

Ispitivanje značajnih čimbenika za biorazgradnju polistirena i poli(vinil-klorida) primjenom bakterijske kulture *Bacillus licheniformis*

Host, Ornella

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:061077>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-22**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ornella Host

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ornella Host

ISPITIVANJE ZNAČAJNIH ČIMBENIKA ZA BIORAZGRADNJU POLISTIRENA I
POLI(VINIL-KLORIDA) PRIMJENOM BAKTERIJSKE KULTURE *Bacillus licheniformis*

DIPLOMSKI RAD

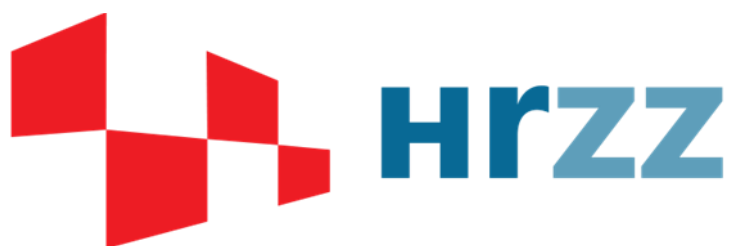
Mentor: doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić
2. doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović
3. dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, rujan 2022.



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

Zahvale

Prije svega, zahvaljujem se svojoj mentorici, doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić, na izboru teme, na predanosti i stručnoj pomoći, te pristupačnosti prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala dugujem i asistentici mag. ing. oecoing. Martini Miloloži na vođenju kroz eksperimentalni dio, na uloženom trudu, strpljenju, prenesenom znanju i ugodnoj atmosferi tijekom rada.

Hvala i svim ostalim zaposlenicima Zavoda za industrijsku ekologiju, na pomoći i pozitivnoj energiji, te spin-off tvrtki „Comprehensive Water Technology d.o.o.“ na omogućenom radu na laboratorijskim uređajima.

Za kraj, hvala mojoj obitelji, koja je uvijek bila bezujetna podrška i sigurna luka, te svim prijateljima i kolegama koji su na bilo koji način olakšali i uljepšali moje fakultetsko obrazovanje.

SAŽETAK

Rastuća količina plastičnog otpada postala je ozbiljan okolišni i društveni problem. U skorije vrijeme pojavio se veliki problem malih dimenzija, mikroplastika (MP). MP su plastične čestice manje od 5 mm, a njihova je prisutnost danas zabilježena u svim sastavnicama okoliša. Bioakumulacijom u hranidbenom lancu vrlo brzo se mogu naći i u čovjekovom organizmu, gdje imaju visok potencijal štetnog djelovanja. Spomenute male dimenzije ovih čestica čine njihovo uklanjanje iz okoliša gotovo nemogućim zadatkom, stoga je bitno što prije razviti inovativni pristup zbrinjavanja ove vrste otpada. Kao jedno od ekološki prihvatljivih rješenja tog problema, javlja se biorazgradnja plastike koristeći mikroorganizme i njihov enzimski potencijal, čime se nudi mogućnost razvoja tehnologije biološke obrade plastičnog otpada.

U ovom radu ispitani su se značajni čimbenici za proces biorazgradnje MP čestica, polistirena (PS) i poli(vinil-klorida) (PVC) primjenom bakterijske kulture *Bacillus licheniformis*. Eksperiment je osmišljen prema Taguchi dizajnu prema kojem je ispitano 7 čimbenika: temperatura, pH vrijednost, broj okretaja, veličina i koncentracija MP, optička gustoća i dodatak glukoze i to na 2 razine - minimalna i maksimalna vrijednost. Tijekom 30 dana praćena je promjena CFU vrijednosti, a u filtratu vodene faze određivane su vrijednosti ukupnog organskog ugljika (TOC) i anorganskog ugljika (IC). Nastali razgradni produkti i/ili otpušteni aditivi praćeni su LC-MS analizom, dok su strukturalne promjene okarakterizirane FTIR-ATR spektroskopijom. Nakon 30 dana provođenja procesa biorazgradnje ispitana je toksičnost filtrata na *Vibrio fischeri*. Značajni čimbenici određivani su statističkom analizom varijance (ANOVA) prema eksperimentalnim rezultatima.

Rezultati ovog eksperimenta pokazali su prema CFU analizi da je *B. licheniformis* koristio PS i PVC kao izvor supstrata pri određenim uvjetima. LC-MS analizom potvrđena je prisutnost novih spojeva u vodenoj fazi, a FTIR-ATR spektroskopijom potvrđene su promjene u materijalu, što su potvrde uspješne biorazgradnje. Kao značajni čimbenik ovog procesa biorazgradnje pokazala se optička gustoća. Dakle, *B. licheniformis* ima sposobnost biorazgradnje PS i PVC čestica, ali je od velike važnosti odabrati optimalne uvjete za najveću učinkovitost.

Ključne riječi: mikroplastika, polistiren, poli(vinil-klorid), biorazgradnja, značajni čimbenik, *B. licheniformis*

ABSTRACT

The growing amount of plastic waste has become a serious environmental and social issue. Recently, a major problem of small dimensions has emerged, microplastics (MP). MP are plastic particles smaller than 5 mm, and their presence is now found in all components of the environment. Due to bioaccumulation in the food chain, they can very quickly enter the human body, where they can have negative influence on human health. The aforementioned small size of these particles makes their removal from the environment almost impossible, which is why it is urgent to develop an innovative approach to the disposal of this type of waste. One of the environmentally friendly solutions to this problem is the biodegradation of plastics using microorganisms and their enzymatic potential, and it offers the possibility of developing a biological treatment technology for plastic waste.

In this work, the significant factors for the process of biodegradation of MP particles of polystyrene (PS) and polyvinyl chloride (PVC) were studied using the bacterial species *Bacillus licheniformis*. The experiment was designed according to Taguchi design in which 7 factors were tested: temperature, pH, rpm, size and concentration of MP, optical density and addition of glucose, at 2 levels - minimum and maximum. During 30 days, the change in CFU value was monitored, and the values of total organic carbon (TOC) and inorganic carbon (IC) were determined in the filtrate of the aqueous phase. The formed degradation products or released additives were monitored by LC-MS analysis, while the structural changes were characterized by FTIR-ATR spectroscopy. After 30 days of biodegradation, the toxicity of the filtrate to *Vibrio fischeri* was tested. Significant factors were determined by statistical analysis of variance (ANOVA) according to the experimental results.

According to CFU analysis, the results of this experiment showed that *B. licheniformis* used PS and PVC as substrate sources under certain conditions. The LC-MS analysis confirmed the presence of new compounds in the aqueous phase, and the FTIR-ATR spectroscopy confirmed changes in the material, confirming successful biodegradation. Optical density was found to be a significant factor in this biodegradation process. Thus, *B. licheniformis* is able to biodegrade PS and PVC particles, but it is of great importance to choose optimal conditions for the highest efficiency.

Key words: microplastics, polystyrene, poly(vinyl-chloride), biodegradation, significant factor, *B. licheniformis*

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	3
2.1. Sintetski polimerni spojevi	3
2.1.1 Plastika.....	4
2.1.2 Polistiren.....	6
2.1.3 Poli(vinil-klorid)	7
2.2. Mikroplastika	8
2.2.1 Primarna mikroplastika	10
2.2.2 Sekundarna mikroplastika	12
2.3. Prisutnost mikroplastike u okolišu	13
2.3.1 Mikroplastika u zraku.....	13
2.3.2 Mikroplastika u vodenom okolišu.....	14
2.3.3 Mikroplastika u sedimentu	17
2.3.4 Mikroplastika u tlu	18
2.4. Utjecaj mikroplastike na ekosustav i čovjeka	19
2.5. Razgradnja mikroplastike	24
2.5.1 Razgradnja plastike u okolišu	24
2.5.2 Biorazgradnja plastike	24
2.6. <i>Bacillus licheniformis</i>	29
3. Eksperimentalni dio	30
3.1. Materijali.....	30
3.1.1 Mikroplastika	30
3.1.2 Bakterijska kultura	30
3.1.3 Kemikalije.....	31
3.2. Instrumenti i oprema.....	33
3.3. Metode rada	36
3.3.1 Priprema uzoraka mikroplastike	36
3.3.2 Sterilizacija mikroplastike	36
3.3.3 Preduzgoj kulture <i>Bacillus licheniformis</i>	37

3.3.4	Pokus biorazgradnje prema Taguchi dizajnu	37
3.3.5	Postupak određivanja ekotoksičnosti pomoću bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	40
4.	Rezultati i rasprava	42
4.1.	Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje	42
4.1.1	Promjena CFU vrijednosti u pokusima s polistirenom	42
4.1.2	Promjena CFU vrijednosti u pokusima s poli(vinil-kloridom)	45
4.2.	Određivanje koncentracije ukupnog organskog ugljika (TOC) i anorganskog ugljika (IC)	47
4.2.1	Promjena koncentracije TOC i IC u pokusima s polistirenom	47
4.2.2	Promjena koncentracije TOC i IC u pokusima s poli(vinil-kloridom)	49
4.3.	LC-MS analiza	51
4.3.1	LC-MS analiza filtrata koji sadrže polistiren	51
4.3.2	LC-MS analiza filtrata koji sadrže poli(vinil-klorid)	55
4.4.	FTIR-ATR spektroskopija	58
4.4.1	FTIR/ATR analiza mikroplastike polistirena	59
4.4.2	FTIR-ATR spektroskopija mikroplastike poli(vinil-klorida)	61
4.5.	Ispitivanje ekotoksičnosti filtrata pomoću bakterijske vrste <i>Vibrio fischeri</i>	63
4.5.1	Ispitivanje ekotoksičnosti filtrata u pokusima s polistirenom	64
4.5.2	Ispitivanje ekotoksičnosti filtrata u pokusima s poli(vinil-kloridom)	66
4.6.	Određivanje značajnih čimbenika statističkom analizom varijance (ANOVA)	67
5.	Zaključak	70
6.	Popis simbola i kratica	72
7.	Literatura	74
	ŽIVOTOPIS	83

1. Uvod

Napredak društva i razvoj novih tehnologija direktno je vezan uz razvoj novih materijala. Tijekom povijesti i razvoja civilizacije uglavnom su korišteni prirodni materijali, međutim, želeći poboljšati njihova svojstva i karakteristike, čovjek je stvorio plastiku, materijal kakav izvorno u prirodi ne postoji.¹ Naziv *plastika* u ovom kontekstu se odnosi na grupu polimernih spojeva naziva poliplasti.² Danas proizvodi od plastike imaju širok spektar primjene u svakodnevnom životu te gotovo u svim granama industrije. Tehnološki proces proizvodnje plastičnih proizvoda polazi od monomera koji se dobivaju iz sirovina kao što su nafta, prirodni plin i ugljen. Procesom polimerizacije u reaktoru monomeri se slažu u lančane strukture te se dobivaju polimerni materijali poput polietilena, polipropilena, polistirena, poli(vinil-klorida) itd. Svojstva takvih materijala ovise o njihovoj strukturi na koju se može utjecati kontroliranom polimerizacijom.³

U počecima komercijalne proizvodnje plastike, svjetska proizvodnja kretala se tek oko nekoliko stotina tona godišnje. Razvojem različitih plastičnih materijala proširen je njihov spektar primjene, uzrokovan je progresivan pad troškova proizvodnje, pa je tako danas plastika jeftin i dostupan materijal.⁴ Plastični materijali, nekada enigma, danas se proizvode u količinama od oko 360 milijuna tona godišnje.⁵ Kao rezultat širokospektralne primjene, rezultati istraživanja u Americi pokazuju da je porastao maseni udio plastike u komunalnom otpadu, i to sa manje od 1% 1960.⁶ na 12,2% 2018. godine,⁷ što implicitno upućuje na potrebu pronalaska načina razgradnje plastičnog otpada.

Velik dio onečišćenja plastikom proizlazi iz neadekvatnog prikupljanja i odlaganja većih komada plastike poznatijih kao makroplastika, no u skorije vrijeme sve veću zabrinutost budi pojava sitnih čestica plastike zvanih - *mikroplastika*. Naime, osim što su veći odbačeni komadi plastike skloni fragmentaciji, u okoliš dospijevaju i sitne čestice plastike koje nastaju pri pranju sintetičke odjeće, trošenju guma te industrijski plastični peleti.⁸ Naziv mikroplastika predstavlja onečišćenje u obliku sitnih plastičnih čestica promjera od 5 mm pa sve do 1 μm .¹ Zbog svog sastava, strukture i velike specifične površine, takve čestice pogoduju adsorpciji organskih onečišćivala i otpuštanju aditiva koje sadrže te tako potencijalno mogu štetno djelovati na organizme.

Jedno od potencijalnih rješenja problema mikroplastike na ekološki prihvatljiv način jest biorazgradnja uz pomoć mikroorganizama iz tla i vode. Biorazgradnja je prirodan proces u kojem neku organsku tvar, jednostavnu ili složenu, mikroorganizmi (bakterije, plijesni, kvasci i njihovi enzimi) koriste kao izvor hrane i pritom ih prevode u jednostavnije spojeve:

vodu, CO₂, i mineralne soli.⁹ Okruženje u kojem se nalaze mikroplastika i bakterije određuje uvjete u kojima će se odvijati proces biorazgradnje, pa tako će se na površini tla odvijati u aerobnim uvjetima, djelomično aerobnim u tlu i kompostu, dok u sedimentu i odlagalištima otpada u anaerobnim.¹⁰ Biorazgradnja sintetskih polimera u velikoj mjeri ovisi o kemijskim i fizikalnim svojstvima materijala. Svojstva kao što su kemijska struktura, molekulska masa polimera, temperatura taljenja, stupanj kristalnosti, elastičnost, hidrofilnost i hidrofobnost površina, veličina površine, te abiotički i biotički faktori okoliša samo su neki od čimbenika koji utječu na razgradnju plastike.¹¹

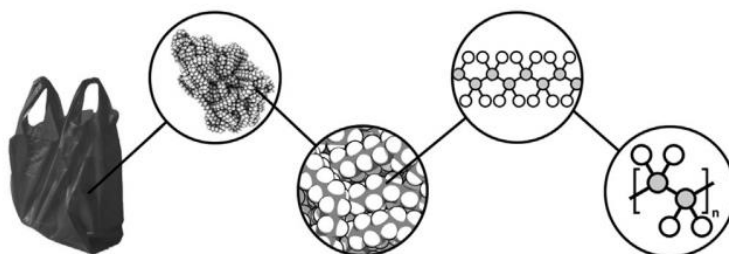
U ovom radu ispitani su se značajni čimbenici za proces biorazgradnje čestica mikroplastike polistirena i poli(vinil-klorida) primjenom bakterijske vrste *Bacillus licheniformis*. Eksperiment je osmišljen prema Taguchi dizajnu prema kojem je ispitano 7 čimbenika: temperatura, pH vrijednost, broj okretaja, veličina i koncentracija MP, optička gustoća i dodatak glukoze; i to na 2 razine - minimalna i maksimalna vrijednost.

2. Opći dio

2.1. Sintetski polimerni spojevi

Sintetski polimeri su organske tvari kojima se osnovni lanac molekule sastoji uglavnom od ugljikovih i vodikovih atoma. To su tvari građene od makromolekula koje su sastavljene od dijelova koji se ponavljaju, od tzv. monomernih jedinica (slika 2.1.). Osnovno obilježje polimera su velike molekulske mase (od nekoliko tisuća pa sve do nekoliko stotina tisuća g/mol), a svojstva i primjena ovise o veličini i strukturi molekulskih masa. Sintetski polimeri dobivaju se sintezom, industrijskim procesima iz derivata nafte ili prirodnog plina, stoga se još nazivaju i petrokemijski polimeri.¹² Postupak dobivanja je takav da se sirova nafta crpi i transportira do rafinerija, gdje se rafinira u naftu, propan i butan. Prirodni plin skupa s etanom također daje propan, iz kojeg se dobivaju kemijski poluproizvodi kao što su etilen, propilen, benzen i praksilen. Ti spojevi su glavne sirovine za izradu različitih tipova plastike, koja može biti naknadno modificirana dodavanjem aditiva i sredstava za punjenje.¹³

Sintetski polimerni spojevi se zbog svojih prilagodljivih značajki koriste za izradu materijala koji se primjenjuju u mnogim granama industrije. Iako je spektar primjene takvih materijala širok, može se reći da se najviše koriste za proizvodnju ambalaže gotovih proizvoda, zatim u elektronici i elektrotehnici, tekstilnoj industriji, građevini, prometu, medicini i kozmetičkoj industriji.¹



Slika 2.1. Polietilenska vrećica sastavljena od mnogo dugih polimernih lanaca, koji su u konačnici sastavljeni od ponavljajućih monomernih jedinica etilena.¹

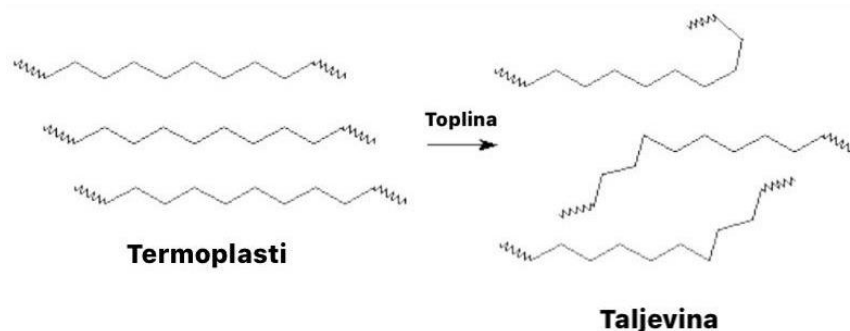
Sintetski polimeri dobivaju se reakcijama polimerizacije – to su kemijske reakcije u kojima se niskomolekularni spojevi, monomeri, međusobno povezuju kovalentnim kemijskim vezama i tvore makromolekule. Molekulska masa polimera određena je stupnjem polimerizacije, DP (eng. *degree of polymerization*), i molekulskom masom ponavljane jedinice.¹⁴ Reakcije polimerizacije mogu se podijeliti s obzirom na mehanizam rasta lanca i medij polimerizacije, pa se tako s obzirom na mehanizam rasta lanca razlikuje lančana polimerizacija (adicijski polimeri) i stupnjevita polimerizacija (kondenzacijski polimeri). Obzirom na medij u kojem se provodi, razlikuju se polimerizacije u masi i otopini,

suspenzijske polimerizacije, emulzijske polimerizacije, polimerizacije u plinskoj fazi te međupovršinske polikondenzacije. Konačni produkt procesa polimerizacije ovisi o uvjetima u kojima se ona provodi stoga kontrola procesa uključuje kontrolu temperature, koncentracije inicijatora i veličine stupnja polimerizacije.¹⁴

Sintetski polimerni spojevi dijele se na duromere (termosete), plastomere (termoplaste) i elastomere.² Prema tipu ponavljanih jedinica mogu biti homopolimeri i kopolimeri, a prema obliku lanca molekule ravnolančani, razgranati i umreženi polimeri. Konformacija molekula u prostoru čini tzv. makromolekularno klupko koje se može mijenjati promjenom temperature te djelovanjem mehaničke sile. Nadmolekulska struktura polimera može biti amorfna ili kristalna, a upravo struktura i morfologija polimernih materijala definira kakva će svojstva imati gotovi proizvod.¹⁵

2.1.1 Plastika

Plastomeri (termoplasti) ili jednostavnije *plastika* su polimerni materijali nastali adicijskom polimerizacijom, te po strukturi lanca makromolekule mogu biti linearne ili razgranate. Važno svojstvo koje posjeduju ovi materijali je to da se mogu višestruko taliti jer im se zagrijavanjem do temperature omekšavanja i taljenja ne mijenja kemijski sastav ni struktura, te se tako mogu lakše oblikovati ili reciklirati nakon uporabe (slika 2.2.).¹²



Slika 2.2. Prikaz termoplasta prije i nakon dovođenja topline.²

Svojstva polimera određena su monomernim sastavom i duljinom lanca polimera koja utječe na njihovo fizičko stanje. Dulji molekularni lanci omogućuju jače intermolekularne van der Waalsove sile između lanaca, što rezultira većom čvrstoćom i žilavošću polimera. Duljina lanca plastičnih polimera utječe i na talište istih.¹⁶

Kako je poznato da modifikacijom strukture polimera dobivamo različite vrste polimera sa svojevrsnim mehaničkim i termičkim svojstvima, tako je Organizacija međunarodne klasifikacije plastičnih proizvoda (eng. *Society of Plastics Industry*, SPI) plastiku svrstala u 7

skupina i to sljedećim redom: 1. poli(etilen-tereftalat) (PET), 2. polietilen visoke gustoće (HDPE), 3. poli(vinil-klorid) (PVC), 4. politilen niske gustoće (LDPE), 5. polipropilen (PP), 6. polistiren (PS) i 7. ostali polimerni materijali (BPA, polikarbonat...)¹⁷

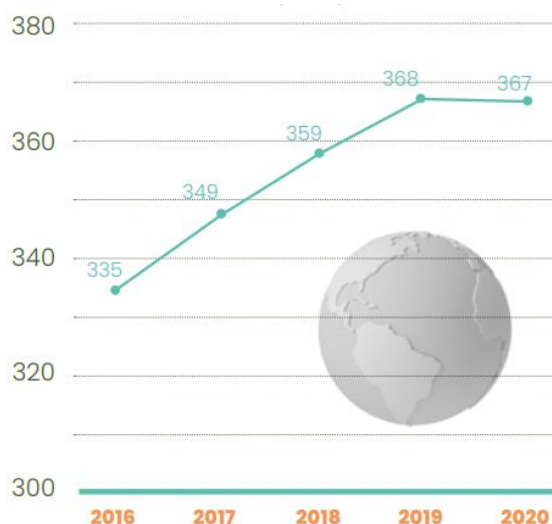
Svaki plastični proizvod na sebi ima oznaku trokuta unutar kojeg se nalazi broj koji određuje vrstu plastike. Oznake vrste plastike su regulirane i čine sastavni dio Priloga VI Pravilnika o ambalaži i otpadnoj ambalaži (NN 88/2015, 116/2017).¹⁸ Navedeni polimeri čine oko 92 % ukupno proizvedene plastike u svijetu. Najveće skupine u ukupnoj proizvodnji plastike osim vlakana su PE (36%), PP (21%) i PVC (12%), te PET, PU i PS (<10% svaka).¹⁹ U tablici 2.1. navedena su osnovna svojstva PS-a, PVC-a, PE-a, PP-a i PET-a.

Tablica 2.1. Fizikalna, kemijska i toplinska svojstva PE, PP, PVC, PS i PET-a.^{20,21}

<i>Polimer</i>	<i>Monomer</i>	<i>Gustoća</i> <i>[g/cm³]</i>	<i>Temperatura</i> <i>staklišta [°C]</i>	<i>Temperatura</i> <i>tališta [°C]</i>	<i>Temperatura</i> <i>raspada [°C]</i>
<i>PS</i>	-C ₆ H ₅ CH=CH ₂ -	1,04-1,06	+1,6	239-275	285
<i>PVC</i>	-CH ₂ -CH(Cl)-	1,37-1,53	+80	103-230	200
<i>PE</i>	-CH ₂ -CH ₂ -	0,90-0,98	-75	110-138	335
<i>PP</i>	-CH(CH ₃)-CH ₂ -	0,84-0,91	-20	120-176	328
<i>PET</i>	-O-C(=O)-C ₆ H ₅ - C(=O)-O-CH ₂ -CH ₃	1,33-1,46	+0,2	245-265	285-329

U počecima komercijalne proizvodnje plastike, svjetska proizvodnja kretala se tek oko nekoliko stotina tona godišnje.⁴ Plastični materijali tada su bili skupi i rijetki te su se koristili za proizvodnju tek manjih predmeta za svakodnevnu uporabu. S vremenom je otkriveno da se takvi materijali mogu modificirati pa su se tako razvile nove vrste sa jedinstvenim reološkim, termičkim, mehaničkim i električnim svojstvima. Razvojem različitih plastičnih materijala proširen je njihov spektar primjene, uzrokovan je progresivan pad troškova proizvodnje, pa je tako danas plastika jeftin i dostupan materijal.⁴

Plastični materijali, nekada enigma, danas se proizvode u količinama od oko 360 milijuna tona godišnje, što je prikazano slikom 2.3.⁵

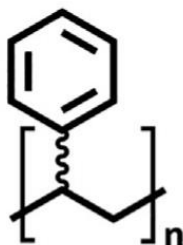


Slika 2.3. Svjetska proizvodnja plastike od 2016. do 2020. godine izražena u milijunima tona.⁵

Na temelju nedavnih proračuna²², 76% ukupno proizvedene plastike do sad tretira se kao otpad. Od toga se tek 9% reciklira, 12% se spaljuje, a 79% se odlaže na odlagalište ili ispušta u okoliš.

