrometra i disperznog IR spektrometra je Michelsonov interferometer koji razdjeljuje jednu zraku svjetlosti u dvije različitih putanja koje se rekombiniraju u detektor gdje se mjeri njihov intenzitet. [39] Velika baza spektara polimera omogućuje ne samo potvrdu o prisutnosti MP-a, već i identifikaciju specifičnih vrsta polimera. Nadalje, mikroFTIR (μ -FTIR) koristi se za određivanje malih čestica MP-a i za mikroskopsko proučavanje prije spektroskopijske potvrde te se mogu detektirati čestice jednake veličine kao otvor kroz koji prolazi IR zračenje. ATR - FTIR (FTIR sa smanjenom totalnom refleksijom) smatra se oblikom analize kod kojeg dolazi do površinskog kontakta što može uzrokovati oštećenje osjetljivijih vrsta MP-a. Također, pomoću FTIR-a je moguće odrediti stupanj razgradnje MP-a zbog pojave oksidiranih veza u spektru. [41] Tablica 2. prikazuje tipične funkcionalne grupe koje se pojavljuju u strukturama polimera i njihove odgovarajuće valne duljine u FTIR spektrima.

Tablica 2. Funkcionalne grupe u prisutne u različitim polimerima i njihove valne duljine u FTIR spektru. [42]

| Polimer | Funkcionalna grupa | Valna duljina / cm^{-1} |
|---------|-----------------------------|----------------------------------|
| HDPE | C-H istežanje | 2915, 2845 |
| | CH ₂ uvijanje | 1463 |
| | CH ₂ njihanje | 730 |
| PVC | CH ₂ uvijanje | 1427 |
| | CH uvijanje | 1331, 1255 |
| | C-C istežanje | 1099 |
| | CH ₂ njihanje | 966 |
| PP | C-Cl istežanje | 616 |
| | C-H istežanje | 2950, 2915 |
| | CH ₂ uvijanje | 1455 |
| PS | CH ₃ uvijanje | 1377 |
| | aromatsko C-H istežanje | 3024 |
| | C-H istežanje | 2847 |
| | aromatsko istežanje prstena | 1492, 1601 |
| PET | CH ₂ uvijanje | 151 |
| | C=O istežanje | 1713 |
| PA | C-O istežanje | 1241, 1094 |
| | N-H istežanje | 3298 |
| | CH istežanje | 2932, 2858 |
| | C=O istežanje | 1634 |
| | NH uvijanje | 1538 |
| | CH ₂ uvijanje | 1464, 1372 |

2.3.2. Raman spektroskopija

Tijekom usmjeravanja svjetlosti na molekulu dolazi do raspršenja zračenja koje ima različitu frekvenciju od ulazne zrake što uzrokuju interakcije između oscilacije svijetla i molekulske vibracije. Taj fenomen naziva se Ramanovo raspršenje te je pomoću analize spektra raspršenog zračenja moguće odrediti strukturu molekule. Ukoliko se analizira mikročestica, Ramanova spektroskopija kombinira se s mikroskopom (Slika 9). [43]

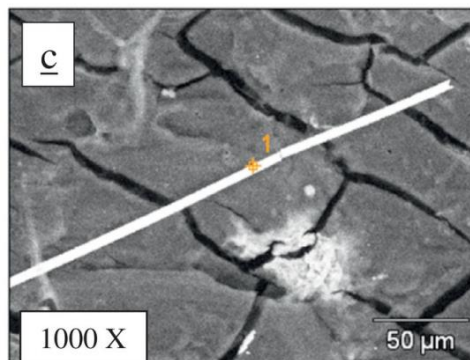


Slika 9. Dijelovi Ramanove spektroskopije u kombinaciji sa mikroskopom. [43]

Tijekom analize ne dolazi do oštećenja površine čestice pa su moguće daljnje analize uzorka, no Raman spektroskopija je osjetljiva na aditive i pigmente u MP-u koji mogu smetati u identifikaciji različitih polimera. Primjerice, prilikom identifikacije MP-a pomoću Ramanove spektroskopije dobiven je spektar koji odgovara plavom pigment (bakrov ftalocijanin), a ne spektar koji odgovara određenom tipu plastike. [44] Međutim, taj pigment je često korišten u plastičnoj industriji, što pridonosi pretpostavci da je nepoznati uzorak MP-e.[44] Nadalje, za lociranje čestica MP-a u tkivima koristi se koherentno anti – Stokesovo Ramanovo raspršenje (CARS) koje se često upotrebljava za detekciju čestica veličine 2-3 μm kod zooplanktona. [44]

2.3.3. SEM

SEM (*Scanning electron microscope*) je metoda karakterizacije MP-a kod koje se dobiva vrlo detaljna slika površine pomoću uskog snopa elektrona. Snaga rezolucije ovisi o kvaliteti leća i valnoj duljini upadne zrake te s obzirom da elektroni imaju značajno kraće valne duljine, elektronski mikroskopi pružaju bolju rezoluciju od svjetlosnog mikroskopa, slika 10. [45]



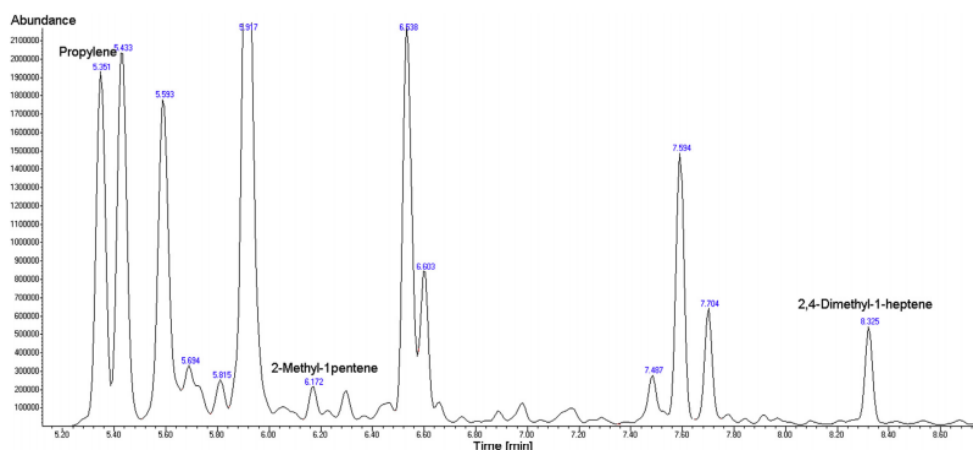
Slika 10. Površina MP-a snimljena pomoću SEM-a.[46]

2.3.4. HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) koristi se za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između analizirane tvari i stacionarne faze. Kromatografska separacija sastoji se od otapala, pumpe, uzorka, stupca, detektora i računala. Pokretna faza ili otapalo obično je mješavina polarnih i nepolarnih komponenata čija koncentracija ovisi o uzorku. Sve kromatografske separacije funkcioniraju na istom principu: kromatografija razdvaja uzorak na sastavne komponente zbog razlike u molekulskim afinitetima prema mobilnoj i stacionarnoj fazi koja se koristi kod separacije.[41] Kombinacijom tekućinske kromatografije i masene spektrometrije mogu se odrediti koncentracije PET-a i polikarbonata (PC) na način da se molekule depolimeriziraju hidrolizom. [47]

2.3.5. GS/MS

Kombinacija plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC/MS) danas se sve više koristi za određivanje čestica MP-a. Piroliza – plinska kromatografija/masena spektrometrija (Py – GC/MS) analitička je metoda koja se koristi za identificiranje komponenata, a uključuje zagrijavanje uzorka na visoku temperaturu što uzrokuje razlaganje na manje molekule koje su separirane pomoću plinske kromatografije i identificirane pomoću masene spektrometrije.⁴⁸ Koncentracije polimera za koje se metoda može primijeniti ovise o vrsti polimera i mogućim smetnjama prirodnih matrica prilikom provođenja metode. Istraživanjem je dokazano da je moguća detekcija PE, PP, PET, PVC, PA tijekom provođenja jedne izvedbe metode GC/MS. Nakon provođenja metode dobivaju se kromatogrami prikazani na slici 11. koji se dalje analiziraju u svrhu identificiranja vrste MP-e. [48]



Slika 11. Kromatogram nastao nakon provođenja metode Py – GC/MS. [48]

2.4. Uklanjanje mikroplastike iz vodenog medija

Fizikalno – kemijske karakteristike polimernih materijala poput velike čvrstoće, dugotrajnosti, kemijske rezistentnosti i elastičnosti čine ih savršenim materijalom za mnogobrojne primjene. Međutim, te prednosti ujedno su i njihove mane zato što je gotovo nemoguće postići njihovu potpunu razgradnju u zadovoljavajućem vremenu što predstavlja velik problem za okoliš. Tijekom godina proučavani su brojni načini razgradnje čestica MP-a te je utvrđeno da je moguće abiotičko (fizikalno – kemijska razgradnja) i biotičko (biorazgradnja) uklanjanje. Abiotička razgradnja vrlo često prethodi biotičkoj razgradnji, a uključuje fizikalno – kemijske procese kojima se veće molekule cijepaju na manje [50]. S druge strane, biotička razgradnja odvija se uz enzime koji su prisutni u stanicama mikroorganizama [55].

2.4.1. Abiotička razgradnja

2.4.1.1. Termička razgradnja

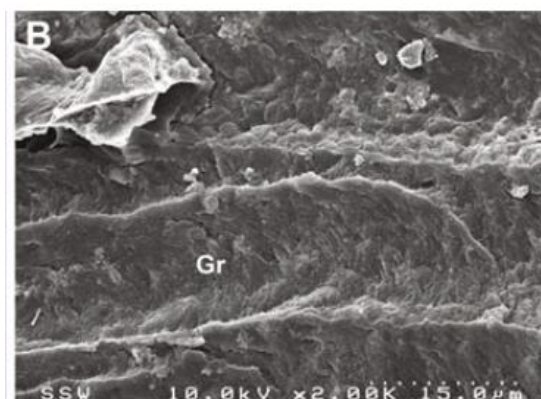
Termičkom oksidacijom nastaju hidroksilne, karboksilne i hidroperoksidne skupine te dolazi do povećanja hidrofilnosti polimera čineći ga sklonijim vezanju mikroorganizama na površinu. [49] Naime, termičko tretiranje polimera ubrzava proces razgradnje što je i potvrđeno kod istraživanja gdje se kod polimera koji su bili termički obrađeni i nakon toga izloženi bakteriji *Bacillus spericus*, primjećuje gubitak mase od 17 %, dok se kod polimera koji nisu bili termički obrađeni zabilježuje gubitak mase od 10 %.[50]

2.4.1.2. Mehanička razgradnja

Mehanička razgradnja mikročestica najčešće nastupa abrazijom kad čestice dođu u kontakt sa zrcima sedimenta, školjkama i drvenim ostacima ili antropogenim čimbenicima poput drugih plastičnih proizvoda, ostacima smeća, barijerama ili transportnim vozilima (automobilima, brodovima). Druge metode mehaničke razgradnje uključuju temperaturne promjene i vlažno/suhe cikluse.[51] Koristeći SEM primjećeno je da mehaničko djelovanje tijekom vremena uzrokuje nastajanje udubljenja na površini PE-a prikazanog na slici 12. [52]

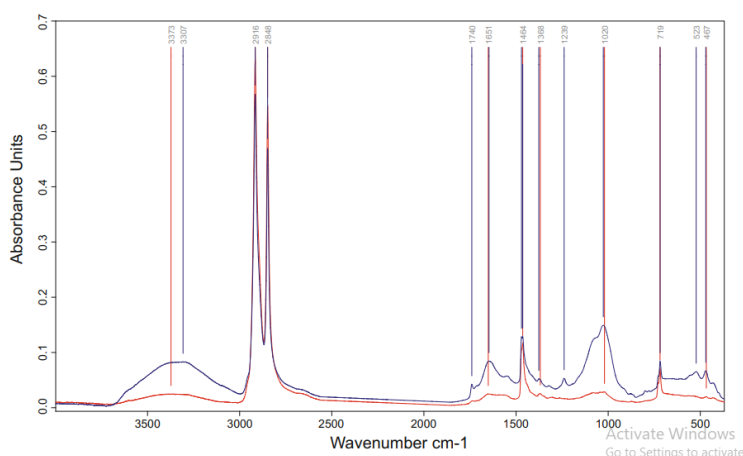
2.4.1.3. Kemijska razgradnja

Kemijska razgradnja pokazuje različite stupnjeve uspješnosti ovisno o vrsti polimera, prisutnosti UV stabilizatora i medija u kojem se nalaze čestice MP-a. Općenito, foto–razgradnja inicirana je kad je mikročestica izložena UV zračenju i kisiku što rezultira nastajanjem molekule koja ima kraći lanac od izvorne molekule.



Slika 12. SEM slika udubljenja (Gr) nastala mehaničkim djelovanjem na površinu čestice MP-a. [52]

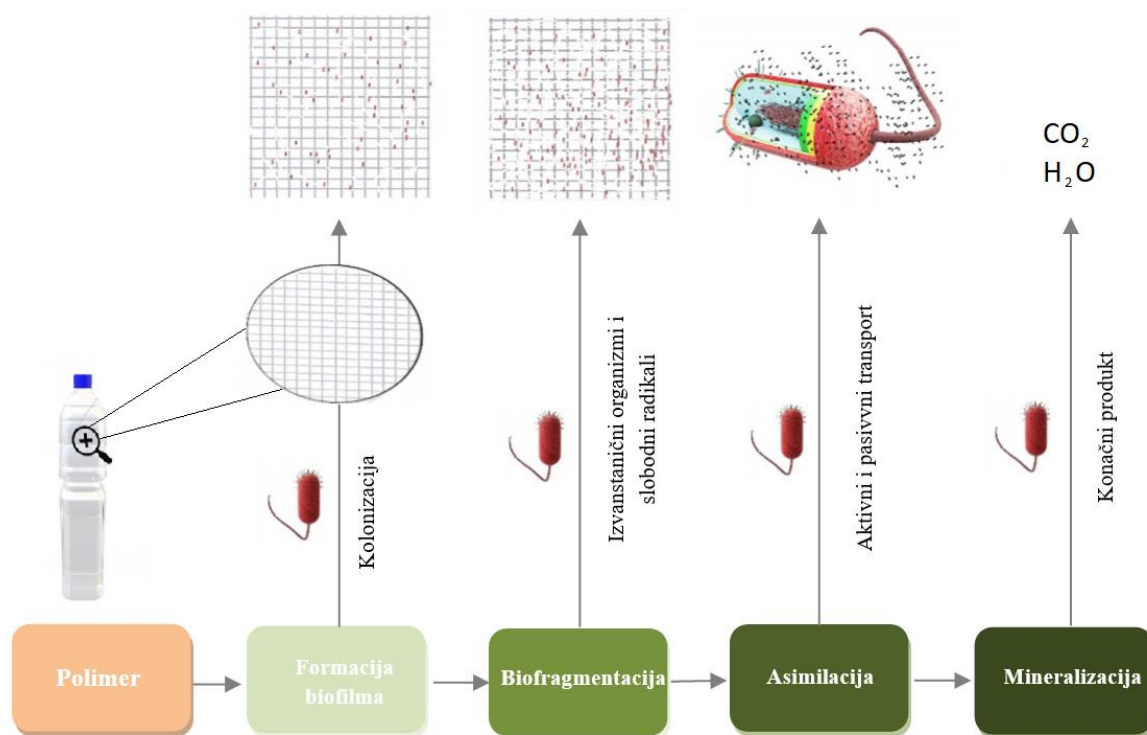
Da bi inicijacija započela, polimer mora sadržavati nezasićene veze koje apsorbiraju energiju te se smatra da su PE i PP manje podložni foto–oksidaciji jer ne sadrže nezasićene dvostruke veze.[53] Slijedi propagacija, proces u kojem dolazi do cijepanja, spajanja lanaca i nastajanja novih radikala te terminacija, spajanje dva radikala. Olefini, aldehidi i ketoni koji su podložniji foto–oksidaciji očekivani su produkti radikalske terminacije.[54] Ukoliko je došlo do kemijske razgradnje, doći će do promjene u spektru nastalom FTIR spektroskopijom. Naime, kemijska oksidacija uzrokuje nastajanje karboksilnih kiselina, aldehida, estera i ketona čiji će se signali pojavljivati u području od 1700 do 1850 cm^{-1} na FTIR spektru. To je dokazano i snimanjem spektara dva uzorka PE peleta s plaža te se iz spektra vidi koji uzorak je više kemijski razgrađen (Slika 13.). [51]



Slika 13. FTIR spektar dva uzorka poletilnih peleta skupljenih na plažama. Plavi spektar kemijski je više razgrađen od crvenog spektra zbog pojave signala na oko 3310 cm^{-1} (O – H istežanje) i na oko 1650 cm^{-1} i 1740 cm^{-1} (C – O istežanje). [51]

2.4.2. Biotička razgradnja

Biorazgradnja je cijepanje polimerne strukture MP-a na monomere primjenom mikroorganizama. Proces biorazgradnje odvija se u nekoliko koraka: formacija biofilma, kolonizacija, bio – fragmentacija, asimilacija i mineralizacija. Kako bi nastao biofilm, čestica dolazi u kontakt s vodom te djelovanjem vode na površinu nastaje prikladna površina za formiranje. Naknadna kolonizacija započinje nakon što površina pukne i nastanu udubljenja zbog mehaničkih i kemijskih djelovanja.[55] Nakon što je završila kolonizacija površine mikročestice, mikroorganizmi pomoću odgovarajućih enzima razgrađuju MP-e do oligomera, dimera i monomera.[56] Zatim slijedi process asimilacije ukoliko prilikom biorazgradnje nastanu male molekule koje mogu proći kroz staničnu stijenku mikroorganizama i tako služiti kao izvor ugljika i energije (slika 14.).[51] Željeni produkti biorazgradnje su CO_2 i H_2O i ona ovisi o mikroorganizmima koji provode razgradnju i karakteristikama polimera. Uspješan process biorazgradnje ovisi o vrsti mikroorganizma, distribuciji, optimalnim uvjetima (temperatura, pH-vrijednost, koncentracija kisika, prisutnost nutrijenata) i vrsti enzima (unutarstanični i izvanstanični). Karakteristike polimera uključuju fizikalna i kemijska svojstva polimera, površinske karakteristike (hidrofilnost i hidrofobnost), temperature staklišta, temperaturu tališta, modul elastičnosti i kristaliničnost.[57]

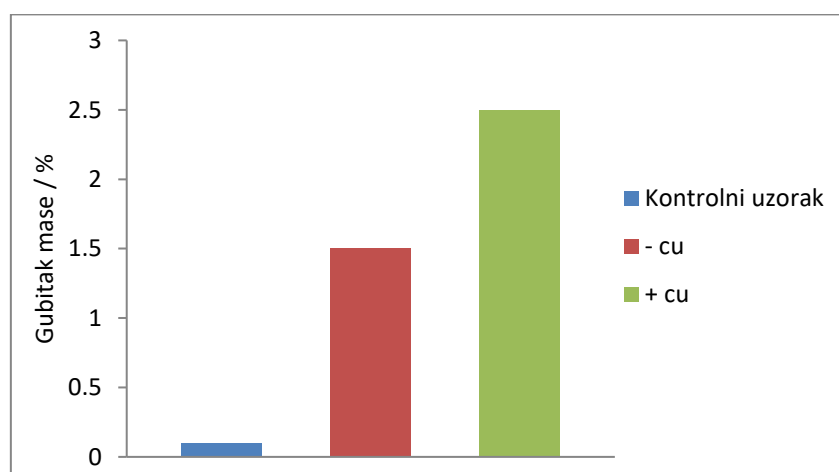


Slika 14. Shematski prikaz koraka u biorazgradnji MP-a.[58]

Mikroorganizmi se mogu prilagoditi skoro svakoj okolini u kojoj se nalaze pa tako i imaju sposobnost razgradnje MP-a. Međutim, još uvijek nisu detaljno poznate interakcije između mikroorganizama i čestica MP-e što onemogućava širu primjenu biorazgradnje. [56]

2.4.2.1. Mehanizam biorazgradnje

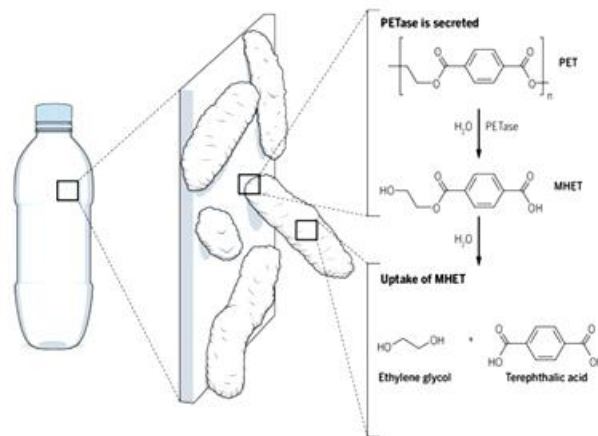
U nepovoljnim uvjetima bakterije mijenjaju svoju morfologiju koja im omogućuje preživljavanje te se tako u ranoj fazi stvaranja biofilma na površini MP-e uz pomoć enzima omogućuje njegova adhezija. [59] Samom procesu biorazgradnje prethodi izloženost UV zračenju ili oksidirajućim agensima koji uzrokuju nastajanje karbonilne grupe te se smatra da je takav oblik MP lakši za razgradnju. [59] Godine 2013. godine provedeno je istraživanje o enzimima koji su zaslužni za biorazgradnju PE-a pomoću bakterije *Rhodococcus ruber*. [60] *Rhodococcus ruber* posjeduje enzim lakazu, enzim koji pripada grupi oksidaza plavog bakra u gljivama i biljkama zaslužni za razgradnju lignina i fenola. [61] Najpoznatiji su kao katalizatori oksidacije aromatskih spojeva, međutim, dokazana je aktivnost lakaze i na ne – aromatskim spojevima. S obzirom na to da je lakaza enzim koji veže bakar te mu je on potreban da bi uspješno djelovao, Sento i sur. pretpostavili su da bi dodatak bakra lakazi povećao biorazgradnju PE, što je i potvrđeno povećanjem razgradnje od 75 % (Slika 15.). Njihovo otkriće dokazuje da bakar i bakar – vežući enzimi imaju veliku ulogu u biorazgradnji PE-a i drugih sintetičkih polimera. [60]



Slika 15. Gubitak mase u postocima uzrokovan dodatkom bakra. [60]

Sljedeći enzim koji pokazuje aktivnost kod razgradnje MP-a uz pomoć mikroorganizama je mangan peroksidaza (MnP). To je izvanstanični hemprotein koji pripada oksidoreduktazama i oksidira Mn^{2+} u Mn^{3+} ukoliko je prisutan H_2O_2 . U prirodi je jedan od najučestalijih enzima

zaslužnih za razgradnju lignina te se primjenjuje u poljoprivredi za razgradnju celuloze i hemiceluloze. [62] *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. i *Arthrobacter* spp. su jedni od najproučivanijih mikroorganizma koji imaju sposobnost razgradnje brojnih polimernih vrsta upravo zahvaljujući enzimima lakazi, lipazi i mangan peroksidazama.[63] Aktivnost mangan peroksidaze dokazana je pri biorazgradnji PE primjenom bakterije *Pseudomonas aeruginosa* koja ima sposobnost cijepanja ugljikove veze koje se nalaze u PE uzrokujući depolimerizaciju čestice MP-a.[64] Ostali enzimi koji pokazuju aktivnosti pri biorazgradnji PE-a su alkan hidroksilaza, rubredoksin i rubredoksin reduktaza.[65] Znanstvenici su najviše proučavali mehanizam PET–aze, enzim s α/β hidroliznim savijanjima koji pripada esterazama i katalizira hidrolizu (PET) do monomera mono-2-hidroksietil tereftalata (MHET), dok njegov dopunski enzim MHET –aza djeluje na MHET pretvarajući ga u tereftalnu kiselinu i etilen glikol (Slika 16.). [66]



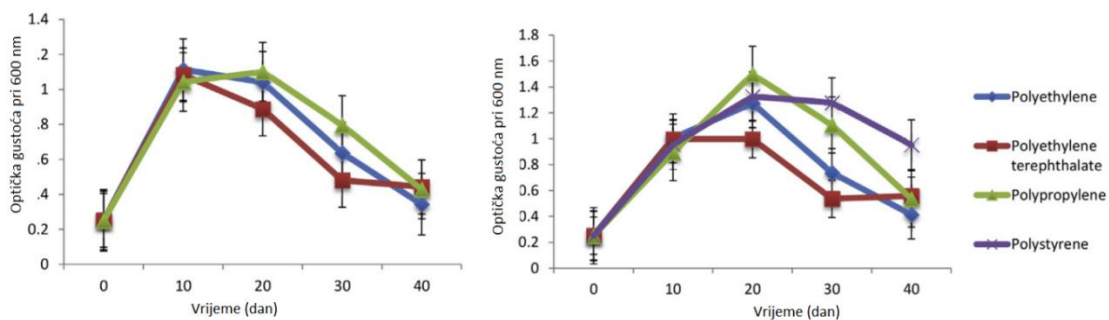
Slika 16. Mehanizam biorazgradnje uz *I. sakaiensis* koja zadrži enzim PET – azu. [67]