2.1.2 Polistiren

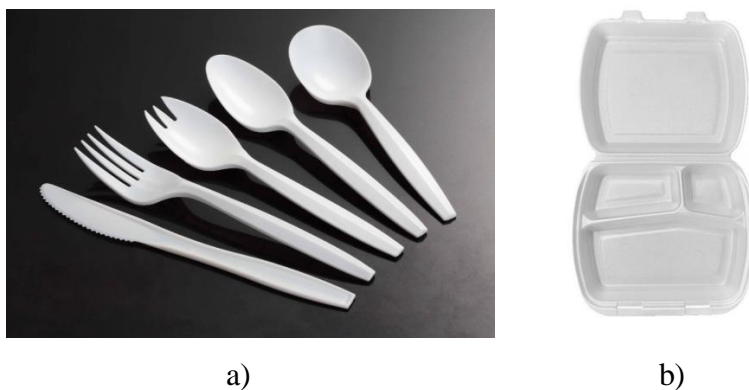
Polistiren (PS) je proziran, amorfan i nepolaran polimer dobiven adicijskom polimerizacijom monomera stirena (vinil-benzena)¹, slika 2.4.



Slika 2.4. Strukturna formula monomera polistirena.¹

PS je amorfne prirode i otapa se u velikom broju ugljikovodika sa sličnim parametrima topljivosti, poput benzena i toluena.²³ Odličan je električni izolator i rezistentan je na razrijeđene kiseline i baze. Upotreba je donekle limitirana zbog osjetljivosti na organska otapala te na temperature više od 373 K (100 °C).²⁰ Nije lako biorazgradiv stoga je njegova razgradnja u okolišu vrlo spora.²² Najvažnije su vrste obični, žilavi i pjenasti polistiren. Uglavnom se koristi za izradu ambalaža, zaštitnog pakiranja (za CD-e i DVD-e), poklopca, boca, jednokratnog pribora za jelo, igračkaka, medicinskih i higijenskih proizvoda, itd.²³ Neki od primjera prikazani su slikom 2.5. PS se može miješati sa hlapljivim organskim otapalima

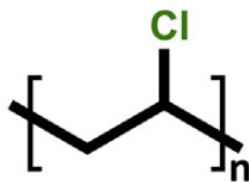
npr. pentanom. Zagrijavanjem takve smjese pentan se širi te nastaju sitne kuglice polimera nama poznatog kao stiropor. Daljnjim širenjem pentana kuglice se mogu ekspanirati do 40 puta od svoje početne veličine. Stiropor i slične varijacije polistirena niske su gustoće stoga plutaju na vodi i često se zbog toga nalaze na površinama vodenih ekosustava.²⁴ Uzevši u obzir njegove karakteristike, te usporedivši ih s drugim konkurentnim plastikama poput PP-a i PET-a, tržište PS-a ponegdje karakterizira smanjenje potražnje.²³



Slika 2.5. Jednokratni pribor za jelo od polistirena²⁵ (a), stiroporna kutija za hranu²⁶ (b).

2.1.3 Poli(vinil-klorid)

Poli(vinil-klorid) (PVC) je sintetski polimer (plastomer) koji je sastavljen od ponavljajućih vinilnih skupina kojima je jedan atom vodika zamijenjen sa atomom klora ($w(\text{Cl}) = 35\% \text{ ma}$) što mu daje visoku polarnost.²⁷ Strukturna formula prikazana je slikom 2.6. Dobiva se adicijskom polimerizacijom monomera vinil-klorida, najčešće u vodenoj suspenziji, ali i u masi, emulziji i otopini pri temperaturi od 50 – 70 °C.²⁸



Slika 2.6. Strukturna formula monomera poli(vinil-klorida).¹

PVC je bijeli, amorfni prah bez mirisa, kemijski otporan na kiseline, baze, alkohole i mineralna ulja. Stabilan je pri sobnoj temperaturi i tlaku. Pri temperaturi od 70 – 80 °C počinje razgradnja gdje se razvija plin klorovodične kiseline (HCl) i mijenja boju ka žutoj.²⁷ Svojstva PVC-a mogu se mijenjati ugradnjom drugih monomera tijekom polimerizacije, pa tako dobivamo materijale širokog raspona svojstava.²⁴ Zbog polarnosti klora lako se miješa sa različitim tvarima, pa se tako dodaju različiti plastifikatori, aditivi i modifikatori kako bi se

dobila poboljšana elastičnost, fleksibilnost, otpornost na udarce, rast mikroba i sl. Dvije najpoznatije varijacije PVC-a su kruti i savitljivi. PVC je dobrih izolacijskih svojstava, no zbog polarnosti molekule, ona su nešto lošija u odnosu na nepolarne polimere poput polietilena i polipropilena.²⁴ PVC je polimer u koji se najčešće dodaje najviše plastifikatora od svih sintetskih polimera. Kasnije tijekom biorazgradnje, ti plastifikatori mogu koristiti mikroorganizmima kao izvor ugljika.²²

Najvažnija primjena PVC-a je u građevinskoj industriji (oko 50 %) gdje se koristi u različitim fazama gradnje za izradu cijevi, okvira prozora i vrata, raznog namještaja, prevlaka za električne kablove, itd.²⁷ Veliku ulogu ima i u proizvodnji medicinskih i kliničkih plastičnih proizvoda (oko 25 %), ali je upitna sigurnost za korištenje u ovome području.²⁷ Osim toga, vrlo često se susreće u svakodnevnom životu, kao sastavni dio odjeće, umjetne kože, različitih ambalaža za prehrambene i druge proizvode. Glavni razlog je niska cijena, trajnost, jednostavnost obrade i mogućnost prilagodbe njegovih svojstava širokom spektru primjene.²⁷ Godišnja proizvodnja PVC-a iznosi oko 40 milijuna tona i očekuje se da će globalno tržište PVC-a nastaviti rasti oko 3 – 5 % godišnje.²⁷



(a)



(b)

Slika 2.7. PVC ambalaža za hranu²⁹ (a) i PVC cijevi²⁷ (b).

2.2. Mikroplastika

Zbog dostupnosti i široke uporabe, proizvodi od plastike zamijenili su prirodne materijale u svim segmentima ljudskog života. Dosadašnjim neadekvatnim načinom gospodarenja plastičnim otpadom, velike količine plastike odlagane su u okoliš. Međutim, veći plastični komadi često su skloni fragmentaciji što dovodi do stvaranja sitnijih čestica, poznatijih pod nazivom *mikroplastika* (kratica MP).³⁰ Naziv „*mikroplastika*“ prvi put se spominje u publikaciji iz 1968. godine koju je objavilo istraživački laboratorij za materijale Američkih zračnih snaga. Tada je pojam opisivao manje deformacije plastičnih materijala

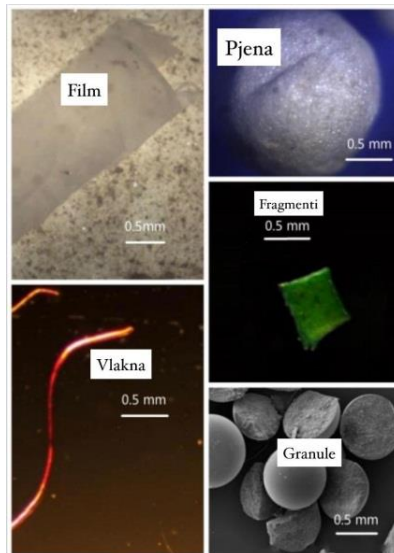
koje su se pojavljivale kao odgovor na vanjsko opterećenje.¹ Pojam mikroplastika je tek 2004. Upravljački odbor Nacionalne uprave za ocean i atmosferu (eng. *Steering Committee of the National Oceanic and Atmospheric Administration*, NOAA) definirao kao komadiće plastike manje od 5 mm duž najdulje dimenzije, te je usvojena i od strane znanstvene zajednice. Iste godine prihvaćena je i klasifikacija plastike prema veličini čestica³¹ koja je navedena u tablici 2.2.

Tablica 2.2. Kategorizacija plastike prema veličini čestica.³¹

<i>Kategorija</i>	<i>Kratika</i>	<i>Veličina čestica</i>
<i>Makroplastika</i>	MAP	≥ 25 mm
<i>Mezoplastika</i>	MEP	25 – 5 mm
<i>Mikroplastika</i>	MP	5 mm – 1 mm
<i>Mini-mikroplastika</i>	MMP	1 mm – 1 μ m
<i>Nanoplastika</i>	NP	> 1 μ m

Danas naziv mikroplastika predstavlja plastično onečišćenje različitih morfoloških oblika kao što su kuglice, fragmenti, vlakna ili filmovi veličine od 5 mm pa sve do 1 μ m,¹ kao što je prikazano slikom 2.8. i budi sve veću zabrinutost među znanstvenicima i ljudskoj populaciji općenito, obzirom da su sveprisutna onečišćivala u morskom, vodenom i kopnenom okolišu.³²

Izvori MP danas su mnogobrojni, međutim ipak se razlikuju dvije vrste s obzirom na prirodu nastanka: primarna i sekundarna mikroplastika. Primarnom MP se definiraju sve plastične čestice koje su izvorno proizvedene u toj veličini, te se kao takve nalaze u okolišu. Sekundarna MP nastaje raspadanjem, truenjem i razgradnjom većih komada plastike djelovanjem slane morske vode i turbulencija, UV zračenja te ostalih biotičkih i abiotičkih čimbenika.³³ Tako je još 1970. prvi put zabilježena prisutnost fragmenata plastike MP veličine u otvorenom moru,³⁴ a istraživanja iz proteklog desetljeća pokazuju da je ova vrsta onečišćenja danas široko rasprostranjena i sveprisutna u svim sastavnicama okoliša.³⁵ Štoviše, procjenjuje se da se dnevno po osobi u okoliš ispuštaju čak 2,4 mg MP, te također da je u obrađenim otpadnim vodama na području Europske unije otkrivena koncentracija MP u iznosu od čak 100 čestica po litri.³⁶

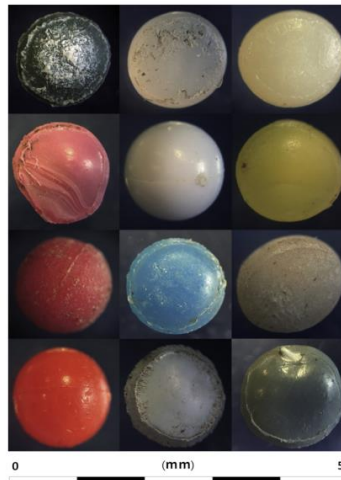


Slika 2.8. Morfološki oblici mikroplastike.³⁷

Rast proizvodnje plastičnog otpada iz industrije i kućanstava stvara ozbiljnu prijetnju okolišu i čovjeku. Iz tog razloga potrebno je razmotriti načine uklanjanja onečišćenja MP iz svih sastavnica okoliša, uključujući vodu, zrak i tlo.

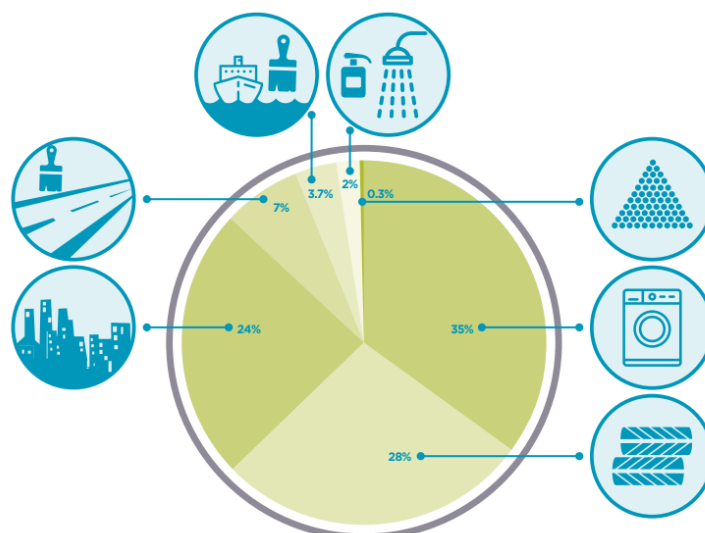
2.2.1 Primarna mikroplastika

Primarnom MP po definiciji se smatraju sve plastične čestice koje su izvorno proizvedene u tipičnom sferičnom obliku promjera manjeg od 5 mm što je prikazano slikom 2.9.¹ Takve mikrogranule često pronalaze primjenu u kozmetičkoj industriji, i to kao sastojak sredstava za čišćenje lica ili u pilinzima, gdje su zamijenile klasične prirodne sastojke poput kave, mljevene zobi i ljuske oraha jer su isti nerijetko bili grubi za kožu lica.¹ Sferične plastične čestice proizvode se i za procese zračnog pjeskarenja gdje su se pokazale kao bolji izbor od prethodno upotrebljivanog pijeska zbog svojih mehaničkih svojstava. U procesu pjeskarenja njima se skidaju stare boje i lakovi sa metalnih površina, primjerice strojeva, motora ili trupova brodova. Nakon što se višekratno koriste u takvim procesima, sitne čestice MP budu onečišćene teškim metalima (npr. kadmijem, olovom i kromom), a zatim se često nemarno ispuštaju direktno u more.³⁸



Slika 2.9. Primarna MP prikupljena iz okoliša.¹

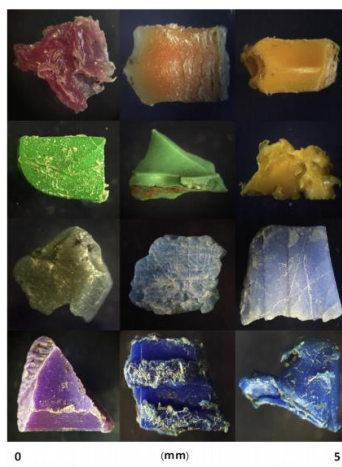
Jedan od ključnih primjera izvora MP u okolišu je industrija tekstila i odjeće, gdje se proizvode iznimno tanke sintetičke niti i vlakna. Prema Međunarodnom savezu za očuvanje prirode i prirodnih bogatstava, IUCN (eng. *International Union for Conservation of Nature*), pranje sintetičke odjeće pridonosi oko skoro 35% ukupnog ispuštanja MP u oceane, dok su ostali izvori prikazani slikom 2.10.³⁹ U istraživanju iz 2020. godine otkriveno je da se u jednom ciklusu pranja odjeće može ispustiti čak oko 3500 mikrovlakana po gramu teksila, odnosno oko 6 milijuna mikrovlakana po ciklusu pranja sa kapacitetom odjeće od 5 kg.⁴⁰ Pojedine čestice MP ponekad su toliko malih dimenzija da mogu proći kroz brojne filtre u sustavima za pročišćavanje vode, te tako mogu dospjeti u vodovodni sustav pitke vode.



Slika 2.10. Podjela izvora MP u oceanima: 35% pranje sintetičke odjeće, 28% trošenje sintetičkih guma, 24% gradska prašina, 7% sredstva za obilježavanje cesta, 3,7% brodski premazi, 2% iz proizvoda za osobnu njegu, 0,3% plastični peleti.³⁹

2.2.2 Sekundarna mikroplastika

Europska komisija procjenjuje da je između 69 - 81% MP u oceanima sekundarna MP.⁴¹ Sekundarnom MP definirani su fragmenti plastike koji su nehotice dobiveni kao rezultat degradacije većih komada plastike kao što su vrećice, boce, konoplja i mreže za ribolov. Djelovanjem bioloških, fizikalnih i kemijskih procesa tijekom određenog vremena smanjuje se strukturni integritet većih komada te dolazi do fragmentacije (slika 2.11.).¹



Slika 2.11. Sekundarna MP prikupljena iz okoliša.¹

U morskom vodenom okolišu tijekom procesa je takav da prvo UV zračenje uzrokuje oksidaciju polimernih matrica, nakon čega dolazi do pucanja kemijskih veza u materijalu što dovodi do nastajanja mikropukotina na većim komadima, a zatim mehaničko djelovanje valova i turbulencije u konačnici uzrokuju usitnjavanje.⁴² Taj proces se kontinuirano ponavlja te čestice postaju sve manje i manje, pa tako mogu doći do tzv. nano-razine. Trenutno najsitnija detektirana čestica MP u oceanu promjera je svega 1,6 μm .⁴³

Kao jedan od značajnijih izvora sekundarne MP-e navode se užadi i mreže za ribolov. Procjenjuje se da je oko 18% prisutne MP u vodi zapravo rezultat trušnja i degradacije plastičnih užadi i mreža. Jedna od činjenica je i da Europa doprinosi onečišćenju okoliša potencijalnom sekundarnom MP između 68 500 i 275 000 tona godišnje.⁴⁴

Osim što se veličina sekundarne MP smanjuje, nužno je spomenuti da njezina površina nije glatka i ujednačena kao što je to slučaj kod primarne MP. Upravo zbog svoje nepravilne površine, veća je i specifična, odnosno reakcijska površina čestica, koja ima daleko veću učinkovitost adsorpcije toksičnih tvari.⁴⁵ Prisutnost plastičnih čestica nano-dimenzija u morskom okolišu će u narednim godinama vjerojatno dobiti veći značaj, stoga znanstvenici već sada upućuju na utjecaj koji MP potencijalno ima na najniže slojeve prehranbene piramide u vodenom ekosustavu, a posljedično i na čovjeka.⁴⁵

2.3. Prisutnost mikroplastike u okolišu

2.3.1 Mikroplastika u zraku

Za razliku od onečišćenja morskih ekosustava, onečišćenje zraka MP-om nešto je slabije istraživano područje. Zbog niske gustoće i male veličine čestica, MP se može naći u zraku te se lako prenosi vjetrom. Uspoređujući MP iz mora koju ljudi većinom indirektno konzumiraju, onu iz zraka izravno i kontinuirano udišu stoga je rizik za zdravlje veći.⁴⁶

Posljednjih godina razvijene su dvije metode uzorkovanja zraka. Prva se odnosi na sakupljanje padajućih čestica u staklenu bocu kroz lijevak, a druga na propuhivanje zraka kroz filtere na kojima se zadržavaju čestice MP-a.⁴⁶ Primjenom ove dvije metode istraživane su koncentracije MP iz zraka u Parizu, Dungguanu, Yantai-u, Šangaju i Hamburgu, te na Pirenejima. Rezultati istraživanja u Parizu pokazali su da je koncentracija MP-a u zatvorenom prostoru veća od one na otvorenom, a razlog tome je što namještaj i odjeća kontinuirano proizvode MP čestice. Iz tablice 2.3. može se primijetiti kako su najčešći oblik prikupljene MP vlakna.

Tablica 2.3. Zastupljenost MP-a u nekim gradovima i regijama.⁴⁵

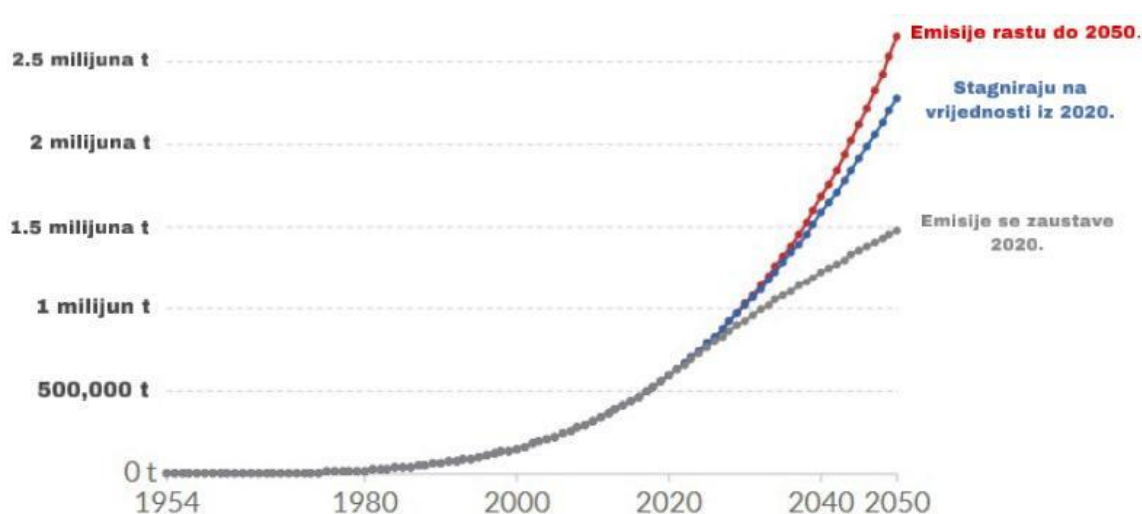
Lokacija	Prosječna koncentracija	Oblik	Veličina [μm]	Vrsta polimera
Pariz (2016)	110 ± 96 n/m ² /dan (urbana područja)	Vlakna	50-5000	/
	53 ± 38 n/m ² /dan (predgrađe), 29% MP			
Pariz (2017)	5,4 n/m ² (u zatvorenom)	Vlakna	50-3250	PA, PP
	0,9 n/m ² (na otvorenom), 33% MP			
Dongguan	36 ± 7 n/m ² /dan	Vlakna, fragmenti, filmovi, pjena (PS)	0-4200	PE, PP, PS
Yantai	400 n/m ² /dan	Vlakna, fragmenti, filmovi, pjena (PS)	50-3000	PET, PE, PVC, PS
Šangaj	1,42 ± 1,42 n/m ² /dan	Vlakna, fragmenti, granule	23-5000	PET, PE, PES, PAN
Hamburg	275 n/m ² /dan	Fragmenti, vlakna	63-5000	PE, PTFE, PET
Pireneji	365 n/m ² /dan	Vlakna, fragmenti, filmovi	50-2600	PS, PP, PE, PET

Istraživanje iz 2020. godine⁴⁰ pokazalo je da sintetička odjeća prilikom nošenja može ispustiti oko 350 mikrovlakana po gramu tkanine, što potencijalno objašnjava razlog povećanog broja MP u zraku u zatvorenom prostoru.

2.3.2 Mikroplastika u vodenom okolišu

MP se danas može pronaći diljem svijeta duž obala, na plažama i u morima i oceanima. Izvori MP-a u morskom okolišu su brojni i većinom su to izvori sa kopna (oko 80%), a ostali izvori uključuju obalni turizam, ribolov, brodove i brodogradilišta, akvakulturu i naftna postrojenja.⁴⁷ Sredozemno more jedno je od najugroženijih mjesta na svijetu po pitanju pronalaska plastike u moru.⁴⁸ Vrijednost varira tijekom godine, a vrhunac je tijekom ljetne sezone, kada veliki broja turista koji posjećuje ovo područje generira otpad, što čini oko 75% godišnje proizvodnje plastičnog otpada.⁴⁸

Istraživanja pokazuju da bi, ako se nastavi trend ispuštanja plastike u mora i oceane, do 2050. godine u moru moglo biti više plastike nego riba. Lebreton i sur.⁴⁹ su postavili model kojim se može kvantitativno procijeniti količina plastike na površini oceana i mora. Uzimajući u obzir kumulativni učinak nakupljanja proizvedene plastike od 1950. godine do danas, te relativno loše gospodarenje plastičnim otpadom ljske populacije, predviđene su sljedeće tri situacije: ako se emisije plastičnog otpada u okoliš zaustave 2020. godine, ako stagniraju na vrijednosti iz 2020. godine, i ako nastave rasti do 2050. Navedena tri scenarija prikazana su slikom 2.12.



Slika 2.12. MP na površini oceana izražena u milijunima tona od 1954. do 2050. godine, u tri moguća scenarija.⁴⁹

Velika većina MP-a koja se nalazi u vodenom okolišu zapravo je sekundarna MP, a potječe od jednokratnih pakiranja i proizvoda, trošenja guma i odbačenih većih komada plastike.⁵⁰ Manji, ali ne zanemarivi dio čini primarna MP, od koje oko 35% čine sintetička mikrovlakna koja u vodeni okoliš dospijevaju putem pranja sintetičke odjeće.⁴⁰ Zbog karakteristika kao što su niska gustoća i mala veličina čestica, plastika lako prelazi daleke

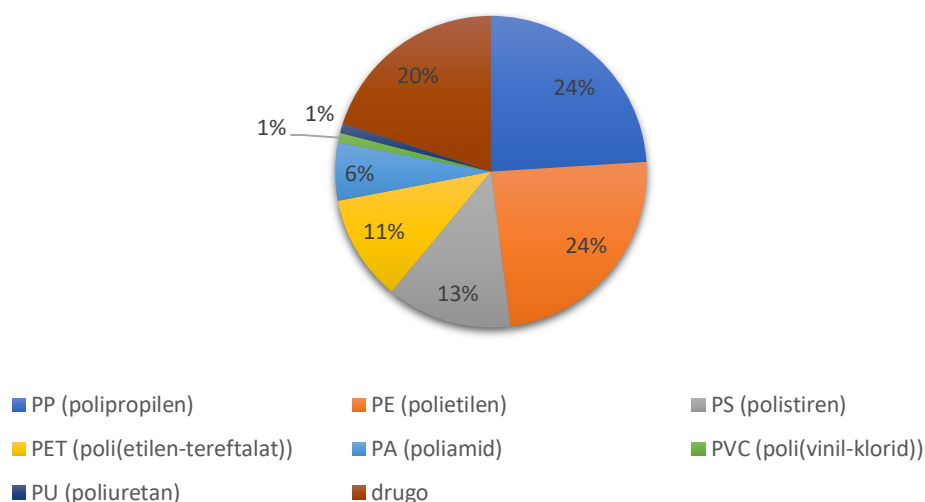
udaljenosti, u oceanima najčešće putem morskih struja. Pojava MP tako je zabilježena diljem svijeta u vodenim ekosustavima.⁵¹

U slatke vode MP često dospjeva preko poljoprivrednih površina ili izravnim odlaganjem otpada u okoliš, kao rezultat lošeg gospodarenja otpadom.⁵² Jedan od potencijalnih izvora MP u slatkim vodama su i otpadne vode i obrađene vode iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Male dimenzije omogućuju MP da prođe kroz filtere u sustavima za obradu otpadnih voda. Panno i sur.⁵³ su u nedavnom istraživanju istaknuli prisutnost MP u podzemnim vodama, koje su važan izvor pitke vode. Primjerice, krški vodonosnik u Illinoisu opskrbljuje čak 25% vode za piće u svijetu.⁵⁴ Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da 16 od 17 uzoraka podzemne vode uzorkovane u Illinoisu sadrže MP, u rasponu koncentracija od 6,4 – 16 čestica po litri.⁵⁵ Istraživanje na području Europe koje je provedeno 2019. godine, FTIR analizom uzoraka podzemne i pitke vode iz uređaja za pročišćavanje pitke vode u pet različitih područja Njemačke, pronađeno je onečišćenje MP-om u 62% uzoraka.⁵⁵ Yao i sur.⁵⁶ prikupili su rezultate brojnih istraživanja o onečišćenju većih svjetskih rijeka MP-om, te su izvjestili da su to uglavnom rijeke smještene u regijama u razvoju, dok se rijeka Yangtze pokazala kao najonečišćenija MP-om. U tablici 2.4. navedene su regije i lokacije gdje su istraživane prisutnosti MP i njihove vrijednosti u vodenim ekosustavima.

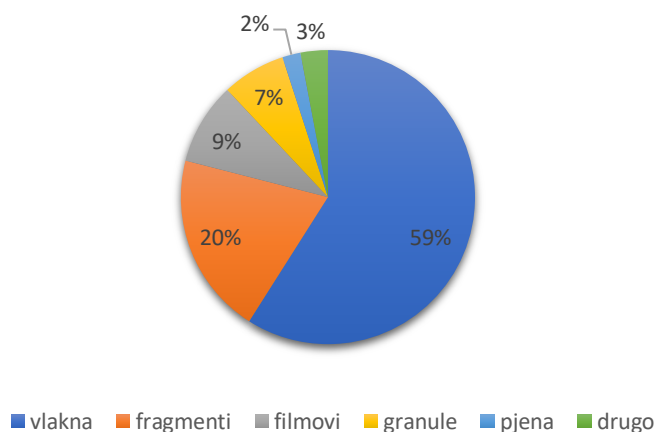
Tablica 2.4. Prisustvo MP u različitim vodenim ekosustavima.⁵¹

<i>Regija</i>	<i>Lokacija</i>	<i>Koncentracija MP (čestica/L)</i>	<i>Veličina čestica</i>
<i>Velika Britanija</i>	rijeka Kelvin	296,5	2,8 mm – 11 μm
<i>Kina</i>	jezero Poyang	226	<0,5 mm
<i>Europa</i>	Panonska nizina	524	<0,3 mm
<i>Belgija</i>	više Belgijskih rijeka	17	<5 mm
<i>Australija</i>	rijeka Bloukrans	240	500 μm
	rijeke Maribyrnong i Yarra	2867	<2 mm
<i>Kanada</i>	jezero Winnipeg	1933	<5 mm
	Kanadske rijeke i jezera	550	2 – 5 mm
<i>Indija</i>	jezero Vembanad	300	0,2 mm - 1 mm
<i>Nizozemska</i>	obrađene vode iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda	3,3	<5 mm
<i>Južnoafrička republika</i>	5 estuarija na području KwaZulu-Natal	320	<5 mm
<i>Brazil</i>	plaža Jurujuba	110	<5 mm
<i>Italija</i>	jezero Garda	17	<5 mm
<i>Švicarska</i>	više jezera	20	<5 mm; >5 mm
<i>SAD i Kanada</i>	jezero Huron	3499	<5 mm (peleti); >5 mm (fragmenti plastike)

Osim prisustva i količine pronađene MP u vodenom okolišu, provedena su i istraživanja karakterizacije pronađenih čestica MP,⁵⁷ što je grafički prikazano slikom 2.13. i 2.14. Pokazalo se da su sastavom to uglavnom polimeri polipropilen i polietilen, dok od morfoloških oblika prednjače vlakna.



Slika 2.13. Sastav MP-a pronađen u uzorcima slatke vode.⁵⁷



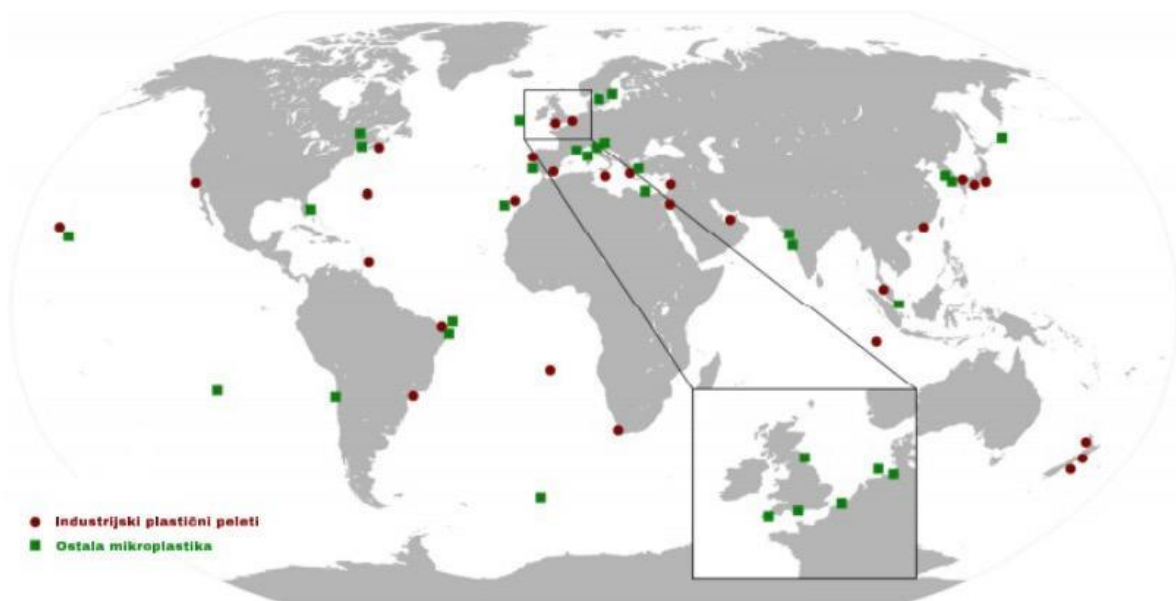
Slika 2.14. Morfološka podjela MP pronađene u uzorcima slatke vode.⁵⁷

2.3.3 Mikroplastika u sedimentu

Prema Programu Ujedinjenih naroda za okoliš (UNEP), 15 % morskoga otpada pluta na površini mora, 15 % lebdi u vodenom stupcu, dok se 70 % nalazi se na morskome dnu. Europska agencija za okoliš izvjestila je da se čestice MP zbog djelovanja morskih struja, vjetra i Zemljine rotacije nakupljaju i povezuju u vrtloge. Postoji pet takvih vrtloga: dva su u Atlantskom, dva u Tihom i jedan u Indijskom oceanu, a najveći je sjevernopacifički koji sadrži oko 3,5 milijuna tona smeća.⁵⁸

Prisutnost MP zabilježena je u sedimentima diljem svijeta, a pogotovo na plažama te u obalnim i plitkomorskim sedimentima. Neka od novijih istraživanja uključuju i duboko more, pa je tako zabilježena prisutnost MP u sedimentu na dubini od 5000 metara u iznosu do 2000 čestica MP po m². Istraživanja sedimenta pokazala su da je onečišćenje plastičnim otpadom u

svijetu sve veće; primjerice, u posljednjih 20 godina na plažama u Belgiji taloženje čestica MP-a povećalo se tri puta.⁵⁹ Kako je uspoređivanje rezultata raznih istraživanja MP u sedimentu bilo teško zbog nejednolikosti u prikupljanju uzoraka i izboru promatranog područja, tako je provedeno istraživanje⁵⁹ kojim se obuhvatilo 18 područja na 6 kontinenata i kojim je dokazan proporcionalan porast količine čestica MP s gustoćom naseljenosti. U tom istraživanju je velika koncentracija MP zabilježena na području Sjevernog mora, Sredozemnog mora, Azije te na gusto naseljenoj obali Brazila. Na slici 2.15. prikazani su rezultati prikupljenih istraživanja diljem svijeta.



Slika 2.15. Istraživanja koja obuhvaćaju MP u sedimentu (crvene točkice prikazuju prisutnost industrijskih plastičnih peleta, dok zeleni kvadratići prikazuju istraživanja ostale MP (krhotine, vlakna, mikrogranule))⁵⁹

2.3.4 Mikroplastika u tlu

Izvori MP-a u tlu za razliku od vodenog okoliša nešto su manje istraženi. Najčešći izvori MP su odlagališta otpada, aktivni mulj nakon obrade otpadnih voda, korištenje organskog gnojiva, ostatci filmova malča u poljoprivredi, trošenje guma i kočnica u cestovnom prometu, taloženje MP-a iz atmosfere itd.⁴⁷ Prisutnost MP u tlu narušava njegovu kvalitetu za uzgoj. Migracija MP u tlu, pogotovo u jako onečišćenim područjima kao što su ona tla gdje se primjenjuje obrađena otpadna voda te gdje ima ostataka filmova malča, predstavlja veliku opasnost za ekosustav. Biocenoza, sastav i poroznost tla, veličina pora i postojanje pukotina te agronomske prakse kao što su obrađivanje zemlje (oranje) i žetva

utječu na raspodjelu MP u tlu.⁴⁷ Biljke pridonose migraciji MP u vodoravnom i vertikalnom smjeru, na način da širenjem svojeg korijenja kroz pore ispunjene zrakom prenose MP u dublje dijelove, a na sličan način ju prenose i organizmi koji su prisutni u tlu (npr. crvi, ličinke i kralježnjaci).⁴⁷

U posljednjim istraživanjima procjenjuje se da se u Europi u tlo godišnje ispusti od 63 000 do 430 000 tona MP-a, dok za Sjevernu Ameriku taj broj iznosi 44 000 do 300 000. Rezultati nekolicine istraživanja MP-a u tlu obuhvaćeni su u tablici 2.5.⁴⁷

Tablica 2.5. Srednje koncentracije mikroplastike na različitim lokacijama u svijetu.⁴⁷

<i>Lokacija</i>	<i>Koncentracija (srednja vrijednost, mean)</i>
<i>Sydney, Australija, industrijsko područje</i>	4191 mg kg ⁻¹
<i>Švicarska, poplavna tla</i>	5 mg kg ⁻¹
<i>Campeche, Meksiko, gradski vrtovi</i>	0,87 čestica kg ⁻¹
<i>Šangaj, Kina, duboka zemlja</i>	62,5 čestica kg ⁻¹
<i>Šangaj, Kina, plitka zemlja</i>	78 čestica kg ⁻¹
<i>Yunnan, Kina, estuarij rijeke Cha</i>	26410 čestica kg ⁻¹
<i>Yunnan, Kina, Dangoujian</i>	48960 čestica kg ⁻¹
<i>Yunnan, Kina, Dunshang</i>	27310 čestica kg ⁻¹
<i>Yunnan, Kina, Anle</i>	53090 čestica kg ⁻¹
<i>Yunnan, Kina, Shangsuan</i>	22610 čestica kg ⁻¹

2.4. Utjecaj mikroplastike na ekosustav i čovjeka

Zbog svojih karakteristika kao što je otpornost na razgradnju i sveprisutnosti u okolišu, MP može prouzročiti dugoročne posljedice na ekosustav. MP čestice mogu često slučajno progutati mnoge životinje (najviše morske) koje ju zamijene za prirodni plijen, a lako ulazi u morske organizme i kroz usta ili škrge.⁴⁶ Indigestijom MP-a smanjuje se kvaliteta prehrane jedinke neke vrste i dolazi do deficita esencijalnih nutrijenata.⁶⁰ Prisutnost MP čestica otkrivena je u mnogim vrstama riba, škampa, kornjača, školjkaša, zooplanktona i kitova. Prisustvo MP u takvim organizmima može uzrokovati fizičke i fiziološke promjene uključujući reduciran rast i razvoj, oksidativni stres te reproduktivne komplikacije.⁴⁶ Osim što djeluje na same organizme na nižim trofičkim razinama, MP ima sposobnost bioakumulacije i biomagnifikacije u hranidbenom lancu. Tako konzumacijom hrane (životinjskog ili biljnog

porijekla), udisanjem ili ispijanjem onečišćene vode, MP dolazi u organizam čovjeka kao krajnjeg potrošača, gdje predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje zbog otpuštanja toksičnih tvari vezanih na njenu površinu.⁴⁷ Putevi MP iz okoliša do ljudskog organizma prikazani su slikom 2.16.



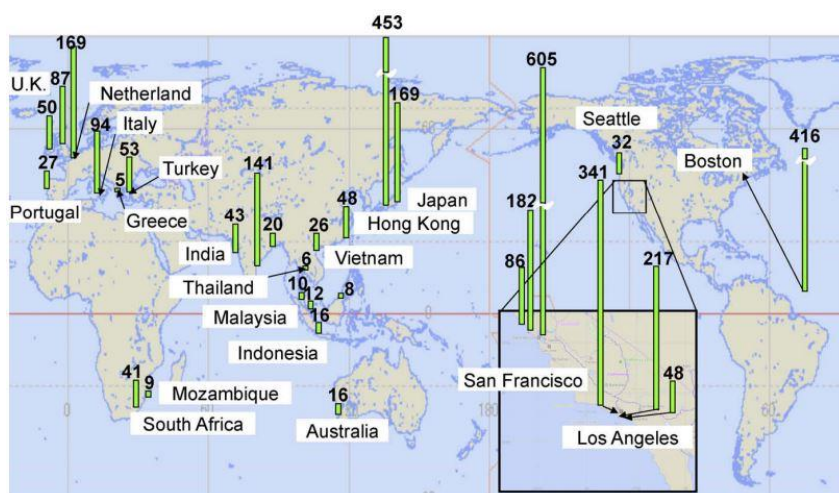
Slika 2.16. Grafički prikaz puta mikroplastike do ljudskog organizma.

Razlog zabrinutosti za ljudsko zdravlje je činjenica da neki spojevi koje MP sadrži mogu oponašati ljudske hormone. Tako je Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma (eng. *International Agency for the Research on Cancer – IARC*) klasificirala vinil-klorid, koji je monomer PVC-a, kao kancerogenu tvar za ljude.⁶¹ Monomer polistirena, stiren, IARC je klasificirala kao potencijalno kancerogenu tvar za ljude, jer izaziva tumore na mliječnim žlijezdama sisavaca i endokrini je disruptor.⁶² Bisfenol A (BPA), koji je ključan monomer u proizvodnji poliepoksida i polikarbonata, povezuje se sa prijevremenim porodom, usporenim rastom ploda i ostalim komplikacijama u trudnoći.⁶³

Aditivi koji se dodaju polimernim materijalima prilikom proizvodnje i prerade možda poboljšavaju karakteristike i svojstva gotovih proizvoda, ali nisu uvijek sigurni za ljudsko zdravlje. Aditivi su podijeljeni u nekoliko kategorija: plastifikatori ili omekšavala, maziva, punila, ojačavala, pjenila, antistatici, antioksidansi, stabilizatori, bojila i pigmenti, usporivači gorenja i makromolekularni modifikatori.⁶⁴ Najštetnijim aditivima smatraju se bromirani aditivi koji se koriste kao usporivači gorenja, te ftalatni plastifikatori i aditivi za toplinsku stabilizaciju na bazi olova.⁶⁵

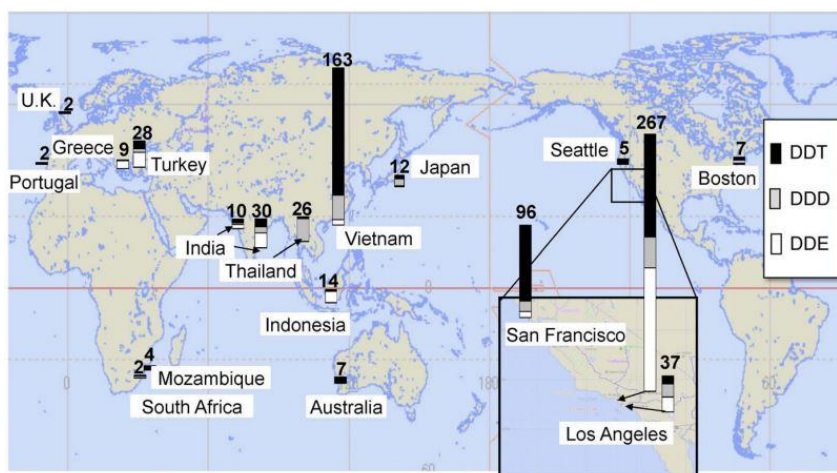
Plastifikatori su aditivi koji čine plastiku mekšom, fleksibilnijom i trajnijom, a primjer su ftalati, esteri ftalatne kiseline i alifatskih alkohola. Jedan od poznatijih plastifikatora jest poliklorirani bifenil (PCB) i spada u grupu sintetskih organskih spojeva. Primjena PCB-a bila je široka sredinom 20. stoljeća, međutim prepoznata je njena visoka toksičnost, postojanost

u okolišu (vrlo su stabilni spojevi) te sposobnost bioakumulacije i biomagnifikacije.⁶⁶ Zbog toga su 1979. godine zabranjeni u SAD-u odlukom kongresa te u ostatku svijeta Stockholmskom konvencijom o postojećim onečišćujućim organskim tvarima 2001. godine. Iako su davno zabranjeni i danas se prenose kroz hranidbeni lanac.⁶⁶ U sklopu „*International Pellet Watch*“ programa prikupljeni su uzorci plastičnih peleta sa 30 plaža u 17 država te su određivane koncentracije raznih organskih onečišćujućih tvari. Koncentracija PCB-a je najviša bila na obali Sjedinjenih Američkih Država, Japana i potom Europe, a nešto niža u tropskoj Aziji, južnoj Africi i Australiji, što je prikazano na slici 2.17.⁶⁷



Slika 2.17. Srednje koncentracije PCB-a u svijetu izražene u ng/g peleta.⁶⁷

Pored PCB-a važno je spomenuti i diklorodifeniltrikloroetan (DDT). DDT se koristio u Drugom svjetskom ratu kao pesticid kada se smatralo da nije štetan za ljudsko zdravlje, a korišten je kao sredstvo protiv uši i tifusa. Iako je kasnije je otkriveno njegovo mutageno i kancerogeno djelovanje, te je krajem 80-ih zabranjen u Europi, u nekim državama se i dalje koristi; primjerice u Africi protiv komaraca koji prenose malariju.⁶⁸ Zbog njegovog svojstva adsorpcije na MP i topljivosti u mastima pogodan je za bioakumulaciju u prehrambenom lancu pa se tako i danas može pronaći u ljudskom tijelu, stoga je važno pratiti njegovu količinu adsorbiranu na MP-u, slika 2.18.⁶⁷



Slika 2.18. Srednje koncentracije DDT-a u svijetu izražene u ng/ g peleta.⁶⁷

Još jedna vrsta posebno štetnih aditiva su usporivači gorenja. Oni se miješaju sa polimerima u udjelima i do 30% kako bi se spriječilo zapaljenje materijala u procesima. Zbog njihovog lakog oslobađanja u okoliš iz čestica MP, te kancerogenog, neurotoksičnog i reprotoksičnog djelovanja, 2004. godine su zabranjeni pentabromirani i oktabromirani, a 2008. i dekabromirani difenil-eteri u plastici.⁶⁹

Posljednje no ne i manje važno, treba ukazati na mogućnost interferencije nekih elemenata sa MP, te rezultirajuće učinke na određene organizme. Kod svih vrsta MP primijećen je sinergijski učinak u kombinaciji sa barem nekim spojem ili elementom. U tablici 2.6. prikazani su toksični učinci pojedinih kemijskih elemenata ili spojeva te doprinos MP u njihovom toksičnom djelovanju. Ta vrsta praćenja bitna je iz razloga što se, kako je već spomenuto, razni metali i spojevi lako mogu adsorbirati na površinu MP te tako ulaze u organizam. Neki od organizama na kojima je praćena toksičnost su *Daphnia magna*, europski brancin *Dicentrarchus labrax*, zebrafish *Danio rerio* i drugi.⁷⁰

Tablica 2.6. Učinci mikroplastike u kombinaciji s organskim i anorganskim onečišćivačima adsorbiranih na površini mikroplastike.⁷⁰

Mikroplastika	Onečišćivalo	Vrsta organizma	Toksični efekt	Kombinacijski efekt
PS / PS-COOH	Ni	<i>Daphnia magna</i>	Anomalije, uključujući imobilizaciju i promjene u morfologiji	Test akutne toksičnosti pokazuje antagonistički učinak PS na Ni toksičnost, dok PS-COOH ima sinergijsko djelovanje
Flourescentne crvene mikrosfere	Hg	Europski brancin <i>Dicentrarchus labrax</i>	Akumulacija metala u mozgu i mišićima, uzrokujući neurotoksičnost, oksidativni stres i promjene u aktivnosti enzima kod mladunčadi ove vrste	Pojačana akumulacija Hg u tkivima
PS	Cu	Zebrafish <i>Danio rerio</i>	Akumulacija u tkivu i toksičnost za crijeva i jetru.	Mikroplastika i prirodne organske tvari pospešuju akumulaciju i toksičnost Cu
PE	PCB	Pjeskulja <i>Arenicola marina (L)</i>	Bioakumulacija i utjecaj na aktivnost hranjenja	Mikroplastika doprinosi bioakumulaciji
PVC	Kiralni antidepressiv venlafaksin i njegovi metaboliti	Piškori <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Akumulira se u tkivu i jetri ribe	Mikroplastika je olakšala prijenos i bioakumulaciju u jetri te odgodila metabolizam kontaminanata
PE, PS, PVC i PVC800	Triklosan (TCS)	Mikroalge <i>Skeletonema costatum</i>	Toksičnost mikroplastike uzrokovana je primarno fizičkim oštećenjima, dok je triklosan inhibirao rast	Kombinacija pokazuje antagonizam što je veća koncentracija adsorbiranog triklosana
Flourescentna mikroplastika	Trajni organski zagađivači (POP)	<i>Artemia nauplii</i> i <i>Danio rerio</i>	Desorpcija u crijevima i prijenos u crijevni epitel i jetru	Mikroplastika služi za prijenos do viših trofičkih razina
PS	C-fenantren	<i>Daphnia magna</i>	Doprinosi bioakumulaciji ostataka derivata fenantrena i inhibira disipaciju i transformaciju fenantrena u mediju	Povećanjem kapaciteta adsorpcije povećava se i toksičnost kombinacije

2.5. Razgradnja mikroplastike

2.5.1 Razgradnja plastike u okolišu

Razgradnjom plastike smatra se svaka fizikalna ili kemijska promjena koja nastaje u polimernom materijalu kao rezultat djelovanja okolišnih faktora kao što su svjetlost, toplina, vlaga, kemijski uvjeti ili biološka aktivnost. Svi procesi koji uzrokuju promjene svojstava polimernih spojeva (najčešće smanjenje funkcionalnosti) i koji uzrokuju kidanje veza u makromolekulama polimera, kategorizirani su kao razgradnja.