2.4.2.2. Biorazgradnja MP-a primjenom bakterije roda *Bacillus*

Razne bakterijske vrste razgrađuju polimerne materijale smanjujuću njihovu molekulsku masu te uzrokuju promjene u morfološkoj i kemijskoj strukturi na način da polimer služi kao glavni izvor ugljika u mediju s minimalnom količinom nutrijenata. Eksperimentalno je dokazano da korištenje dvije ili više vrsta bakterija koje su u simbiotskom odnosu pospješuje proces biorazgradnje u odnosu na korištenje samo jedne vrste. [68]

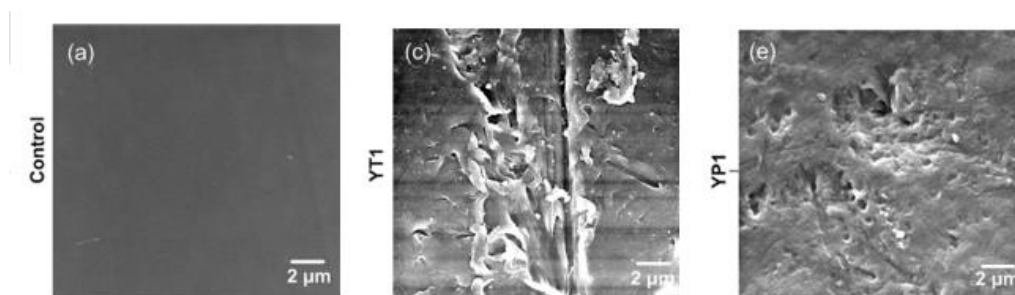
Brojnim istraživanjima dokazana je sposobnost biorazgradnje MP-a bakterija koje pripadaju rodu *Bacillus*. Jedno od takvih je istraživanje Arutchelvi-ja i sur. koji su proučavali utjecaj djelovanje UV zračenja na čestice MP-a na uspješnost biorazgradnje pomoću bakterija *Bacillus cereus* i *Bacillus gottheilii*. Rezultati pokazuju da predtretman UV zračenjem

poboljšava razgradnju čestica MP-a zbog nastanka C=O i O-H skupina.[69] Obje vrste uspješno su promijenile površinu mikročestice gdje su se pojavila udubljenja i napuknuća koja upućuju na razgradnju MP-a.[69] Međutim, primjećeni su različiti rezultati kod biorazgradnje drugačijih vrsta MP-a te tako *B. cereus* pokazuje veći gubitak mase kod razgradnje polistirena, dok *B. gottheilii* ima sposobnost razgradnje šireg raspona vrsta MP-a i može se smatrati višestrukim razgrađivačem.[70] Nadalje, izračunat gubitak mase za 40 dana kod *B.cereus* iznosi 1,6%, 6,6% i 7,4% za PE, PET i PS, odnosno 6,2%, 3,0%, 3,6 i 5,8% za PE, PET, PP i PS kod *B.gottheilii*. Također, pratio se i rast bakterija u mediju s različitim vrstama MP-a te su rezultati prikazani na dijagramima na slici 17. *B. gottheilii* pokazuje veći kapacitet biorazgradnje u odnosu na *B. cereus* što je rezultat varijacija u postojećem metabolizmu, mehanizmu hranjenja s polimerima i genetskim alteracijama kod individualnih vrsta.[70]



Slika 17. Krivulja rasta *B. cereus* (lijevo) i *B. gottheilii* (desno) prilikom biorazgradnje.[70]

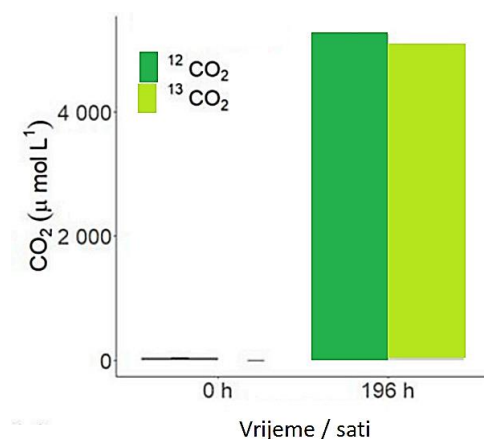
Nadalje, Yang i sur. primjetili su da se ličinka voštanog crva *Plodia interpunctella* može hraniti česticama PE. Uspješno su iz utrobe crva izolirali dvije vrste bakterija (*Enterobacter asburiae* YT1 i *Bacillus sp.* YP1.) koje su zaslužne za biorazgradnju MP-a. U 28 dana formirao se biofilm te se smanjila hidrofobnost površine. Bakterija YTI (10^8 stanica/mL) razgradila je 6,1% PE pločice, a bakterija YPI (10^8 stanica/mL) 10.7% PE pločice u periodu od 60 dana. Pomoću SEM mikroskopa proučavana je površina PE-a(Slika 18.). [71]



Slika 18. SEM slike površine polietilena. **A.** površina bez utjecaja bakterija, **B.** površina pod utjecajem bakterije YT1, **C.** površina pod utjecajem bakterije YP1. [71]

2.4.2.3. Biorazgradnja MP-a primjenom bakterije roda *Rhodococcus*

Bakterije roda *Rhodococcus* gram-pozitivne su vrste koje mogu preživjeti u različitim vrstama staništa poput tla, vode i eukariotskih ćelija. Vrste roda *Rhodococcus* vrlo su važne zbog njihove sposobnosti kataliziranja širokog raspona spojeva, mogućnosti stvaranja bioaktivnih steroida, akrilamida i akrilne kiseline te su često korištene za eksperimentalno promatranje zbog relativno brzog rasta i jednostavnog razvojnog ciklusa.[72] Rose i sur. su 2020. godine istraživali su biorazgradnju LDPE bakterijom *Rhodococcus rhodochrous*.⁷³ Prilikom biorazgradnje LDPE pratili su nastajanje i mjerili količinu nastalog CO₂ u vodenom mediju gdje je jedini izvor ugljika bio polimer. Mjerenje količine nastalog CO₂ pomoću plinske kromatografije već se dugo koristi u znanosti, međutim, još nikada nije korištena kao metoda za određivanje biorazgradnje polimera. Kako bi se potvrdila uspješnost metode, usporedno je mjeren i CO₂ nastao prilikom uzgajanja bakterije *R. rhodochrous* na ¹³C-glukozi. Rezultati su prikazani na slici 19. i ukazuju da je količina nastalog CO₂ uz ¹³C-glukozu jednaka količini nastalog CO₂ uz LDPE kao jedinog izvora ugljika.[73] Također, eksperimentalno je dokazana sposobnost biorazgradnje PP-a uz pomoć bakterije *Rhodococcus* sp. ADL36. [74] Nakon 40 dana u mediju u kojoj su prisutne čestice MP-a, smanjila se njihova težina čestica za 7,3%. Kako bi dodatno potvrdili biorazgradnju PP-a, provedena je FTIR spektroskopija prije i nakon biorazgradnje te je dokazano da je uistinu došlo do smanjenja molekulske mase čestica. [74]



Slika 19. Količina nastalog CO₂ nakon 196 sati uz polimer kao izvor ugljika (tamno zelena) i ¹³C-glukoze kao izvor ugljika (svijetlo zelena). [74]

Osim navedenih vrsta, neke vrste bakterije roda *Rhodococcus* koje imaju sposobnost biorazgradnje PE-a, PS-a i PP-a su: *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus* sp. C208 i *Rhodococcus rhodochrous* ATC2967. [75]

2.4.2.4. Biorazgradnja MP-a primjenom bakterije roda *Pseudomonas*

Brojne bakterijske vrste roda *Pseudomonas* nalaze se u slanim i slatkim vodama te su zbog svojih raznolikih metaboličkih sposobnosti jedne od najznačajnijih razgrađivača različitih vrsta polimera. [76] To dokazuje i podatak da je od 15 bakterijskih vrsta koje imaju sposobnost biorazgradnje HDPE-a najučinkovitija bila upravo ona koja pripada rodu *Pseudomonas*. Također, na stupanj biorazgradnje utječe struktura polimera kao i vrsta bakterije. Osim PE, bakterije ovog roda imaju sposobnost biorazgradnje i PS-a, PU-a, PET i PVA. Vrste plastike, njegovi biorazgrađivači i enzimi prikazani su u tablici 3. Velika molekulska masa glavni je uzročnik slabe biorazgradnje zato što su polimeri velike molekulske mase manje podložni napadu mikroorganizama što rezultira manjem broju nastalih oligomera i monomera potrebnih za uspješnu razgradnju. Također, polimeri s dugim lancem obično ne mogu proći kroz staničnu membranu te na njih trebaju prvo djelovati izvanstanični enzimi. Nadalje, polimeri su većinom visoko hidrofobne sa stabilnim funkcionalnim grupama poput alkana i fenila, tako da je potrebna njihova oksidacija ili hidroliza kako bi se povećala njihova hidrofilnost, što ih čini prikladnijima za mikrobiološki napad. [56] Na uspješnost biorazgradnje mogu utjecati čimbenici poput pH-vrijednosti, temperature i vlažnosti. Naime, primjećeno je da visoka vlažnost i temperatura mogu potaknuti mikrobiološki uzrokovanu hidrolizu te je kod *P. chlororaphis* pri pH-vrijednosti od 8.5 primjećena optimalna aktivnost enzima esteraze, dok se kod pH =7 primjećuje aktivnost enzima proteaze. [77] Osim navedenih čimbenika koji utječu na stupanj biorazgradnje valja spomenuti i utjecaj UV zračenja. Naime, pri provođenju IR spektroskopske analize PP-a koji je prethodno bio pod utjecajem UV zračenja na spektru se pojavljuju karbonilni pikovi dok toplinski predtretman potiče nastanak esterskih karbonilnih pikova.[77] Pretpostavlja se da su esterske veze prikladnije za napad bakterije *P. stutzeri* s obzirom na to da se kod toplinske oksidacije primjećuje veći gubitak mase PP-a. [77] Međutim, ni tretman UV zračenjem ni termalni predtretman nisu pridonijeli stupnju biorazgradnje polipropilena kod *P. azoformans*. [78]

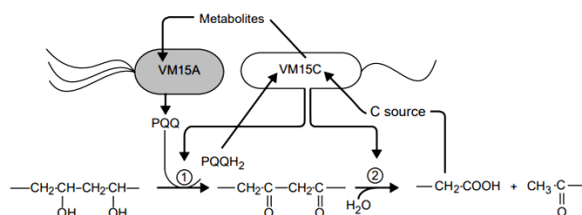
Jednako tako dodatak aditiva može pospješiti stupanj biorazgradnje bakterija roda *Pseudomonas* sp. Jedna vrsta aditiva koje ima takvo svojstvo kada su dodani polimeru je škrob koji pruža nutritivni izvor koji bakterijske stanice mogu lako metabolizirati. Tako je PE pomiješan sa hidroksipropiliranim škrobom rezultirao većom biorazgradnjom uz pomoć bakterije *P. aeruginosa* ATCC 13388 u usporedbi sa polietilenom bez škroba. [79] Međutim, u sustavima s aditivima problem predstavlja smanjenje mehaničke snage i uporabljivost materijala. Zbog toga je bolje imati nutritivni stimulans prisutan u mediju gdje se vrši biorazgradnja u odnosu na umiješan aditiv. To dokazuje i činjenica da je došlo do veće

razgradnje poliuretana uz bakteriju *P. protegens* Pf-5 u mediju s dodatkom citrata i sukcinata. [80]

Tablica 3. Popis vrsta bakterija roda *Pseudomonas* i pripadajući enzimi koji imaju sposobnost razgradnje različitih vrsta MP-a. [76]

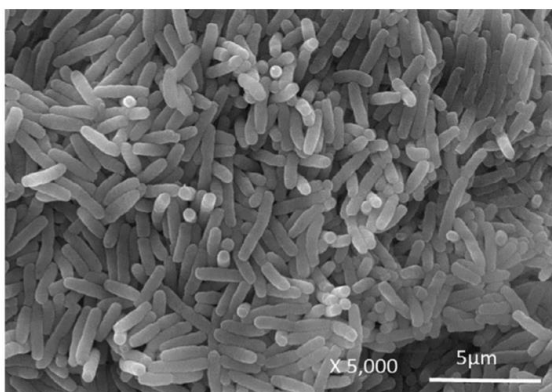
| Vrsta plastike | Mikroorganizmi | Enzimi |
|-------------------|-----------------------------------|----------------------|
| LDPE | <i>Pseudomonas</i> sp. AKS2 | Hidrolaza |
| LMWPE | <i>Pseudomonas</i> sp. E4 | Alkan hidoksilaza |
| PVC | <i>Pseudomonas putida</i> AJ | Alken monooksigenaza |
| Poliester | <i>Pseudomonas chlororaphis</i> | Poliuretanaza |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Esteraza |
| | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Esteraza |
| | <i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 | Lipaza |
| | <i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5 | Lipaza |
| PET | <i>Pseudomonas</i> sp. | Lipaza |
| Polietilen glikol | <i>Pseudomonas stutzeri</i> | PEG dehidrogenaza |
| PVA | <i>Pseudomonas vesicularis</i> PD | Esteraza |

Osim vrste medija u kojoj se događa biorazgradnja, na njezinu uspješnost može utjecati i prisutnost drugih bakterija. Primjerice, *P. putida* VM15A i *Pseudomonas* sp. VM15 C ne mogu rasti samostalno na polivinil alkoholu (PVA) kao jedinom izvoru ugljika. No ukoliko se one nalaze zajedno u mediju, žive u simbiozi i imaju sposobnost biorazgradnje PVA. Naime, VM15A otpušta factor rasta PQQ koji omogućuje rast VM15C na PVA.[81] Njihov simbiotski način života i mehanizam razgradnje prikazan je na slici 20. VM15C je bakterija koja ima sposobnost razgradnje PVA te mu je potreban faktor rasta PQQ za korištenje PVA kao izvor ugljika. Također, ukoliko se u medij doda PQQ, bakterija koja razgrađuje PVA može rasti u čistoj kulturi te je potrebna koncentracija za razgradnju PVA vrlo niska (~10 µg/L) te je dovoljna za maksimalnu brzinu rasta. [81]



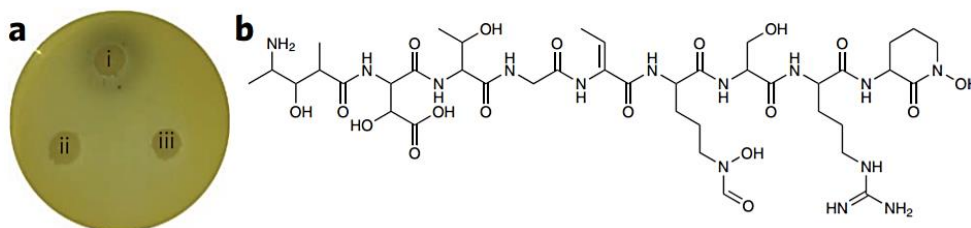
Slika 20. Simbioza VM15A i VM15C na PVA i mehanizam biorazgradnje. 1. PQQ – PVA dehidrogenaza. 2. oksidirana PVA hidrolaza. [81]

Delftia acidovorans, originalno poznata kao *Psuedomonas acidovorans* ili *Comamonas acidovorans* je aerobna, gram – negativna, blago zakrivljena štapićasta bakterija koja može živjeti kao jedna stanica ili u paru (Slika 21.).⁸² Vrlo je raširena te se može pronaći u tlu i vodi. Mezofilna je bakterija i optimalna temperatura za njen rast iznosi 30°C te preferira okolinu sa minimalnom koncentracijom soli. [82]



Slika 21. SEM prikaz *Delftia acidovorans* ESM-1. [83]

D. acidovorans sojevi Cs1-4 i SPH-1 mogu koristiti fenantren, piruvat, vanilat, sukcinat, mravlju kiselinu, mliječnu kiselinu i propionsku kiselinu kao izvor ugljika. Također, bakterija je otporna na razna antimikrobna sredstva. Prema Dynes i sur., *D. acidovorans* formira efektivni biofilm koji štiti bakteriju od klorheksidina (CHX) koji se koristi kao antibakterijsko sredstvo. [84] Sposobna je pretvarati toksične metale poput selenija i kroma u manje toksične produkte i može razgraditi fenantren koji često onečišćuje okoliš. [85] Nadalje, *Delftia acidovorans* je jedna od rijetkih bakterija, zajedno sa *Cupraiaavidus metallidurans*, koja ima sposobnost metaboliziranja zlata. Naime, bakterija sadrži sekundarni metabolit, ne – ribosomski peptid - delftibaktin, koji reducira otopljene ione zlata u mikroskopsko grumenje čistog zlata. Jedno od brojnih istraživanja koje dokazuje tu činjenicu je eksperiment Johnstona i sur. 2013. godine. u kojem su uzgajane kulture bakterija *D. acidovorans* i *Cupraiaavidus metallidurans* te su se nakon dodatka 10mM otopine $AuCl_3$ primjetile nanočestice zlata nakon 3 sata (Slika 22.). [86] Bakterija *Delftia acidovorans* ima sposobnost razgradnje polimera sintetičkog PUR koji se koristi kao sirov materijal u brojnim industrijama. Nakajimakambe i sur. 1995. proveli su eksperiment sposobnosti razgradnje PUR – a, koji bakteriji služi kao izvor ugljika i dušika. [86] Stupanj biorazgradnje pratio se vaganjem čestica PUR-a prije i nakon inkubacije s bakterijom, pomoću HPLC-a te mjerenjem indeksa loma (RI). Rezultati pokazuju da je došlo do smanjenje mase PUR čestica nakon 14 dana inkubacije. [87]



Slika 22. a. Bakterijske kulture *D. acidovorans* i *Cupraiaavidus metallidurans* (i, ii, iii). Tamne točke predstavljaju zlatne nanočestice. **b.** Struktura ne-ribosomskog peptida delftbaktina. [86]

2.4.2.5. Biorazgradnja MP-a primjenom gljiva

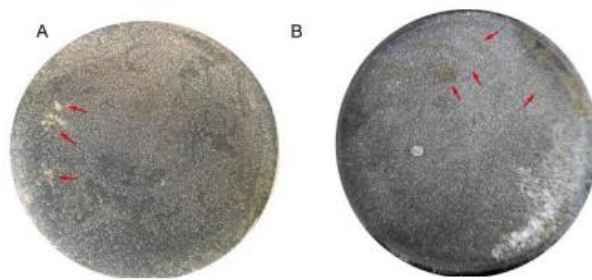
Gljive su heterotrofni organizmi što znači da kao izvor ugljika koriste organsku tvar. Razvile su visok stupanj metaboličke raznolikosti koja im omogućuje da koriste širok opseg organskih supstrata za rast, uključujući jednostavne spojeve poput nitrata, amonijaka, acetate i etanola.[88] Zahvaljujući njihovom velikom metaboličkom potencijalu, uključujući i multienzimske izvanstanične komplekse, gljive (plijesni i kvasci) predstavljaju velik potencijal biorazgradnje čestica MP-a. Različite vrste gljiva mogu razgraditi veliki spektar vrsta MP-a uključujući PE, PS, PU, PVC i polilaktičnu kiselinu (PLA). Gljive koje razgrađuju određene vrste MP-a prikazane su u tablici 4. [89]

Tablica 4. Gljive koje imaju sposobnost biorazgradnje MP-a.[89]

| Vrsta gljive | Vrsta MP-a | Vrijeme biorazgradnje / mjesec | Izgubljena masa / % |
|--|------------|--------------------------------|---------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i> VRKPT2 | PE | 1 | 9,34 |
| <i>Aspergillus tubingensis</i> VRKPT1 | | 1 | 6,88 |
| <i>Trichoderma harzianum</i> | | 3 | 40,00 |
| <i>Cephalosporium</i> sp. (NCIM 1251) | PS | 2 | 2,17 |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp. | | 1 | 74,43 |
| <i>Phoma</i> sp. | PU | 5 | 95,00 |
| <i>Tritirachium album</i> | PLA | 2 | 76,00 |
| <i>Trichoderma viride</i> | PLA | 0,7 | 1.20 |

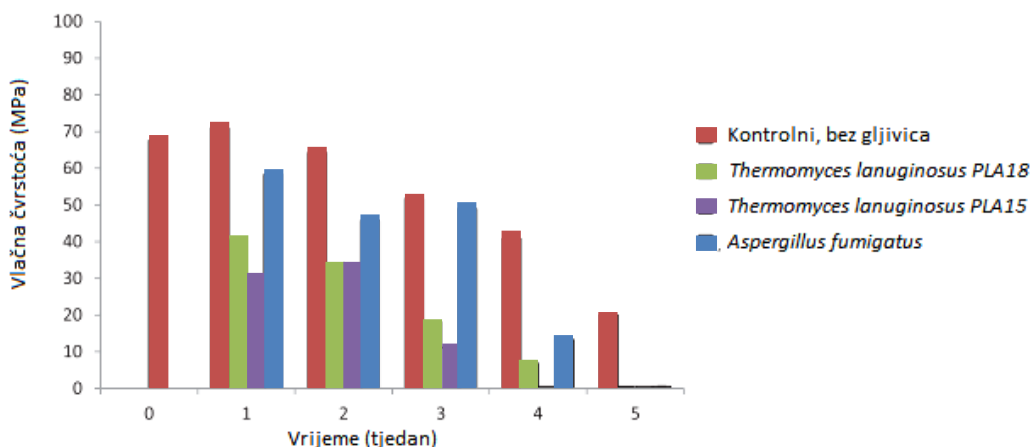
Zalerion maritimum je vrsta gljive koja je vrlo raširena u morima te je 2017. eksperimentalno dokazana njezina sposobnost biorazgradnje rezultirajući smanjenjem mase i veličine peleta. [90] Naime, čestice PE-a bile su u doticaju s bakterijom 14 dana te je u tom periodu došlo do smanjenja mase za čak $82,0\% \pm 2,1\%$ što predstavlja značajan gubitak. Osim promjene mase MP-a, što je jedan od indikatora biorazgradnje, primjećene su i promjene na FTIR-ATR i NMR spektrima koje jednako tako potvrđuju pretpostavku da gljiva *Zalerion maritimum* razgrađuje PE. [90]

Osim gljive *Zalerium maritimum*, mogućnost biorazgradnje PE-a ima i gljiva *Aspergillus flavus* nazvana (PEDX3) koja je u istraživanju Zhanga i sur. 2019. izolirana iz crijeva voskovog moljca, *Galleria mellonella*. [91] Kolonija PE-a razgrađujućih gljiva uzgojena je na PDA (*potato dextrose agar*) mediju te je proučavana njihova sposobnost biorazgradnje tijekom 30 dana. Rezultati pokazuju značajan rast gljiva (Slika 23.) na PDA pločici u usporedbi s medijom bez prisustva čestica PE. [91]



Slika 23. Rast gljive PEDX3 na SCS – LDPE pločici (A) i na SCS – HDPE (B) pločici. Kolonije su označene crvenim strelicama. [91]

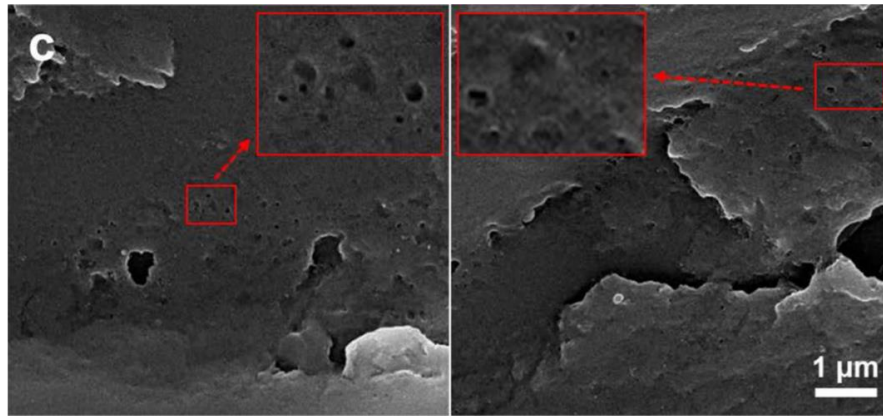
Doseg biorazgradnje PLA najviše ovisi o temperaturi. Naime, kada je PLA blizu temperature staklišta ($50 - 62^{\circ}\text{C}$), biorazgradnja značajno poraste zato što su u tom stanju hidroliza estera i mikrobiološko vezanje favorizirani zbog povećane absorpcije vode.[92] Sljedeća vrsta gljive koja ima sposobnost biorazgradnje je *Thermomyces lanuginosus*. Ona snažno kolonizira površinu PLA što se očituje i u gubitku vlačne čvrstoće. Utjecaj gljiva na vlačnu čvrstoću PLA prikazan je na slici 24. te se može zaključiti da u vremenskom intervalu od 4 tjedna može doći do pada vlačne čvrstoće za 60 Mpa. [93]



Slika 24. Pad vlačne čvrstoće PLA uzrokovano biorazgradnjom različitih vrsta gljiva. [93]

2.4.2.6. Biorazgradnja MP-a primjenom algi

Alge su autotrofni fotosintetski organizmi od kojih većinu čine morske alge, ali žive i u površinskim vodama, različitim vrstama tla i kamenju uz prisutnost dovoljne količine svjetlosti i vode. Alge procesom fotosinteze pomoću klorofila, karotenoida i fikobilina pretvaraju ugljikov dioksid u ugljikohidrate i kao produkt nastaje kisik. Zbog toga imaju vrlo važnu ulogu u morskom ekosustavu i čine bazu hranidbenog lanca te postanak gotovo svih životinjskih vrsta ovisi o algama. [94] U posljednjih nekoliko godina sve više se istražuje njihova mogućnost biorazgradnje raznih vrsta MP-a što je iznenađujuće s obzirom na to da brojna istraživanja dokazuju smanjenje brzine rasta raznih vrsta alga u prisutnosti različitih vrsta MP-a. Eksperiment koji su proveli Vimal Kumar i sur. pokazuje da zelena - plava alga (cijanobakterija), *Anabaena spiroides*, ima najveću sposobnost biorazgradnje LDPE-a (8.18%), zatim *Navicula pupula* (4.44%) i zelena alga *Scenedesmus dimorphus* (3.74%). [95] Nadalje, mikroalge mogu biti genetski modificirane tako da imaju sposobnost proizvodnje i izlučivanja enzima koji sudjeluju u razgradnji plastike. Primjerice, zelena mikroalga *Chlamydomonas reinhardtii* modificirana je tako da stvara PET-azu i stanični lizat alge u inkubaciji sa PET-om rezultira udubljenjima i rupama na površini PET materijala i nastajanjem TPA, što je produkt potpuno razgrađene PET, slika 25. [96] Ovakva nova otkrića o biorazgradnji mikroplastike poput genetske modifikacije otvaraju brojna vrata prema ekološki prihvatljivoj razgradnji što u budućnosti dovodi do smanjenja MP-a u okolišu i kvalitetnijem životu za sve organizme.