Promjena mehaničkih, optičkih i električnih karakteristika, kao što su promjena boje ili pojava obezbojenja, manjih ili većih pukotina, erozije, separacije faza ili delaminacije, načini su očitovanja razgradnje plastike.¹⁰ Proces razgradnje plastike u okolišu tako se odvija se u 4 stupnja:

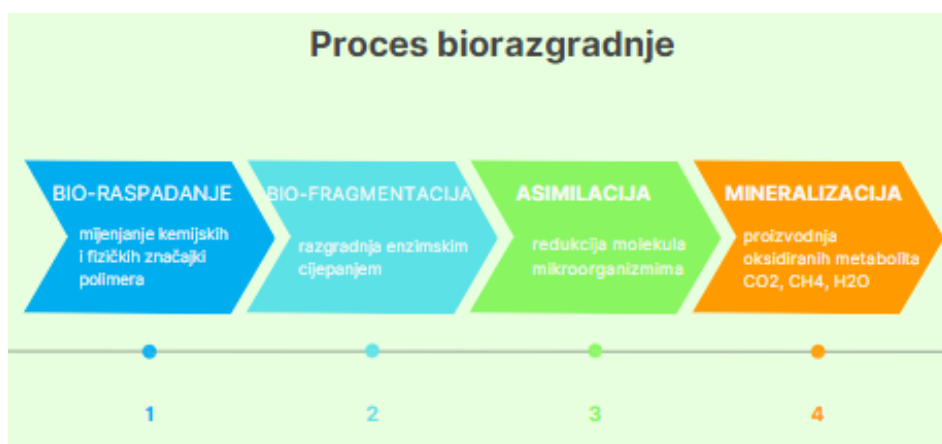
1. Fotorazgradnja
2. Termooksidativna razgradnja
3. Hidroliza
4. Biološka razgradnja.

Inicijalni proces je fotorazgradnja koja se odvija pomoću Sunčevog UV zračenja i priprema materijal za sljedeći proces, odnosno termooksidativnu razgradnju. Rezultat provedbe oba procesa je krhkost plastike, te raspadanje na sve manje fragmente dok se ne dosegne molekularna veličina. Mikroorganizmi tada mogu metabolizirati nastalu plastiku molekularne veličine koristeći ugljik iz lanaca polimera, koji onda ugrađuju u biomolekule ili ga oksidiraju u CO₂.¹⁰ Ovaj je proces poprilično spor, te za jednokratnu čašu od ekspaniranog PS traje 50 godina, za plastičnu jednokratnu PE čašu 400 godina, a za ribarski najlon za pecanje čak 600 godina. Najveći problem postojanosti plastike u oceanima je zbog ograničene dostupnosti kisika i zagrijavanja vode, te zbog slabog prodiranja UV zraka u veće dubine.⁷¹

2.5.2 Biorazgradnja plastike

Biorazgradnja je prirodan proces u kojem neku organsku tvar, jednostavnu ili složenu, mikroorganizmi (bakterije, gljivice, kvasci i njihovi enzimi) koriste kao izvor hrane i pritom ih prevode u jednostavnije spojeve, vodu, ugljikov (IV) oksid i mineralne soli. Proces razgradnje plastike uz pomoć mikroorganizama postiže se različitim enzimatskim aktivnostima koje uzrokuju cijepanje veza u makromolekulama.

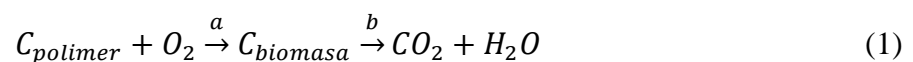
Prema *Ng i sur.*⁷² biorazgradiva plastika sadrži heteroatome O, N i S u glavnom lancu koji služe kao mete za hidrolitičke i enzimatske procese, nakon kojih se dobivaju produkti manje molekularne mase, te se može odviti asimilacija mikroorganizmima. Međutim, problem kod ne-biorazgradive plastike kao što su PP, PE, PS, PET i PVC je što je njihov osnovni lanac otporan na hidrolitičke i enzimatske procese, te ima hidrofobnu površinu i veliku molekulsku masu što otežava proces biorazgradnje.⁷³ Takve je polimere potrebno prethodno podvrgnuti kemijskoj, fizičkoj ili foto-degradaciji, kako bi se lakše i uspješnije odvila asimilacija mikroorganizmima. Proces biorazgradnje tako se odvija u četiri stupnja, što je shematski prikazano slikom 2.19.⁷⁴



Slika 2.19. Shematski prikaz procesa biorazgradnje.⁷⁴

Proces biorazgradnje organske tvari može se odvijati na zraku u aerobnim uvjetima, u sedimentu i odlagalištima otpada u anaerobnim, i u tlu i kompostu djelomično aerobnim i djelomično anaerobnim uvjetima.¹⁰ Produkti razgradnje polimera u anaerobnim uvjetima su organske kiseline, H₂O i plinovi (CH₄ i CO₂). U aerobnim uvjetima, biorazgradnja za produkte ima CO₂ i H₂O uz nastajanje stanične biomase. Slično, u sulfidogenim uvjetima su produkti biorazgradnje H₂S, CO₂ i H₂O.⁷⁴ Biomineralizacija je proces koji je vezan za biorazgradnju. Biološka mineralizacija odnosi se na pretvorbu organskih tvari (ugljika) u anorganske (mineral), a također se može odvijati u aerobnim ili anaerobnim uvjetima.⁷⁴

Prema *Chinaglia i sur.*⁷⁵ karakteristična reakcija biorazgradnje može se prikazati jednadžbom 1:



gdje je C_{polimer} ugljik iz polimera koji se u reakciji *a* konvertira u ugljik u biomasi, a koji se zatim reakcijom *b* konvertira u ugljikov dioksid i vodu. Prema tome, reakcija *a* može se nazvati biorazgradnjom, dok je reakcija *b* mineralizacija.

Budući da još uvijek nije razvijena egzaktna metoda za praćenje dobivanja biomase u eksperimentima biorazgradnje, doseg reakcije se može izračunati iz sljedeće jednadžbe (2):

$$\text{Biorazgradnja (\%)} = \frac{C_{\text{dobiven kao CO}_2}}{C_{\text{polimer}}} \cdot 100 \quad (2)$$

Biorazgradnja čvrstih materijala kao što je plastika, koji općenito nisu topljivi u vodi, je heterogena reakcija koja se odvija na granici faza čvrsto-kapljevito. Mikrobnim enzimima, koji su zaduženi za razgradnju, u tom slučaju su u kontaktu samo sa dostupnom površinom čvrstih čestica. Kako makromolekule u unutrašnjim dijelovima čestica nisu dostupne za reakciju, u njoj ni ne sudjeluju, stoga gornja jednadžba poprima novi oblik, jednadžba (3):

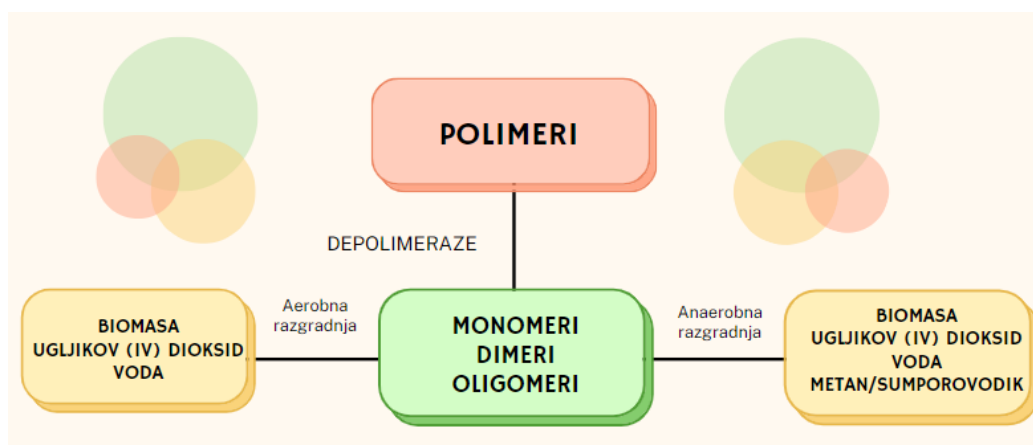
$$\text{Biorazgradnja (\%)} = \frac{C_{\text{dobiven kao CO}_2}}{\text{dostupni } C_{\text{polimer}}} \cdot 100 \quad (3)$$

Obzirom da dio polimera tijekom reakcije bude ukomponiran u mikrobiološku biomasu, humus i ostale prirodne produkte, proces biorazgradnje uglavnom ne doseže 100%.¹⁰

Bakterije i gljive široko su rasprostranjene grupe mikroorganizama koje imaju ključnu ulogu u razgradnji plastike u okolišu. Dominantna skupina mikroorganizama koji će se baviti razgradnjom određena je okolišnim uvjetima. Preferirani način rasta mikroorganizama je prijanjanje na površinu MP i naknadno stvaranje biofilma. U nekim slučajevima kada se na površini polimera formira biofilm, mikroorganizmi biofilma luče biosurfaktante koji pomažu u internalizaciji oligomera. U odsustvu biofilma dolazi do sekvencijalne razgradnje MP u uobičajene metabolite tzv. ciklusa trikarboksilne kiseline (TCA).⁷⁴

Ciklus trikarboksilne kiseline jedan je od glavnih metaboličkih načina za stvaranje energije iz većine organskih spojeva. U TCA ciklusu, acetil koenzim A (acetyl-CoA) djeluje kao ključni međuprodukt i koristi se u staničnim aktivnostima poput stvaranja CO₂ procesom oksidacije, formiranjem acetata ili u biosintezi. Stvaranje ATP-a koji osigurava energiju u stanicama mikroorganizama glavna je zadaća TCA ciklusa. Metabolizam i učinkovitost procesa proizvodnje energije, tj. razgradnje varira ovisno o mikrobiološkim uvjetima rasta. Tijekom procesa obrade otpadnih voda, reaktori s aktivnim muljem gube mnogo energije u obliku topline. U takvim uvjetima, potrošnja ATP-a je povećana i manje energije je dostupno za rast i metabolizam. Unatoč tome što se dio energije gubi, aerobni procesi su učinkovitiji od anaerobnih, obzirom da se zbog manjka kisika u anaerobnim uvjetima, koji služi kao elektron akceptor, dobiva manje energije.⁷⁴

Enzimi koji su zaduženi za biorazgradnju polimera kategoriziraju se u dvije vrste: izvanstanična i unutarstanična depolimeraza. Egzozoenzimi uglavnom su uključeni u razgradnju kompleksnih spojeva do monomera ili dimera, a kasnije ih mikroorganizmi iskorištavaju kao izvor ugljika i energije. Koncept biorazgradnje polimera prikazan je na slici 2.19.⁷⁴



Slika 2.19. Biorazgradnja polimera u aerobnim i anaerobnim uvjetima.⁷⁴

Biorazgradnja polimera, osim o vrsti mikroorganizama i uvjetima u kojim se provodi, u velikoj mjeri ovisi o kemijskim i fizikalnim svojstvima materijala. Kemijska struktura, molekulska masa polimera, temperatura taljenja, stupanj kristalnosti, elastičnost, hidrofilnost i hidrofobnost površina i veličina samo su neka od svojstava koji utječu na razgradnju plastike.⁷⁶ Primjerice, poliesteri s manje bočnih lanaca podložniji su bakterijskoj asimilaciji nego oni sa više bočnih lanaca.⁷⁶ Općenito vrijedi da se povećanjem molekulske mase polimernog spoja smanjuje mogućnost biološke razgradnje polimera,⁷⁶ zbog toga što se porastom molekulske mase naglo se smanjuje topljivost polimera, a bakterije mogu apsorbirati samo otopljene supstrate koji prolaze kroz njihovu membranu.¹⁰ Plastični materijali s nižom temperaturom taljenja imaju veću sposobnost biorazgradnje. Stupanj kristalnosti također je jedan od ključnih faktora za biorazgradnju jer enzimi koji provode razgradnju uglavnom napadaju amorfne dijelove polimera. Za razliku od kristala, u amorfnim dijelovima su molekule su rjeđe pakirane pa ih to čini pogodnijima za razgradnju. Površinske karakteristike poput hidrofilnosti i hidrofobnosti isto uvelike utječu na mehanizam biorazgradnje.⁷⁶ Hidrofobne plastike kao što je primjerice PE, nisu podložne bakteriološkoj razgradnji jer onemogućuju pristup hidrolitičkim enzimima. Dodatkom škroba pri polimerizaciji PE stvaraju se hidrofilni dijelovi koji omogućuju stvaranje kolonija bakterija, gdje je onda moguća hidrolitička razgradnja.⁷⁷

Uz navedena kemijska i fizikalna svojstva polimernih materijala, važnu ulogu pri biorazgradnji plastike imaju i karakteristike samih mikroorganizama. Rasprostranjenost i zastupljenost različitih vrsta u okolišu i optimalni uvjeti rasta značajni su za proces biološke razgradnje polimera. Uvjeti rasta koji diktiraju odvijanje biorazgradnje su pH, temperatura, sadržaj vlage u materijalu, dostupnost kisika, nutrijenata i sl.⁷⁶ Bioraznolikost i zastupljenost mikroorganizama koji razgrađuju polimere može varirati ovisno o okolišu (tlo, more, kompost, aktivni mulj i dr.), stoga je bitno ispitati vrste i distribuciju u različitim ekosustavima.⁷⁶ Na slici 2.20. prikazani su okolišni čimbenici i svojstva plastike koji utječu na njezinu razgradnju. Zbog uvjeta koji vladaju u različitim staništima, biorazgradivost polimera bi se trebala promatrati u okolišu za koji se očekuje da je prikladan za razgradnju; poput kompostišta ili odlagališta otpada.

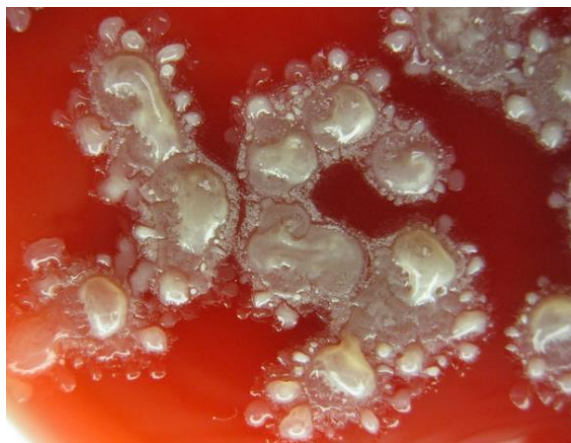


Slika 2.20. Faktori koji utječu na brzinu razgradnje plastike.²²

2.6. *Bacillus licheniformis*

Ova bakterija inicijalno je nazvana *Clostridium licheniforme* 1898. godine,⁷⁸ a 1901. dobiva naziv koji i danas nosi, *Bacillus licheniformis*.⁷⁹ *B. licheniformis* je štapićasta, fakultativno anaerobna, gram pozitivna bakterijska vrsta sa visokim potencijalom biotehnoške upotrebe.⁸⁰ Ima sposobnost stvaranja endospora i može se izolirati iz ptičjeg perja, tla i biljaka, a u posljednjem desetljeću i iz morskog okoliša. Spada u grupu mezofilnih bakterija sa optimalnom temperaturom rasta od 50 °C. Optimalna temperatura za sekreciju enzima je 37 °C. *B. licheniformis* ima različite morfologije kolonija, ali ipak prevladavaju oblici lišajeva, po čemu je i dobila ime. Kolonije su uglavnom krem boje kao što je prikazano slikom 21, dok u prisustvu željeza mogu poprimiti crvenu boju.⁸¹ Opće je poznato da ove bakterije mogu kontaminirati mliječne proizvode, uzrokuju kvarenje hranje, a posljedično mogu uzrokovati i trovanje hranom.

Upotreba je u širokom spektru područja, od kojih su neki akvakultura, agrokultura, prehrambena i farmaceutska industrija te biomedicina. U posljednje vrijeme osim najčešće primjene kao probiotika, *B. licheniformis* pronalazi primjenu na području bioflokulacije, biomineralizacije, bioremedijacije i proizvodnje biogoriva.⁸² *B. licheniformis* proizvodi enzim proteazu koji može opstati na visokim pH razinama. Proteaza je poželjan sastojak deterdženta za pranje rublja zbog svoje sposobnosti korištenja na niskim temperaturama, što sprječava skupljanje i blijeđenje boja rublja.⁸³



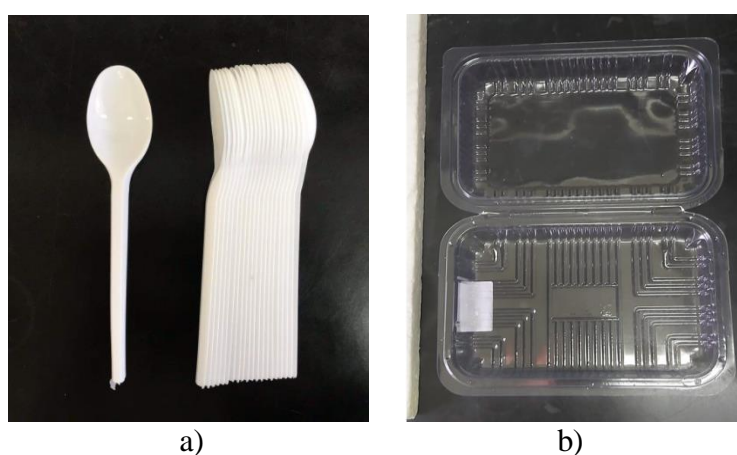
Slika 2.21. Fotografija bakterijske kolonije *B. licheniformis*.⁸⁴

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1 Mikroplastika

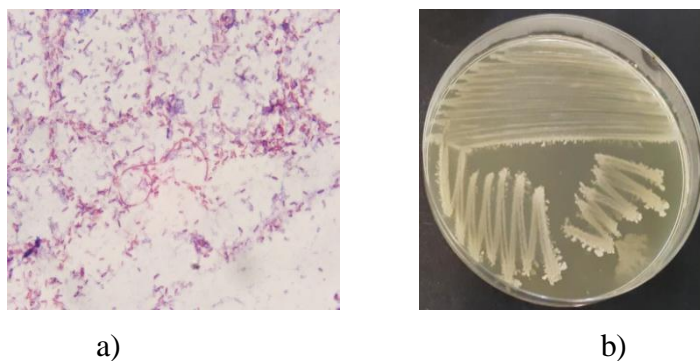
U ovom pokusu korištene su dvije vrste plastičnih materijala od kojih se izrađuju komercijalni proizvodi: polistiren (PS), čiji je uzorak MP-a dobiven usitnjavanjem jednokratnog pribora za jelo, te poli(vinil-klorid) (PVC) čiji je uzorak MP-a dobiven usitnjavanjem jednokratne posude za pohranu hrane (slika 3.1.). Oba materijala usitnjena su na dvije veličine čestica: 500-710 μm i $<300 \mu\text{m}$.



Slika 3.1. Jednokratni pribor za jelo od polistirena (a) i jednokratna posuda za pohranu hrane od poli(vinil-klorida) (b).

3.1.2 Bakterijska kultura

Za ovaj eksperiment koristila se bakterijska kultura *Bacillus licheniformis* koja je izolirana iz uzorka riječnog sedimenta. Čuva se na kosim hranjivim podlogama, a uzgojena je na hranjivom agaru. Na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije je pohranjena u zbirci mikroorganizama na Zavodu za industrijsku ekologiju. Na slici 3.2. prikazana je mikrofotografija trajnog preparata bakterije *Bacillus licheniformis* obojanog po Gramu i mikroskopirana svjetlosnim mikroskopom pri povećanju $P = 1000x$, te izrasla kultura na hranjivome agaru dobivena tehnikom iscrpljivanja pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 24 sata.



Slika 3.2. Mikrofotografija trajnog preparata bakterije *Bacillus licheniformis* (a), te izrasla kultura na hranjivome agaru (b).

3.1.3 Kemikalije

- Etanol

Prije početka ovog pokusa, za sterilizaciju čestica MP bilo je potrebno pripremiti 70 %-tnu vodenu otopinu etanola (C_2H_5OH , $w = 70\%$). U menzuri je odmjereno 730 mL etanola ($w = 96\%$, $M = 46,07\text{ g/mol}$, $\rho = 0,805\text{ kg/L}$), te je preneseno u tikvicu od 1000 mL i do oznake dopunjeno deioniziranom vodom.

- Mineralni medij

Za provođenje pokusa priređeno je 2 L mineralnog medija kemijskog sastava navedenog u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Sastav mineralnog medija prema Kyaw i sur.⁸⁵

<i>Tvar</i>	<i>Masa / gL⁻¹</i>
K_2HPO_4	12,5
KH_2PO_4	3,8
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1
5 mL elemenata u tragovima	
H_3BO_3	0,232
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,174
$FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$	0,116
$CoSO_4 \cdot 5H_2O$	0,096
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,022
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,008
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,008

Mineralni medij podijeljen je na dva volumena od 1 L, te je pH podešen na 6,0, odnosno 8,0 pomoću 1 M otopine HCl i KOH. Tako priređen medij potrebno je sterilizirati u autoklavu pri 121 °C i 1,1 atm te se koristi za pripravu suspenzije bakterijske kulture.

- Hranjivi agar

Za uzgoj bakterijske kulture i analizu ukupnog broja živih stanica bakterije (eng. *Colony forming units*, CFU) pripremljeno je 500 mL hranjivog agara (HA). Hranjivi agar se sastoji od 1,8 – 2,0 % agara i hranjivog bujona (eng. *nutrient broth*) koji se dodaje u količini koja je propisana uputama proizvođača. Tako je dodano ukupno 9,0 g agara i 4,0 g hranjivog bujona na 500 mL deionizirane vode. Kada se suhe komponente dodaju u deioniziranu vodu, ostavi se 15 min da nabubri te se kreće s laganim zagrijavanjem uz konstantno miješanje do vrenja. Takav pripravak zatim se sterilizira u autoklavu tijekom 20 minuta pri 121 °C i 1,1 atm.

- Fiziološka otopina

Osim mineralnog medija i hranjivog agara bilo je potrebno prirediti fiziološku otopinu, odnosno 0,9 %-tnu otopinu natrij klorida (NaCl) koja je korištena u svrhu priprave decimalnih razrjeđenja za određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija (CFU).

- Otopina za reuspenziju

Za provedbu testa ekotoksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* bilo je potrebno pripremiti suspenziju bakterije *Vibrio fischeri*, koja se radi uz pomoć otopine za reuspenziju koja prema HRN/EN ISO 11348-1:2000, te u 1L sadrži:

- 20 g NaCl
- 10 g glukoze
- 10 g rafinoze
- 0,2 g KH₂PO₄
- 0,2 g MgSO₄
- 0,5 g CaCl₂
- 0,5 mL glicerola

Otopina se prokuhala i ohladila. pH otopine mora iznositi između 6,8 i 7,2 te se po potrebi pH podešavao dodatkom NaOH ili HCl.

- 2%-tna otopina NaCl

Za test ekotoksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* bilo je potrebno pripremiti 2 %-tnu otopinu NaCl-a tako da se u odmjernu tikvicu od 100 mL odvagnulo 2 g NaCl, otopilo te dopunilo deioniziranom vodom do oznake. Također je pripremljena i čvrsta

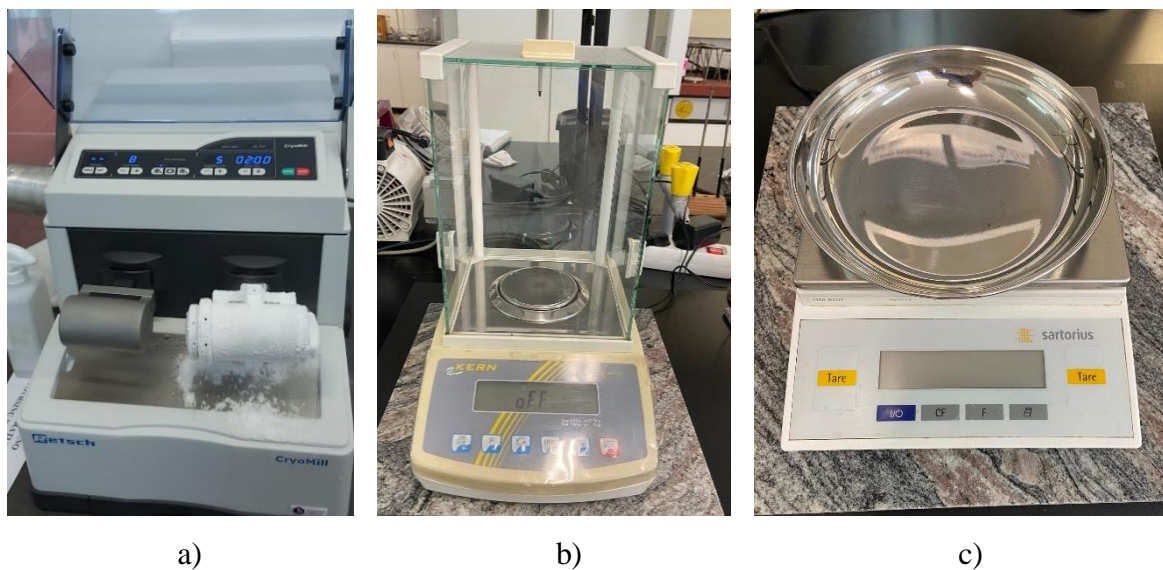
podloga na kojoj se uzgajala bakterijska kultura *Vibrio fischeri*, otapanjem sljedećih sastojaka u 1 L deionizirane vode, uz zagrijavanje do vrenja:

- 30 g NaCl
- 15 g agara
- 10 g glicerola
- 5 g CaCO₃
- 5 g peptona
- 3 g kvašćevog ekstrakta

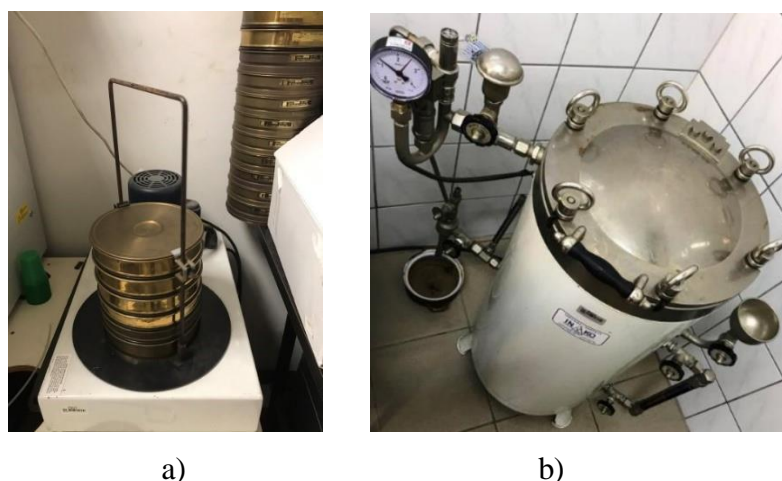
Podloga se sterilizirala 15 min u autoklavu na 121 °C. Kultura se održavala na temperaturi od 15 do 22 °C uz temperaturni optimum 18 °C. Pri navedenim uvjetima kultura je upotrebljiva najmanje dva, a najviše devet dana od precijepljivanja, optimalna luminiscencija i stabilnost bakterijske suspenzije je od drugog do četvrtog dana.

3.2. Instrumenti i oprema

Za pripremu uzoraka prije početka pokusa, te za provođenje istog, korišteni su uređaji i oprema koji se nalaze u laboratoriju i prostorijama Zavoda za industrijsku ekologiju, dok su se analize koje su služile za praćenje procesa biorazgradnje odvijale na uređajima koji se nalaze u *spin-off* tvrtki CWT (eng. *Compressive water technology*), na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilište u Zagrebu. Prije početka pokusa, za usitnjavanje početnog uzorka plastike koristio se kriomlin nadopunjen s tekućim dušikom (Retsch GmbH, CryoMill, Njemačka) te mehanička sita (W. S. Tyler RX-86-1 Sieve shaker, USA) za prosijavanje kako bi se dobio uzorak željene veličina čestica. Tehnička vaga Sartorius GM 6101 i analitička vaga KERN ALJ 220-4NM služile su za početnu odvagu uzorka te odvagu za pripravu otopina. Nakon sterilizacije MP korištena je boca za odsisavanje, metalni lijevak, vakuum pumpa te sterilni membranski filter papiri čija je veličina pora 0,45 µm. Koristile su se i četiri rotacijske tresilice Grant-bio PSU-10i tijekom 30 dana na dva temperaturna uvjeta: 15 i 25 °C. Termostat u kojem se provodio pokus pri 15 °C jest Liebherr, FKU 1800-20C/774, Njemačka. Za postizanje sterilnih uvjeta rada korišten je plamenik, a za steriliziranje opreme, hranjive podloge i mineralnog medija korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija. Navedeni uređaji i oprema prikazani su na slikama 3.3. i 3.4.

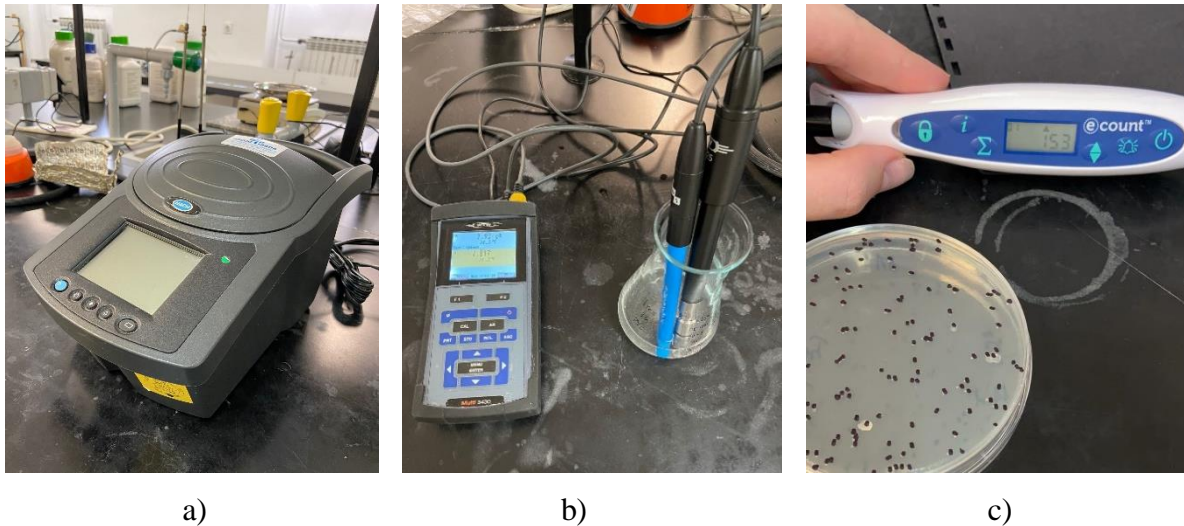


Slika 3.3. Kriomlin (a), analitička vaga (b), tehnička vaga (c).



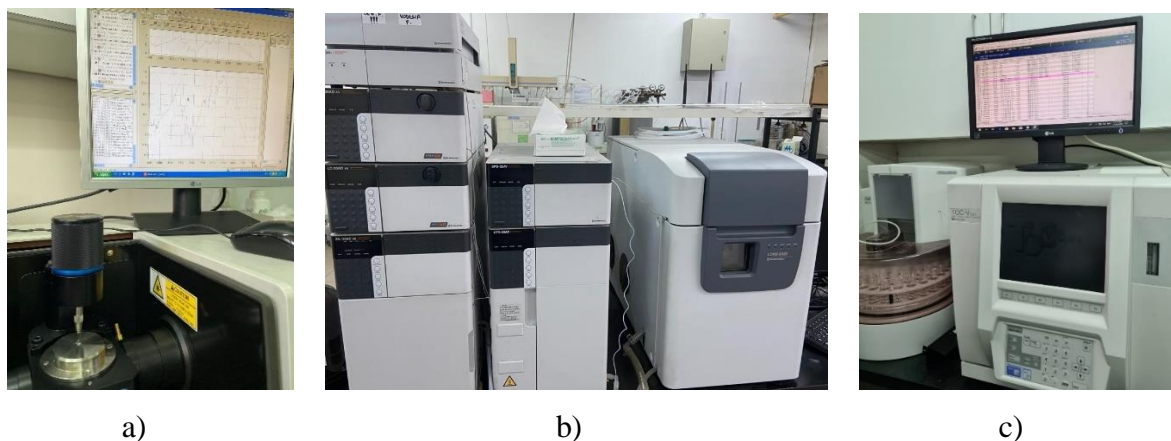
Slika 3.4. Mehanička sita (a), autoklav (b).

Za izuzimanje uzoraka korištene su plastične pipete od 1 mL (Pasteur pipete), staklene bočice od 25 mL sa čepom na navoj, plastične šprice te okrugli filteri CHROMAFIL® CA-45/25 s promjerom pora 0,45 μm . Optička gustoća očitavala se pri valnoj duljini $\lambda = 600 \text{ nm}$ na prijenosnom spektrofotometru Hach DR2400. Koncentracija otopljenog kisika, pH i temperatura mjereni su pomoću dviju elektroda i prijenosnog multimetra WTW Multi 3430. Za ukupan broj živih stanica bakterija (CFU) korištene su sterilne plastične petrijeve zdjelice i ručni brojač kolonija E-Count™. Navedeni uređaji prikazani su slikom 3.5.



Slika 3.5. spektrofotometar (a), prijenosni multimetar (b), brojač kolonija (c).

Za određivanje koncentracije ukupnog organskog ugljika (eng. *total organic carbon*, TOC) i anorganskog ugljika (eng. *inorganic carbon*, IC) u uzorcima korišten je TOC-V Shimadzu uređaj. Na kromatografu (HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU) masenom spektrometrijom analizirali su se sastoji uzoraka po raspodjelom po masi. Tijekom biorazgradnje pratila se i ekotoksičnost koja je ispitivana pomoću morske bakterijske vrste *Vibrio fischeri* na luminometru Dr. Lange LUMIStox 300, koji je povezan s termostatisanim inkubacijskim blokom Dr. Lange LUMIStherm u kojem se uzorci održavaju na temperaturi od 15 °C. Nakon provedene biorazgradnje, PS i PVC su okarakterizirani infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama na FTIR/ATR spektrometru Perkin Elmer, Spectrum One. Navedeni uređaji prikazani su na slikama 3.6. i 3.7.



Slika 3.6. Uređaji za praćenje biorazgradnje: a) FTIR-ATR spektrometar, b) LC-MS tekućinski kromatograf, c) TOC uređaj.



a)



b)

Slika 3.7. Uređaji za praćenje ekotoksičnosti: luminometar (a), termostatirani inkubacijski blok (b).

3.3. Metode rada

3.3.1 Priprema uzoraka mikroplastike

Plastični komercijalni proizvodi (jednokratni pribor za jelo i ambalaža) razrezani su škarama na manje komade. Takvi komadi dalje su usitnjavani u kriomlinu, gdje je kao medij za hlađenje korišten tekući dušik. Dobivene usitnjene čestice plastike osušene su na zraku pri sobnoj temperaturi te su prosijavane kroz mehanička sita različitih promjera otvora kako bi se dobila željena veličina čestica, a to je 500-710 μm te <300 μm .

3.3.2 Sterilizacija mikroplastike

Prije početka pokusa potrebno je sterilizirati uzorke MP kako bi bilo osigurano da će se biorazgradnja provoditi isključivo pomoću ispitivane bakterijske vrste *Bacillus licheniformis*. Sterilizacija MP provodila se u sterilnim tikvicama od 100 mL sa 70 %-tnim etanolom tijekom 10-15 min na tresilici pri 160 o/min na sobnoj temperaturi. Nakon toga čestice MP su odvojene metodom membranske filtracije pomoću sterilnog membranskog filter papira veličine pora 0,45 μm poštujući sterilne uvjete rada (slika 3.8.). Tijekom filtracije uzorci su ispirani sterilnom deioniziranom vodom kako bi se lakše uklonili sa stijenki tikvica te sakupili na filteru papiru. Kada su bili suhi, uzorci su prebačeni u sterilne Erlenmeyerove tikvice do 250 mL koristeći se pritom sterilnom metalnom špatulom i pincetom.



Slika 3.8. Prikaz odvajanja čestica mikroplastike nakon sterilizacije poštujući sterilnu tehniku rada.

3.3.3 *Preduzgoj kulture Bacillus licheniformis*

Preduzgoj kulture se provodi u svrhu prilagodbe iste na uvjete eksperimenta. To uključuje pripremljenu bakterijsku kulturu uzgojenu na hranjivom agaru pri 37 °C, koja se 24 h prije postavljanja pokusa koristi za pripravu 20 mL bakterijske suspenzije u mineralnom mediju (pH 6 i 8) u tikvicama od 100 mL. Ovim načinom preduzgoja, kultura se prilagodila na uvjete mineralnog medija, da nema supstrata, te se na taj način izbjegla lag faza rasta bakterijske kulture, odnosno postigla se log faza gdje je najintenzivnija produkcija enzima.

3.3.4 *Pokus biorazgradnje prema Taguchi dizajnu*

Tijekom ovog eksperimenta koji se odvijao 30 dana ispitivani su značajni čimbenici za proces biorazgradnje MP primjenom bakterijske kulture *Bacillus licheniformis*. Pokus je proveden prema Taguchi dizajnu koji daje kombinaciju čimbenika na određenim razinama. Za primjenu Taguchi metode potrebno je odrediti čimbenike i razine na kojima se oni ispituju. U ovom pokusu odlučeno je da će se ispitati sljedećih 7 čimbenika: pH-vrijednost, temperatura, broj okretaja, veličina čestica MP, koncentracija MP, optička gustoća i dodatak glukoze, na dvije razine – minimalna i maksimalna vrijednost. Popis čimbenika na dvije razine prikazan je u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Pregled ispitivanih čimbenika na dvije razine prema Taguchi dizajnu.

	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	γ (MP) / mg/L	10	1000
E	broj okretaja / o/min	100	200
F	OG / -	0,1	0,5
G	γ (glukoza) / mg/L	0	100

Prema programu dobiva se matrica koja predstavlja broj tikvica i kombinaciju čimbenika na dvije razine za svaku tikvicu. Sastav svake tikvice prikazan je u tablici 3.3.

Tablica 3.3. Sastav pojedine tikvice dobiven prema L_8 ortogonalnoj matrici iz programa prema Taguchi dizajnu.

pokus	MP	$T / ^\circ\text{C}$	broj okretaja / -	pH-vrijednost / -	veličina čestica / μm	γ (MP) / mg/L	OG / -	γ (glukoza) / mg/L
P-1	PS	15	100	8	500-710	1000	0,5	0
P-2	PVC	15	100	8	500-710	1000	0,5	0
P-3	PS	15	100	6	<300	10	0,1	0
P-4	PVC	15	100	6	<300	10	0,1	0
P-5	PS	15	200	8	500-710	10	0,1	100
P-6	PVC	15	200	8	500-710	10	0,1	100
P-7	PVC	15	200	6	<300	1000	0,5	100
P-8	PS	15	200	6	<300	1000	0,5	100
P-9	PS	25	100	6	500-710	10	0,5	100
P-10	PVC	25	100	6	500-710	10	0,5	100
P-11	PS	25	100	8	<300	1000	0,1	100
P-12	PVC	25	100	8	<300	1000	0,1	100
P-13	PS	25	200	6	500-710	1000	0,1	0
P-14	PVC	25	200	8	<300	10	0,5	0
P-15	PS	25	200	8	<300	10	0,5	0
P-16	PVC	25	200	6	500-710	1000	0,1	0

Iz tablice 3.8. vidljivo je da se pokus sastojao od 16 tikvica različitog sastava. Svaka tikvica sadržavala je sterilizirane čestice MP, mineralni medij, te suspenziju bakterije *Bacillus licheniformis*. Radni volumen pojedine tikvice iznosio je 100 mL. Pored tikvica u kojima se pratio proces biorazgradnje, postavljene su i 4 tikvice bez čestica MP kao slijepe probe. Ukupno 20 tikvica postavljeno je na 4 tresilice na dva temperaturna uvjeta, što je prikazano slikom 3.9.



Slika 3.9. Prikaz provedbe pokusa na tresilici u termostatu pri 15°C.

Na početku pokusa izmjerene su početne vrijednosti praćenih parametara koje su prikazane u tablici 3.4., a tijekom pokusa uzorci su se izuzimali za naknadne analize 5 puta i to: 3., 7., 14., 21. i 30. dan, što je prikazano slikom 3.10. Izuzimalo se po 0,5 mL uzorka iz svake tikvice pomoću sterilne pipete metodom usnog pipetiranja. Nakon izuzimanja, uzorci su filtrirani kroz sterilne membranske filtere širine pora 0,45 μm kako bi se uklonili mikroorganizmi i eventualne krute čestice iz vodene faze. To se činilo da bi se izbjeglo stvaranje začepjenja u uređajima za analize. Početnih 0,5 mL uzorka razrijeđeno je na 10 mL dodatkom 9,5 mL deionizirane vode.

Tablica 3.4. Početne vrijednosti parametara za pokuse s PS-om i PVC-om.

MP	OG ₀ / -	γ_0 (MP) / mg/L	pH-vrijednost / -	T ₀ / °C	log CFU ₀ / -	γ (TOC ₀) / mg/L	γ (IC ₀) / mg/L
PS	0,1	8,06	6,03	26,20	7,26	6,14	3,38
	0,5	8,10	7,83	25,30	8,21	9,89	2,57
PVC	0,1	8,06	6,03	26,20	7,26	6,14	3,38
	0,5	8,10	7,83	25,30	8,21	9,89	2,57



Slika 3.10. Postava aparature za izuzimanje uzoraka poštujući sterilnu tehniku rada.

3.3.5 Postupak određivanja ekotoksičnosti pomoću bakterije *Vibrio fischeri*

Ovom metodom ispitana je aerobna ekotoksičnost filtrata svakog pokusa, nakon 30 dana provođenja biorazgradnje MP uz *Bacillus licheniformis*. Ova metoda u skladu je s normom HRN/EN ISO 11348-1:2000, Kakvoća vode - Određivanje inhibitornog učinka vodenih uzoraka na emisiju svjetla bakterije *Vibrio fischeri* (Test sa svjetlećim bakterijama). Metoda se temelji na procjeni smanjenja fiziološke aktivnosti čiste kulture bakterija *Vibrio fischeri* u prisutnosti toksičnih tvari. Kao mjera fiziološke aktivnosti koristilo se prirodno svojstvo luminiscencije ove vrste bakterija. Suspendirana kultura bakterijskih stanica izložila se rastućem nizu koncentracija toksične tvari, pri čemu su svi ostali parametri u testu održavani konstantnima. Mjerio se intenzitet luminiscencije na početku testa i nakon 30 min. Instrument očitava dva rezultata: EC₂₀ i EC₅₀ koji predstavljaju volumni udio (%) uzorka pri kojemu dolazi do 20%-tnog, odnosno 50%-tnog pada luminiscencije.

Postupak kreće s termostatiranjem kiveta u termostatnom bloku na 15 °C barem 15 minuta prije početka izvođenja testa. Svaki put prije postavljanja testa provodio se test valjanosti bakterijske kulture tako da se u referentnu kivetu stavilo 0,5 mL 2 % otopine NaCl-a i 0,5 mL inokuluma, dok se u test kivetu stavi 0,5 mL otopine kalij dikromata (K₂Cr₂O₇). Inhibicija referentne otopine trebala je biti između 20 i 80 %. Nakon provedenog testa valjanosti bakterijske kulture priredio se linearni niz razrjeđenja početnog uzorka filtrata, dok je posljednja kiveta u nizu bila ispunjena otopinom NaCl-a. Redosljedom s lijeva na desno po uputama instrumenta, očitavala se izmjerena luminiscencija pojedinog uzorka na luminometru, što je prikazano na slici 3.11.



Slika 3.11. Postava aparature za provođenje ispitivanja ekotoksičnosti na *Vibrio fischeri*.

4. Rezultati i rasprava

Masovna proizvodnja plastičnih proizvoda i nepravilno rukovanje plastičnim otpadom dovelo je ljudsko društvo do problema prekomjernog onečišćenja okoliša. Karakteristike sintetskih polimernih materijala, kao što su izdržljivost i otpornost na razgradnju, sprječavaju brzo uklanjanje takve vrste otpada iz prirode. Otkriće pojave MP u okolišu dodatno je zabrinulo znanstvenu zajednicu i javnost. Zbog svojih malih dimenzija čestica, uklanjanje MP iz okoliša vrlo je težak zadatak. Kao jedna od mogućih metoda za rješenje tog problema javlja se biorazgradnja različitim mikroorganizmima koja se temelji na iskorištavanju enzimskog potencijala i metaboličkim aktivnostima mikroba.

U ovom radu predstavljani su provedeni pokusi biorazgradnje MP čestica PS-a i PVC-a primjenom Gram pozitivne bakterije *Bacillus licheniformis* tijekom 30 dana. Ispitivao se utjecaj odabranih čimbenika koji mogu imati utjecaj na proces biorazgradnje: temperatura, pH-vrijednost, veličina i koncentracija čestica, broj okretaja tresilice, optička gustoća suspenzije i dodatak glukoze i to pri minimalnoj i maksimalnoj vrijednosti. Izuzeti uzorci tijekom provedbe procesa biorazgradnje podvrgnuti su sljedećim analizama: broj stanica izraslih bakterijskih kolonija (CFU), TOC analiza, LC-MS analiza i FTIR spektroskopija. Po završetku pokusa ispitana je ekotoksičnost filtrata pomoću bakterije *Vibrio fischeri*. Značajni čimbenici procesa biorazgradnje naknadno su utvrđeni statističkom obradom u programu „Design Expert“ prema Taguchi metodi.

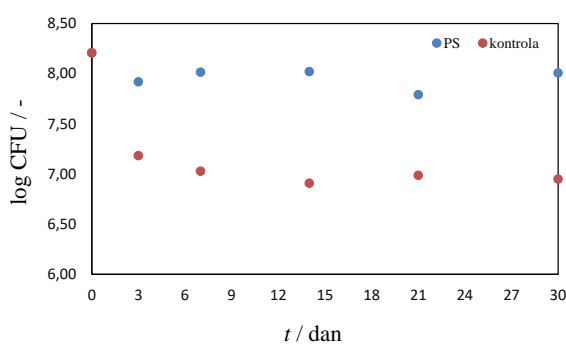
4.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje

4.1.1 Promjena CFU vrijednosti u pokusima s polistirenom

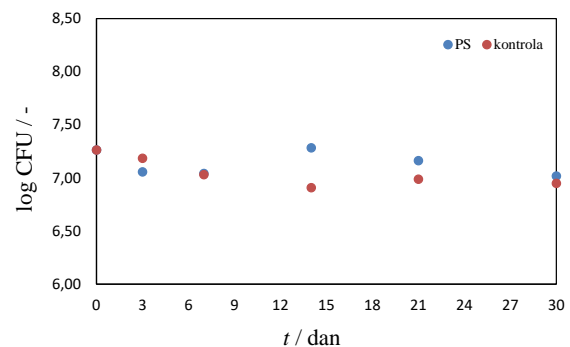
CFU vrijednost se koristi za mikrobiološku dijagnostiku nekog sustava, a predstavlja broj izraslih bakterijskih kolonija izraženih po mililitru.⁸⁶ Na slikama 4.1. grafički su prikazane promjene CFU vrijednosti tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PS-a uz *Bacillus licheniformis*.

U 0. danu analiza CFU vrijednosti provedena je za dvije suspenzije različitog pH, 6 i 8, te je broj izraslih kolonija iznosio $1,8 \times 10^7$ st/mL i $1,6 \times 10^8$ st/mL. Na slikama 4.1.d) i 4.1.e) prikazani su pokusi P-8 i P-9 (oba su pH = 6) gdje je u 3. danu došlo je do porasta vrijednosti CFU s $1,8 \times 10^7$ na $8,7 \times 10^7$ st/mL i $9,5 \times 10^7$ st/mL. Tu se bakterijsko razmnožavanje može protumačiti kao uspješan preduzgoj bakterijske vrste, stoga nije bilo potrebno vrijeme da se bakterija prilagodi na novonastale uvjete. Za razliku od prethodno navedena dva pokusa, u pokusima P-5 i P-11 koji su prikazani slikama 4.1.c) i 4.1.f) nakon postavljanja došlo je do značajnijeg pada CFU vrijednosti. Međutim, tijekom vremena ta vrijednost uglavnom nije

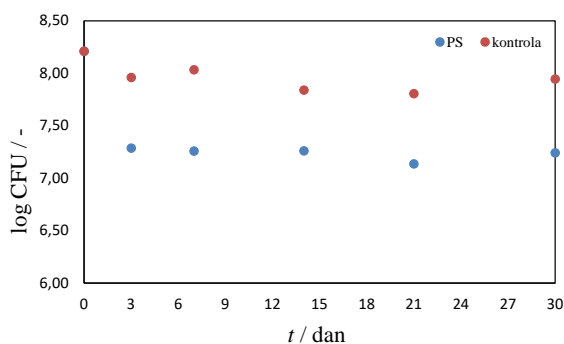
znatno oscilirala stoga se može reći da je uskoro bila postignuta stacionarna faza bakterijskog rasta.⁸⁶ U pokusima P-1, P-3, P-13 i P-15 nakon postavljanja pokusa došlo je do manje značajnog pada CFU vrijednosti, te je u 14. danu postignut maksimum izmjerenih vrijednosti broja izraslih kolonija i iznosi redom: $1,5 \times 10^8$ st/mL za pokus P-1, $1,9 \times 10^7$ st/mL za pokus P-3, $1,5 \times 10^7$ st/mL za pokus P-13 i $8,3 \times 10^7$ st/mL za pokus P-15. Na slikama 4.1.c) i 4.1.g), odnosno u pokusima P-5 i P-13 vidi se konstantna razlika u vrijednostima CFU spram slijepe probe koja nije sadržavala MP, što potencijalno ukazuje na minimalno iskorištavanje PS-a kao supstrata. Može se pretpostaviti da eksperimentalni uvjeti i prisutnost MP nisu odgovarali bakteriji *Bacillus licheniformis* da bi neometano rasla i koristila PS kao supstrat. Suprotno navedenim pokusima pokazali su se pokusi P-1, P-9 i P-11 u kojima, također, postoji neprestana razlika vrijednosti broja izraslih kultura u pojedinim danima, ali u korist slučaja gdje se nalaze čestice MP. Iz toga se može zaključiti da su bakteriji *Bacillus licheniformis* odgovarali uvjeti tih pokusa, te je potencijalno koristila PS kao supstrat. Kao točke najintenzivnije biorazgradnje mogle bi se izdvojiti 14. dan u pokusu P-1 i 21. dan u P-9, što je dobiveno na temelju računanja razlike CFU vrijednosti pokusa i slijepe probe.