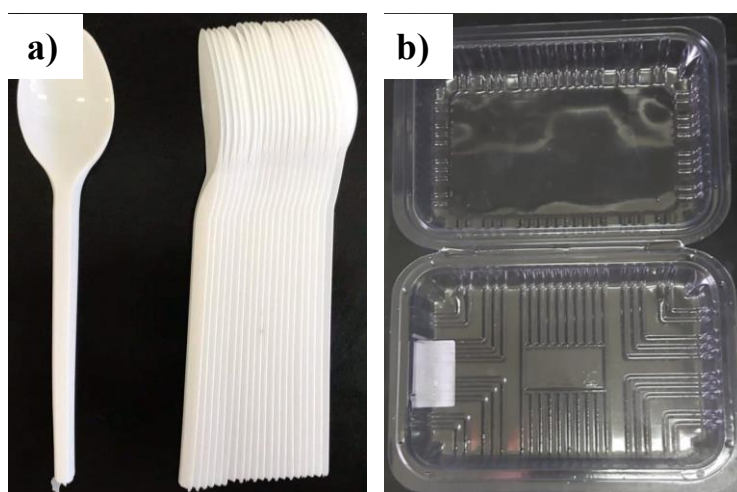
Slika 25. Udubljenja i rupe nastale na površini PET– anakon 4 – tjedne inkubacije s modificiranom mikroalgom *Chlamydomonas reinhardtii*. [96]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroplastika

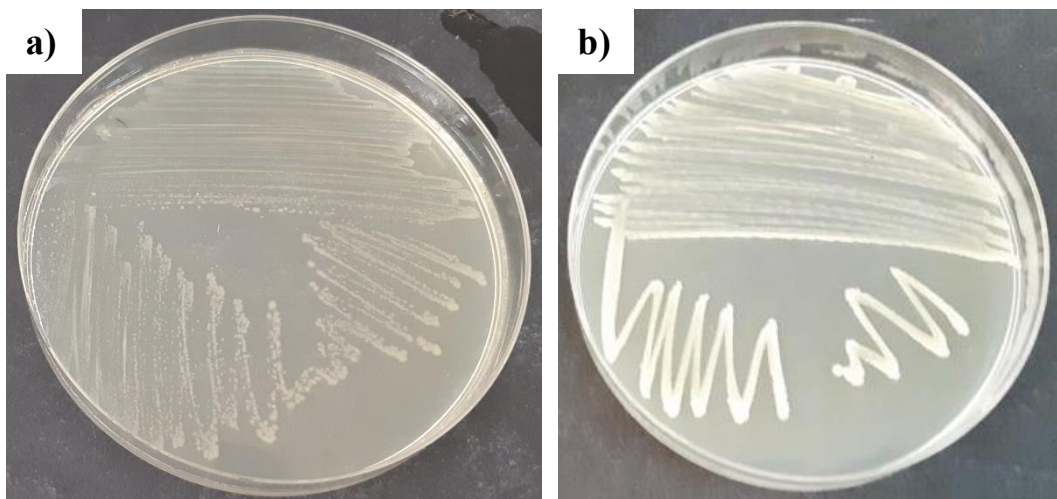
Za ispitivanje značajnih čimbenika za biorazgradnju PS-a i PVC-a (slika 26.) bakterijama *Delftia acidovorans* i *Bacillus subtilis* korištene su čestice PS-a i PVC-a veličine 500 – 710 μm i čestice manje od 300 μm .



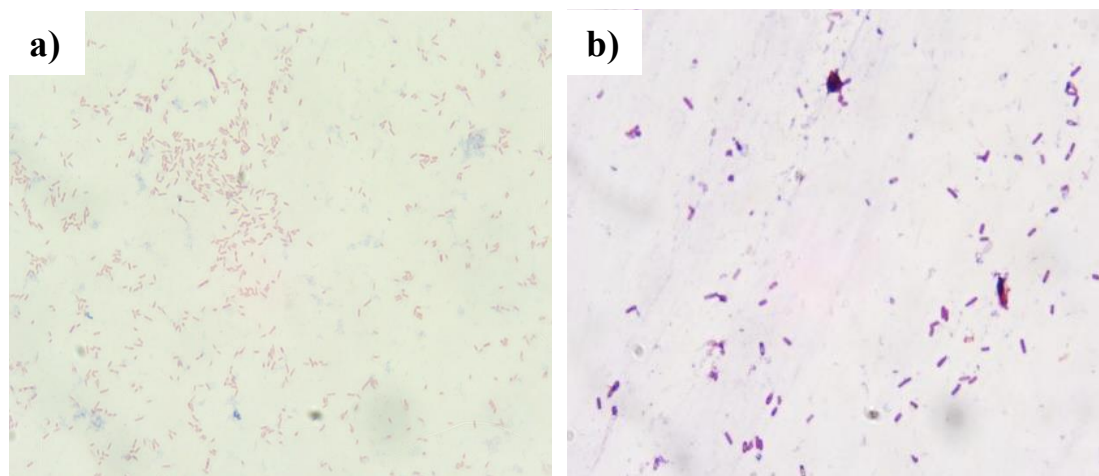
Slika 26. Prikaz plastičnih materijala korištenih za dobivanje čestica mikroplastike PS-a (a) i PVC-a (b).

3.1.2. Mikroorganizmi

Za provedbu procesa biorazgradnje MP-a korištene su dvije bakterijske kulture – gram pozitivna bakterijska kultura *Bacillus subtilis* i gram negativna bakterijska kultura *Delftia acidovorans*. Kulture su pohranjene u zbirci mikroorganizama na Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Bakterija *Bacillus subtilis* izolirana je iz uzorka komposta, dok je *Delftia acidovorans* izolirana iz riječnog sedimenta. Kulture su uzgajane na hranjivome agaru tijekom 24-48 h pri 37 °C (slika 27). Morfologija stanica bakterijskih kultura snimljena je mikroskopom pri povećanju od 1000x, kao što je prikazano na slici 28.



Slika 27. Fotografski snimak izraslih bakterijskih kultura *Delftia acidovorans* (a) i *Bacillus subtilis* (b) dobivene tehnikom iscrpljivanja na hranjivom agaru.



Slika 28. Mikrofotografije bakterijskih kultura *Delftia acidovorans* (a) i *Bacillus subtilis* (b) obojane po Gramu snimljena u prolaznoj svjetlosti, P = 1000×.

3.1.3. Kemikalije i mediji

- **Hranjiva podloga**

Za uzgoj bakterijskih kultura pripravljena je 1 L hranjivog agara (HA) prema recepturi proizvođača (Biolife Manual, Ingaf, Italija 1991). Podloga je prije upotrebe homogenizirana, zagrijana do vrenja te sterilizirana u autoklavu tijekom 15 minuta pri 121 °C i 1,1 atm.

- **Mineralni medij**

2,0 L mineralnog medija uz podešavanje pH-vrijednosti (6,0 ili 8,0) koristi se za postavljanje pokusa. pH-vrijednost mineralnog medija podešavala se s 1 M KOH ili 0,1

M H₂SO₄. Sastav mineralnog medija, koji je korišten za pripremu bakterijske suspenzije, kao i za provedbu procesa biorazgradnje, prikazan je u Tablici 5 [97].

Tablica 5. Sastav mineralnog medija [97].

| Tvar | γ / g/L |
|--|----------------|
| K ₂ HPO ₄ | 12,500 |
| KH ₂ PO ₄ | 3,800 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,000 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,100 |
| H ₃ BO ₃ | 0,232 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,174 |
| FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O | 0,116 |
| CoSO ₄ ·7H ₂ O | 0,096 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O | 0,022 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,008 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 0,008 |

- **Fiziološka otopina**

Za određivanje CFU vrijednosti (*Colony forming units*) potrebno je pripremiti 500 mL 0,9% fiziološke otopine, dodavanjem 4,5 g NaCl-a u 500 mL deionizirane vode.

- **Čista kultura bakterija *Vibrio fischeri***

Određivanje toksičnosti provedeno je na čistoj kulturi bakterija *Vibrio fischeri*. Kruta podloga za održavanje čiste kulture priprema se otapanjem sastojaka, prikazanih u Tablici 6., u 1,0 L deionizirane vode, uz zagrijavanje do vrenja.

- **Otopina za resuspenziju**

Za određivanje toksičnosti potrebno je pripremiti hranjivu izosmotsku otopinu za resuspendiranje bakterijske kulture. U 1,0 L deionizirane vode otope se tvari prikazane u tablici 7. Otopina se prokuha i ohladi. pH-vrijednost otopine mora iznositi između 6,8 i 7,2, a podešava se pomoću NaOH ili HCl. Otopina se čuva u hladnjaku do pojave zamućenja.

Tablica 6. Sastav krute podloge za održavanje čiste kulture bakterije *Vibrio fischeri*.

| Tvar | Masa / g |
|-------------------|----------|
| NaCl | 30 |
| Agar | 15 |
| Glicerol | 10 |
| CaCO ₃ | 5 |
| Pepton | 5 |
| Kvašćev ekstrakt | 3 |

Tablica 7. Tvari potrebne za pripremu otopine za resuspendiranje bakterijske kulture *Vibrio fischeri*.

| Tvar | Masa / g |
|---------------------------------|----------|
| NaCl | 20,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 |
| CaCl ₂ | 0,5 |
| MgSO ₄ | 0,2 |
| glicerol | 0,6 |
| glukoza | 10,0 |
| rafinoza | 10,0 |

- **Otopina 2% NaCl-a**

Radna otopina za pripremu niza razrjeđenja pripremi se dodavanjem 2 g NaCl-a u odmjernu tikvicu od 100 mL te dodavanjem deionizirane vode do oznake. pH-vrijednost otopine se podešava pomoću NaOH ili HCl, a mora iznositi između 6,8 i 7,2.

- **Etanol (70%)**

Za sterilizaciju MP-e prije postavljanja pokusa koristio se etanol (70%).

3.2. Mjerni instrumenti

- Za provedbu eksperimenata korištena je rotacijska tresilica Heindolph Unimax 1010.
- Za precizno vaganje korištena je vaga Sartorius AG, Njemačka.

- Za filtraciju sterilizirane mikroplastike korišten je membranski lijevak uz vakuum pumpu i sterilni celulozno nitratni (C/N) membranski filteri Ahlstrom ReliaDisc™, promjera pora 0,45 µm.
- Za sterilizaciju mineralnog medija, hranjive podloge, čistog staklenog posuđa, nastavaka za poluautomatske pipete korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija.
- pH-vrijednost određivana je pH-elektrodom SenTix® 940, a koncentracija otopljenoga kisika kisikovom elektrodom FDO® 925 pomoću prijenosnog mjerača WTW Multi 340i.
- Optička gustoća određivana je na spektrofotometru Hach, Model DR/2400, SAD.
- Ukupni ugljik (TC) i ukupni organski ugljik (TOC) određeni su pomoću TOC-V_{CSH} Shimadzu uređaja.
- Ionski sastav uzoraka određen je pomoću ionske kromatografije provedene na HPLC UFLC XR D4, Shimadzu uređaju.
- Materijali, LDPE i PS karakterizirani su pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama tj. FTIR-ATR spektrometru, PerkinElmer, Spectrum One.
- Ispitivanje toksičnosti provedeno je na luminometru Lumistox 300 proizvođača *Dr Lange* te su uzorci termostatorani na 15°C u termostatoranom inkubacijskom bloku Lumistherm proizvođača *Dr Lange*.

3.3. Metoda rada

3.3.1. Priprema mikroplastike

Za ove pokuse su korišteni materijali koji se koriste u svakodnevnoj upotrebi. Za PS je korišten jednokratni plastični pribor (plastične žlice), dok je za PVC korištena jednokratna ambalaža (slika 26.). Navedeni materijali su prvo usitnjeni škarama te potom u kriomlinu nadopunjenim s tekućim dušikom. Osušene čestice su potom prosijavane na mehaničkim sitima u svrhu raspodjele veličine čestica u rasponima - <300 µm te 500-710 µm. Prije postavljanja pokusa čestice MP-a su izvagane u sterilne tikvice te sterilizirane u 70% etanolu. Čestice su se vakuuskom filtracijom izdvojile iz etanola te dodatno isprale sterilnom destiliranom vodom. MP-e je potom pomoću sterilne žlice i pincete prebačena u Erlenmeyerove sterilne tikvice volumena 250 mL.

3.3.2. Priprema bakterijskih suspenzija

Bakterijske kulture su se uzgajale na hranjivome agaru tijekom 24 h pri 37 °C. Potom su pripremljene suspenzije svake pojedine bakterije u mineralnom mediju te su kulture stavljene na preduzgoj u mineralni mediju svrhu postizanja logaritamske faze rasta. Optička gustoća (OG) u sustavu iznosila je 0,1 ili 0,5, a određivala se spektrofotometrijski pri $\lambda = 600$ nm.

3.3.3. Pokus biorazgradnje prema Taguchi dizajnu

Pokusi su se provodili s ciljem ispitivanja značajnih čimbenika za proces biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterijskih kultura *Bacillus subtilis* i *Delftia acidovorans*. Dizajn eksperimenta se provodi prema Taguchi dizajnu koji daje kombinaciju čimbenika na određenim razinama. Za Taguchi metodu potrebno je odrediti čimbenike i razine na kojima bi oni bili ispitivani. Za ovaj pokus je predviđeno 7 čimbenika: pH-vrijednost, temperatura, veličina MP-a, koncentracija MP-a, broj okretaja, OG i dodatak glukoze, na 2 razine – minimalna i maksimalna vrijednost (Tablica 8).

Tablica 8. Popis čimbenika na dvije razine korištenih u ovom pokusu.

| | razina | 1 - min | 2 - max |
|----------|-------------------------------------|---------|---------|
| A | pH-vrijednost / - | 6 | 8 |
| B | $T / ^\circ\text{C}$ | 15 | 25 |
| C | veličina MP / μm | <300 | 500-710 |
| D | $\gamma_{\text{MP}} / \text{mg/L}$ | 10 | 1000 |
| E | broj okretaja / o/min | 100 | 200 |
| F | OG / - | 0,1 | 0,5 |
| G | $\gamma_{\text{GLU}} / \text{mg/L}$ | 0,0 | 100,0 |

Nakon unosa čimbenika i razina, prema dizajnu se dobiva L_8 ortogonalna matrica koja predstavlja broj tikvica i kombinaciju čimbenika na dvije razine. Pokus se sastoji od 16 tikvica, Tablica 9. Pokus s bakterijom *Bacillus subtilis* označen je oznakom P1, dok je pokus s bakterijom *Delftia acidovarans* označen oznakom P2. Pokusi su se provodili u Erlenmeyerovim tikvicama od 250 mL, a radni volumen je bio 100 mL tijekom 30 dana. Tikvice su sadržavale odgovarajući volumen mineralnog medija, sterilizirane čestice MP-a, te određeni volumen bakterijske suspenzije. Postavljene su i kontrolne tikvice, koje nisu sadržavale čestice MP-a. Početni uvjeti prikazani su u Tablici 10. za pokus P1 i u Tablici 11. za pokus P2.

Tablica 9. L₈ ortogonalna matrica za svaki ispitivani čimbenik prema Taguchi dizajnu za pokus P1 s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* i pokus P2 s bakterijskom kulturom *Delftia acidovarans* za PS i PVC.

| Pokus # | pH- vrijednost / - | T / °C | veličina MP / μm | γ _{MP} / mg/L | broj okretaja / o/min | OG / - | γ _{GLU} / mg/L |
|--------------|--------------------------|--------|---------------------|---------------------------|--------------------------|-----------|----------------------------|
| P1-1; P2-1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| P1-2; P2-2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P1-3; P2-3 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| P1-4; P2-4 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P1-5; P2-5 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| P1-6; P2-6 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| P1-7; P2-7 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| P1-8; P2-8 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 |
| P1-9; P2-9 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| P1-10; P2-10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| P1-11; P2-11 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| P1-12; P2-12 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| P1-13; P2-13 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| P1-14; P2-14 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| P1-15; P2-15 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| P1-16; P2-16 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 |

Tablica 10. Početni uvjeti u pokusu P1 (biorazgradnja PS-a i PVC-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus subtilis*).

| | OG = 0,5 | OG = 0,1 |
|---|----------|----------|
| Optička gustoća | 0,52 | 0.17 |
| pH-vrijednost | 7,91 | 6,23 |
| γ (O₂) / mg/L | 8,03 | 8,19 |
| T / °C | 15,00 | 26,00 |
| log CFU₀ / - | 8,04 | 7,27 |

Tablica 11. Početni uvjeti u pokusu P2 (biorazgradnja PS-a i PVC-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans*).

| | OG = 0,5 | OG = 0,1 |
|---|----------|----------|
| Optička gustoća | 0,53 | 0,17 |
| pH-vrijednost | 7,91 | 6,04 |
| γ (O₂) / mg/L | 8,40 | 8,17 |
| T / °C | 24,00 | 15,00 |
| log CFU₀ / - | 8,16 | 7,66 |

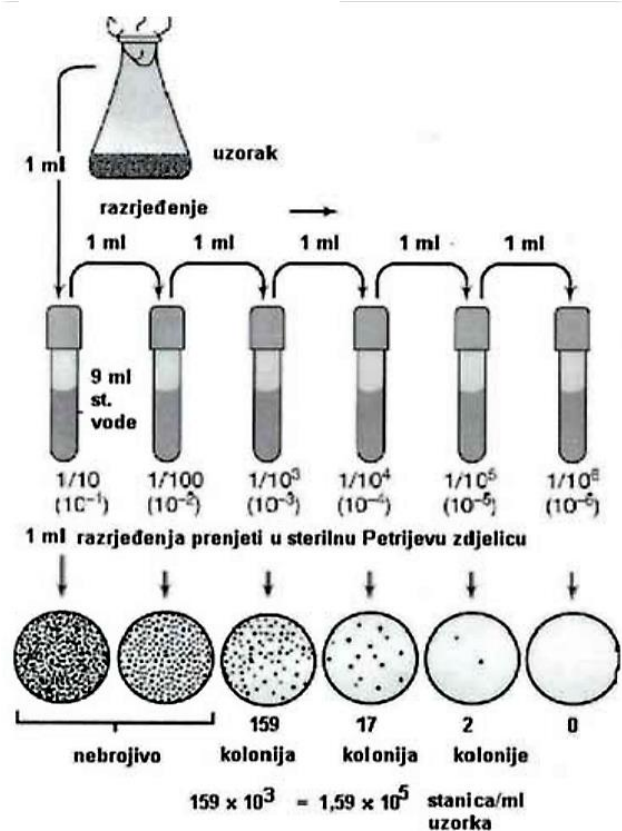
Tijekom provedbe pokusa, praćena je optička gustoća, OG, ukupan broj živih stanica bakterijske kulture, CFU, vrijednosti ukupnog ugljika, TC, ukupnog organskog ugljika, TOC, te ukupnog anorganskog ugljika, IC, vrijednosti aniona i kationa primjenom ionske kromatografije, te HPLC/MS analizom je praćeno otpuštanje aditiva s površine čestica MP-a. Nakon 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje, iz uzoraka su izdvojene čestice MP-a vakuumskom filtracijom, a za vodenu fazu (filtrat) se provodilo istraživanje toksičnosti primjenom testa toksičnosti s *Vibrio fischeri*. Izdvojene čestice MP-a analizirale su se FTIR-ATR spektroskopijom.

3.3.4. Mjerenje optičke gustoće

Mjerenje optičke gustoće provodilo se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 600 nm pomoću spektrofotometra Hach, Model DR/2400, SAD. Izuzimalo se 0,5 mL uzorka uz dodatak 4,5 mL deionizirane vode čime se uzorak razrijedio 10x.

3.3.5. Određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija

Ukupan broj živih stanica u uzorcima, određivao se pripravom decimalnih razrjeđenja uz sterilnu tehniku rada. Razrjeđenje 10^{-1} dobiva se tako da se 1 mL dobro homogeniziranog originalnog uzorka sterilnom tehnikom rada prenese u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Razrjeđenje 10^{-2} dobiva se tako da se 1 mL dobro homogeniziranog razrjeđenja 10^{-1} sterilnom tehnikom rada prenese u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine. Primjenom istoga principa rada, pripremaju se i veća razrjeđenja. Sadržaj svake epruvete se homogenizira električnim homogenizatorom (Slika 29.)



Slika 29. Prikaz priprave razrjeđenja.

Nakon priprave razrjeđenja otpipetira se 1 mL određenih razrjeđenja (10^{-6}) u sterilne Petrijeve zdjelice i to sterilnom tehnikom rada, tj. u blizini plamenika, tako da se jednom rukom odigne djelomično poklopac sterilne Petrijeve zdjelice, a drugom rukom se Paster pipeta s otpipetiranim razrjeđenjem prisloni u Petrijevu zdjelicu i ispusti se uzorak. Prethodno je potrebno otopiti hranjivu podlogu (hranjivi agar), zagrijavanjem do vrenja sve dok se podloga potpuno ne otopi. Podlogu čuvati u vodenoj kupelji pri 45°C . Otopljenu podlogu sterilno izliti u Petrijeve zdjelice s izlivenim razrjeđenjima uz kružno pokretanje u obliku broja 8 radi

homogeniziranja sadržaja. Petrijeve zdjelice staviti u obrnutom položaju (zbog kondenzacije vodene pare) u termostat na inkubaciju pri 37°C tijekom 24 do 48 h. Tijekom inkubacije iz svake bakterijske stanice izraste vidljiva kolonija. Kolonije se broje i pri tome se polazi od činjenice da od jedne bakterijske stanice izraste po jedna kolonija. Broje se Petrijeve zdjelice na kojima je izraslo 30 - 300 kolonija te se brojenje izvodi vizualno. Vrijednost CFU (stanica / mL) određuje se prema jednadžbi (1):

$$CFU = \frac{\text{broj izraslih kolonija}}{1 \text{ mL}} * \frac{1}{\text{razrjeđenje}} \quad (1)$$

3.3.6. Određivanje TOC i TC vrijednosti

Uzorci za određivanje TOC-a i TC-a pripremaju se tako da se u svaki uzorak doda 9,5 mL deionizirane vode te se u uzorak u kojem se određuje TOC vrijednost doda 3 kapi H₂SO₄. Nakon toga uzorci se postave u TOC-V_{CSH} Shimadzu uređaj pomoću kojeg se provodi analiza.

3.3.7. Ionska kromatografija

Ionska kromatografija koristi se za određivanje koncentracije kationa i aniona u izuzetim uzorcima i profiltriranim kroz filter veličine pora 0,45 μm. Navedeni se uzorci stavljaju u vijale za ionsku kromatografiju. Korišten je ionski kromatograf DIONEX ICS SERIES, AS – DV proizvođača ThermoFisher.

3.3.8. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s masenom spektrometrijom

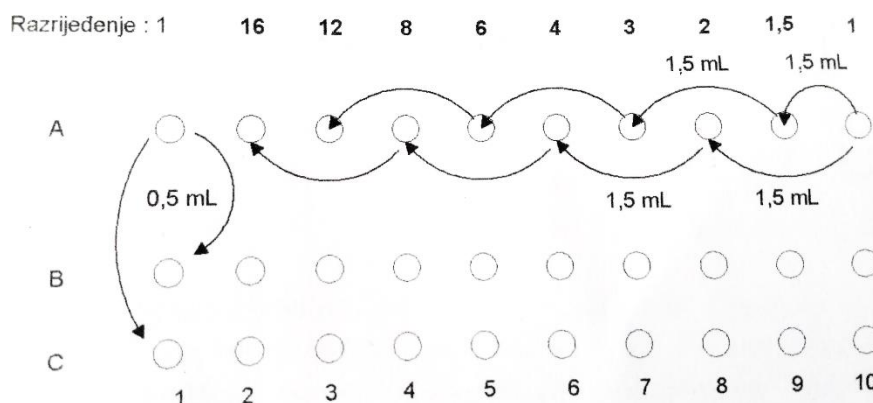
Tijekom pokusa u određenim vremenskim intervalima izuzimano je 500 μL uzorka za HPLC/MS analizu. Dvije pumpe korištene su za podešavanje protoka mobilne faze (0,1% mravlje kiseline + MiliQ i acetonitril/metanol) koji je podešen na 0,5 cm³/min. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 10 μL. S obzirom da se precizan sastav uzorka ne zna, u uređaj se nije stavljalala kolona tj. koristila se metoda bez kolone.