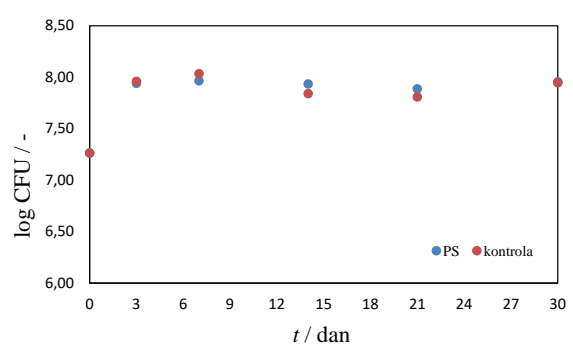
a) P-1



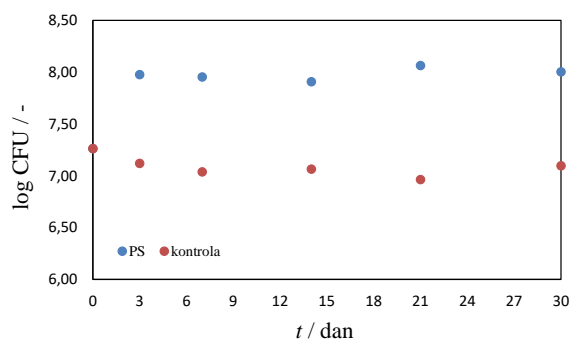
b) P-3



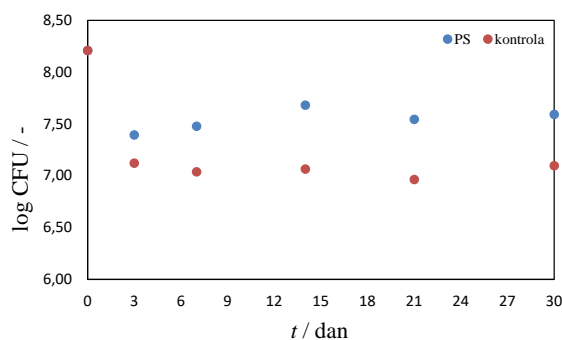
c) P-5



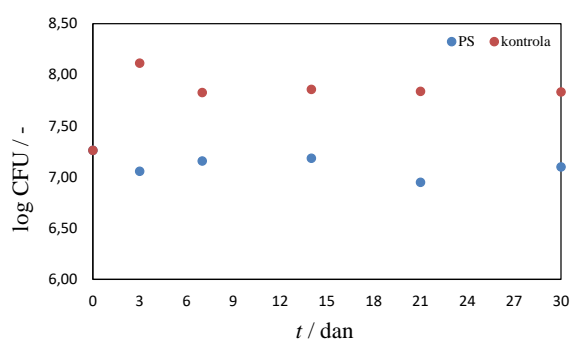
d) P-8



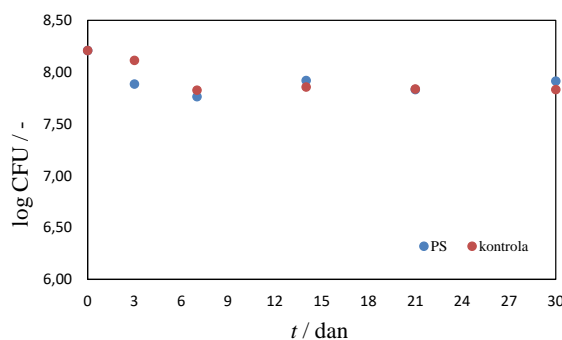
e) P-9



f) P-11



g) P-13



h) P-15

Slika 4.1. Grafički prikaz promjene logaritamske vrijednosti CFU tijekom 30 dana za pokus: a) P-1; b) P-3; c) P-5; d) P-8; e) P-9; f) P-11; g) P-13; h) P-15.

Nakon provedene CFU analize svih pokusa biorazgradnje PS-a uz *Bacillus licheniformis*, najznačajniji su se pokazali pokusi P-1 i P-9. Osim što su u tim pokusima izmjerene najveće vrijednosti ukupnog broja živih stanica bakterija, tijekom trajanja cijelog pokusa održavala se značajna razlika u vrijednostima sa slijepom probom. Ta razlika ukazuje na moguće iskorištavanje PS-a kao supstrata, a u konačnici i njegovu biorazgradnju.

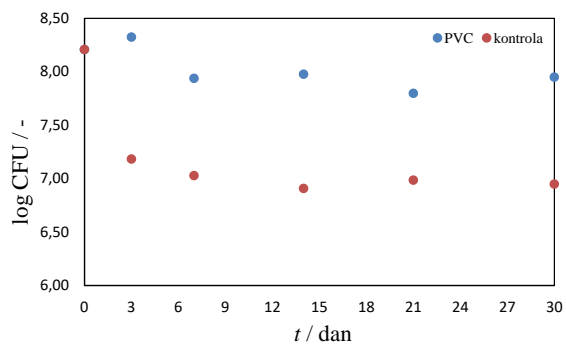
Iako se vjeruje da je PS (bio)nerazgradiv, što zbog njegove hidrofobne naravi, što zbog osnovnog C-C lanca koji ne podliježe hidrolizi,²² ovo istraživanje može dokazati suprotno. Znanstvenici su u prošlogodišnjem istraživanju⁸⁷ ispitali *in vitro* biorazgradnju PS-a uz pomoć dubokomorske bakterije *Bacillus paralicheniformis* G1. Rezultati su pokazali da je nakon 60 dana inkubacije 34 % PS filma bilo razgrađeno. Pored ovog istraživanja koje je proučavalo sposobnost za biorazgradnju *Bacillus licheniformis* i srodnih sojeva, postoje i brojna druga koja su ispitivala mogućnost biorazgradnje ovog problematičnog materijala uz pomoć nekih drugih vrsta. Tako su *Eisaku i sur.*⁸⁸ ispitali sposobnost *Bacillus sp. STR-YO*, *Sphingobacterium sp.*, i *Xanthomonas sp.*, kada su rezultati pokazali 40-56 %-tnu učinkovitost procesa biorazgradnje PS-a. *Mohan i sur.*⁸⁹ su otkrili da *Pseudomonas spp.* and *Bacillus spp.* imaju mogućnost razgradnje žilavog PS (*eng.* high impact PS, HIPS), točnije

postigli su smanjenje mase PS-a u iznosu od 23 % nakon 30 dana. Pored ovih postoje još mnoga istraživanja koja su dokazala ili će tek dokazati mogućnost biorazgradnje PS-a.

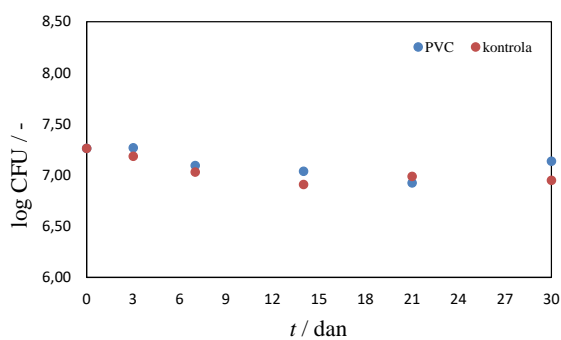
4.1.2 Promjena CFU vrijednosti u pokusima s poli(vinil-kloridom)

Na slikama 4.2. grafički su prikazane promjene CFU vrijednosti tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PVC-a uz *Bacillus licheniformis*.

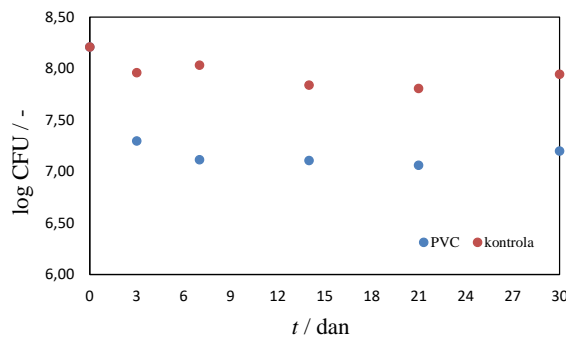
Kao i kod pokusa s PS, u 0. danu je provedena analiza CFU vrijednosti za dvije suspenzije različitog pH, 6 i 8, te je početna CFU vrijednost iznosila $1,8 \times 10^7$ st/mL i $1,6 \times 10^8$ st/mL. U pokusima P-2 i P-7 koji su prikazani slikom 4.2.a) i 4.2.d) već je u 3. danu postignuta maksimalna vrijednost CFU i iznosi $2,1 \times 10^8$ st/mL i $9,6 \times 10^7$ st/mL. Zbog kratkog vremenskog perioda u kojem je postignut taj maksimum, može se pretpostaviti da je preduzgoj uspješno obavljen te se bakterija brzo prilagodila na navedene uvjete. Razlika u njima je što je u pokusu P-2 vrijednost CFU slijepe probe fluktuirala na nižim vrijednostima pa se može zaključiti da je *Bacillus licheniformis* koristio PVC kao supstrat. U pokusu P-6 nakon postavljanja dolazi do pada vrijednosti broja živih bakterija, dok onaj od slijepe probe bez MP oscilira na višim vrijednostima, te se taj trend nastavlja tijekom cijele provedbe eksperimenta. Slično, u pokusu P-16 tijekom cijelog eksperimenta postoji razlika u vrijednostima sa slijepom probom, no u ovom slučaju u 3. danu postoji rast kod slijepe probe te se vrijednosti zadržavaju na višim vrijednostima od onih ispitivanog uzorka. To se može protumačiti na način da bakteriji nisu odgovarali ti uvjeti provedbe procesa biorazgradnje te da nije koristila PVC kao supstrat. U pokusu P-16, također, je moguće da je došlo do sekundarnog rasta mikroorganizama u 14. danu, kao i u pokusu P-12 u 7. danu obzirom da *Bacillus licheniformis* ima sposobnost stvaranja endospora koje mu omogućuju prilagodbu na nepovoljne uvjete.⁸⁶ Primjer potencijalno uspješno provedenog procesa biorazgradnje je pokus P-10 gdje je CFU vrijednost postigla lokalni maksimum u 7. danu i iznosi $1,0 \times 10^8$ st/mL. U 14. danu dolazi do neznatnog pada te nastavlja rasti gdje postiže maksimum u 30. danu i iznosi također $1,0 \times 10^8$ st/mL. Za ovaj pokus se može reći da se tijekom prvih 7 dana bakterija prilagođavala na nove uvjete i trajala je eksponencijalna faza rasta,⁸⁶ a zatim je krenula koristiti PVC kao izvor supstrata i postignuta je stacionarna faza. Pokusi P-4 i P-14 imaju zajedničko to što je razlika postignute vrijednosti CFU ispitivanog uzorka i SP neznatna, što može značiti da je u tim slučajevima iskorištavanje PVC-a kao supstrata bilo minimalno.



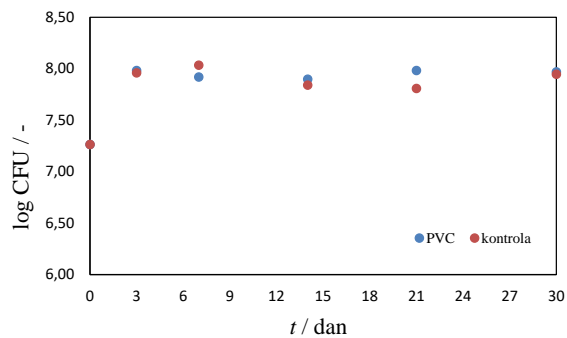
a) P-2



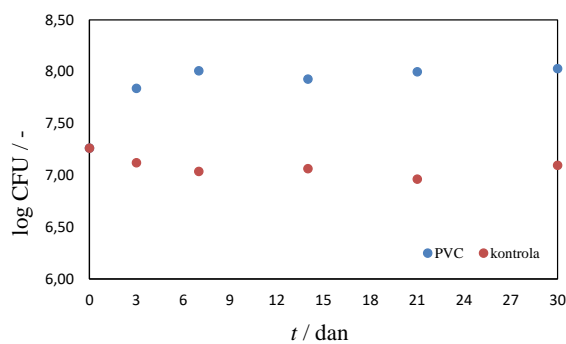
b) P-4



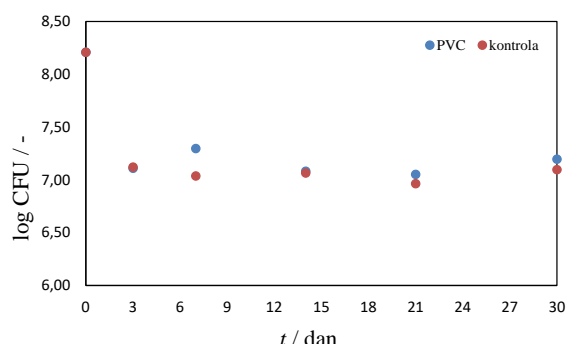
c) P-6



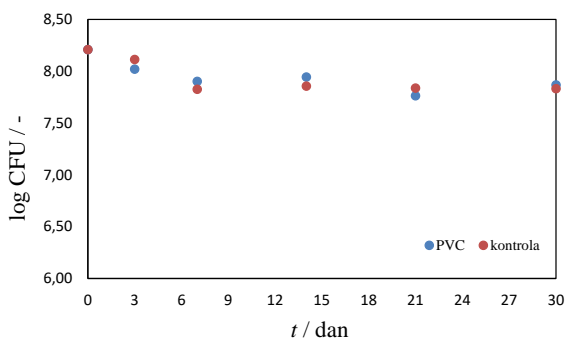
d) P-7



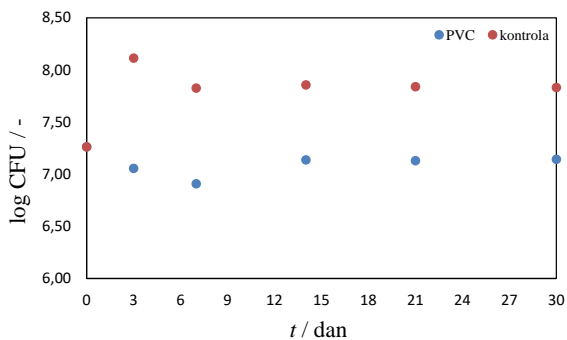
e) P-10



f) P-12



g) P-14



h) P-16

Slika 4.2. Grafički prikaz promjene logaritamske CFU vrijednosti tijekom 30 dana za pokus: a) P-2; b) P-4; c) P-6; d) P-7; e) P-10; f) P-12; g) P-14; h) P-16

Nakon obrađenih rezultata CFU analize svih pokusa, kao uspješniji primjeri moguće biorazgradnje mogu se izdvojiti pokusi P-2 i P-10. U oba pokusa je tijekom cijelog provođenja pokusa postojala razlika između vrijednosti ispitivanog uzorka i SP, u korist pokusa koji sadrže MP. Iako je u pokusu P-2 postignuta maksimalna vrijednost broja živih stanica, i to u 3. danu i iznosi $2,1 \times 10^8$ st/mL, netom nakon toga vrijednost je pala te se taj trend nastavio do kraja izvedbe eksperimenta, osim u 30. danu gdje je neznatno narasla, te je u tom danu iznosila $8,9 \times 10^7$ st/mL. Pokus P-10 se može smatrati boljom kombinacijom uvjeta jer je kasnije dosegnut vrhunac CFU, u 7. danu, te iznosi $1,0 \times 10^8$ st/mL, u 14. i 21. danu je bila tek zanemarivo niža i u posljednjem danu je određeno $1,1 \times 10^8$ st/mL. Dobiveni rezultati pokusa P-10 ukazuju na intenzivniju biorazgradnju, pod pretpostavkom da je *Bacillus licheniformis* koristila PVC kao izvor ugljika i energije. Ovaj eksperiment pridružuje se ostalim istraživanjima na području biorazgradnje PVC-a uz pomoć mikroorganizama. Još 2008. godine provedeno je istraživanje⁹⁰ u kojem su bakterije identificirane kao *Bacillus* spp. sudjelovale u biorazgradnji PVC-a. Razgradnja je utvrđena praćenjem smanjenja mase, koja je iznosila $0,08 \pm 0,02$, $0,17 \pm 0,04$, $0,28 \pm 0,02$, $0,34 \pm 0,17$, $0,32 \pm 0,09$ %, nakon 15, 30, 45, 75 i 90 dana inkubacije. *Khandare i sur.*⁹¹ su u nedavnom istraživanju utvrdili da mješovita kultura morskih bakterija (*Vibrio* sp., *Altermonas* sp. i *Cobetia* sp.) stvara biofilm na površini PVC-a te je do najvećeg gubitka mase PVC filma (1,76 %) došlo nakon 60 dana inkubacije.⁹¹ Najveći uspjeh od navedenih postigli su *Giaomucci i sur.*⁹² kada su kemijskom analizom potvrdili biorazgradnju otpadnog PVC-a uz pomoć *P. citronellolis* and *B. flexus*, i to uzgubitak mase od 19 % nakon 30 dana inkubacije.⁹² Iako postoje radovi koji su dokazali biorazgradnju PVC-a, esencijalni enzimi za njegovu razgradnju još su uvijek nepoznati. Stoga je potrebno provesti još istraživanja kako bi se istražila depolimerizacija dugolančanih molekula PVC-a.

4.2. Određivanje koncentracije ukupnog organskog ugljika (TOC) i anorganskog ugljika (IC)

4.2.1 Promjena koncentracije TOC i IC u pokusima s polistirenom

U tablici 4.1. prikazane su izmjerene vrijednosti promjene koncentracije ukupnog organskog ugljika (TOC) i anorganskog ugljika (IC) za pokus P-1 tijekom 30 dana provedbe procesa biorazgradnje PS-a u vodenoj fazi pomoću bakterijske vrste *Bacillus licheniformis*. Koncentracija TOC-a se u pokusu P-1 nakon 0. dana smanjila, a nakon 3. dana je imala manje oscilacije oko određene koncentracije, te je u 30. danu došlo do porasta. Sličan trend može se primijetiti i kod CFU vrijednosti za isti pokus. Kako mikroorganizmi za rast i

razmnožavanje koriste organski ugljik, očekivalo se da će porastom CFU vrijednosti doći do smanjenja koncentracije TOC-a, no do toga nije došlo. Uz korištenje literature,⁹³ pretpostavlja se da je do povećanja koncentracije TOC-a u 30. danu došlo zbog nastanka organskih produkata, koji su nastali kao posljedica narušavanja strukture PS-a te cijepanja MP na sitnije komade ili otpuštanja aditiva s površine PS-a. Kako bi se ta tvrdnja potvrdila, potrebno je provesti LC-MS analizu i FTIR spektroskopiju kako bi se identificirale funkcionalne skupine novonastalih spojeva te utvrdile razlike u odnosu na početnu kemijsku strukturu PS-a. U 3. danu došlo je do laganog pada koncentracije TOC-a, ali je koncentracija IC nešto porasla, što ukazuje na potencijalnu mineralizaciju otopljenih spojeva. Kako je privođenjem pokusa kraju rasla koncentracija IC-a, koja se interpretira kao količina novonastalog CO₂, kao jednog od produkata biorazgradnje,⁹³ a jednako je rasla i vrijednost CFU, može se reći da je tada biorazgradnja bila najintenzivnija. U uzorku slijepe probe u 7. danu došlo je do porasta TOC koncentracije. Obzirom da je u tom danu započet pad CFU vrijednosti za SP, koji se nastavio do 14. dana, rast TOC-a može se povezati sa liziranjem, odnosno raspadom bakterijskih stanica.

Tablica 4.1. Rezultati TOC analize za pokus P-1 tijekom 30 dana provedbe procesa biorazgradnje MP-a PS-a uz *Bacillus licheniformis*.

<i>t / dan</i>	γ (TOC(P-1)) / mg/L	γ (TOC(SP)) / mg/L	γ (IC(P-1)) / mg/L	γ (IC(SP)) / mg/L
0	9,89	9,89	2,57	2,57
3	8,13	8,93	3,50	2,92
7	8,97	12,87	2,33	6,88
14	8,57	8,92	1,29	2,73
21	8,69	8,63	5,00	1,81
30	11,25	7,91	7,85	2,01

U tablici 4.2. prikazane su izmjerene vrijednosti promjene koncentracije TOC-a i IC-a za pokus P-9 tijekom 30 dana provedbe procesa biorazgradnje PS-a u vodenoj fazi pomoću bakterijske vrste *Bacillus licheniformis*. U 3. danu došlo je do pada koncentracije TOC-a, a istovremeno i do značajnog porasta CFU vrijednosti, što se može protumačiti kao uspješan proces biorazgradnje, gdje su bakterije trošile organski ugljik iz suspenzije za rast i razmnožavanje, odnosno u tijeku je bila ekspanzijska faza rasta bakterija.⁹⁴ Kasnije je koncentracija TOC-a porasla, odakle je do kraja provođenja pokusa lagano padala, što se također može interpretirati kao potencijalna biorazgradnja MP. Naime, u 7. danu CFU vrijednost je održana na višoj razini kao i u 3. danu, a porast koncentracije TOC-a može se

protumačiti kao nastanak razgradnih produkata i otpuštenih aditiva iz MP, kao što je već ranije rečeno. Kod SP-a se rast TOC-a može povezati sa kontinuiranim padom CFU vrijednosti, a takvi rezultati se mogu tumačiti kao proces raspada bakterijskih stanica. IC međutim, nema pravilan trend kretanja tijekom provedbe pokusa. Najviša koncentracija IC-a zabilježena je 7. i 21. dan, kada je zabilježena i najveća razlika CFU vrijednosti uzoraka MP i SP, što se može povezati sa procesom mineralizacije i nastankom CO₂, koji nastaje kao produkt biorazgradnje.⁹³

Tablica 4.2. Rezultati TOC analize za pokus P-9 tijekom 30 dana provedbe procesa biorazgradnje MP-a PS-a uz *Bacillus licheniformis*.

<i>t / dan</i>	γ (TOC(P-9)) / mg/L	γ (TOC(SP)) / mg/L	γ (IC(P-9)) / mg/L	γ (IC(SP)) / mg/L
0	9,89	9,89	2,57	2,57
3	5,99	6,24	0,93	1,64
7	9,25	6,79	4,01	2,69
14	8,79	12,58	2,13	6,24
21	8,71	8,30	4,03	4,19
30	7,92	9,14	0,35	4,64

4.2.2 Promjena koncentracije TOC i IC u pokusima s poli(vinil-kloridom)

U tablici 4.3. prikazane su izmjerene vrijednosti promjene koncentracije, TOC-a i IC-a za pokus P-2 tijekom 30 dana provedbe procesa biorazgradnje PVC-a u vodenoj fazi pomoću bakterijske vrste *Bacillus licheniformis*. Koncentracija TOC-a je u pokusu P-2 najveća u 0. danu, nakon toga pada do 7. dana i zatim nastavlja manje oscilirati oko jedne vrijednosti. Obzirom da se i vrijednost CFU za pokus P-2 slično ponaša, nakon 7. dana uočene su manje oscilacije, može se zaključiti da u ovom pokusu proces biorazgradnje nije toliko uspješan. Dakle, *Bacillus licheniformis* nema značajnijeg rasta nakon 7. dana, koncentracija organskog ugljika također se nije značajnije mijenjala, što je pokazatelj da bakterija nije u većoj mjeri koristila MP kao izvor hrane. S druge strane, koncentracija IC nema pravilan uzorak kretanja, do 7. dana raste, zatim u 14. danu pada, u 21. opet raste, te u 30. završava na nešto nižoj vrijednosti. Ako se uzme u obzir da je IC pokazatelj nastajanja CO₂, što je kao produkt biorazgradnje pokazatelj njene uspješnosti, u 7. i 14. danu je proizvedeno najviše anorganskog ugljika te je tada biorazgradnja potencijalno bila najintenzivnija. Međutim, uzrok tome može biti i nepreciznost instrumenta, ili drugi uzroci, pa se tako biorazgradnja mora potvrditi daljnjim analizama kao što su FTIR i LC-MS.

Tablica 4.3. Rezultati TOC analize za pokus P-2 tijekom 30 dana provedbe procesa biorazgradnje MP-a PVC-a uz *Bacillus licheniformis*.

<i>t / dan</i>	γ (TOC(P-2)) / mg/L	γ (TOC(SP)) / mg/L	γ (IC(P-2)) / mg/L	γ (IC(SP)) / mg/L
0	9,89	9,89	2,57	2,57
3	9,05	8,93	3,25	3,01
7	8,45	12,87	4,02	1,02
14	8,48	8,92	3,13	7,81
21	8,42	8,63	4,15	14,18
30	8,58	7,91	3,61	24,10

U tablici 4.4. prikazane su izmjerene vrijednosti promjene koncentracije TOC-a i IC-a za pokus P-10 tijekom 30 dana provedbe procesa biorazgradnje PVC-a u vodenoj fazi pomoću bakterijske vrste *Bacillus licheniformis*. U ovom pokusu vrijednost koncentracije TOC-a pada sve do 14. dana, dok u tom periodu vrijednost CFU raste, što je možebitni pokazatelj uspješnog procesa biorazgradnje, gdje *Bacillus licheniformis* koristi organski ugljik iz suspenzije kao izvor hrane i energije. U 21. danu došlo je do značajnog rasta TOC-a, te kasnije u 30. danu koncentracija opada. Ovakav obrazac promjene koncentracije TOC-a može se protumačiti na način da je bakterija na početku pokusa koristila otopljene organske spojeve (aditive iz-MP i sl.), te je negdje oko 14. dana počela razgrađivati MP, što se vidi po rastu anorganskog dijela ugljika odnosno IC-a, koji je, kao što je već rečeno pokazatelj nastajanja CO₂. Isto tako, nakon 14. dana i CFU vrijednost ovog pokusa poraste, što ukazuje na spomenuti sekundarni rast ove bakterijske vrste. Koncentracije TOC-a i IC-a krajem pokusa rastu, dok CFU vrijednosti opadaju, odnosno sve je veća razlika između uzorka i SP-a. Iz toga se može zaključiti da se radi o procesu liziranja stanica *B. licheniformis*-a. Pred kraj pokusa koncentracije TOC-a i IC-a ispitivanog uzorka su u padu, što ukazuje oslabljeni potencijal *B. licheniformis*-a da provodi proces biorazgradnje PVC-a.

Usporedbom koncentracije IC-a kod pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a pomoću bakterije *Bacillus licheniformis* može se primijetiti da su oba procesa biorazgradnje bila otprilike podjednako uspješna. Obzirom da je u pokusu P-1 nakon 14. dana došlo do jedinog značajnijeg porasta koncentracije IC-a, može se reći da je PS pri uvjetima pokusa P-1 bio nešto dostupniji za biorazgradnju. Također su i vrijednosti CFU u prosjeku nešto više u pokusima sa PS-om, što ide u prilog mogućoj intenzivnijoj biorazgradnji PS-a u odnosu na PVC.

Tablica 4.4. Rezultati TOC analize za pokus P-10 tijekom 30 dana provedbe procesa biorazgradnje MP-a PVC-a uz *Bacillus licheniformis*.

<i>t / dan</i>	γ (TOC(P-10)) / mg/L	γ (TOC(SP)) / mg/L	γ (IC(P-10)) / mg/L	γ (IC(SP)) / mg/L
0	9,89	9,89	2,57	2,57
3	7,73	6,24	2,30	1,60
7	7,10	6,79	2,41	2,90
14	6,28	12,58	5,13	7,66
21	9,75	8,30	4,81	16,89
30	7,26	9,14	2,24	25,50

4.3. LC-MS analiza

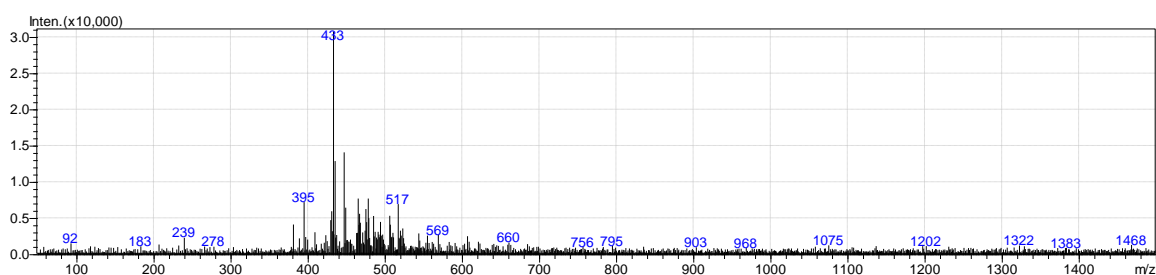
4.3.1 LC-MS analiza filtrata koji sadrže polistiren

Na slikama 4.3.-4.7. prikazani su maseni spektri ispitanih uzoraka vodene faze P-1 tijekom 30 dana provođenja procesa biorazgradnje PS-a pomoću *Bacillus licheniformis*, dobiveni analizom na HPLC/MS uređaju.

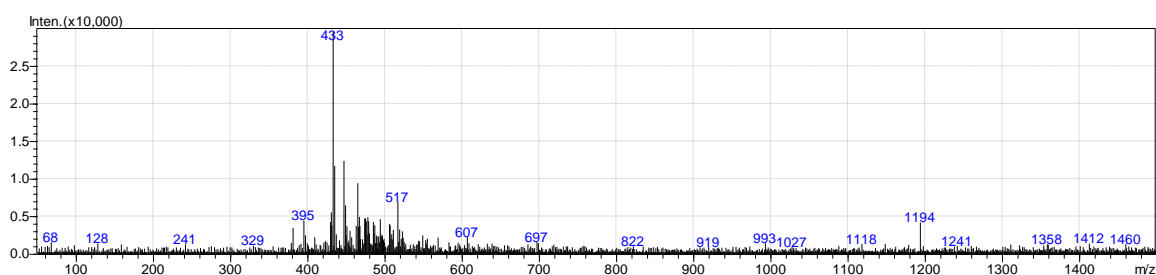
Masenom spektrometrijom analiziran je uzorak pokusa P-1 u 3., 7., 14., 21. i 30. danu. Na svim spektrima pojavljuje se pik 433 koji je višestruko jačeg intenziteta od ostalih pikova, te prema literaturi⁹⁵ odgovara polietilen glikolu (PEG). Polietilen glikol je polieterski spoj dobiven iz nafte koji pronalazi široku primjenu od industrijske proizvodnje do medicine.⁹⁶ Iako je PEG sudeći po FDA-evim zahtjevima smatran biološki inertnim i sigurnim za ljudsko zdravlje, javlja se sve veći broj slučajeva sa preosjetljivošću na ovaj kemijski spoj.⁹⁷ Zbog sveprisutnosti u proizvodima koje čovječanstvo koristi, alergije na PEG otkriju se tek kada se javljaju alergijske reakcije na sve veći broj proizvoda koji su naizgled nepovezani, koji su primjerice prerađena hrana, kozmetika ili lijekovi, a sadrže PEG ili je PEG upotrijebljen pri njihovoj proizvodnji.⁹⁸ Pored PEG-a u uzorcima su se nerijetko nalazili i deterdženti koji su imali razne uloge u sastavu plastike. Površinski aktivne tvari mogu se dodavati polimerima kao aditivi kako bi se prilagodila svojstva gotovog polimernog materijala. Često se koriste kao emulgatori, stabilizatori, solubilizatori i sl.⁹⁹ Ostali spojevi koji se u manjoj mjeri javljaju u pokusu P-1 navedeni su u tablici 4.5. Među njima nalaze se i silikon, deterdžent i peptidi, odnosno keratin.

Tablica 4.5. Popis spojeva čiji se pikovi ističu na spektrima pokusa P-1 sa PS-om dobivenim masenom spektrometrijom.⁹⁵

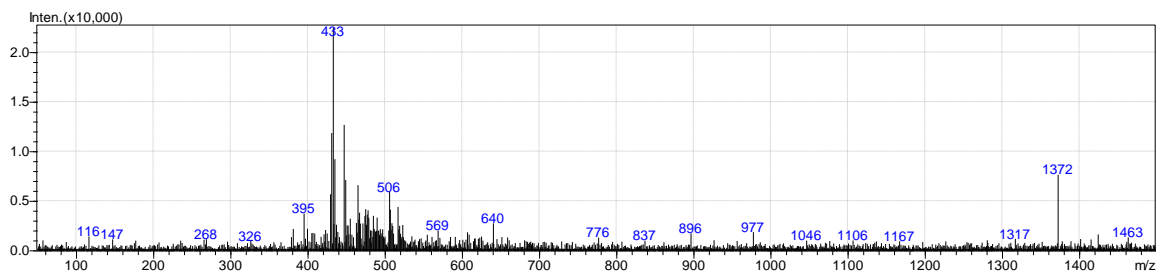
<i>m/z</i> omjer	Forma iona	Naziv spoja	Kemijska formula ili sekvenca
395	[A ₈ B+Na] ⁺	PEG, polietilen glikol	[C ₂ H ₄ O] _n H ₂ O
433	[A ₉ B+Na] ⁺	PEG, polietilen glikol	[C ₂ H ₄ O] _n H ₂ O
517	[M+H] ⁺	polisiloksan, silikon	[C ₂ H ₆ SiO] ₇
1194	[M+H] ⁺	peptid, keratin	YEELQVTVGR
1372	[M+H] ⁺	peptid, keratin	LNDLEEALQQAQ



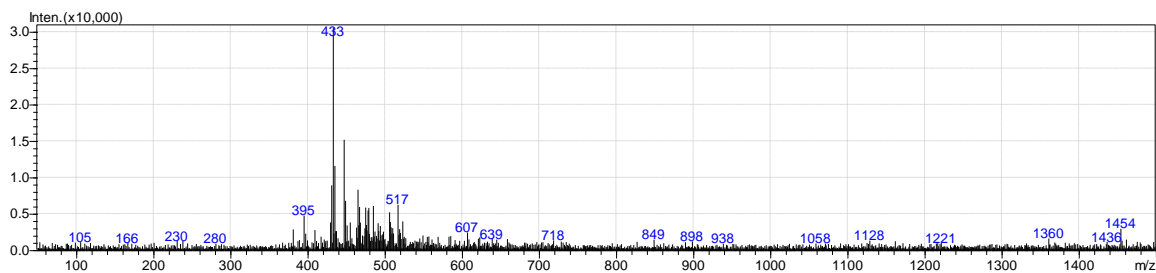
Slika 4.3. Maseni spektar pokusa P-1 u 3. danu provođenja pokusa biorazgradnje PS-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



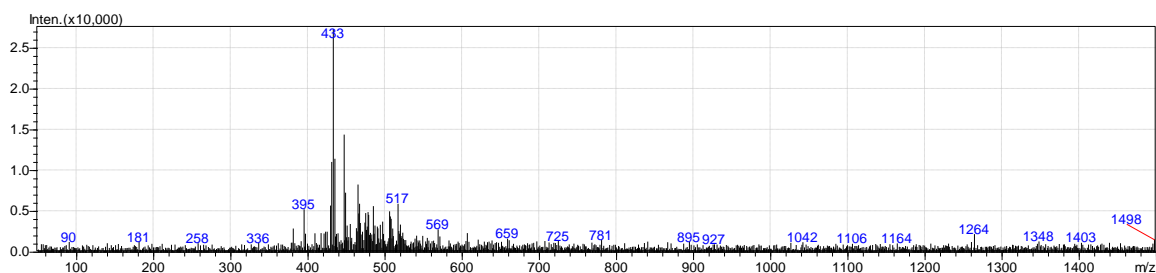
Slika 4.4. Maseni spektar pokusa P-1 u 7. danu provođenja pokusa biorazgradnje PS-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



Slika 4.5. Maseni spektar pokusa P-1 u 14. danu provođenja pokusa biorazgradnje PS-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



Slika 4.6. Maseni spektar pokusa P-1 u 21. danu provođenja pokusa biorazgradnje PS-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



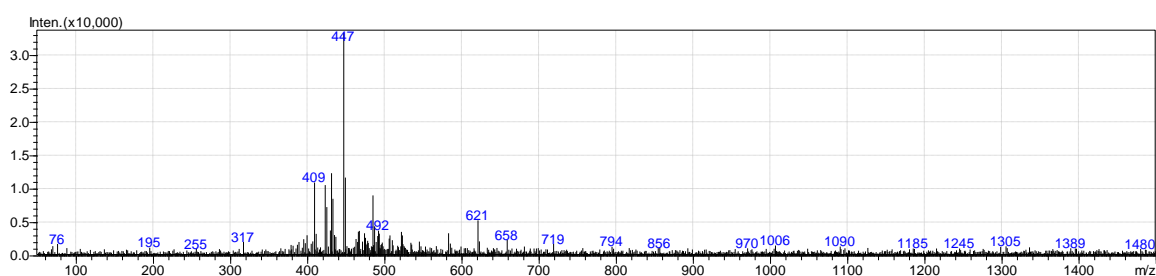
Slika 4.7. Maseni spektar pokusa P-1 u 30. danu provođenja pokusa biorazgradnje PS-a pomoću *Bacillus licheniformis*.

Usporedbom dobivenih masenih spektara, na slici 4.5. može se primijetiti promjena u intenzitetu pika 433 koji odgovara PEG-u, u 14. danu, kada je došlo do značajnijeg smanjenja intenziteta što upućuje na moguću biorazgradnju. U istom pokusu, P-1, također u 14. danu je došlo i do smanjenja m/z omjera pika sa 517 na 506. Smanjenje tog m/z omjera ukazuje na potencijalnu biorazgradnju čestica MP. Ova tvrdnju potkrepljuje razlika u CFU vrijednosti za navedeni pokus, u kojem je u 14. danu postojala najveća razlika između PS-a i SP-a., te se pretpostavlja da je tada biorazgradnja bila najintenzivnija. U 7. i 14. danu pojavila su se dva nova pika, što je prikazano slikama 4.4. i 4.5., 1194 i 1372 koji su peptidi ljudskog porijekla te se smatraju nečistoćama i nisu povezani sa ispitivanim polimerima.

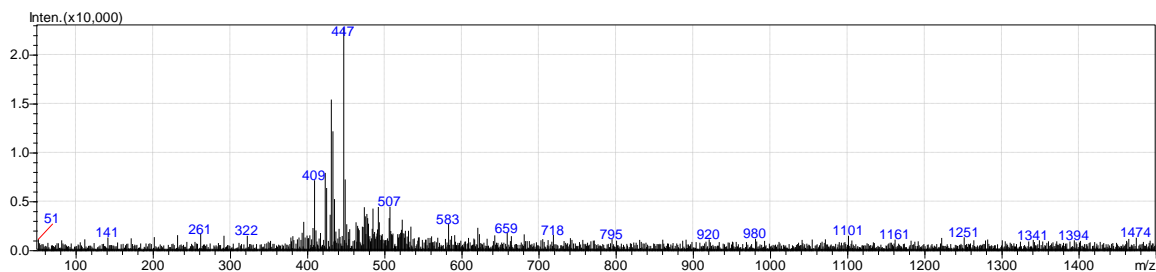
Na slikama 4.8.-4.10. prikazani su spektri testiranih uzoraka izuzetih iz pokusa P-9 tijekom 30 dana provođenja procesa biorazgradnje PS-a pomoću *Bacillus licheniformis*, dobiveni analizom na HPLC/MS uređaju. Masenom spektrometrijom analiziran je i uzorak pokusa P-9 u 3., 7., 14. i 21. danu. Na svim spektrima također se pojavljuje se pik 433 koji je višestruko jačeg intenziteta od ostalih pikova, a kao što je već rečeno, odgovara PEG-u. U tablici 4.6. prikazani su i imenovani i ostali spojevi koji su otkriveni u uzorcima pokusa P-9.

Tablica 4.6. Popis spojeva čiji se pikovi ističu na spektrima pokusa P-9 sa PS-om dobivenim masenom spektrometrijom.⁹⁵

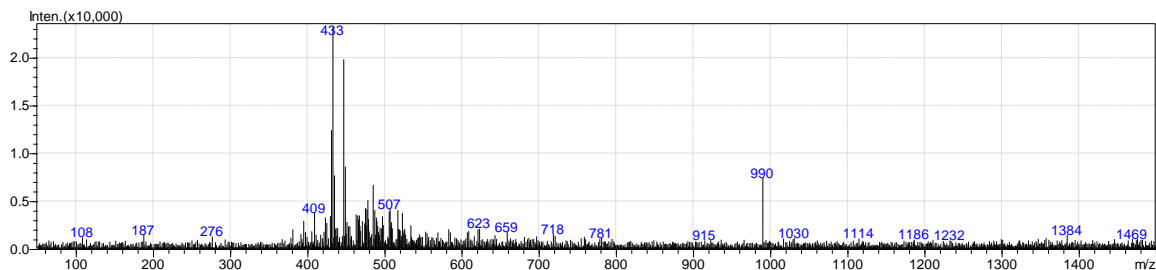
<i>m/z</i> omjer	Forma iona	Naziv spoja	Kemijska formula ili sekvenca
395	[A ₈ B+Na] ⁺	PEG, polietilen glikol	[C ₂ H ₄ O] _n H ₂ O
409	[A ₈ B+K] ⁺	PEG, polietilen glikol	[C ₂ H ₄ O] _n H ₂ O
433	[A ₉ B+Na] ⁺	PEG, polietilen glikol	[C ₂ H ₄ O] _n H ₂ O
517	[M+H] ⁺	polisiloksan, silikon	[C ₂ H ₆ SiO] ₇
621	[M ₆ -6H+3Fe+O] ⁺	kompleks propionske kiseline	C ₃ H ₆ O ₂
990	[AB ₁₇ +Na] ⁺	triton, deterdžent	[C ₁₅ H ₂₄ O][C ₂ H ₄ O] _n



Slika 4.8. Maseni spektar pokusa P-9 u 3. danu provođenja pokusa biorazgradnje PS-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



Slika 4.9. Maseni spektar pokusa P-9 u 7. danu provođenja pokusa biorazgradnje PS-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



Slika 4.10. Maseni spektar pokusa P-9 u 21. danu provođenja pokusa biorazgradnje PS-a pomoću *Bacillus licheniformis*.

U pokusu P-9 intenzitet pika 433 koji odgovara PEG-u, a pojavljuje se u svim danima, porastao je u 3. danu, međutim značajnije se smanjio u 7. danu te je taj intenzitet zadržao do kraja odvijanja pokusa. Smanjenje intenziteta pika ukazuje na smanjenje koncentracije PEG-a u uzorku što može značiti da ga je *B. licheniformis* uspješno razgrađivao. Rezultati CFU analize poklapaju se sa ovakvim spektrima. Upravo u 7. i 21. danu je primijećena najveća razlika CFU vrijednosti SP-a i PS-a, što ukazuje na moguću biorazgradnju PS-a. Daljnjom usporedbom masenih spektara, u 3. danu pojavljuje se pik 621 koji odgovara odazivu kompleksa propionske kiseline što znači da je došlo do otpuštanja aditiva iz plastičnih čestica zbog biorazgradnje. Propionska kiselina dobiva se petrokemijskim putem i često se koristi u proizvodnji plastike kao plastifikator, kako bi se modificirala svojstva gotovog proizvoda.¹⁰⁰ U 21. danu provođenja pokusa, na masenom spektru detektiran je pik 990 koji odgovara deterdžentu. Pojava deterdženta u 21. danu posljedica je otpuštanja aditiva s površine MP-a.

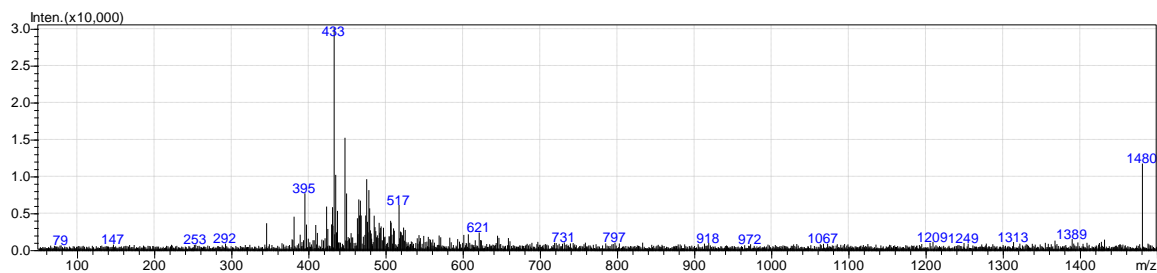
4.3.2 LC-MS analiza filtrata koji sadrže poli(vinil-klorid)

Na slikama 4.11.-4.13. prikazani su maseni spektri testiranih uzoraka izuzetih iz vodene faze pokusa P-2 tijekom 30 dana provođenja procesa biorazgradnje PVC-a pomoću *Bacillus licheniformis*, dobiveni analizom na HPLC/MS uređaju.

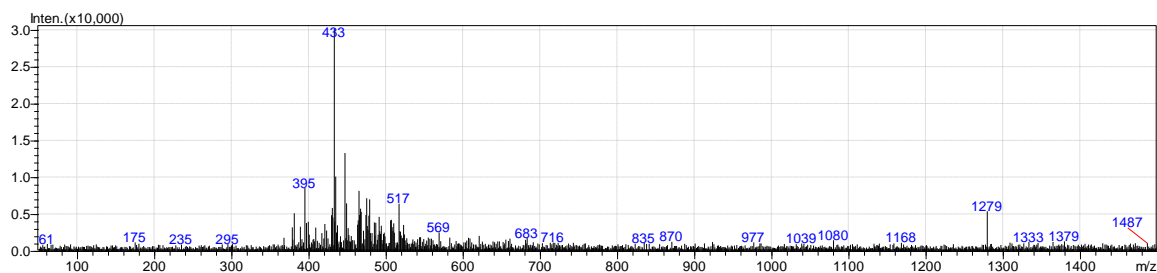
Kao u i pokusima sa PS-om, provedena je masena spektrometrija u pokusima sa PVC-om. Za pokus P-2 ispitali su se uzorci izuzeti 3., 7. i 30. dan. Na svim masenim spektrima uočljiva je pojava pika 433 kao i kod pokusa sa PS-om koja predstavlja prisustvo PEG-a. Pored PEG-a javljali su se i drugi pikovi, odnosno bili su prisutni i drugi spojevi koji su navedeni u tablici 4.7.

Tablica 4.7. Popis spojeva čiji se pikovi ističu na spektrima pokusa P-2 sa PVC-om dobivenim masenom spektrometrijom.⁹⁵

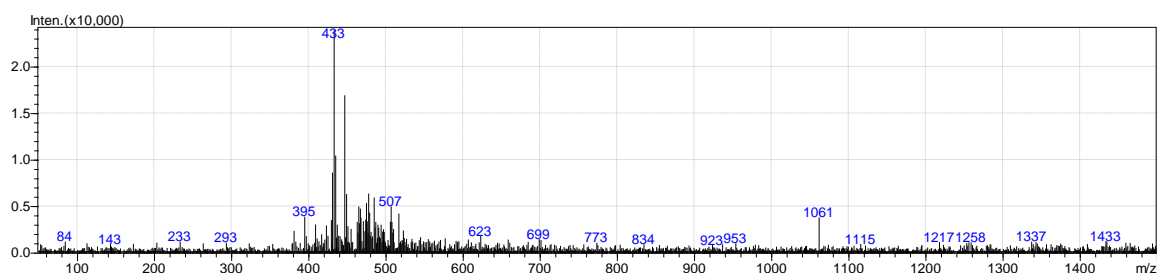
<i>m/z omjer</i>	<i>Forma iona</i>	<i>Naziv spoja</i>	<i>Kemijska formula ili sekvenca</i>
395	$[A_8B+Na]^+$	PEG, polietilen glikol	$[C_2H_4O]_nH_2O$
433	$[A_9B+Na]^+$	PEG, polietilen glikol	$[C_2H_4O]_nH_2O$
517	$[M+H]^+$	polisiloksan, silikon	$[C_2H_6SiO]_7$
1480	$[AB_{24}+Na]^+$	tween 40	$[C_{22}H_{42}O_6][C_2H_4O]$



Slika 4.11. Maseni spektar pokusa P-2 u 3. danu provođenja pokusa biorazgradnje PVC-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



Slika 4.12. Maseni spektar pokusa P-2 u 7. danu provođenja pokusa biorazgradnje PVC-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



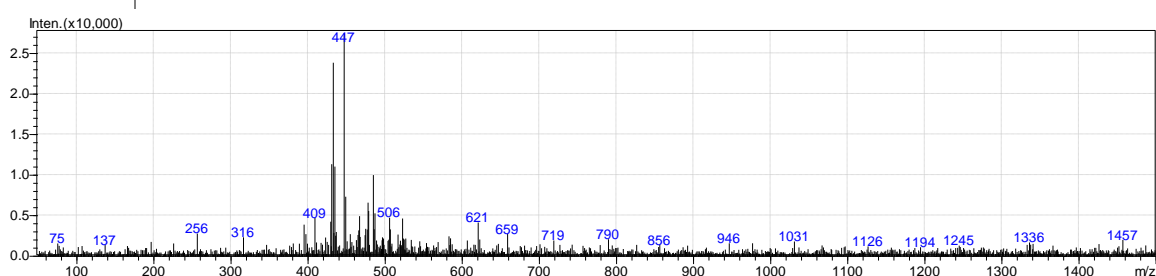
Slika 4.13. Maseni spektar pokusa P-2 u 30. danu provođenja pokusa biorazgradnje PVC-a pomoću *Bacillus licheniformis*.