3.3.9. Određivanje toksičnosti vodene faze provedbom testa toksičnosti s bakterijom

Vibrio fischeri

Metoda određivanja aerobne toksičnosti napravljena je u skladu s normom HRV/EN ISO 11348-1:2000 en. [98]. Metoda se temelji na procjeni smanjenja fiziološke aktivnosti čiste kulture bakterija *Vibrio fischeri* u prisutnosti toksičnih tvari, odnosno filtrata nakon provedbe procesa biorazgradnje primjenom bakterija. Kao mjera fiziološke aktivnosti koristi se prirodno

svojstvo luminiscencije ove vrste bakterija. Suspendirana kultura bakterijskih stanica izlaže se rastućem nizu koncentracija toksične tvari, odnosno sve većem udjelu otpadne vode u smjesi, pri čemu se svi ostali parametri u testu održavaju konstantnima. Mjeri se intenzitet luminiscencije na početku testa i nakon 15, odnosno 30 minuta. Instrument očitava dva rezultata: EC₂₀ i EC₅₀ koji predstavlja volumni udio (%) uzorka pri kojemu dolazi do 20%-tnog, odnosno 50%-tnog pada luminiscencije. Prije početka izvođenja testa, kivete moraju biti u termostatom bloku na 15°C barem 15 minuta. Najprije je potrebno epruvetu s čepom napuniti do 2/3 otopinom za resuspenziju. Ušicom eze u sterilnim uvjetima zahvati se grudica čiste kulture povlačenjem u duljini oko 1 cm te se resuspenzira u pripremljenoj epruveti. Kako bi se bakterijska kultura adaptirala, ostavi se pola sata u termostatu na 15°C. Prema uputama, izmjeri se relativna luminiscencija kako bi se provjerila aktivnost bakterijske kulture te za 0,5 mL suspenzije ona mora iznositi najmanje 2000. Test toksičnosti započinje pripremom linearnog niza razrjeđenja. U prvu kivetu stavi se 2%-tni NaCl, a u zadnju stavi se uzorak kojem se mjeri toksičnost. U predzadnju kivetu stavi se 1 mL 2%-tnog NaCl-a, dok se u sve ostale kivete stavi po 1,5 mL 2% NaCl-a. Zatim se u A nizu napravi niz željenih razrjeđenja na način koji je prikazan na slici 30. a u sve ostale kivete B i C niza stavi se po 0,5 mL inkuluma.



Slika 30. Prikaz pripreme linearnog niza tijekom provedbe testova toksičnosti s *Vibrio fischeri*.

Prema uputama, slijedi mjerenje B i C niza: izmjeri se početna luminiscencija inkuluma u B1, doda se 0,5 mL uzorka iz A1 u B1, zatim se izmjeri početna luminiscencija u C1 pa se doda 0,5 mL uzorka iz A1 u C1. B i C nizovi su paralele. Nakon isteka vremena inkubacije izmjeri se luminiscencija. Provedbom testova toksičnosti dobivene su vrijednosti luminiscencija za početne uvjete (0 minuta) i nakon 30 minuta. Za svako su se razrjeđenje, po linearnom nizu, radile dvije paralele te se rezultati računaju upotrebljavajući srednje vrijednosti luminiscencija. Inhibicija, izražena u postotku, računa se prema sljedećoj jednadžbi 2:

$$INH = \frac{LU_0 - LU_{uz}}{LU_0} \times 100\% \quad (2)$$

gdje je LU_0 srednja vrijednost luminiscencija kontrole nakon inkubacijskog vremena, $t = 30$ min, a LU_{uz} srednja vrijednost luminiscencija uzorka nakon inkubacijskog vremena, $t = 30$ min. EC_{20} i/ili EC_{50} vrijednost izražena u postocima je dobivena preko uređaja Lumistox ili procijenjena nakon provedbe testa pomoću bakterije *Vibrio fischeri*.

3.3.10. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

Uzorci mikroplastike su okarakterizirani ATR-FTIR spektroskopijom. Materijali su se analizirali prije i nakon provedbe pokusa biorazgradnje. Za analizu nije bila potrebna priprema uzoraka. Uzorkom navedene mikroplastike, u čvrstom stanju, bilo je potrebno prekriti cijelu površinu prizme. Kao rezultat dobiveni su spektri karakteristični za pojedini materijal.

3.3.11. Određivanje značajnih čimbenika za proces biorazgradnje MP-e primjenom

Bacillus subtilis* i *Delftia acidovarans

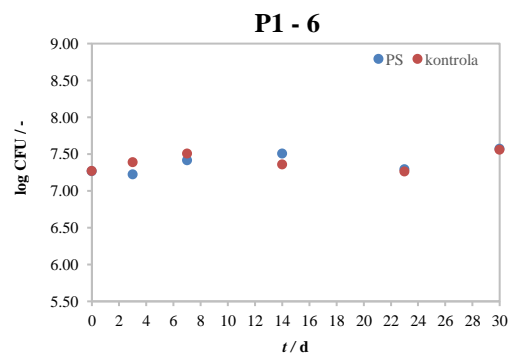
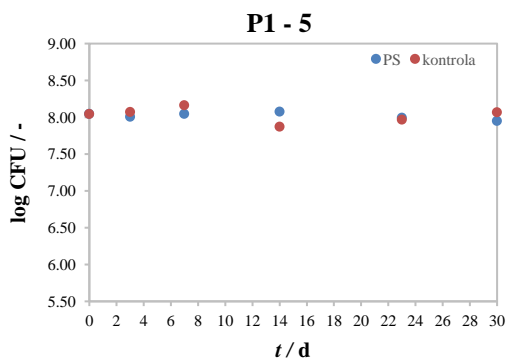
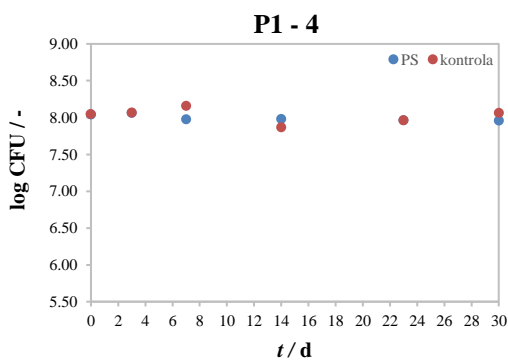
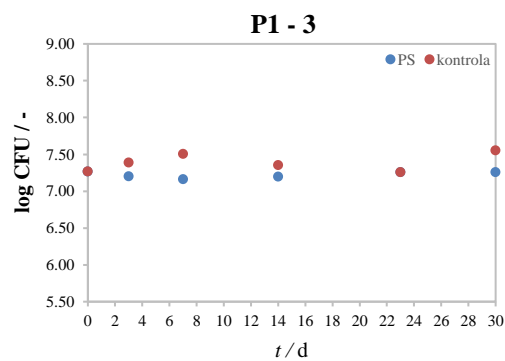
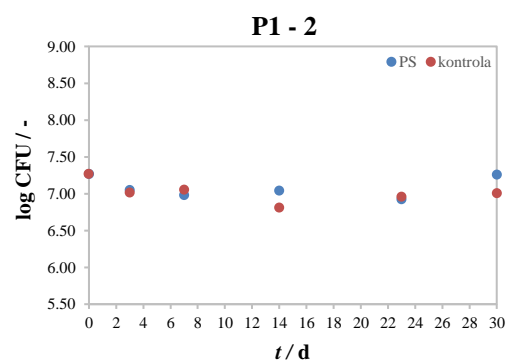
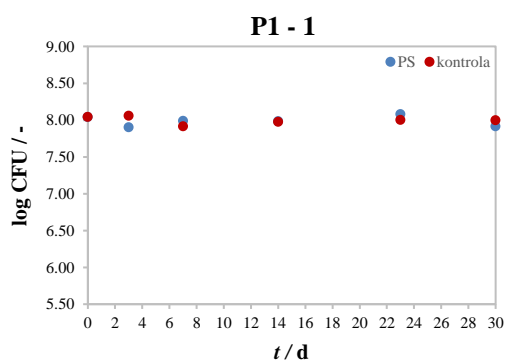
Tijekom provedbe pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a, praćena je logaritamska vrijednost ukupnog broja živih stanica bakterija, log CFU. Kao odziv (eng. *Response*), koristio se upravo log CFU. Pomoću programa Design Expert 7,0, SAD, odredili su se značajni čimbenici za provedene procese biorazgradnje za obje bakterije i obje vrste MP-a, uz ANOVA statističku analizu eksperimentalnih podataka. S obzirom na doprinos (eng. *Contribution*) i p -vrijednost svakoga ispitivanog čimbenika, za svaki su pokus (P1 i P2) određeni čimbenici koji značajno utječu na proces biorazgradnje ispitivanih MP-a.

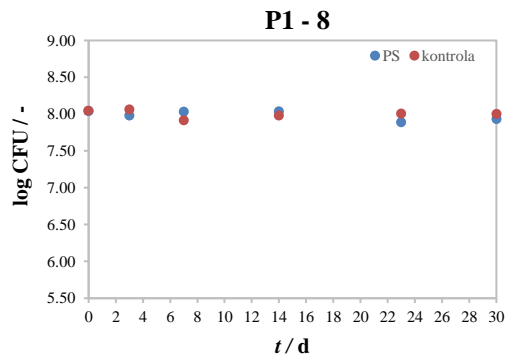
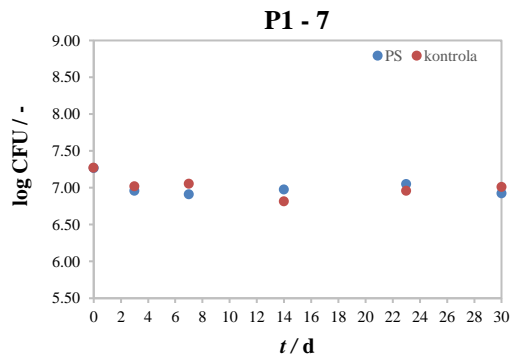
4. REZULTATI

4.1. Određivanje ukupnog broja živih stanica bakterijske kulture (CFU)

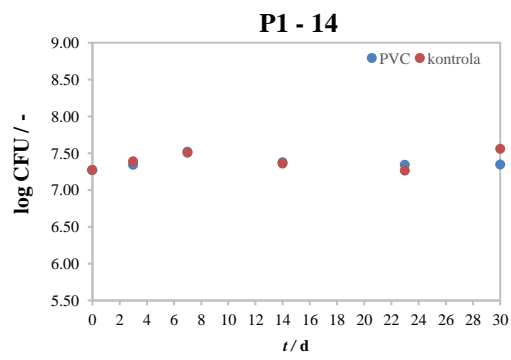
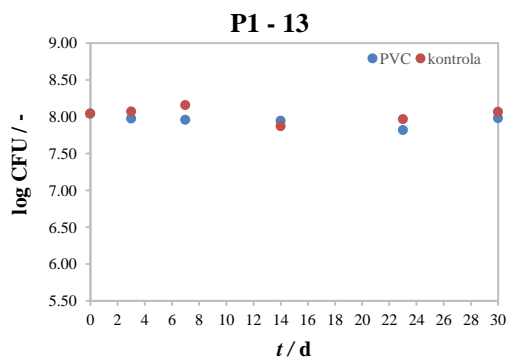
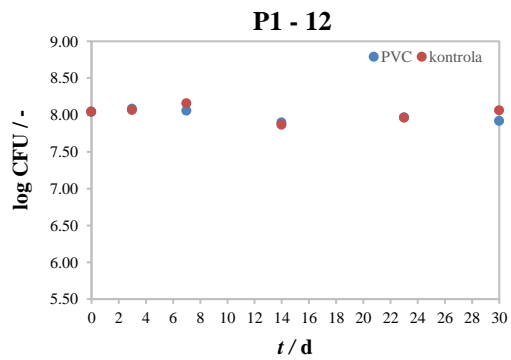
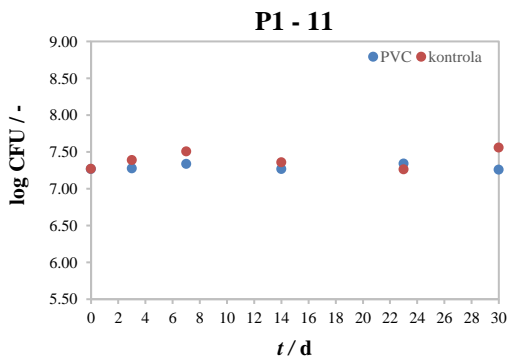
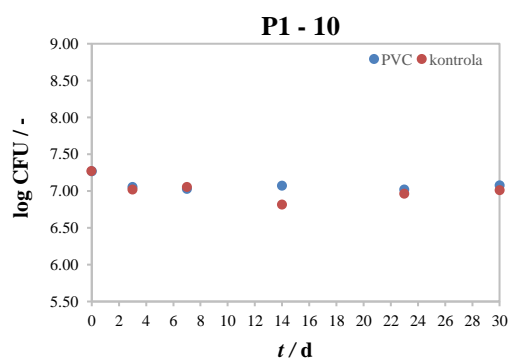
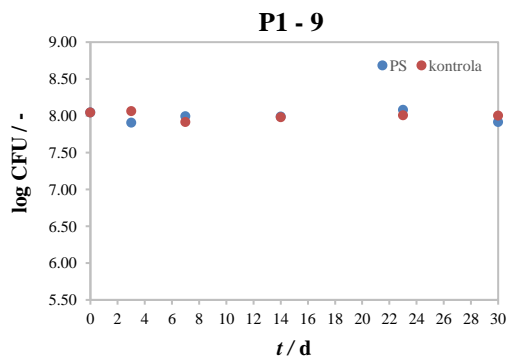
4.1.1. Određivanje vrijednosti CFU u pokusu biorazgradnje MP-a prijenom bakterijske kulture *Bacillus subtilis* (P1)

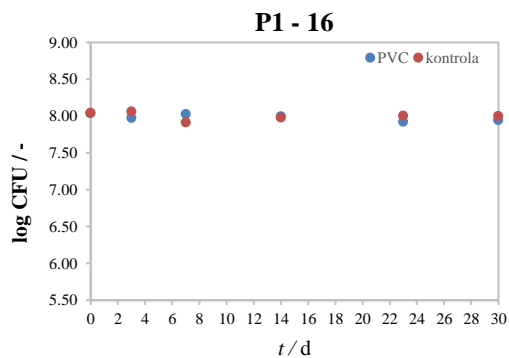
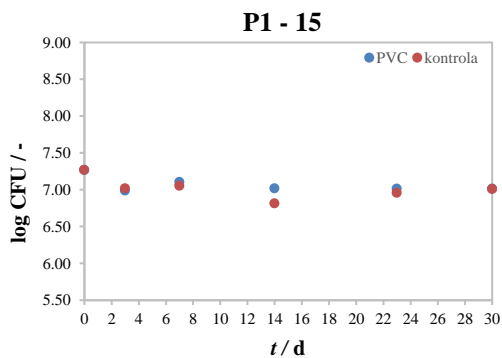
Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.5. određivala se vrijednost CFU, a rezultati su prikazani u slikama 31. i 32 za PS i PVC.





Slika 31. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Bacillus subtilis* za uzorak PS-a (P1) čiji su parametri označeni u Tablici 9.

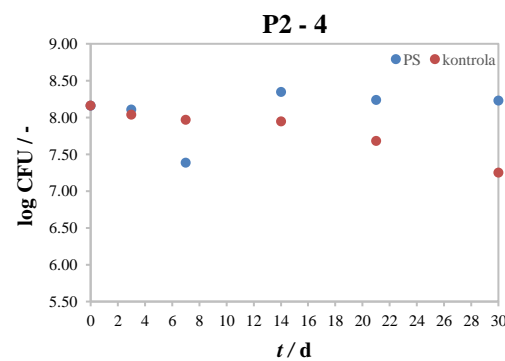
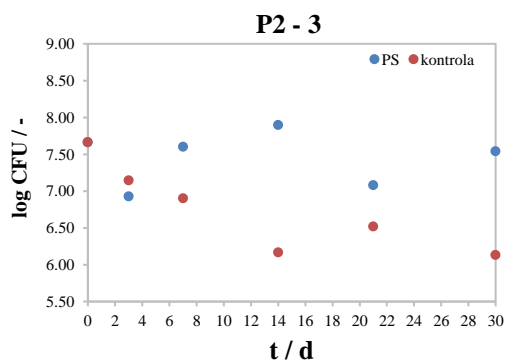
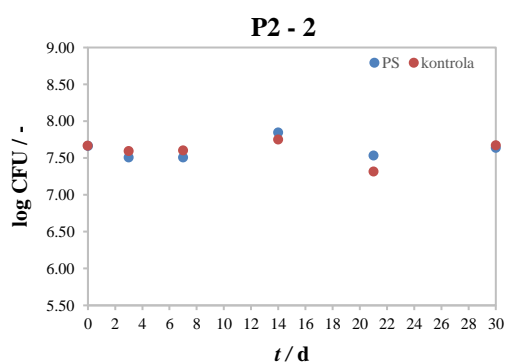
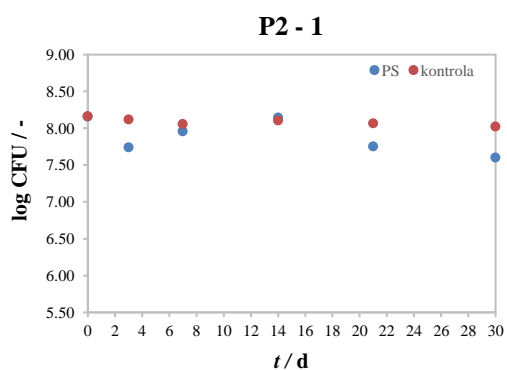


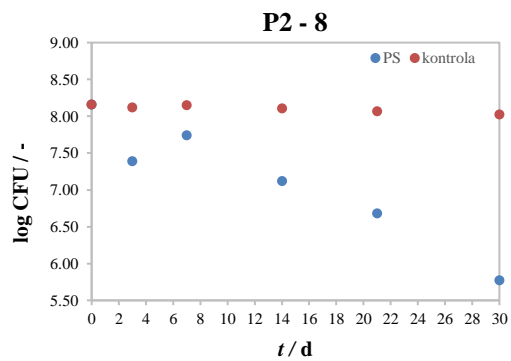
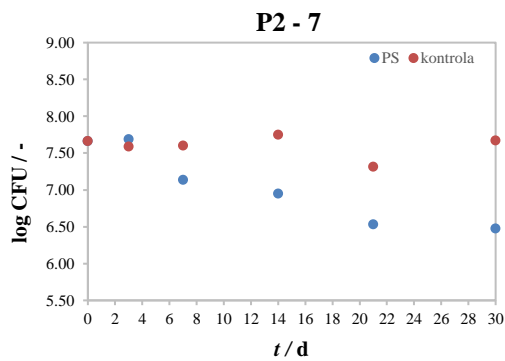
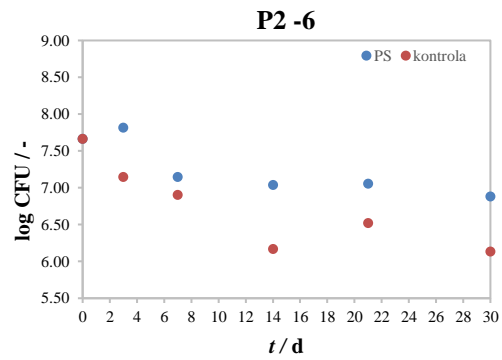
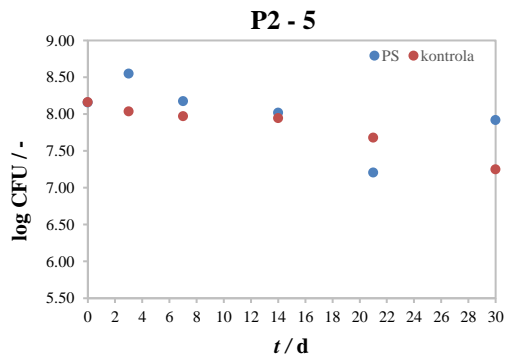


Slika 32. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Bacillus subtilis* za uzorak PVC-a (P1) čiji su parametri označeni u Tablici 9.

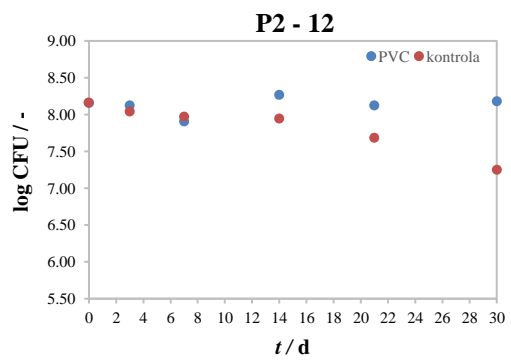
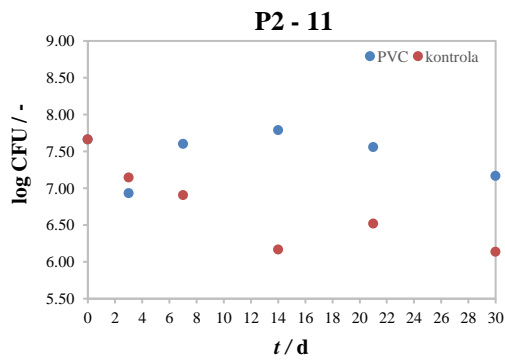
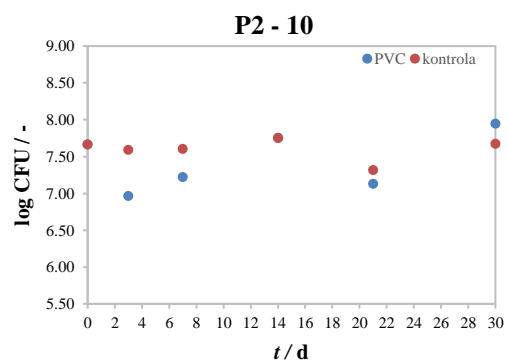
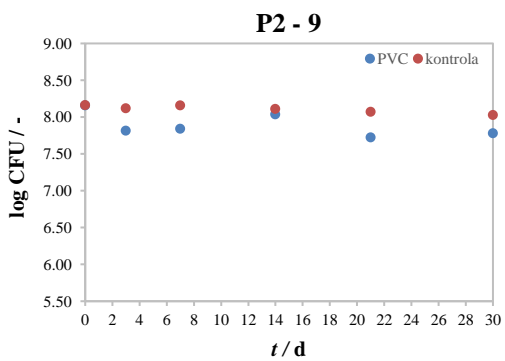
4.1.2. Određivanje vrijednosti CFU u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* (P2)

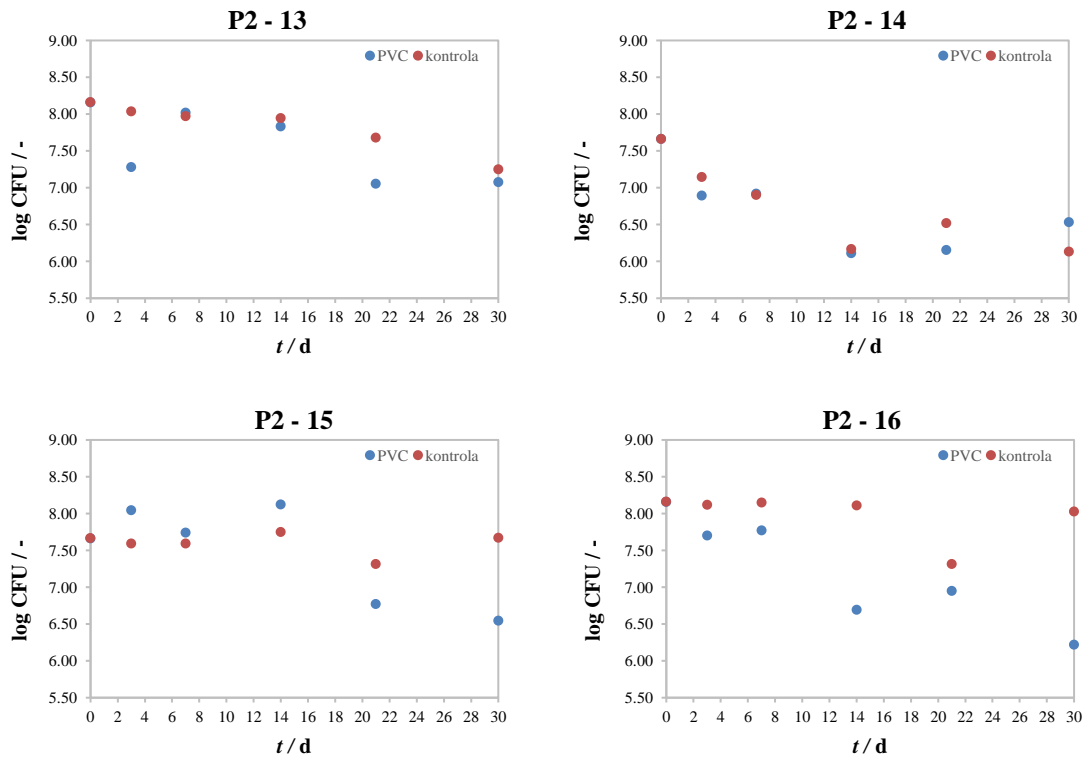
Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.5. određivala se vrijednost CFU, a rezultati su prikazani u slikama 33. i 34. za PS i PVC.





Slika 33. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Delftia acidovorans* za uzorak PS-a (P2) čiji su parametri označeni u Tablici 9.





Slika 34. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Delftia acidovorans* za uzorak PVC-a (P2) čiji su parametri označeni u Tablici 9.

4.2. Vrijednosti TOC-a, TC-a i IC-a

4.2.1. Određivanje vrijednosti TOC-a u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus subtilis* (P1)

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.6. određivala se vrijednost TOC-a i IC-a u pokusu P1 za PS i PVC, a rezultati su prikazani u tablicama 12. i 13.

Tablica 12. TOC vrijednosti za pokus biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus subtilis* u pokusima P1-2, P1-7, P1-10, P1-15, P1-4, P1-5, P1-12 i P1-13 i njihovim kontrolama.

| TOC / mg/L | | | | | | | | | | |
|------------|-------------|--------|-------------|---------|---------|------|--------|--------|---------|---------|
| | | PS | | PVC | | | PS | | PVC | |
| t / dan | SP | P1 - 2 | P1 - 7 | P1 - 10 | P1 - 15 | SP | P1 - 4 | P1 - 5 | P1 - 12 | P1 - 13 |
| 0 | 4,19 | 4,19 | 4,19 | 4,19 | 4,19 | 5,53 | 5,53 | 5,53 | 5,53 | 5,53 |
| 3 | 9,80 | 7,55 | 9,27 | 9,18 | 7,75 | 8,36 | 6,07 | 8,12 | 6,21 | 9,55 |
| 7 | 9,08 | 8,56 | 6,70 | 8,16 | 5,93 | 9,68 | 8,09 | 7,45 | 8,71 | 7,44 |
| 14 | 6,24 | 5,71 | 4,78 | 5,61 | 6,43 | 6,85 | 6,37 | 5,10 | 5,98 | 5,87 |
| 21 | 6,15 | 5,62 | 6,62 | 6,60 | 6,68 | 5,53 | 4,81 | 6,24 | 4,77 | 5,99 |
| 30 | 5,36 | 5,30 | 5,03 | 5,38 | 4,65 | 6,20 | 4,55 | 5,60 | 4,37 | 6,16 |

Tablica 13. TOC vrijednosti za pokus biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus subtilis* u pokusima P1-1, P1-8, P1-9, P1-16, P1-13, P1-6, P1-11 i P1-14 i njihovim kontrolama.

| TOC / mg/L | | | | | | | | | | |
|------------|------|--------|--------|--------|---------|-------------|--------|--------|---------|-------------|
| | | PS | | PVC | | | PS | | PVC | |
| t / dan | SP | P1 - 1 | P1 - 8 | P1 - 9 | P1 - 16 | SP | P1 - 3 | P1 - 6 | P1 - 11 | P1 - 14 |
| 0 | 5,53 | 5,53 | 5,53 | 5,53 | 5,53 | 4,19 | 4,19 | 4,19 | 4,19 | 4,19 |
| 3 | 8,00 | 4,42 | 6,17 | 7,75 | 5,46 | 4,75 | 8,07 | 7,11 | 5,46 | 9,79 |
| 7 | 6,15 | 7,91 | 6,23 | 8,91 | 5,27 | 4,75 | 6,77 | 5,62 | 7,12 | 5,58 |
| 14 | 6,55 | 5,65 | 6,71 | 5,26 | 5,90 | 5,27 | 6,27 | 5,25 | 5,70 | 5,46 |
| 21 | 9,04 | 4,79 | 8,47 | 7,12 | 5,03 | 5,15 | 4,29 | 5,20 | 4,21 | 5,54 |
| 30 | 5,97 | 5,05 | 6,51 | 6,53 | 4,70 | 4,45 | 5,12 | 4,32 | 5,93 | 4,61 |

4.2.2. Određivanje vrijednosti TC-a u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus subtilis* (P1)

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.6. određivala se vrijednost TC-a u pokusu P1 za PS i PVC, a rezultati su prikazani u tablicama 14. i 15.

Tablica 14. TC vrijednosti za pokus biorazgradnje mikroplastike uz pomoć bakterijske kulture *Bacillus subtilis* u pokusima P1-2, P1-7, P1-10, P1-15, P1-4, P1-5, P1-12 i P1-13 i njihovim kontrolama.

| TC / mg/L | | | | | | | | | | | |
|-----------|-------------|--------|-------------|---------|---------|------|--------|--------|---------|---------|--|
| | | PS | | PVC | | | | PS | | PVC | |
| t / dan | SP | P1 - 2 | P1 - 7 | P1 - 10 | P1 - 15 | SP | P1 - 4 | P1 - 5 | P1 - 12 | P1 - 13 | |
| 0 | 4,19 | 4,19 | 4,19 | 4,19 | 4,19 | 5,86 | 5,86 | 5,86 | 5,86 | 5,86 | |
| 3 | 9,80 | 7,55 | 9,27 | 8,22 | 7,75 | 8,36 | 6,07 | 7,76 | 7,36 | 9,00 | |
| 7 | 9,14 | 8,85 | 6,70 | 7,94 | 5,93 | 9,68 | 8,48 | 5,41 | 8,85 | 7,67 | |
| 14 | 6,24 | 6,70 | 6,85 | 4,34 | 6,43 | 7,68 | 6,37 | 4,73 | 5,98 | 4,96 | |
| 21 | 6,15 | 5,62 | 7,94 | 5,48 | 7,41 | 5,53 | 4,81 | 4,95 | 4,77 | 5,92 | |
| 30 | 6,13 | 5,30 | 5,03 | 4,83 | 4,65 | 6,20 | 6,12 | 5,82 | 6,81 | 4,72 | |

Tablica 15. TC vrijednosti za pokus biorazgradnje mikroplastike uz pomoć bakterijske kulture *Bacillus subtilis* u pokusima P1-1, P1-8, P1-9, P1-16, P1-13, P1-6, P1-11 i P1-14 i njihovim kontrolama.

| TC / mg/L | | | | | | | | | | | |
|-----------|------|--------|--------|--------|---------|-------------|--------|--------|---------|--------------|--|
| | | PS | | PVC | | | | PS | | PVC | |
| t / dan | SP | P1 - 1 | P1 - 8 | P1 - 9 | P1 - 16 | SP | P1 - 3 | P1 - 6 | P1 - 11 | P1 - 14 | |
| 0 | 5,86 | 5,86 | 5,86 | 5,86 | 5,86 | 4,50 | 4,50 | 4,50 | 4,50 | 4,50 | |
| 3 | 7,51 | 5,82 | 5,50 | 6,34 | 8,19 | 7,95 | 8,52 | 7,82 | 8,19 | 10,29 | |
| 7 | 5,89 | 10,01 | 5,09 | 7,11 | 6,32 | 7,21 | 7,38 | 6,38 | 8,30 | 10,16 | |
| 14 | 5,31 | 8,35 | 6,20 | 5,15 | 6,03 | 6,08 | 7,46 | 5,43 | 6,66 | 6,10 | |
| 21 | 7,44 | 7,23 | 6,24 | 6,35 | 5,12 | 6,49 | 5,85 | 6,28 | 6,79 | 5,86 | |
| 30 | 4,73 | 6,09 | 4,60 | 8,15 | 5,89 | 5,70 | 6,20 | 7,59 | 5,77 | 6,25 | |

4.2.3. Određivanje vrijednosti IC-a u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture *Bacillus subtilis* (P1)

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.7. određivala se vrijednost IC-a u pokusu P1 za PS i PVC, a rezultati su prikazani u tablici 16. U tablici su prikazani rezultati samo za pokuse u kojima je došlo do promjene IC-a.

Tablica 16. Vrijednosti IC-a u pokusima P1-1, P1-16, P1-2, P1-7, P1-12, P1-4 i P1-12 i njihovim kontrolnim uzorcima.

| IC / mg/L | | | | | | | | | | |
|----------------|------------------|------|-------|------------------------|------|-------------|-------|------------------|-------------|-------|
| <i>t</i> / dan | SP (P1-1, P1-16) | P1-1 | P1-16 | SP (P1-2, P1-7, P1-15) | P1-2 | P1-7 | P1-15 | SP (P1-4, P1-12) | P1-4 | P1-14 |
| 0 | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,31 | 0,31 | 0,31 | 0,31 | 0,33 | 0,33 | 0,33 |
| 3 | 0,27 | 1,40 | 2,73 | 0,05 | 0,27 | 1,24 | 1,57 | 0,90 | 2,14 | 1,15 |
| 7 | 0,21 | 2,10 | 1,05 | 0,06 | 0,30 | 0,01 | 0,17 | 0,35 | 0,39 | 0,14 |
| 14 | 0,42 | 2,69 | 0,13 | 1,91 | 0,99 | 2,07 | 0,86 | 0,83 | 0,43 | 0,94 |
| 21 | 0,38 | 2,44 | 0,09 | 0,09 | 0,99 | 1,32 | 0,73 | 0,32 | 1,24 | 1,28 |
| 30 | 0,22 | 1,04 | 1,19 | 0,76 | 1,29 | 1,47 | 1,34 | 0,18 | 1,57 | 2,44 |

4.2.4. Određivanje vrijednosti TOC-a u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* (P2)

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.6. određivala se vrijednost TOC-a u pokusu P2 za PS i PVC, a rezultati su prikazani u tablicama 17 i 18.

Tablica 17. TOC vrijednosti za pokus biorazgradnje mikroplastike primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* u pokusima P2-1, P2-8, P2-9, P2-16, P2-2, P2-7, P2-10 i P2-15.

| TOC / mg/L | | | | | | | | | | | |
|----------------|------|--------|--------|--------|---------|--------|------|--------|---------|---------|--|
| <i>t</i> / dan | SP | PS | | | PVC | | SP | PS | | PVC | |
| | | P2 - 1 | P2 - 8 | P2 - 9 | P2 - 16 | P2 - 2 | | P2 - 7 | P2 - 10 | P2 - 15 | |
| 0 | 5,01 | 5,01 | 5,01 | 5,01 | 5,01 | 5,96 | 5,96 | 5,96 | 5,96 | 5,96 | |
| 3 | 6,13 | 6,35 | 4,11 | 5,33 | 4,20 | 8,19 | 5,11 | 4,08 | 4,98 | 4,37 | |
| 7 | 3,95 | 3,98 | 3,75 | 4,41 | 3,95 | 4,54 | 4,39 | 4,77 | 4,64 | 4,28 | |
| 14 | 4,70 | 4,35 | 4,21 | 3,90 | 4,26 | 5,10 | 5,50 | 4,53 | 4,77 | 3,98 | |
| 21 | 4,49 | 3,52 | 4,56 | 4,40 | 4,29 | 4,82 | 4,85 | 4,35 | 4,55 | 4,30 | |
| 30 | 4,01 | 4,15 | 4,09 | 3,93 | 4,35 | 4,94 | 4,79 | 5,65 | 4,57 | 4,41 | |

Tablica 18. TOC vrijednosti za pokus biorazgradnje mikroplastike primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* u pokusima P2-3, P2-6, P2-11, P2-14, P2-4, P2-5, P2-12 i P2-13.

| TOC / mg/L | | | | | | | | | | |
|----------------|------|--------|--------|-------------|---------|------|-------------|--------|---------|---------|
| | | PS | | PVC | | | PS | | PVC | |
| <i>t</i> / dan | SP | P2 - 3 | P2 - 6 | P2 - 11 | P2 - 14 | SP | P2 - 4 | P2 - 5 | P2 - 12 | P2 - 13 |
| 0 | 5,01 | 5,01 | 5,01 | 5,01 | 5,01 | 5,96 | 5,96 | 5,96 | 5,96 | 5,96 |
| 3 | 5,53 | 8,00 | 4,65 | 8,05 | 5,81 | 4,37 | 6,92 | 4,86 | 6,29 | 4,49 |
| 7 | 4,86 | 4,32 | 4,95 | 4,91 | 5,70 | 4,28 | 4,03 | 4,53 | 3,94 | 3,84 |
| 14 | 5,95 | 5,19 | 5,04 | 4,41 | 4,53 | 3,98 | 4,14 | 4,10 | 4,29 | 4,53 |
| 21 | 5,03 | 5,30 | 4,97 | 4,96 | 4,99 | 4,30 | 4,97 | 4,37 | 5,19 | 4,30 |
| 30 | 4,55 | 5,57 | 4,79 | 4,76 | 5,22 | 4,41 | 4,49 | 4,16 | 4,01 | 4,14 |

4.2.5. Određivanje vrijednosti TC-a u pokusu biorazgradnje MP-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* (P2)

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.6. određivala se vrijednost TC-a u pokusu P2 za PS i PVC, a rezultati su prikazani u tablicama 19 i 20.

Tablica 19. TC vrijednosti za pokus biorazgradnje mikroplastike primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* u pokusima P2-1, P2-8, P2-9, P2-16, P2-2, P2-7, P2-10 i P2-15.

| TC / mg/L | | | | | | | | | | |
|----------------|------|--------|--------|--------|---------|-------|--------|--------|---------|---------|
| | | PS | | PVC | | | PS | | PVC | |
| <i>t</i> / dan | SP | P2 - 1 | P2 - 8 | P2 - 9 | P2 - 16 | SP | P2 - 2 | P2 - 7 | P2 - 10 | P2 - 15 |
| 0 | 6,74 | 6,74 | 6,74 | 6,74 | 6,74 | 6,02 | 6,02 | 6,02 | 6,02 | 6,02 |
| 3 | 7,52 | 7,46 | 5,35 | 5,13 | 6,57 | 8,10 | 5,64 | 5,74 | 6,27 | 5,29 |
| 7 | 5,49 | 8,34 | 5,57 | 8,20 | 5,99 | 5,70 | 6,27 | 10,75 | 11,59 | 4,67 |
| 14 | 6,12 | 6,11 | 5,39 | 5,89 | 6,10 | 11,24 | 5,55 | 6,24 | 6,03 | 8,33 |
| 21 | 5,53 | 4,68 | 5,87 | 6,08 | 5,60 | 4,87 | 5,59 | 5,33 | 5,59 | 5,46 |
| 30 | 5,89 | 8,99 | 6,58 | 10,86 | 10,31 | 5,52 | 8,53 | 5,83 | 5,19 | 5,55 |

Tablica 20. TC vrijednosti za pokus biorazgradnje mikroplastike primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* u pokusima P2-3, P2-6, P2-11, P2-14, P2-4, P2-5, P2-12 i P2-13.

| TC / mg/L | | | | | | | | | | |
|-----------|-------|-------|--------|-------------|---------|-------|-------------|--------|---------|---------|
| | | PS | | PVC | | | PS | | PVC | |
| t / dan | SP | P2 -3 | P2 - 6 | P2 - 11 | P2 - 14 | SP | P2 - 4 | P2 - 5 | P2 - 12 | P2 - 13 |
| 0 | 6,02 | 6,02 | 6,02 | 6,02 | 6,02 | 6,74 | 6,74 | 6,74 | 6,74 | 6,74 |
| 3 | 5,59 | 9,21 | 6,97 | 8,22 | 6,08 | 8,94 | 8,43 | 5,13 | 8,96 | 6,09 |
| 7 | 6,08 | 5,66 | 5,79 | 5,22 | 6,09 | 10,13 | 6,53 | 5,04 | 5,38 | 6,36 |
| 14 | 11,64 | 11,75 | 12,26 | 5,62 | 11,29 | 9,00 | 5,51 | 10,50 | 5,62 | 5,63 |
| 21 | 5,17 | 6,46 | 5,49 | 4,70 | 6,46 | 6,06 | 5,41 | 5,92 | 5,34 | 5,89 |
| 30 | 7,09 | 4,66 | 5,76 | 5,10 | 5,24 | 5,89 | 5,68 | 5,75 | 5,40 | 6,44 |

4.2.6. Određivanje vrijednosti IC-a u pokusu biorazgradnje mikroplastike uz pomoć bakterijske kulture *Delftia acidovorans* (P2)

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.6. određivala se vrijednost IC-a u pokusu P2 za PS i PVC, a rezultati su prikazani u tablici 21. U tablici su prikazani rezultati samo za pokuse u kojima je došlo do promjene IC-a.

Tablica 21. Vrijednosti IC-a u pokusima P2-4, P2-12, P2-13 i njihovih kontrolnih uzoraka.

| IC / mg/L | | | | |
|-----------|---------------------|-------------|------------|-------------|
| t / dan | SP (P2-4, P2-12) | P2-4 | SP (P2-11) | P2-11 |
| 0 | 1,01 | 1,73 | 0,06 | 0,06 |
| 3 | 0,06 | 0,43 | 1,22 | 1,93 |
| 7 | 1,22 | 2,21 | 1,80 | 1,28 |
| 14 | 5,69 | 0,32 | 7,66 | 1,34 |
| 21 | 0,14 | 0,11 | 0,74 | 0,49 |
| 30 | 2,54 | 0,11 | 2,68 | 1,09 |

4.3. Određivanje koncentracije aniona i kationa u izuzetim uzorcima

4.3.1. Određivanje koncentracije aniona i kationa u pokusu P1

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.7. određivala se koncentracija kationa i aniona u izuzetim uzorcima. Iz grafičkog prikaza ovisnosti logaritamske vrijednosti CFU-a o vremenu vidljivo je da je bakterijska kultura *Bacillus subtilis* razgradila čestice PS-a u pokusu P1-7 te

čestice PVC-a u pokusu P1-15. Shodno navedenom, u Tablici 22. dane su vrijednosti koncentracija kationa i aniona za ta dva pokusa.

Tablica 22. Vrijednosti koncentracija kationa i aniona u pokusima P1-7 i P1-14.

| <i>t</i> / dan | PO ₄ ³⁻ / mg/L | | | | K ⁺ / mg/L | | | |
|----------------|--------------------------------------|---------------|---------|---------------|-----------------------|---------------|---------|---------------|
| | SP | P1-7 | SP | P1-14 | SP | P1-7 | SP | P1-14 |
| 0 | 599,33 | 599,33 | 599,33 | 599,33 | 156,26 | 156,26 | 156,26 | 156,26 |
| 3 | 390,51 | 256,94 | 305,01 | 346,62 | 104,29 | 70,51 | 82,40 | 108,25 |
| 7 | - | - | - | 135,30 | 71,79 | 90,98 | 47,28 | 46,34 |
| 14 | 411,51 | 272,46 | 5459,54 | - | 62,11 | 142,44 | 4845,02 | 31,76 |
| 21 | 466,54 | 227,04 | 320,98 | 329,77 | 120,14 | 98,26 | 58,44 | 65,81 |
| 30 | 0,00 | 167,41 | 224,44 | - | 29,58 | 53,88 | 56,80 | 59,58 |

4.3.2. Određivanje koncentracije aniona i kationa u pokusu P2

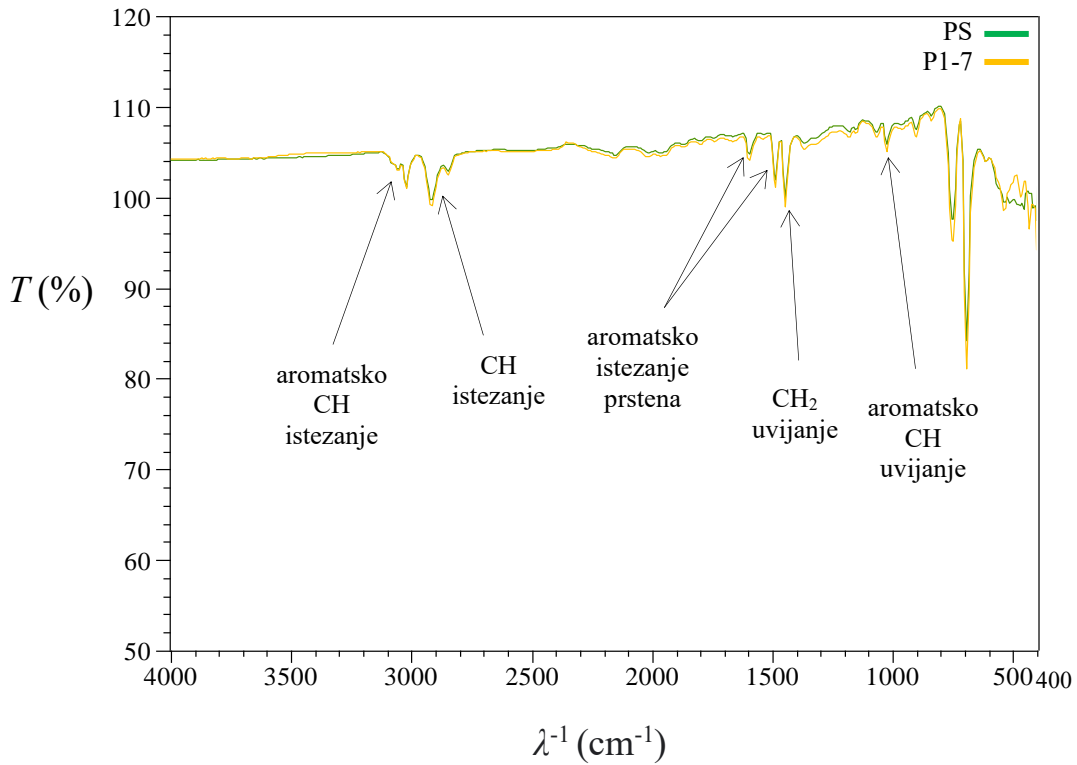
Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.7. određivala se koncentracija kationa i aniona u izuzetim uzorcima. Iz grafičkog prikaza ovisnosti logaritamske vrijednosti CFU-a o vremenu vidljivo je da je bakterijska kultura *Delftia acidovorans* razgradila čestice PS-a u pokusu P2-4 te čestice PVC-a u pokusu P2-12. Shodno navedenom u tablici 23. dane su vrijednosti koncentracija kationa i aniona za ta dva pokusa.

Tablica 23. Vrijednosti koncentracija kationa i aniona u pokusima P2-4 i P2-12.

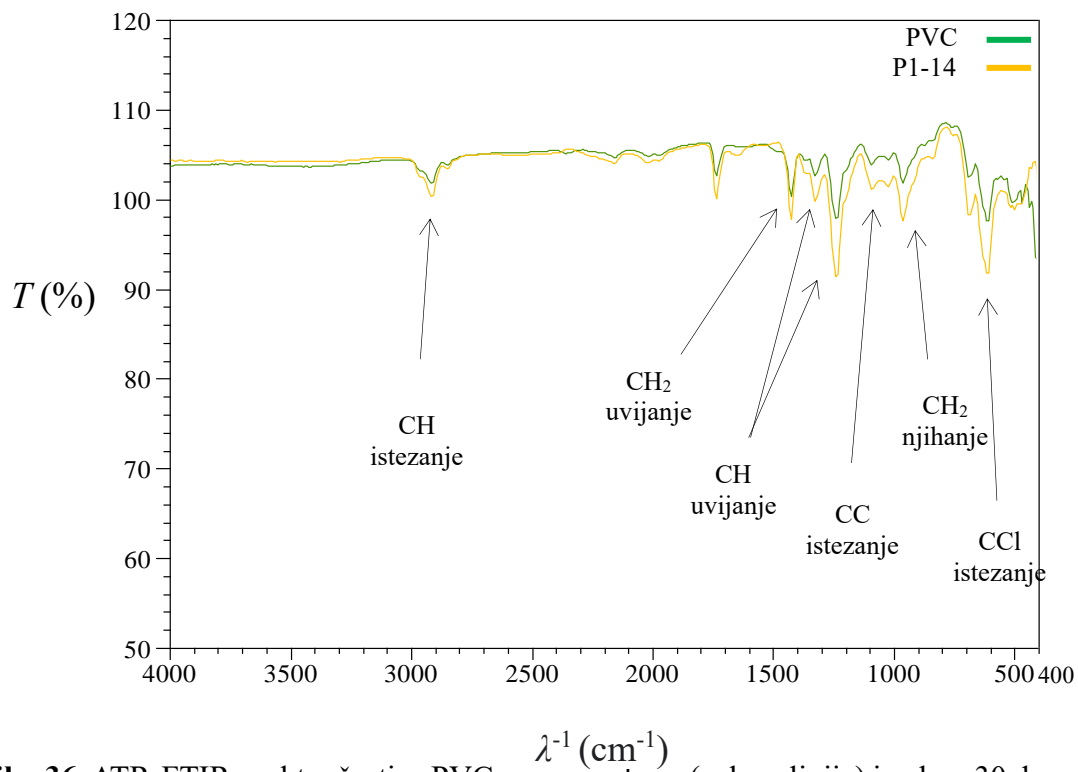
| <i>t</i> / dan | PO ₄ ³⁻ / mg/L | | | | K ⁺ / mg/L | | | |
|----------------|--------------------------------------|---------------|------------|--------|-----------------------|---------------|-----------|--------------|
| | SP (P2-4) | P2-4 | SP (P2-11) | P2-11 | SP (P2-4) | P2-4 | SP (P2-4) | P2-11 |
| 0 | 258,07 | 258,07 | 463,20 | 463,20 | 124,03 | 124,03 | 95,50 | 95,50 |
| 3 | 230,70 | - | 163,54 | - | 126,45 | 73,22 | 42,98 | 41,21 |
| 7 | 409,66 | 257,05 | - | - | 89,29 | 59,48 | 56,78 | 57,40 |
| 14 | 276,38 | 285,38 | 195,63 | - | 84,26 | 87,64 | 32,33 | 42,07 |
| 21 | 230,96 | 318,85 | - | - | 74,57 | 83,15 | 37,15 | 60,03 |
| 30 | 208,69 | 356,39 | - | - | 53,56 | 99,52 | 43,92 | 52,34 |

4.4. Rezultati ATR-FTIR spektroskopske analize

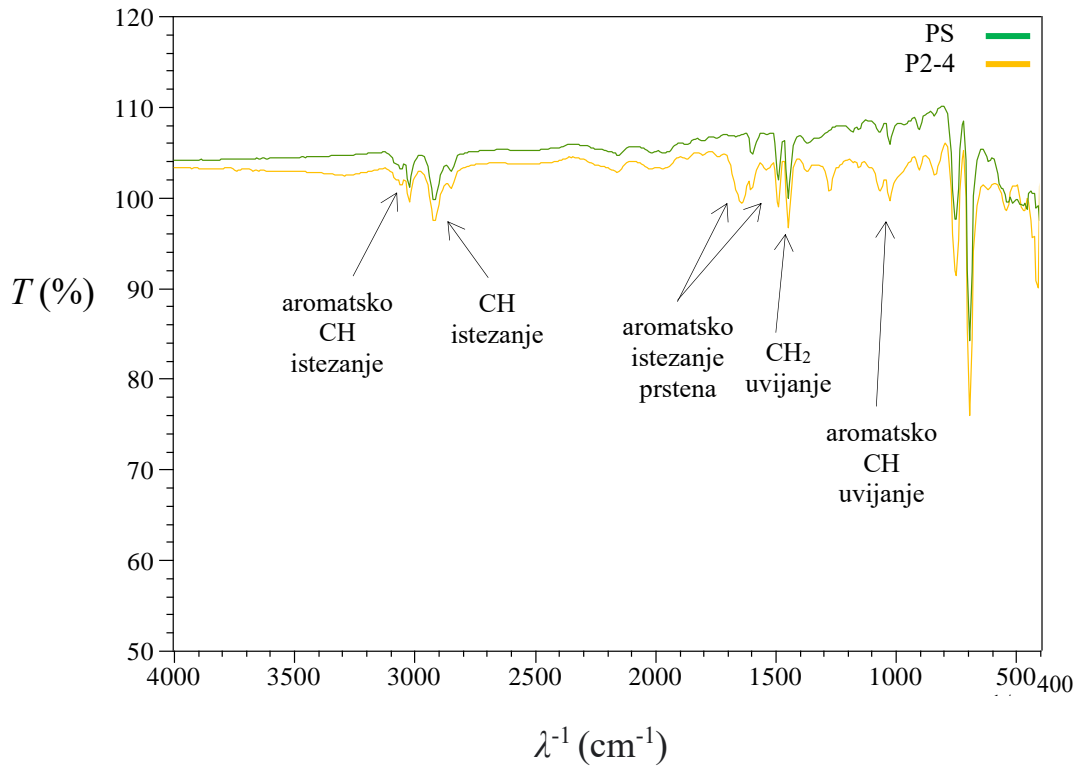
Postupkom opisanim u 3.3.10. dobiveni su grafovi prikazani na slikama 35. i 36. za pokus P1-7 (PS) odnosno P1-15 (PVC) te na slikama 37. i 38. za pokus P2-4 (PS) odnosno P2-12 (PVC).



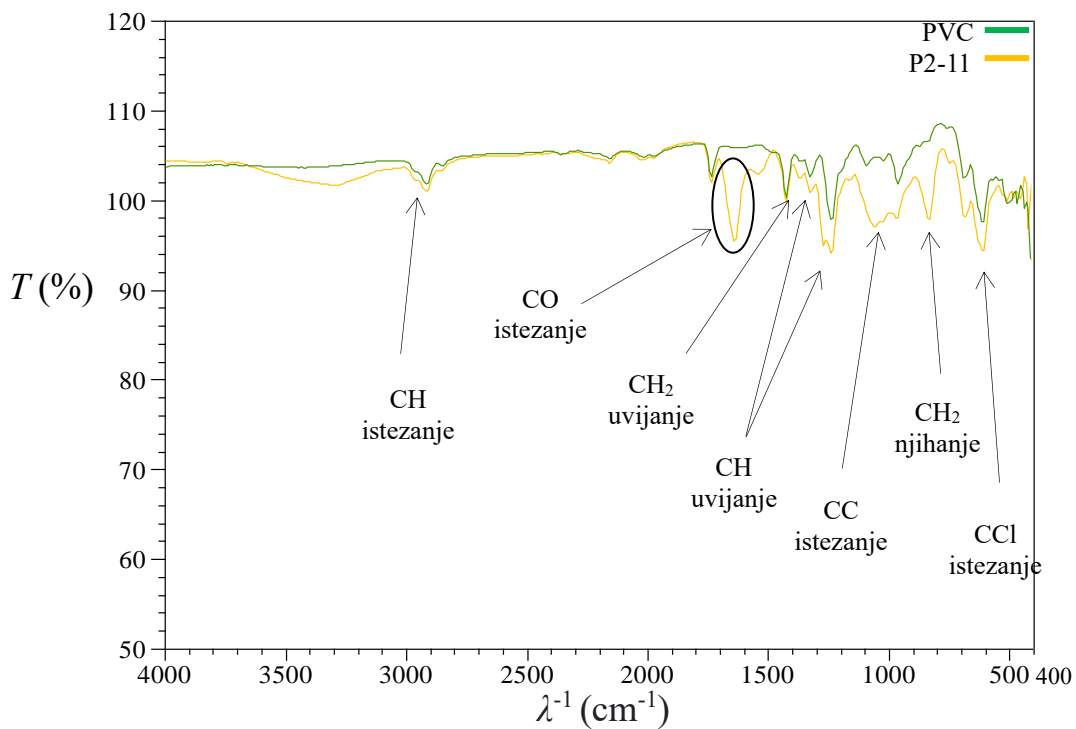
Slika 35. ATR- FTIR spektar čestica PS-a prije pokusa (zelena linija) i nakon 30 dana pokusa P1-7 (naranđsta linija).



Slika 36. ATR-FTIR spektar čestica PVC-a prije pokusa (zelena linija) i nakon 30 dana pokusa P1-14 (narančsta linija).



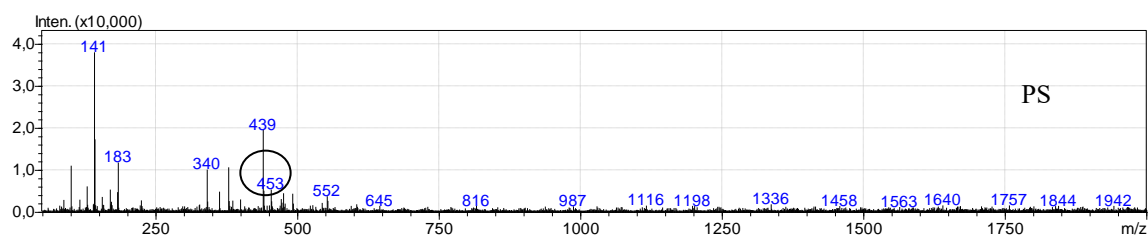
Slika 37. ATR-FTIR spektar čestica PS-a prije pokusa (zelena linija) i nakon 30 dana pokusa P2-4 (narančsta linija).



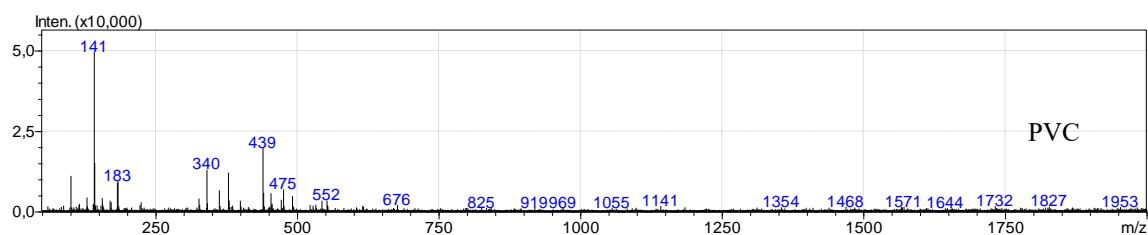
Slika 38. ATR-FTIR spektar čestica PVC-a prije pokusa (zelena linija) i nakon 30 dana pokusa P2-11 (narančsta linija).

4.5. Rezultati provedbe tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s masenom spektrometrijom

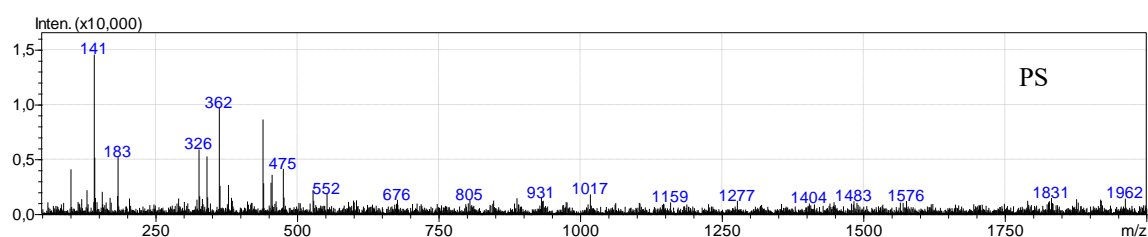
Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.8. provedena je HPLC/MS analiza. Rezultati analize prikazani su na slikama 39. i 40. za pokus P1 (P1-7 i P1-15) i na slikama 41. i 42. za pokus P2 (P2-4 i P2-12).



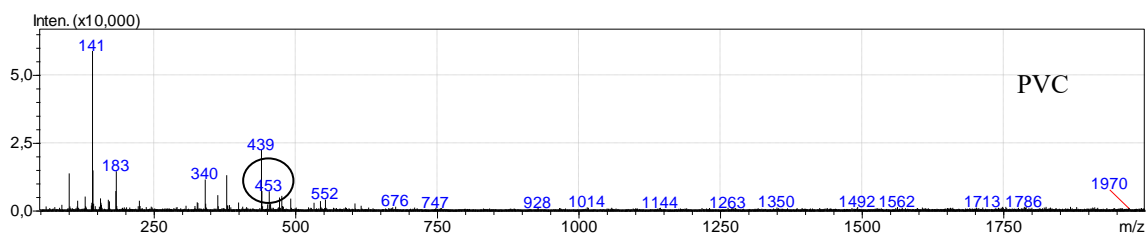
Slika 39. HPLC/MS spektar za čestice PS nakon 30 dana pokusa P1-7 primjenom bakterijske kulture *Bacillus subtilis*.



Slika 40. HPLC/MS spektar za čestice PVC-a nakon 30 dana pokusa P1-14 primjenom bakterijske kulture *Bacillus subtilis*.



Slika 41. HPLC/MS spektar za čestice PS-a nakon 30 dana pokusa P2-4 primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans*.



Slika 42. HPLC/MS spektar za čestice PVC-a nakon 30 dana pokusa P2-11 primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans*.

4.6. Određivanje toksičnosti vodene faze provedbom testa toksičnosti s bakterijom

Vibrio fischeri

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.9. određene su vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ koje su prikazane u tablicama 24. i 25. za za pokuse P1 i P2.

Tablica 24. EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti za pokus P1.

| | EC ₂₀ / % | EC ₅₀ / % | TU / % |
|---------|----------------------|----------------------|-------------|
| P1 - 1 | 7,18 | 10,74 | 9,32 |
| P1 - 2 | 7,75 | 21,46 | 4,66 |
| P1 - 3 | - | - | - |
| P1 - 4 | 10,13 | 32,72 | 3,06 |
| P1 - 5 | 34,86 | - | - |
| P1 - 6 | 90,90 | - | - |
| P1 - 7 | 10,15 | 26,84 | 3,73 |
| P1 - 8 | 27,91 | - | - |
| P1 - 9 | 19,50 | - | - |
| P1- 10 | 65,21 | 35,90 | 2,79 |
| P1 - 11 | 57,58 | - | - |
| P1 - 12 | 12,40 | 41,61 | 2,40 |
| P1 - 13 | 81,30 | - | - |
| P1 - 14 | 51,65 | - | - |
| P1 - 15 | 57,98 | 40,00 | 2,50 |
| P1 - 16 | 33,62 | - | - |

Tablica 25. EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti za pokus P2.

| | EC ₂₀ / % | EC ₅₀ / % | TU / % |
|---------|----------------------|----------------------|-------------|
| P2 - 1 | 3,88 | 15,67 | 6,38 |
| P2 - 2 | 8,63 | 30,18 | 3,31 |
| P2 - 3 | - | - | - |
| P2 - 4 | 6,20 | 24,56 | 4,07 |
| P2 - 5 | 8,55 | 53,02 | 1,89 |
| P2 - 6 | - | - | - |
| P2 - 7 | 43,52 | - | - |
| P2 - 8 | 21,22 | 22,00 | 4,55 |
| P2 - 9 | 54,75 | - | - |
| P2 - 10 | 9,45 | 36,79 | 2,72 |
| P2 - 11 | 18,09 | - | - |
| P2 - 12 | 12,30 | 47,74 | 2,09 |
| P2 - 13 | 7,89 | 25,76 | 3,88 |
| P2 - 14 | 24,11 | - | - |
| P2 - 15 | 5,6 | 20,73 | 4,82 |
| P2 - 16 | - | - | - |

4.7. Rezultati statističke analize eksperimentalnih podataka, ANOVA

U tablici 26. prikazani su rezultati statističke analize eksperimentalnih podataka za pokus P1 u kojem se za biorazgradnju PS-a i PVC-a koristila bakterijska kultura *Bacillus subtilis*, dok su u tablici 27. prikazani rezultati za pokus P2 u kojem se za biorazgradnju koristila bakterijska kultura *Delftia acidovorans*.

Tablica 26. Rezultati ANOVA-e analize za pokus P1.

| Faktor | Sum of Squares | | DF | | F | | p-value | | Doprinos / % | |
|----------------------|----------------|------|----|-----|---------|----------|---------|----------|--------------|-------|
| | PS | PVC | PS | PVC | PS | PVC | PS | PVC | PS | PVC |
| pH-vrijednost | 0,04 | 0,04 | 1 | 1 | 386,78 | 63660000 | 0,032 | < 0,0001 | 3,82 | 3,14 |
| OG | 0,93 | 1,26 | 1 | 1 | 8281,00 | 63660000 | 0,007 | < 0,0001 | 81,72 | 94,33 |

DF – stupnjevi slobode

Tablica 27. Rezultati ANOVA-e analize za pokus P2.

| Faktor | Sum of Squares | | DF | | F | | p-value | | Doprinos / % | |
|--------------------|----------------|------|----|-----|--------|--------|---------|------|--------------|-------|
| | PS | PVC | PS | PVC | PS | PVC | PS | PVC | PS | PVC |
| Temperatura | 1,95 | 2,75 | 1 | 1 | 143,27 | 228,89 | 0,05 | 0,04 | 41,67 | 74,31 |

DF – stupnjevi slobode

Tablica 28. Eksperimentalne vrijednosti parametara analize varijance (ANOVA) za biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Bacillus subtilis* i *Delftia acidovorans*.

| Mikroorganizam | Polimer | σ | Mean | C.V. / % | R^2 | Prilagođeni R^2 | Predviđeni R^2 | Odgovarajuća preciznost |
|----------------------------|---------|--------------|------|-------------|---------------|-------------------|------------------|-------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | PS | 0,011 | 7,59 | 0,14 | 0,9999 | 0,9993 | 0,9937 | 104,066 |
| | PVC | 0,000 | 7,57 | 0,00 | 0,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,000 |
| <i>Delftia acidovorans</i> | PS | 0,120 | 7,26 | 1,61 | 0,9971 | 0,9796 | 0,8139 | 21,784 |
| | PVC | 0,110 | 7,18 | 1,53 | 0,9968 | 0,9773 | 0,7923 | 19,118 |

5. RASPRAVA

5.1. Analiza pokusa P1

U pokusu P1 ispitivala se sposobnost biorazgradnje PS-a i PVC-a pomoću bakterijske kulture *Bacillus subtilis* pri različitim uvjetima koji su prikazani u tablici 9. Na slikama 31. i 32. grafički je prikazana promjena logaritamskog broja živih stanica bakterijske kulture tijekom 30 dana provedbe pokusa u različitim uvjetima gdje je bakterijska kultura bila izložena česticama PS-a i česticama PVC-a (označeno na grafu plavim kružićem) u usporedbi s rastom logaritamskog broja živih stanica bakterijske kulture u sustavu s istim uvjetima, ali bez čestica MP-a (crveni kružić). Može se primijetiti da se logaritamski broj CFU minimalno razlikuje u odnosu na kontrolni uzorak u kojem se ne nalaze čestice MP-a te je on veći u nekoliko pokusa. U pokusu P1-7, 14. i 21. dan vidljiv je veći rast bakterijske kulture u odnosu na kontrolni uzorak. Zatim, sličan trend pojavljuje se u pokusu P1-14 gdje dolazi do blagog rasta bakterijske kulture i u pokusu P1-15 gdje je logaritamski broj živih stanica bakterijske kulture malo veći u 14. i 21. danu u odnosu na kontrolni uzorak. Ukoliko promatramo P1-7 i P1-14 gdje dolazi do najvećeg rasta CFU vrijednosti, u P1-7 nalaze se čestice PS-a veličine od 500-710 μm , dok se u P1-14 nalaze čestice PVC-a manje od 300 μm . Također, oba pokusa imaju jednaku koncentraciju čestica, to jest, 1000 mg/L.

Nadalje, u pokusu P1-7 primijenjuje se 200 okretaja/minuti, dok se pokus P2-14 provodi pri 100 okretaja/minuti. Naime, brojem okretaja osigurava se koncentracija otopljenog kisika u sustavu te veći broj okretaja rezultira većom koncentracijom otopljenog kisika. S obzirom da je kisik nužan za biorazgradnju ugljikovodičnih polimera, ona će biti bolja u prisustvu veće koncentracije kisika [110] Usporkos tome što literatura ukazuje na to da veća brzina rezultira boljom biorazgradnjom, dobiveni rezultati u ovom pokusu to nisu potvrdili.

Jedan zajednički parametar navedenih pokusa (P1-7 i P1-14) je temperatura (25 °C) pri kojoj su izvođeni pokus. Naime, optimalna temperatura za preživljavanje bakterijske kulture *Bacillus subtilis* je 30 – 34 °C [100] zbog čega ne čudi činjenica da je do biorazgradnje čestica MP-a došlo pri većoj temperaturi (25°C) u odnosu na nižu (15°C). Optimalna pH-vrijednost za rast bakterijske kulture je 7-8 [101] te se pokus P1-7 provodi pri pH=6, a pokus P1-14 pri pH=8, ne može se sa sigurnošću reći koji uvjet pH vrijednosti pogoduje biorazgradnji.

S obzirom na činjenicu da heterotrofne bakterije koriste organski ugljik kao izvor energije, ugljik koji je vezan za polimerni lanac mjeri se pomoću TOC-e uređaja. Rezultati analize prikazani su u tablicama 12. i 13. S obzirom da vrijednosti CFU ukazuju na mogućnost da je u pokusima P1-7 i P1-14 došlo do biorazgradnje, rezultati vrijednosti TOC-a navedenih pokusa

su promatrani (podebljani u tablici). U pokusu P1-7, u 14. danu pokusa primjećuje se razlika TOC vrijednosti od 3.37 mg/L u sustavu s česticama PS-a i one bez njih. U istom danu pokusa P1-7 u sustavu s česticama PS-a izraslo je $9,4 \times 10^6$ st/mL, dok je u sustavu bez čestica PS-a izraslo $6,5 \times 10^6$ st/mL što se slaže s dobivenim TOC vrijednostima. Naime, ako dolazi do biorazgradnje MP-e, ona se razgrađuje na monomere i dolazi do otpuštanja aditiva s površine što uzrokuje rast TOC vrijednosti [102]. U tablici 12. u P1-7 značajni rast TOC vrijednosti primjećuje se od 14. do 21. dana te se može zaključiti da je u tom periodu nastupila biorazgradnja.

Ukupni ugljik (TC) zbroj je TOC-a, točnije, organskog ugljika koji potječe iz strukture MP-e te IC-a, ugljika koji potječe iz CO₂, produkta biorazgradnje. U tablici 14. prikazani su rezultati TC-e analize u usporedbi s njihovim kontrolnim uzorcima. Ukoliko dolazi do biorazgradnje, očekuje se da će TC vrijednost pokusa biti veća od njegove kontrole. U tablici 15. kod P1-7 veći skok u TC vrijednosti pojavljuje se od 14. do 21. dana, dok se rast TC koncentracije ne primjećuje kod slijepe probe, što upućuje da je nastupio proces biorazgradnje. U tablici 16. prikazani su rezultati IC-a koji označava ugljik koji potječe iz CO₂ koji je željeni produkt biorazgradnje i ukoliko je došlo do potpune mineralizacije, u pokusu će se detektirati IC-e. U P1-7, u 14. danu pokusa detektiran je značajniji rast koncentracije IC-a od 2,07 mg/L i 21. dana od 1,32 mg/L. Nadalje, ukoliko dolazi do biorazgradnje PS-a i PVC-a, očekuje se da CFU vrijednost raste, a koncentracija kalija i fosfata se smanjuje zato što bakterije koriste fosfat kao izvor hrane. Fosfor je od velike važnosti za bakterije zato što u različitim oblicima čini strukturne biomolekule kao što su membranski fosfolipidi, funkcionalne biomolekule kao nukleinske kiseline te čine molekule koje u najvećem postoku pohranjuju energiju, ADP i ATP. Fosfat u bakterijama u najvećem dijelu čini anorganski fosfat (PO₄³⁻) koji se pohranjuje u citoplazmi pretvorbom u ATP [103].

U tablici 22. kod P1-7 za uzorak SP-a primjećuje se rast koncentracije fosfata od 7. do 14. dana dok CFU vrijednost raste. Takav trend upućuje na to da je došlo do razaranja stanične stijenke uzrokovano odumiranjem stanica i ispuštanje nutrijenata u medij u kojem se nalaze. Naime, stanica bakterije sastavljena je od različitih elemenata poput ugljika, vodika, kisika, fosfata i drugih te njezino kidanje uzrokuje ispuštanje elemenata [104]. Stoga, ukoliko dolazi do razaranja stanice, detektirati će se veća koncentracija tih elemenata u filtartu. S druge strane, u tablici 22. u pokusu P1-7 primjećuje se pad koncentracije fosfata (14.-30.dan) što upućuje da na to bakterije koriste fosfat kao izvor energije.

Rast CFU vrijednosti primjećuje se u P1-14 na slici 32. tijekom prvih sedam dana provođenja pokusa gdje je s $1,9 \times 10^7$ st/mL (0. dan) broj kolonija porastao na $3,3 \times 10^7$ st/mL (7. dan). Ukoliko je nastupila biorazgradnja, doći će do porasta TOC, TC i IC koncentracija. U tablici 13. prikazane se TOC vrijednosti i uistinu dolazi do povećanja TOC vrijednosti u prvih sedam dana provođenja P1-14 u odnosu na kontrolni uzorak (podebljane vrijednosti u tablici 13.) bez čestica PS-a koji imaju konstantne vrijednosti TOC-a. U tablici 15. primjećuje se rast TC-vrijednosti od 0. do 7. dana što je dodatna potvrda da je nastupila biorazgradnja PVC-a. Međutim, u P1-14 nije detektirana koncentracija IC-a koja ukazuje da je nastao CO₂, produkt biorazgradnje, te se ne može sa sigurnošću tvrditi da je nastupila biorazgradnja usprkos tome što ostali rezultati analiza ukazuju na to.

Nadalje, ukoliko dolazi do biorazgradnje, rastom CFU vrijednosti smanjivat će se koncentracija fosfata i kalija zato što ih bakterije koriste kao izvor energije. Takav trend primjećuje se u tablici 22. za pokus P1-14 tijekom prvih sedam dana. Nakon sedmog dana koncentracija fosfata raste što upućuje na odumiranje stanica bakterija, što je kod P1-7 detaljno objašnjeno. Kod slijepih proba, koncentracija fosfata varira tijekom pokusa što se primjećuje i iz CFU vrijednosti na slici 32. koja također varira.

Kalij ima veliki značaj u homeostazi stanica bakterija. Velika koncentracija kalija nalazi se u staničnoj membrani gdje se ponaša kao važan upravitelj mikrobiološke fiziologije. Ioni kalija sudjeluju u osmoregulaciji, pH ravnoteži, u regulaciji sinteze proteina, aktivaciji enzima i električnoj signalizaciji [105]. Kako bi se uspješno regulirale sve funkcije, stanična membrana posjeduje mnogo puteva kojima se omogućava prijelaz iona kalija unutar i izvan stanice. U skladu s time, za uspješno preživljavanje bakterije vrlo je važno da je koncentracija kalija pravilno regulirana. U tablici 22. prikazane su koncentracije kalija u P1-7 i P1-14 tijekom pokusa. Kod P1-7 može se primijetiti da koncentracija kalija raste od 7. do 14. dana, a u tom periodu CFU vrijednost blago rase, što znači da stanice odumiru u tom periodu. Kod uzorka SP-a koncentracija kalija varira što se vidi i na slici 32. na kojoj CFU vrijednost SP-a također varira. S druge strane, u P1-14 u tablici 22. primjećuje se da koncentracija kalija pada prvih sedam dana pokusa, dok CFU vrijednost rase. Takav trend upućuje na to da stanice koriste kalij kao izvor energije. Koncentracija kalija u uzorku SP-a varira što se vidi i u variranju vrijednosti CFU na slici 32.

Na slikama 35. i 36. prikazani su ATR-FTIR spektri čestica PS-a i PVC-a prije izvođenja pokusa i nakon 30 dana pokusa. Funkcionalne grupe dodijeljene su pikovima prema podacima u Tablici 2. Pokusi P1-7 i P1-14 analizirani su s obzirom da dobiveni rezultati prethodnih analiza ukazuju na pojavu biorazgradnje čestica u određenim uvjetima. Iz slike 35. na kojoj je

prikazan ATR-FTIR spektar (narančasta linija) za čestice PS-a iz P1-7 može se primijetiti da je intenzitet transmitancije manji za pikove koji označuju CH istežanje, aromatsko istežanje prstena, CH₂ uvijanje i aromatsko CH uvijanje. Veći intenzitet ukazuje na to da je došlo do promjene u strukturi mikročestica PS-a što je uzrokovano biorazgradnjom. Nadalje, iz ATR-FTIR spektra na slici primjećuje se da je intenzitet spektra za čestice PVC-a (narančasta linija) nakon pokusa P1-14 značajno manji od intenziteta spektra za čestice PVC-a prije pokusa (zeleno linija). Stoga, može se zaključiti da je smanjenje intenziteta pikova uzrokovano promjenom strukture čestica PS-a i PVC-a, što je posljedica biorazgradnje [41]. Također, iz grafova se može primijetiti se da u pokusu P1-7 i P1-14 ne dolazi do pomaka pikova kao ni nastajanje novih pikova.

Na slici 39. i 40. prikazani su rezultati HPLC/MS analize. Na slici 39. može se primijetiti pik (zaokružen) sa m/z vrijednosti = 453 koji pripada diisooktil ftalatu koji se koristi kao aditiv plastici kako bi se poboljšala njezina fizikalna svojstva [106]. S obzirom da je taj pik detektiran HPLC/MS analizom u uzorku nakon 30 dana pokusa, može se zaključiti da je u pokusima P1-7 došlo do biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus subtilis*. Na HPLC/MS spektru čestica PS-a iz pokusa P1-14 ne primjećuju se pikovi koji odgovaraju aditivima koji se koriste kod proizvodnje plasike.

U tablici 24. prikazane su EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti za pokus P1. Iz prethodno dobivenih rezultata vidljivo je da je do biorazgradnje došlo u pokusima P1-7 i P1-14. Za P1-7 EC₂₀ vrijednost iznosi 10,15%, dok je EC₅₀ vrijednost 26.84%. EC₂₀ za P1-14 iznosi 51.65 % te nije određen volumni udio uzorka koji bi izazivao smanjenje luminiscencije kod 50 % bakterijske kulture. Valja primijetiti da pokus P1-7 u kojem je došlo do biorazgradnje pokazuje nižu EC₂₀ vrijednost u odnosu na druge pokuse iz čega se može zaključiti da produkti biorazgradnje negativno utječu na fiziološku aktivnost bakterijske kulture *Vibrio fischeri*, točnije, volumni udio od 10,5 % uzorka uzrokovat će 20%-tni pad luminiscencije.

Također, toksičnost je iskazana preko TU vrijednosti koja se prema Kahru (2012) iskazuje kao recipročna vrijednost EC₅₀ vrijednosti te su dobivene vrijednosti podijeljene u tri kategorije: TU < 1% označava ne toksični uzorak, vrijednosti od 1 do 40 % označavaju toksični uzorak, vrijednosti od 40 do 100 % jako toksični uzorak, dok vrijednosti veće od 100% označuju ekstremno toksičan uzorak [107]. Prema tome, može se zaključiti da je od 16 pokusa biorazgradnje bakterijom u različitim uvjetima, 7 uzoraka označeno toksičnim. Veličina čestica PS-a koje su manje od 300 μm i one od 500-710 μm uzrokuju približno jednaku toksičnost, dok kod čestica PVC-a, veću toksičnost pokazuju manje čestice (<300 μm). Također, iz navedenih rezultata može se primijetiti da je 85% uzoraka koji su prema Kahru određeni kao

toksični imalo koncentraciju MP-e od 1000 mg/L. Stoga, zaključuje se da se toksičnost povećava povišenjem koncentracije MP-a. Na slici 39. i 40. primjećuje se pik na HPLC/MS spektru koji odgovara diisooktil ftalatu koji se često koristi kao aditiv plastici u pokusima P1-7 i P1-15 [106]. Ako promotrimo vrijednosti toksičnosti navedenih pokusa u tablici 24., može se primijetiti da vrijednosti EC20 u P1-7 pripada nižim vrijednostima u odnosu na druge pokuse što ukazuje na to da aditivi koji se dodaju plastici mogu imati nepovoljno djelovanje na fiziološku aktivnost čiste kulture bakterija *Vibrio fischeri* te moguće nepovoljno djelovanje prema drugim organizmima u okolišu. Kod P1-3, P1-5, P1-6, P1-8, P1-9, P1-11, P1-13, P1-14 i P1-16 analizom toksičnosti nije uočen volumni udio uzorka koji bi uzrokovao pad luminiscencije za 50 % kod *Vibrio fischeri*.

Postupkom opisanim u 4.3.11. određivali su se značajni čimbenici za proces biorazgradnje MP-a primjenom *Bacillus subtilis*. U tablici 26. prikazani su rezultati statističke analize eksperimentalnih podataka za pokus P1. Iz rezultata se može zaključiti sa 95%-tnom sigurnošću ($p < 0,05$) da najveći doprinos u biorazgradnji PS-a bakterijom *Bacillus subtilis* ima OG (81,72 %) i pH-vrijednost (3,82 %). Također, s 95%-tnom sigurnošću može se zaključiti da biorazgradnji PVC-a bakterijom *Bacillus subtilis* najviše doprinosi OG (94,33 %), a zatim pH-vrijednost (3,14 %). Ti čimbenici su najznačajniji i najviše doprinose biorazgradnji zato što veća OG-e rezultira većim brojem stanica bakterijske kulture koja je sposobna obaviti biorazgradnju te rezultati pokazuju da je od velikog značaja provedba eksperimenta pod uvjetima OG = 0,1 ili OG = 0,5, koje su bile proučavane vrijednosti. Nadalje, činjenica da je ANOVA analiza pokazala da je čimbenik koji doprinosi u značajnijem postotku biorazgradnji PS-a i PVC-a pH-vrijednost, ukazuje na to da je bakterijska kultura *Bacillus subtilis* osjetljiva na pH-vrijednost te je vrlo bitno odabrati prikladnu pH-vrijednost koja će rezultirati najboljom biorazgradnjom.

U tablici 28. prikazane su eksperimentalne vrijednosti parametara analize varijance (ANOVA) za biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus subtilis*. Primjećuje se da je standardna devijacija modela ($\sigma = 0,1011$) značajno manja od modela za biorazgradnju PS-a bakterijom *Delftia acidovorans* ($\sigma = 0,120$). Odgovarajuća preciznost pokazuje omjer signala i šuma te se vrijednost veća od 4 smatra prihvatljivom. Model biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus subtilis* pokazuje najveću vrijednost (104,066) što dodatno potvrđuje preciznost modela.

S obzirom da ANOVA analiza najznačajnijih čimbenika za biorazgradnju PVC-a bakterijom *Bacillus subtilis* ne pokazuje vrijednosti standardne devijacije, koeficijenta varijance, R^2 , prilagođenog i predviđenog R^2 ni odgovarajuće preciznosti. Takav rezultat

upućuje na to da se na osnovi jedne varijable ne može zaključiti niti pretpostaviti o vrijednosti druge varijable.

5.2. Analiza pokusa P2

U pokusu P2 ispitivala se sposobnost biorazgradnje PS-a i PVC-a pomoću bakterijske kulture *Delftia acidovorans* pri različitim uvjetima koji su prikazani u tablici 9.

Na slikama 34. i 35. grafički je prikazana promjena logaritamskog broja živih stanica bakterijske kulture tijekom 30 dana provedbe pokusa u različitim uvjetima gdje je bakterijska kultura bila u doticaju s česticama PS-a i PVC-a (plavi kružić) u usporedbi s rastom logaritamskog broja živih stanica bakterijske kulture u sustavu s istim uvjetima, ali bez čestica PS-a i PVC-a (crveni kružić). Najveći rast broja živih stanica bakterijske kulture *Delftia acidovorans* u odnosu na kontrolni uzorak pokazuju pokusi P2-4 i P2-11 zato što je CFU svakog dana izuzimanja uzorka veći od CFU kontrolnog uzorka. Također, u pokusu P2-4 primjećuje se nagli rast bakterijske kulture s $2,4 \times 10^7$ st/mL u 7. danu na $2,2 \times 10^8$ st/mL u 14. danu.

Promatrajući veličinu čestica PS-a i PVC-a primjećuje se da su u pokusima P2-4 i P2-11 gdje dolazi do rasta CFU korištene čestice manje od 300 μm (P2-4) koncentracije 10 mg/L, dok su u pokusu P2-11 korištene čestice veličine 500-710 μm koncentracije 1000 mg/L.

Parametar koji je zajednički pokusima P2-4 i P2-11 je dodatak glukoze. Naime, dokazano je da dodatak glukoze pospješuje biorazgradnju čestica mikroplastike [108] što je u skladu s dobivenim rezultatima. Nadalje, može se primijetiti da je do većeg broja rasta stanica u pokusima u kojima dolazi do biorazgradnje došlo u pokusima P2-4 i P2-11 pri temperaturi od 15 °C. Prema tome, može se zaključiti da unatoč tome što optimalna temperatura za rast bakterijske kulture *Delftia acidovorans* iznosi 30 °C [82], *Delftia acidovorans* učinkovitije razgrađuje PS i PVC pri temperaturi od 15°C. Ukoliko se u obzir uzima broj okretaja, veći stupanj biorazgradnje primjećuje se u pokusima u kojima je broj okretaja iznosio 200 o/min (P2-4, P2-11) u odnosu na pokuse u kojima je broj okretaja bio 100 o/min. Može se zaključiti da veći broj okretaja pospješuje biorazgradnju čestica PS-a, što su dokazali Panyachanakul i sur. (2019) na česticama polilaktične kiseline [99].

Optimalna pH-vrijednost za rast bakterijske kulture *Delftia acidovorans* je 6,8 [109]. Ukoliko promatramo rezultate dobivene na slici 33. i 34., može se primijetiti da je do potencijalne biorazgradnje došlo u pokusima P2-4 i P2-11 zato što je rast bakterijske kulture veći od kontrolnog uzorka bez čestica PS-a i PVC-a te ostali rezultati analiza to potvrđuju.

Zbog navedenih razloga u P1, ukoliko dolazi do biorazgradnje, rastom CFU vrijednosti, rasti će i TOC vrijednosti. U tablici 18. za P2-11 primjećuje se nagli rast u trećem danu kada se i na grafu na slici 34. može primijetiti početak rasta vrijednosti CFU. Odgovarajuće vrijednosti koncentracija TOC-a za slijepu probu variraju što se vidi i iz odgovarajuće vrijednosti CFU na slici 34. Za P2-4 iz grafa na slici 33. primjećuje se nagli rast CFU vrijednosti sa 7. na 14. dan što se u TOC vrijednosti u tablici 18. očituje u blagom porastu koncentracije. Nadalje, dodatna potvrda da u P2-11 dolazi do biorazgradnje vidi se u tablici 20. gdje dolazi do rasta TC vrijednosti u prva tri dana provedbe pokusa. Međutim, u P2-4 ne može se sa sigurnošću tvrditi da je u periodu od 7. do 14. dana pokusa nastupila biorazgradnja zato što dolazi do pada TC vrijednosti. Nadalje, ukoliko dolazi do biorazgradnje, rastom CFU vrijednosti kod P2-4 i P2-11, detektirati će se i IC vrijednost, što se vidi u tablici 21. 3. dana pokusa za P2-4 detektirano je 0,43 mg/L IC-a, a 21. dana u P2-11 detektirano je 0,49 mg/L IC-a (boldano u tablici 21.).

U tablici 23. prikazane su koncentracije fosfata i kalija u P2-4 i P2-11. Naime, u P2-4 pri najvećem rastu CFU vrijednosti od 7. do 14. dana primjećuje se najmanja koncentracija fosfata (257,05 mg/L) i kalija (59,48 mg/L) što upućuje da su bakterije koristile fosfat i kalij kao izvor energije. Kod slijepa probe koja odgovara P2-4 primjećuje se nagli porast koncentracije fosfata 7. dana što znači da je došlo do odumiranja bakterijskih stanica. U P2-11, nije detektirana koncentracija fosfata što može upućivati na to da su bakterije iskoristile sav fosfat kao izvor energije. Međutim, od 3. do 14. dana pokusa kada dolazi do najvećeg rasta CFU vrijednosti u P2-11, primjećuje se isti trend varijacije koncentracije kalija kao i u SP-i te se ne može zaključiti sa sigurnošću da dolazi do biorazgradnje.

Na slikama 37. i 38. prikazani su ATR-FTIR spektri čestica PS-a i PVC-a prije izvođenja pokusa i nakon 30 dana pokusa. Funkcionalne grupe dodijeljene su pikovima prema podacima u Tablici 2. Pokusi P2-4 i P2-11 analizirani su s obzirom da dobiveni rezultati prethodnih analiza ukazuju na pojavu biorazgradnje čestica u određenim uvjetima. Iz slike 37. na kojem je ATR-FTIR spektar (narančasta linija) za čestice PS-a iz P2-4 može se primijetiti značajno smanjenje intenziteta pikova za pokus P2-4 (narančasta linija) u odnosu na čestice PS-a prije pokusa (zelena linija). Također, kod pikova koji označuju aromatsko istezanje prstena i aromatsko CH uvijanje primjećuju se pomaci pika što je indikator da je došlo do biorazgradnje. Na ATR-FTIR spektru za P2-12 na slici 38. primjećuje se da je intenzitet spektra za čestice PVC-a nakon pokusa manji za pikove koji pripadaju CH uvijanju, CC istezanju (dolazi i do pomaka pika), CH₂ njihanju i CCl istezanju. Također, primjećuje se nastanak novog pika (zaokružen) koji odgovara C=O istezanju, vezi koja nastaje kada dolazi do biorazgradnje [41].

Prema tome, zaključuje se da je u pokusu P2-11 bakterijska kultura *Delftia acidovorans* razgradila čestice PVC-a.

Na slici 41. i 42. prikazani su rezultati HPLC/MS analize za čestice PS-a i PVC-a nakon 30 dana pokusa P2. Na slici 42. može se primijetiti karakterističan pik (zaokružen) sa m/z vrijednosti = 453 koji pripada diisooktil ftalatu koji se koristi kao aditiv plastici kako bi se poboljšala njezina fizikalna svojstva [101]. Detekcija tog pika, dodatna je potvrda da je nastupila biorazgradnja u P2-11, no u P2-4 ne primjećuju se karakteristični pikovi koji bi odgovarali aditivima koji se dodaju plastici.

U tablici 25. prikazane su EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti za pokus P2. Iz prethodno dobivenih rezultata vidljivo je da je do biorazgradnje došlo u pokusima P2-4 i P2-11. Za P2-4 EC₂₀ vrijednosti iznosi 6.20%, dok je EC₅₀ vrijednost 24,56%. Uspoređujući rezultate s ostalim dobivenim vrijednostima, primjećuje se da je toksičnost u tim pokusima viša jer je volumni udio koji uzrokuje pad luminiscencije za 20 i 50% niži. Najvišu EC₂₀ vrijednost (54,75%) ima filtrat dobiven iz pokusa P2-9, a najnižu vrijednost (3,88%) filtrat iz pokusa P2-1. Najniža vrijednost EC₅₀ (15,67%) primjećuje se u pokusu P2-1, dok najvišu vrijednost (53,02 %) ima P2-5. Pokusi pokazuju približno jednake EC₂₀ vrijednosti koje se kod PS-a nalaze u intervalu od 3,88% do 43,52%, kod PVC-a u intervalu od 5,60 % do 54,75% te EC₅₀ vrijednosti koje se kod PS-a kreću od 15,67% do 53,02 te kod PVC-a od 25,76% do 47,74%. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da čestice PS-a i čestice PVC-a imaju jednak toksični utjecaj na fiziološku aktivnost čiste bakterijske kulture *Vibrio fischeri*. Za razliku od bakterijske kulture *Bacillus cereus*, kod bakterijske kulture *Delftia acidovorans* niže su EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti, točnije, veću toksičnost imaju čestice PS-a i PVC-a veličine 500-700 µm i koncentracije 10 mg/L.

U tablici 25. prikazane su TU vrijednosti te se može zaključiti da su uzorci u 9 pokusa toksični. Pokusi koji pokazuju toksičnost (P2-1, P2-2, P2-4, P2-5, P2-7) sadržavale su čestice PS-a veličine <300 µm i 500-710 µm, stoga se ne može zaključiti koja veličina čestica uzrokuje veću toksičnost uzorka. Nadalje, pokusi P2-10, P2-13 i P2-15 sadržavali su čestice PVC-a manje od 300 µm kao i čestice veličine 500-710 µm te se također ne može odrediti koja veličina čestica uzrokuje veću toksičnost. Ukoliko promatramo koncentraciju PVC-a ili PS-a, može se primijetiti da 5 od 9 pokusa koji imaju EC₅₀ i TU vrijednost sadrže čestice manje koncentracije (10 mg/L), stoga slijedi da koncentracija PVC-a i PS-a u slučaju biorazgradnje bakterijskom kulturom *Delftia acidovorans* nema veliki utjecaj na razinu toksičnosti.

Postupkom opisanim u 3.3.11. određivali su se značajni čimbenici za proces biorazgradnje MP-a primjenom *Delftia acidovorans*. U tablici 26. prikazani su rezultati statističke analize eksperimentalnih podataka za pokus P2. Iz rezultata se može zaključiti sa 95%-tnom

sigurnošću ($p < 0,05$) da biorazgradnji PS-a bakterijom *Delftia acidovorans* najviše doprinosi temperatura (41,67 %), kao i biorazgradnji PVC-a (74,31 %). Ostali čimbenici koji su proučavani u pokusu (pH-vrijednost, koncentracija MP-e, veličina čestica, broj okretaja, OG, dodatak glukoze) doprinose biorazgradnji, ali u manjem postotku i nisu statistički značajni ($p > 0,05$). Činjenica da je temperatura čimbenik koji najviše doprinosi biorazgradnji čestica PS-a i PVC-a upućuje na to da je za uspješnu biorazgradnju najvažnije odabrati određenu temperaturu, što je u ovom slučaju $T = 15^{\circ}\text{C}$, međutim, dodatni eksperimenti potrebni su kako bi se bolje razumio doprinos temperature biorazgradnji čestica MP-e bakterijom *Delftia acidovorans*.

U tablici 28. prikazane su eksperimentalne vrijednosti parametara analize varijance (ANOVA) za biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijom *Delftia acidovorans*. Primjećuje se da su standardne devijacije modela približno jednake za biorazgradnju PS-a i PVC-a bakterijom *Delftia acidovorans*. Također, primjećuju se približno jednake vrijednosti za sve parametre (C.V., R^2 , prilagođeni i predviđeni R^2 , odgovarajuća preciznost) što upućuje na to da su oba modela prikladna za određivanje čimbenika koji utječu na proces biorazgradnje ispitivanih čestica MP-a.

5.3. Usporedba pokusa P1 i P2

U pokusu P1 za razgradnju mikročestica PS-a i PVC-a koristila se bakterijska kultura *Bacillus subtilis*, dok se u pokusu P2 za razgradnju istih čestica koristila bakterijska kultura *Delftia acidovorans*. *Bacillus subtilis* je gram-pozitivna bakterija i kao takva, stvara spore kako bi preživjela i kako bi se prilagodila nepovoljnim uvjetima, dok je *Delftia acidovorans* gram-negativna bakterija. Prema tome, s obzirom da bakterijska kultura *Bacillus subtilis* stvara spore, očekuje se veći stupanj biorazgradnje u pokusima s tom bakterijom. Međutim, rezultati pokazuju da bakterijska kultura *Delftia acidovorans* bolje razgrađuje čestice PS-a i PVC-a. To se može zaključiti iz slika 31. – 34. koje pokazuju promjenu logaritamskog broja živih stanica tijekom pokusa iz kojih se vidi da je više pokusa (P2-3, P2-4, P2-5, P2-6, P2-11, P2-12) pokazalo veću logaritamsku CFU vrijednost u odnosu na kontrolni uzorak ukoliko se rezultati uspoređuju između bakterijskih kultura. Osim većeg rasta, pokusi P2 većinom imaju veću razliku između sustava s česticama MP-e i onog bez njih.

U pokusima se ispitivala značajnost veličine čestica na proces biorazgradnje PS-a i PVC-a na dvije razine: čestice manje od 300 μm i čestice veličine od 500 do 710 μm . Uspoređujući veličinu čestica MP-a može se zaključiti su bakterijska kultura *Bacillus subtilis* i *Delftia*

acidovorans jednako uspješne u razgradnji čestica PS-a i PVC-a manjih od 300 μm i čestica veličine 500-710 μm .

Ispitivanje koncentracije MP-a na dvije razine: 10 mg/L i 1000 mg/L pokazalo je da je biorazgradnja uspješnija u uvjetima gdje koncentracija MP-a iznosi 1000 mg/L.

Također, ispitivala se značajnost pH-vrijednosti na dvije razine: pH=6 i pH=8 i temperature na dvije razine: $T = 15^{\circ}\text{C}$ i $T = 25^{\circ}\text{C}$. Povoljniji uvjeti za biorazgradnju čestica MP-a primjenom *Bacillus subtilis* su temperatura od 25°C pri obje pH vrijednosti, što je i očekivano s obzirom da je optimalna temperatura za rast bakterije $T = 30^{\circ}\text{C}$. S druge strane, bez obzira na to što je optimalna temperatura za rast bakterijske kulture *Delftia acidovorans* 30°C , do najveće razgradnje je došlo pri 15°C . Optimalna pH-vrijednost za preživljavanje bakterijske kulture *Delftia acidovorans* iznosi 6,8, a najveća razgradnja zabilježena je u pokusima P2-4 i P2-11 gdje su pH vrijednosti 6,0 i 8,0.

Broj okretaja rotacijske tresilice se također ispitivao na dvije razine: 100 i 200 okretaja u minuti. Kod pokusa biorazgradnje čestica PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus subtilis* i bakterijom *Delftia acidovorans*, rezultati pokazuju da je bolja biorazgradnja zabilježena pri većem broju okretaja, to jest, pri 200 okretaja u minuti. Naime, brojem okretaja osigurava se koncentracija otopljenog kisika u sustavu te veći broj okretaja rezultira većom koncentracijom otopljenog kisika. S obzirom da je kisik nužan za biorazgradnju ugljikovodičnih polimera, ona će biti bolja u prisustvu veće koncentracije kisika [110].

Sljedeći čimbenik koji je ispitivan je dodatak glukoze. Naime, u P1 kod biorazgradnje bakterijom *Bacillus subtilis*, biorazgradnja je dokazana u uvjetima bez i sa glukozom, dok je biorazgradnja primjenom bakterije *Delftia acidovorans* nastupila u uvjetima gdje je dodana glukoze.

Proces biorazgradnje praćen je i anazom TOC, TC i IC vrijednosti. U P1-7, P1-15, P2-4 i P2-11 primjećuje se rast TOC i TC vrijednosti u danima kada vrijednost CFU raste, što je potvrda biorazgradnje. Međutim, IC koncentracija detektirana je samo u P1-7, P2-4 i P2-11 što upućuje na to da je nastao CO_2 kao produkt biorazgradnje. Rast CFU vrijednosti uzrokovat će smanjenje koncentracije fosfata i kalija ako je došlo do biorazgradnje. Smanjenje koncentracije fosfata primjećuje se u P1-7, P1-14, P2-4 i P2-11, dok se smanjenje koncentracije kalija primjećuje u P1-14 i P2-4, dok u P1-7 i P2-11 koncentracija kalija varira u danima kad CFU vrijednost rase.

Potvrda biorazgradnje provela se snimanjem i analize ATR-FTIR spektara čestica PS-a i PVC-a prije i nakon provedbe pokusa. Rezultati pokazuju da je do blago veće razgradnje došlo kod bakterijske kulture *Delftia acidovorans* u odnosu na bakterijsku kulturu *Bacillus subtilis*.

Iz ATR-FTIR spektara vidi se da u P2 pokusima dolazi do većeg smanjenja intenziteta pikova kod bakterijske kulture *Delftia acidovorans* te nastanak novog pika na 1600 cm^{-1} koji odgovara karbonilnoj vezi koja je posljedica biorazgradnje.

Nadalje, ukoliko dolazi do biorazgradnje snimanjem HPLC/MS spektra može se utvrditi prisutnost aditiva koji se dodaju plastici kako bi se poboljšala njezina fizikalna svojstva. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je u oba pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus subtilis* i *Delftia acidovorans* uočen pik koji odgovara diisooktil ftalatu, čestom aditivu.

Ispitivanje toksičnosti provodilo se na bakterijskoj kulturi *Vibrio fischeri*. U pokusu P1, najveću toksičnost uzrokovale su čestice PS-a svih veličina (<300 i $500-710\text{ }\mu\text{m}$) i koncentracije 1000 mg/L te pokus u kojima je došlo do biorazgradnje (P1-7) pokazuje veću toksičnost od pokusa u kojima nije došlo do biorazgradnje. S druge strane, u pokusu P2 s bakterijskom kulturom *Delftia acidovorans* čestice PS-a i PVC-a imaju jednak toksični utjecaj na fiziološku aktivnost čiste bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (vrijednosti EC_{20} i EC_{50} približno su slične za sve pokuse). Za razliku od bakterijske kulture *Bacillus subtilis*, kod bakterijske kulture *Delftia acidovorans* manje EC_{20} i EC_{50} vrijednosti, točnije, veću toksičnost imaju čestice PS-a i PVC-a veličine $500-710\text{ }\mu\text{m}$ i koncentracije 10 mg/L .

Rezultati statističke analize eksperimentalnih podataka pokazuju da su značajni čimbenici u biorazgradnji čestica PS-a optička gustoća koja doprinosi $81,72\%$, dodatak glukoze uz doprinos od $5,53\%$, slijedi koncentracija MP-e od $5,22\%$, broj okretaja od $4,08\%$ i pH uz doprinos od $3,82\%$. Značajni čimbenici u biorazgradnji čestica PVC-a su optička gustoća koja doprinosi $94,33\%$ i pH doprinosi $3,14\%$. Stoga, ukoliko se čestice PS-a i PVC-a žele razgraditi pomoću bakterije *Bacillus subtilis*, najveći utjecaj će imati optička gustoća. Biorazgradnji primjenom bakterije *Delftia acidovorans* najviše će doprinositi temperatura za razgradnju PS-a ($41,67\%$) i PVC-a ($74,31\%$) dok ostali faktori neće značajno utjecati na proces biorazgradnje.

Također, valja primijetiti da je koeficijent varijance (C.V. = $0,14\%$) za biorazgradnju PS-a u P1 puno manji od koeficijenta varijance (C.V. = $1,61\%$) za biorazgradnju PS-a u pokusu P2 što znači da je varijabilnost čimbenika manja kod bakterijske kulture *Delftia acidovorans* kod biorazgradnje PS-a. Koeficijent determinacije (R^2) mjeri koliko dobro linearni regresijski model odgovara stvarnim podacima te što je vrijednost bliža 1, model je točniji [111]. Iz tablice se zaključuje da model za biorazgradnju PS-a bakterijom *Bacillus subtilis* ima najveću vrijednost R^2 što ga čini najtočnijim modelom.

6. ZAKLJUČAK

Mikroplastiku čine čestice veličine od 1 μm do 5 mm te danas gotovo ne postoji eko-sustav u kojem se one ne pronalaze. Zahvaljujući svojoj izdržljivosti, niskoj cijeni, maloj težini i velikoj primjenjivosti izbor je mnogih industrija što je rezultiralo njezinim povećanjem u prirodi u zadnjih 50 godina. Njezina izdržljivost i gotovo nemoguća i dugotrajna razgradnja pruža joj veliku prednost u brojnim pogledima, međutim, u isto vrijeme, predstavlja ogroman problem za prirodu i sustave koje se nalaze u njoj

Cilj ovog istaživanja bilo je provesti ispitivanje značajnih čimbenika za biorazgradnju polistirena i poli(vinil-klorida) bakterijom *Delftia acidovorans* (P2) i *Bacillus subtilis* (P1)

Na temelju logaritamskog broja rasta živih stanica bakterijske kulture određeno je da je do najveće biorazgradnje došlo u pokusima P1-7 i P1-14 za bakteriju *Bacillus subtilis* i P2-4 i P2-11 za bakteriju *Delftia acidovorans*. Uspoređujući veličinu čestica MP-a može se zaključiti su bakterijska kultura *Bacillus subtilis* i *Delftia acidovorans* jednako uspješne u razgradnji čestica PS-a i PVC-a manjih od 300 μm i čestica veličine 500-710 μm . Nadalje, veća koncentracija MP-a uzrokuje bolju biorazgradnju kod obje bakterijske kulture te je biorazgradnja uspješnija pri uvjetima veće brzine okretaja.

Biorazgradnja čestica PS-a i PVC-a uspješnija je kod više temperature (25°C) kod *Bacillus subtilis*, dok je kod bakterije *Delftia acidovorans* biorazgradnja uspješnija pri nižoj temperaturi (15°C), dok je kod obje kulture biorazgradnja uspješnija pri pH = 6. Promatrajući dodatak glukoze, u P1 kod biorazgradnje bakterijom *Bacillus subtilis*, biorazgradnja je dokazana u uvjetima bez i sa glukozom, dok je biorazgradnja primjenom bakterije *Delftia acidovorans* nastupila u uvjetima gdje je dodana glukoze.

Rast vrijednosti TOC-a pri rastu CFU vrijednosti u odnosu na pripadajuće kontrolne uzorke potvrđuju biorazgradnju u pokusima P1-7, P1-14, P2-4 i P2-11 što podupiru i rezultati IC-a. Shodno tome, biorazgradnju u navedenim pokusima potvrđuje i smanjenje koncentracija fosfata i kalija u danima gdje CFU vrijednosti raste. Nadalje, prisutstvo ftalata, to jest, često upotrebljivanih aditiva u plastici, dokazano je HPLC/MS analizom što je dodatna potvrda da je do biorazgradnje došlo u P1-7 i P1-11.

Ispitivanje toksičnosti dokazalo je da čestice PS-a i PVC-a imaju toksičan utjecaj na *V. fischeri*, no razina toksičnosti ovisi o uvjetima u kojima se provodio određeni pokus. Nadalje, prilikom biorazgradnje otpuštaju se ftalati koji su povećali toksičnost filtrata.

Rezultati statističke analize eksperimentalnih podataka pokazuju da biorazgradnji čestica PS-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis* najveći doprinos ima optička gustoća (81,72 %) i pH (3,82 %). Značajni čimbenici u biorazgradnji čestica PVC-a bakterijom *Delftia acidovorans* su optička gustoća koja doprinosi 94,33% i pH-vrijednost s doprinosom od 3,14%. Biorazgradnji primjenom bakterije *Delftia acidovorans* najviše doprinosi temperatura za razgradnju PS-a (41,67 %) i PVC-a (74,31 %) dok ostali faktori doprinose u puno manjem postotku.

U konačnici, može se zaključiti da bakterijske kulture *Bacillus subtilis* i *Delftia acidovorans* imaju sposobnost biorazgradnje čestica PS-a i PVC-a u kontroliranim uvjetima. No, kako bi se bolje razumjeli uvjeti i doprinosi različitih čimbenika potrebno je provesti dodatna istraživanja.

7. LITERATURA

- [1] <https://www.plasticseurope.org/application/files/4315/1310/4805/plastic-the-fact-2016.pdf> (pristup: 20.11.2020.)
- [2] Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, Polystyrene spherules in coastal waters, *Science* 178 (1972).
- [3] Thompson, R. C., Lost at Sea: Where Is All the Plastic?, *Science*, 304 (2004), 838–838.
- [4] Frias, J.P.G.L., Nash, R., Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Mar. Pollut. Bull.* 138 (2019), 145-147.
- [5] Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S., Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62 (2011), 2588–2597.
- [6] Nelms, S.E., Barnett, J., Brownlow, A., Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory?, *Sci Rep* 9, 1075 (2019).
- [7] Qiang, L., Cheng, J., Exposure to microplastics decreases swimming competence in larval zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 176 (2019), 226–233.
- [8] Rehse, S., Kloas, W., Zarfl, C., Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*, *Chemosphere*, 153 (2016), 91–99.
- [9] Khan, S., Nadir, S., Shah, Z. U., Shah, A., Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*, *Environmental Pollution*, 225 (2017), 469–480.
- [10] Sánchez, C., Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation, *Biotechnology Advances*, 2019.
- [11] Andrady, A.L., Microplastics in the marine environment, *Mar. Pollut. Bull.* 62 (2011), 1596-1605.
- [12] Davidson, J. D., Goulbourne, N. C., Microscopic mechanisms of the shape memory effect in crosslinked polymers, *Smart Materials and Structures*, 24 (2015).
- [13] Whiteley, K. S., Heggs, T. G., Koch, H., Polyolefins, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2000).
- [14] Khanam, P. N., & AlMaadeed, M. A. A., Processing and characterization of polyethylene-based composites, *Advanced Manufacturing: Polymer & Composites Science*, 1(2015), 63–79.
- [15] Clayman, H. M., Polypropylene, *Ophthalmology*, 88 (1981.), 959–964.
- [16] <https://rubenstube.wordpress.com/saftey-section/pvc/> (pristup: 25.11.2020.)
- [17] Blackley, D. C., Plasticised Polyvinyl Chloride (PVC), *Synthetic Rubbers: Their Chemistry and Technology*, (1983), 244–269.

- [18] Crawford, C. B., & Quinn, B., Physiochemical properties and degradation. *Microplastic Pollutants*, (2017) 68-71.
- [19] <https://letstalkscience.ca/educational-resources/stem-in-context/polystyrene-pros-cons-chemistry> (pristup: 25.11.2020.)
- [20] Robertson, G. L., Food Packaging, *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (2014) 232-249.
- [21] <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polyethylene-terephthalate-pet-plastic> (pristup: 25.11.2020.)
- [22] Horton, A.A., Walton, A., Spurgeon, D.J., Lahive, E., Svendsen, C., Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities, *Sci. Total Environ.* 586 (2017), 127-141.
- [23] Hall, R.O., Meyer, J.L., The trophic significance of bacteria in a detritus-based stream food web. *Ecology* 79 (1998), 1995-2012.
- [24] Wang, W., Ndungu, A. W., Li, Z., Wang, J, Microplastics pollution in inland freshwaters of China: A case study in urban surface waters of Wuhan, China, *Science of The Total Environment*, 575 (2017), 1369–1374.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Galgani, F., Leaute, J., Moguedet, P., Litter on the Sea Floor Along European Coasts, *Marine Pollution Bulletin*, 40 (2000), 516-527.
- [28] Maršić-Lučić, J., Lušić, J., Tutman, P., Bojanić Varezić, D., Levels of trace metals on microplastic particles in beach sediments of the island of Vis, Adriatic Sea, Croatia, *Mar. Pollut. Bull.*, 137 (2018) 231–236.
- [29] Turner, A., Holmes, L. A., Adsorption of trace metals by microplastic pellets in fresh water, *Environmental Chemistry*, 12 (2015), 600-610.
- [30] Tutman, P., Bojanić-Varezić, D., Prvan, M., Božanić, J., Nazlić, M., Integrirano planiranje u cilju smanjivanja utjecaja otpada iz mora – projekt DeFishGear, *Tehnoko*, 67 (2017), 20-29.
- [31] Nizzetto, L., Futter, M., Langaas, S., Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin?, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016), 10777-10779.

- [32] Blaesing, M., Amelung, W., Plastics in soil: Analytical methods and possible sources, *Sci. Total Environ.* 612 (2018), 422-435.
- [33] Qi, Y., Yang, X., Pelaez, A. M., Huerta Lwanga, E., Beriot, N., Macro- and micro- plastics in soil-plant system: Effects of plastic mulch film residues on wheat (*Triticum aestivum*) growth, *Science of The Total Environment*, 645 (2018), 1048–1056.
- [34] Zhang, Q., Zhao, Y., Du, F., Cai, H., Microplastic fallout in different indoor environments. *Environ. Sci. Technol.* 54 (2020), 6530-6539.
- [35] 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.
- [36] Vianello, A., Jensen, R.L., Liu, L., Vollertsen, J., Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a Breathing Thermal Manikin. *Sci. Rep.* 8670 (2019).
- [37] Prata, J. C., da Costa, J. P., Duarte, A. C., Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: a critical review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2018), 150-159.
- [38] Klein, S., Dimzon, I. K., Eubeler, J., & Knepper, T. P., Analysis, Occurrence, and Degradation of Microplastics in the Aqueous Environment, *Freshwater Microplastics* (2017) 51–67.
- [39] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/How_an_FTIR_Spectrometer_Operates) (pristup: 4.2.2021.)
- [40] Xu, J.-L., Thomas, K. V., Luo, Z., FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: state of the art, challenges and prospects, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2019).
- [41] Shim, W. J., Hong, S. H., & Eo, S. E., Identification methods in microplastic analysis: a review, *Analytical Methods*, 9 (2017), 1384–1391.
- [42] Jung, M. R., Horgen, F. D., Orski, S. V., Rodriguez C., V., 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.
- [43] Wan, F., Du, L., Chen, W., Wang, P., Wang, J., Shi, A Novel Method to Directly Analyze Dissolved Acetic Acid in Transformer Oil without Extraction Using Raman Spectroscopy. *Energies*, 10 (2017), 967.
- [44] Van Cauwenberghe, L., Vanreusel, A., Mees, J., & Janssen, C. R., Microplastic pollution in deep-sea sediments, *Environmental Pollution*, 182 (2013), 495–499.
- [45] <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/> (pristup: 6.2.2021.)

- [46] Wang, Z.-M., Wagner, J., Ghosal, S., Bedi, G., SEM/EDS and optical microscopy analyses of microplastics in ocean trawl and fish guts, *Science of The Total Environment*, 603-604 (2017), 616–626.
- [47] Wang, L., Zhang, J., Hou, S., A Simple Method for Quantifying Polycarbonate and Polyethylene Terephthalate Microplastics in Environmental Samples by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Environmental Science & Technology Letters*, 4 (2017), 530–534.
- [48] Kusch, P., Application of Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry (Py-GC/MS), *Comprehensive Analytical Chemistry* (2017), 169–207.
- [49] M. Sudhakar, M. Doble, P. S. Murthy, and R. Venkatesan, Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61 (2008), 203-213
- [50] Arhant, M., Le Gall, M., Le Gac, P.-Y., Davies, P., Impact of hydrolytic degradation on mechanical properties of PET - Towards an understanding of microplastics formation, *Polymer Degradation and Stability*, 161 (2019), 175-182.
- [51] Corcoran, P. L., Degradation of Microplastics in the Environment, *Handbook of Microplastics in the Environment* (2020), 1–12.
- [52] Cooper, DA., Effects of chemical and mechanical weathering processes on the degradation of plastic debris on marine beaches. PhD dissertation, The University of Western Ontario (2012).
- [53] Calvert, P. D., Polymer degradation and stabilization, *British Polymer Journal*, 18 (1986), 278–278.
- [54] Gewert, B., Plassmann, M. M., MacLeod, M., Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment, *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17 (2015), 1513–1521.
- [55] 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.
- [56] Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., Biological degradation of plastics: a comprehensive review, *Biotechnol Adv*, 26 (2008), 246–265.
- [57] Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., Aiba, S., Biodegradability of plastics, *Int. J. Mol. Sci.*, 10 (2009), 3722–3742.
- [58] Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., Pillai, S., Plastic biodegradation: frontline microbes and their enzymes, *Science of The Total Environment*, 759 (2020).

- [59] Chifiriuc, M.C., Ficai, A., Grumezescu, A.M., Ditu, Soft tissue engineering and microbial infections: challenges and perspectives, *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering* (2016), 1-29.
- [60] Santo, M., Weitsman, R., & Sivan, A., The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84 (2013), 204–210.
- [61] Suzuki, T., Endo, K., Iro, M., Tsujibo, A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence and expression bioscience, *Biotechnology and Biochemistry* 6 (2003), 2167-2175.
- [62] Xu, H., Guo, M.-Y., Gao, Y.-H., Expression and characteristics of manganese peroxidase from *Ganoderma lucidum* in *Pichia pastoris* and its application in the degradation of four dyes and phenol, *BMC Biotechnology*, 17 (2017), 17-19.
- [63] Twala, P.P., Mitema, A., Baburam, C., Feto, N.A., Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin, *AIMS Microbiology*, 6 (2020), 330 – 349.
- [64] Ganesh, P., Dineshraj, D., Yognathan, K., Production and screening of depolymerising enzymes by potential bacteria and fungi isolated from plastic waste dump yard sites, *International Journal of Applied Research*, 3 (2017), 693 – 659.
- [65] Yoon, M.G., Jeon, H.J., Kim, M.N., Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and AlkB cloned recombinant cell, *J. Bioremed. Biodegrad.* 3 (2012), 1-8.
- [66] Austin, H.P., Allen, M.D., Donohoe, B.S., Rorrer, N.A., Kearns, F.L., Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyestherase, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 115 (2018), 4350-4357.
- [67] Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate), *Science*, (2016) 1196-1199.
- [68] Singh, L., Wahid, Z. A., Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: a review, *J. Ind. Eng. Chem.*, 21 (2015), 70–80.
- [69] Arutchelvi, J., Sudhakar, M., Arkatkar, A., Doble, M., Biodegradation of polyethylene and polypropylene, *Indian J. Biotechnol.* 7 (2008), 9–22.
- [70] Auta, H. S., Emenike, C. U., Fauziah, S. H., Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation, *Environmental Pollution*, 231 (2017), 552–1559.
- [71] Yang, J., Yang, Y., Wu, W.-M., Zhao, J., Jiang, L., Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms, *Environmental Science & Technology*, 48 (2014), 13776–13784.

- [72] Warhurst, A.M., Fewson, C.A., Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*, *Crit Rev Biotech*, 14 (1994), 29-73.
- [73] Rose, R., Richardson, K., Latvanen, E.J., Hanson, C.A., Resmini, M., Microbial Degradation of Plastic in Aqueous Solutions Demonstrated by CO₂ Evolution and Quantification, *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (2020).
- [74] Habib, S., Iruthayam, A., Abd Shukor, M. Y., Alias, S. A., Biodeterioration of Untreated Polypropylene Microplastic Particles by Antarctic Bacteria, *Polymers*, 12 (2020).
- [75] Oliveira, J., Belchior, A., da Silva Veronica, D., Rotter, A., Marine Environmental Plastic Pollution: Mitigation by Microorganism Degradation and Recycling Valorization, *Frontiers in Marine Science*, 7 (2020).
- [76] Dos Santos, V.A.P., Heim, S., Moore, E.R.B., Stratz, M., Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440, *Env Microbiol* 6 (2004), 1264–1286.
- [77] Ruiz, C., Main, T., Hilliard, N.P. Howard, G.T., Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*, *Int Biodeterior Biodegrad*, 43 (1999), 43–47.
- [78] Arkatkar, A., Juwarkar, A.A., Bhaduri, S., Uppara, P.V., Doble, M., Growth of *Pseudomonas* and *Bacillus* biofilms on pretreated polypropylene surface, *Int. Biodeterior Biodegrad*, 64 (2010), 530–536.
- [79] Kim, M., Evaluation of degradability of hydroxypropylated potato starch/polyethylene blend films, *Carbohydr Polym*, 54 (2003), 173–181.
- [80] Hung, C.-S., Zingarelli, S., Nadeau, L.J., Biffinger, J.C., Carbon catabolite repression and imbranil polyurethane degradation in *Pseudomonas protegens* strain Pf-5, *Appl Environ Microbiol*, 82 (2016), 6080–6090.
- [81] Shima, M., Biodegradation of plastics, *Curr Opin Biotechnol*, 12 (2001), 242–247.
- [82] Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S., Sly, L., Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 (1999), 567–576.
- [83] Khalifa, A. Y. Z., AlMalki, M., Polyphasic characterization of *Delftia acidovorans* ESM-1, a facultative methylotrophic bacterium isolated from rhizosphere of *Eruca sativa*, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26 (2018), 1262-1267.
- [84] J.J. Dynes, T. Rema, J.R. Lawrence, G.D.W. Swerhone, A.P. Hitchcock, STXM and SR-IR analysis of *Delftia acidovorans* biofilms exposed to chlorhexidine, *Surveill. Rep. EPS (Environ. Can.)* 104 (2007) 104–105.

- [85] Shetty, A.R., de Gannes, V., Obi, C.C., Lucas, S., Lapidus, A., Cheng, J.F., Complete genome sequence of the phenanthrene-degrading soil bacterium *Delftia acidovorans* Cs1-4, *Standards in Genomic Sciences*, 10 (2015), 55.
- [86] Johnston, C. W., Wyatt, M. A., Li, X., Ibrahim, A., Gold biomineralization by a metallophore from a gold-associated microbe, *Nature Chemical Biology*, 9 (2013), 241–243.
- [87] Nakajimakambe, T., Onuma, F., Kimpara, N, Nakahara, T., Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source, *FEMS Microbiology Letters*, 129 (1995), 39–42.
- [88] Marzluf G.A., Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi, *Microbiological Reviews*. 45 (1981), 437–461.
- [89] Oliveira, J., Afonso, B., Rotter, A., Petrovski, Ž., Marine Environmental Plastic Pollution: Mitigation by Microorganism Degradation and Recycling Valorization, *Frontiers in Marine Science*, 7 (2020), 1007.
- [90] Paço, A., Duarte, K., da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Pereira, R., Pereira, M. E., Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*, *Science of The Total Environment*, 586 (2017), 10–15.
- [91] Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*, *Science of The Total Environment* (2019).
- [92] Qi, X., Ren, Y., and Wang, X., New advances in the biodegradation of Poly(lactic) acid, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 117 (2017), 215–223.
- [93] Karamanlioglu, M., Houlden, A., Robson, G. D., Isolation and characterisation of fungal communities associated with degradation and growth on the surface of poly(lactic) acid (PLA) in soil and compost, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95 (2014), 301–310.
- [94] Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M., Photosynthesis in Microalgae, *Handbook of Microalgal Culture* (2013), 21–36.
- [95] Vimal Kumar, R., Kanna, G. R., Elumalai, S., Biodegradation of Polyethylene by Green Photosynthetic Microalgae, *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 8 (2017).
- [96] Kim, J. W., Park, S.-B., Tran, Q.-G., Cho, D.-H., Functional expression of polyethylene terephthalate-degrading enzyme (PETase) in green microalgae, *Microbial Cell Factories*, 19 (2010), 39–42.
- [97] Kyaw, B., M., Champakalakshmi, R., Biodegradation of Low Density Polythen (LDPE) by *Pseudomonas* Species, *Indian J Microbiol*, 53 (2012), 411-419.

- [98] Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri*, Method using freshly prepared bacteria.
- [99] Panyachanakul, T., Sorachart, B., Lumyong, S., Lorliam, W., Development of biodegradation process for poly(DL-lactic acid) degradation by crude enzyme produced by *Actinomadura keratinilytica* strain T16–1. *Electronic Journal of Biotechnology* (2019).
- [100] Isnawati, Trimulyono, G., Temperature range and degree of acidity growth of isolate of indigenous bacteria on fermented feed “fermege.” *Journal of Physics: Conference Series*, 953 (2018.)
- [101] Satapute, P., Olekar, H.S, Shetti, A., Kulkarni, A., Isolation and characterization of nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain as-4 from agricultural soil, *Int. J. Recent Sci. Res.* 3 (2012), 762-765.
- [102] Bisutti, I., Hilke, I., Raessler, M., Determination of total organic carbon – an overview of current methods, *TrAC*, 23 (2004) 10.
- [103] Bruna, R., Kendra, C., Groisman, E., Limitation of phosphate assimilation maintains cytoplasmic magnesium homeostasis, *PNAS*, 118 (2021).
- [104] Black, J. G., Black, L. J., John Wiley & Sons (Eds.), *Microbiology: Principles and Explorations* 8th edition, USA, 2012
- [105] Stautz, J., Hellmich, Y., Fuss, M.F., Silberberg, Molecular mechanisms for bacterial potassium homeostasis: bacterial potassium transport, *J. Mol. Biol.*, 433 (2021).
- [106] https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/bckgrnd_ion_mstr_lst_4_13_2010.pdf (pristup: 13.8.2021,)
- [107] Kahru, A., Põllumaa, L., Reiman, R., Rätsep, A., Microbiotests for the evaluation of the pollution from the oil shale industry, In *New Microbiotests for Routine Toxicity Testing and Biomonitoring*, US: Springer; 2000 (2012) 357–365.
- [108] Wilkes, R. A., Aristilde, L. Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges, *Journal of Applied Microbiology*, 123(2017), 582–593.
- [109] Hoffmann, D., Müller, R. H., 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Utilization by *Delftia acidovorans* MC1 at Alkaline pH and in the Presence of Dichlorprop is Improved by Introduction of the *tfdK* Gene, *Biodegradation*, 17 (2006), 263–273.
- [110] Urbanek, A. K., Rymowicz, W., Mirończuk, A. M., Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (2018), 7669–7678.
- [110] Cheng, C.-L., Garg, G., Coefficient of determination for multiple measurement error

models. *Journal of Multivariate Analysis*, 126 (2014), 137–152.