Usporedbom masenih spektara pokusa P-2 primjećuje se postojanost pika 517 sve do 30. dana kada je omjer m/z pao na 507. Prema literaturi⁹⁵ pik 517 odgovara polisiloksanu. Polisiloksan je aditiv koji se dodaje plastici kako bi se zaštitila od habanja. Jednom kada je dodan u plastiku, polako migrira prema površini i formira kontinuirani film.¹⁰¹ Smanjenje omjera m/z polisiloksana može se pripisati enzimskim aktivnostima *B. licheniformis* u smislu biorazgradnje. U 3. danu primjećena je pojava pika 1480 koji odgovara odazivu kemijskog spoja pod nazivom *tween 40*, ionskog oblika $[AB_{24}+Na]^+$ te kemijske formule $[C_{15}H_{24}O][C_2H_4O]_n$. Tween 40 pripada skupini površinski aktivnih tvari, a koristi se kao aditiv plastičnim materijalima, kao stabilizator, emulgator, kompatibilizator i sl.¹⁰² Njegova pojava u 3. danu može se povezati sa otpuštanjem sa površine čvrstih čestica, ali i kao posljedica biorazgradnje ako se nalazio u smjesi PVC-a.

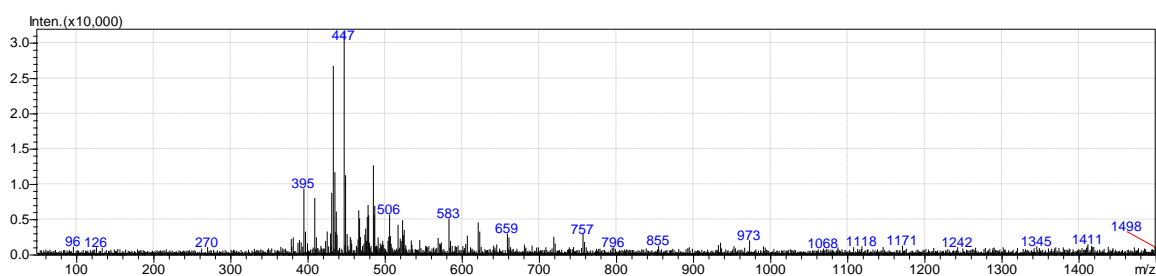
Masenom spektrometrijom ispitani su uzorci izuzeti iz vodene faze pokusa P-10 tijekom 30 dana provođenja procesa biorazgradnje PVC-a pomoću *Bacillus licheniformis*, dobiveni analizom na HPLC/MS uređaju. Na slikama 4.14.-4.17. prikazani su maseni spektri pokusa P-10 u 3., 7., 14. i 21. danu. Kao i na prethodnim pokusima, može se primijetiti isticanje pika 433 na svim spektrima, a u pokusu P-10 u 3. danu se pojavljuje i pik 447 koji je jačeg intenziteta sve do 21. dana. Pik 447 prema literaturi⁹⁵ odgovara polipropilen glikolu (PPG) koji se u većem dijelu koristi za proizvodnju nezasićenih poliesterskih smola, u farmaciji i medicini, ali i u polimernim plastifikatorima koji se dodaju kao aditivi u proizvodnji plastike.¹⁰³ Osim PEG-a i PPG-a u tablici 4.8. su navedeni ostali kemijski spojevi koji su otkriveni u uzorcima pokusa P-10.

Tablica 4.8. Popis spojeva čiji se pikovi ističu na spektrima pokusa P-10 sa PVC-om dobivenim masenom spektrometrijom.⁹⁵

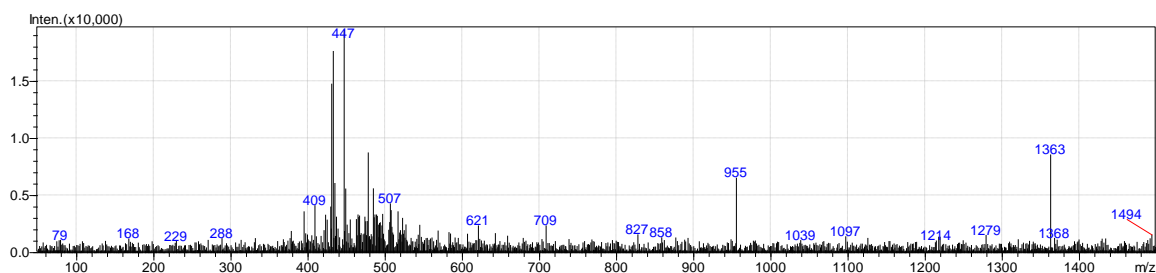
<i>m/z</i> omjer	Forma iona	Naziv spoja	Kemijska formula ili sekvenca
213	[M+H] ⁺	n-BBS, plastifikator	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S
395	[A ₈ B+Na] ⁺	PEG, polietilen glikol	[C ₂ H ₄ O] _n H ₂ O
433	[A ₉ B+Na] ⁺	PEG, polietilen glikol	[C ₂ H ₄ O] _n H ₂ O
447	[M+H] ⁺	PPG, polipropilen glikol	[C ₃ H ₆ O] _n H ₂ O
517	[M+H] ⁺	polisiloksan, silikon	[C ₂ H ₆ SiO] ₇
955	[AB ₁₇ +H] ⁺	triton, deterdžent	[C ₁₄ H ₂₂ O][C ₂ H ₄ O] _n



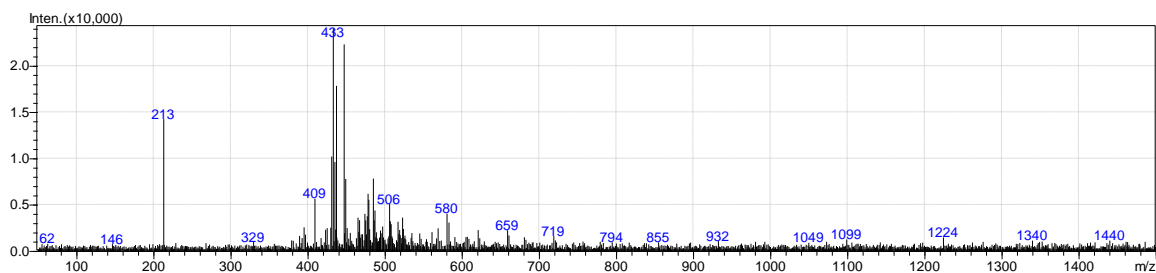
Slika 4.14. Maseni spektar pokusa P-10 u 3. danu provođenja pokusa biorazgradnje PVC-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



Slika 4.15. Maseni spektar pokusa P-10 u 7. danu provođenja pokusa biorazgradnje PVC-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



Slika 4.16. Maseni spektar pokusa P-10 u 14. danu provođenja pokusa biorazgradnje PVC-a pomoću *Bacillus licheniformis*.



Slika 4.17. Maseni spektar pokusa P-10 u 21. danu provođenja pokusa biorazgradnje PVC-a pomoću *Bacillus licheniformis*.

Uspoređujući masene spektre pokusa P-10, osim pikova 433 i 447, može se primijetiti i pik 955, ionskog oblika $[AB_{17+H}]^+$ i kemijske formule $[C_{14}H_{22}O][C_2H_4O]_n$ koji se pojavljuje u 14. danu provođenja pokusa. Naime, radi se o deterdžentu koji se otpustio sa površine ili je dospio u vodenu fazu iz unutrašnjosti PVC-a kao rezultat biorazgradnje. U 21. danu, pik jačeg intenziteta koji se javlja pri masenom omjeru 213, ionske forme $[M+H]^+$ i kemijske formule $C_{10}H_{15}NO_2S$, je n-BBS plastifikator. n-BBS plastifikator dodaje se polimerima u procesima polimerizacije kako bi se izmijenile performanse takvih materijala. Međutim, istraživanje¹⁰⁴ na životinjama je pokazalo kako je on neurotoksičan, te se postavlja pitanje sigurnosti za ljudsko zdravlje prilikom njegove primjene.

4.4. FTIR-ATR spektroskopija

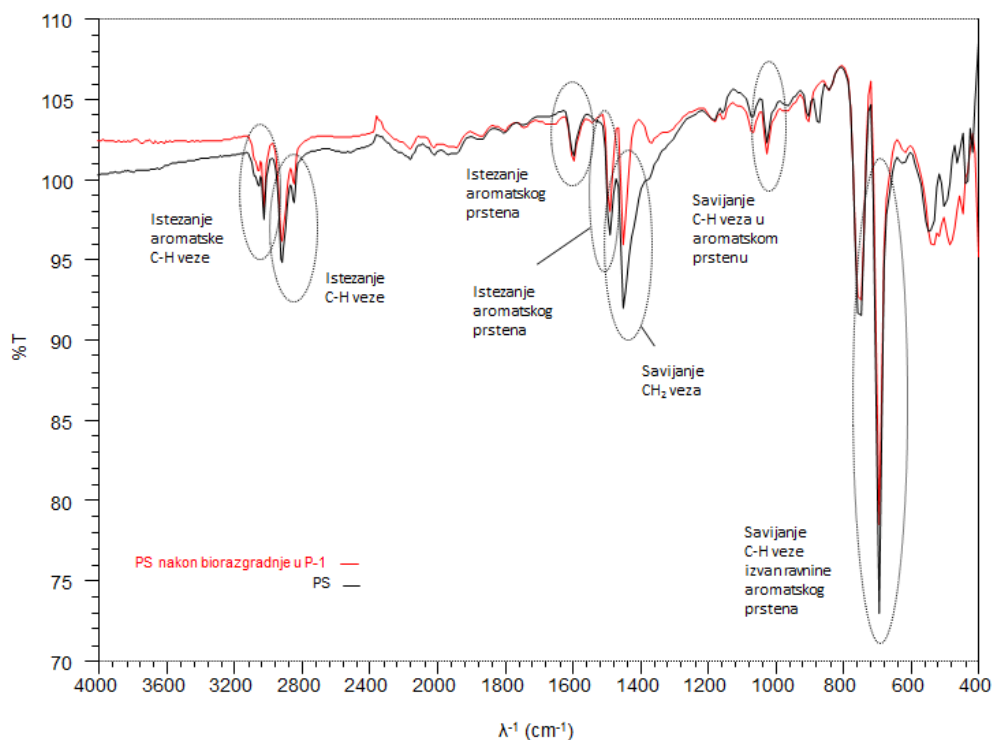
FTIR-ATR spektroskopija provedena je za dvije vrste MP-a, PS i PVC, prije i nakon procesa biorazgradnje. Prije početka procesa, FTIR spektroskopijom početnih uzoraka i usporedbom s bazom podataka, potvrđeno je da se radi o spomenutim vrstama polimera. Nakon procesa biorazgradnje ova se analiza provela u svrhu određivanja promjena u strukturi čime se može potvrditi da je do biorazgradnje zbilja i došlo. FTIR spektroskopija ne zahtjeva posebnu pripremu uzroka već je samo potrebno čvrsti uzorak postaviti na površinu kristala, te očitati spektar.

4.4.1 FTIR/ATR analiza mikroplastike polistirena

Na slikama 4.18.-4.19. prikazani su spektri PS-a snimljeni prije i poslije provedenog pokusa biorazgradnje uz pomoć bakterije *Bacillus licheniformis*. Prema literaturi određeno je da PS karakteriziraju sljedeći pikovi¹⁰⁵:

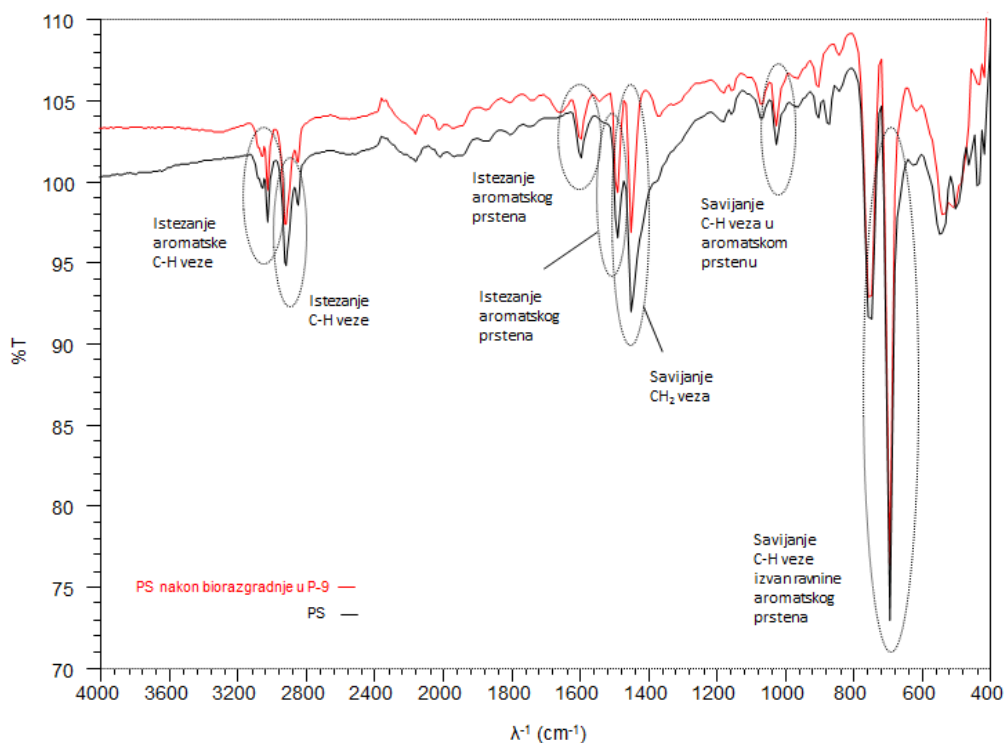
- pri $\sim 3024\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C-H istezanje aromatske skupine
- pri $\sim 2847\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja alifatsko C-H istezanje
- pri ~ 1601 i $\sim 1492\text{ cm}^{-1}$ koji su karakteristični za istezanje aromatskog prstena
- pri $\sim 1451\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja CH_2 savijanje
- pri $\sim 1027\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja savijanje C-H veza u aromatskom prstenu
- pri $\sim 694\text{ cm}^{-1}$ koji odgovara savijanju C-H veze izvan ravnine aromatskog prstena

Na slici 4.18. prikazana su dva preklopljena spektra, PS prije biorazgradnje crnom bojom, i PS nakon procesa biorazgradnje u pokusu P-1, crvenom bojom. Na spektrima možemo vidjeti da su skoro svi postojeći pikovi prije biorazgradnje i dalje prisutni i nakon pokusa. Razlika je većinom u intenzitetu pikova, i to u smanjenu intenziteta nakon biorazgradnje. Da smanjenje intenziteta pikova ukazuje na biorazgradnju PS-a, potvrdili su *Lin i sur.* nakon biorazgradnje polistirena uz pomoć dva soja crijevnih bakterija.¹⁰⁶ Moguće je tako da su enzimske aktivnosti *Bacillus licheniformis* razgrađivale PS sa strane bočnih lanaca. Osim smanjenja intenziteta, indikator da se početni lanac rascijepao na manje lance je i stvaranje novih skupina na spektru. Tako je primjerice u pokusu P-1 uočeno stvaranje novog pika na $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ koji odgovara istezanju karbonilne C=O skupine. Stvaranje karbonilnih skupina jedan je od pokazatelja uspješne biorazgradnje.¹⁰⁷ Pri $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$ također se pojavljuje novi pik koji odgovara C-H istezanju, a može biti dodatna potvrda cijepanju glavnog lanca polimera, odnosno njegovoj biorazgradnji.



Slika 4.18. FTIR spektar PS-a snimljen prije (crna linija) i nakon biorazgradnje (crvena linija) uz *Bacillus licheniformis* u pokusu P-1.

Dva preklapljena spektra snimljena prije i nakon biorazgradnje PS-a u pokusu P-9 prikazana su slikom 4.19. U ovom pokusu došlo je do većeg smanjenja intenziteta nego u pokusu P-1, što govori o mogućoj uspješnijoj biorazgradnji. Ova tvrdnja u skladu je i s rezultatima CFU analize koja je pokazala da su vrijednosti CFU nešto više u pokusu P-9 nego u P-1. U prosjeku je veća i razlika u CFU vrijednosti između SP-a i PS-a u pokusu P-9, što potvrđuje da je *B. licheniformis* koristila MP kao izvor ugljika. Nadalje, najznačajnija razlika u intenzitetu naspram početnog uzorka PS-a vidljiva je u apsorpcijskim vrpčama pri $\sim 1492\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 1451\text{ cm}^{-1}$. Također je došlo do nastajanja novog pika $\sim 1380\text{ cm}^{-1}$ koji odgovara C-H istezanju, čiji uzrok može biti potencijalna biorazgradnja.



Slika 4.19. FTIR spektar PS-a snimljen prije (crna linija) i nakon biorazgradnje (crvena linija) uz *Bacillus licheniformis* u pokusu P-9.

4.4.2 FTIR-ATR spektroskopija mikroplastike poli(vinil-klorida)

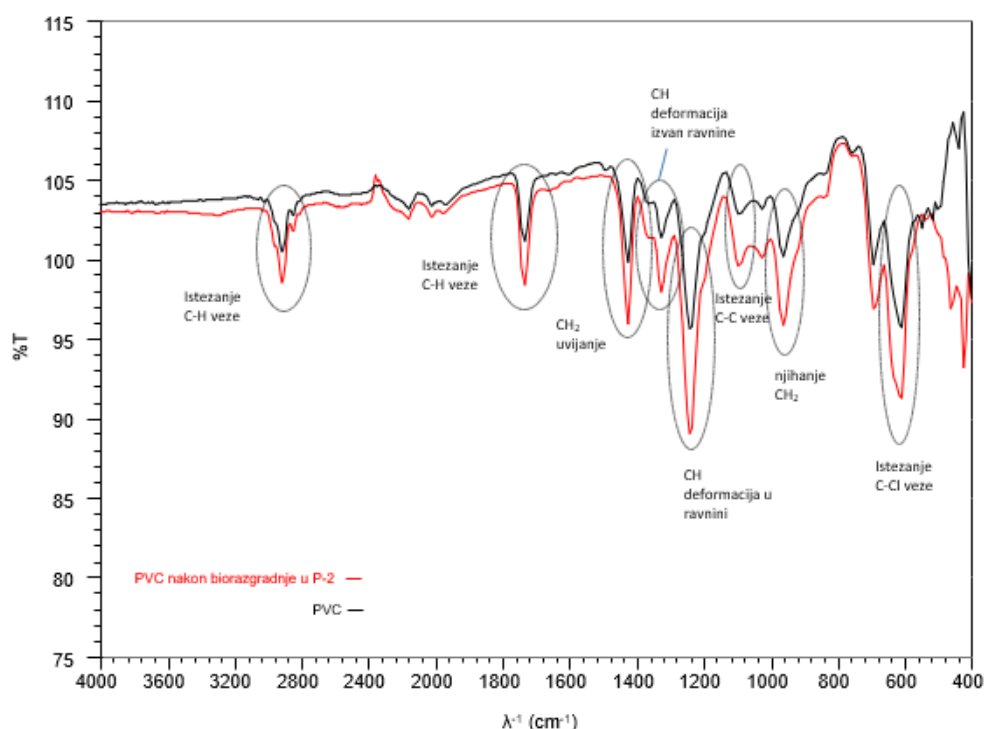
Spektri PVC-a snimljeni prije i poslije provedenog pokusa biorazgradnje uz pomoć bakterije *Bacillus licheniformis* prikazani su slikama 4.20-4.21. Prema literaturi određeno je da PVC karakteriziraju sljedeći pikovi¹⁰⁸:

- pri $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$, $\sim 2849\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1736\text{ cm}^{-1}$ koji predstavljaju simetrično C-H istezanje
- pri $\sim 1427\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja CH_2 uvijanje
- pri $\sim 1331\text{ cm}^{-1}$ koji je karakterističan za C-H deformaciju izvan ravnine
- pri $\sim 1255\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C-H deformaciju u ravnini
- pri $\sim 1099\text{ cm}^{-1}$ koji odgovara istezanju C-C veze
- pri $\sim 966\text{ cm}^{-1}$ koji odgovara njihanju CH_2 skupine
- pri $\sim 616\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 690\text{ cm}^{-1}$ koji odgovaraju istezanju C-Cl veze.

Na slici 4.20. prikazani su spektri PVC-a prije i nakon provedenog procesa biorazgradnje uz pomoć bakterije *Bacillus licheniformis* u pokusu P-2. Usporedbom tih dvaju spektara može se primijetiti da su razlike u intenzitetu značajne za sve pikove.

Manja promjena dogodila se na pikovima pri $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 2849\text{ cm}^{-1}$, dok je izraženija na pikovima pri $\sim 1255\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1099\text{ cm}^{-1}$, $\sim 966\text{ cm}^{-1}$ i $\sim 616\text{ cm}^{-1}$ koji odgovaraju redom

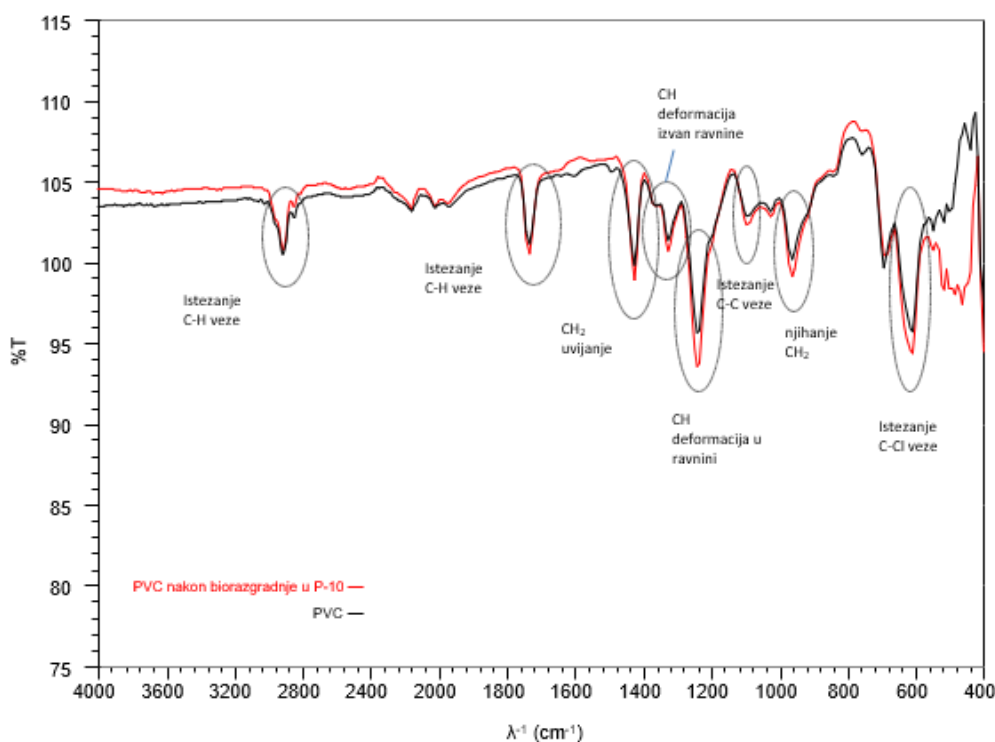
vibracijama CH₂, CHCl i C-Cl. Osim promjene u intenzitetu došlo je do pojave novog pika i to pri ~2380 cm⁻¹, a prema literaturi¹⁰⁸ radi se o karakterističnoj apsorpcijskoj vrpici za CO₂. Nastanak ugljikovog dioksida jedan je od dokaza biorazgradnje PVC-a. Ovakve pojave smanjenja intenziteta pikova i nastajanje novih, posljedica je procesa dehidrokloriranja te stvaranja novih dvostrukih veza. Dobiveni pikovi na ~1050, 1255 i 1331 cm⁻¹ prema literaturi¹⁰⁹ odnose se redom na istezanja C-O i C-H deformacije, te se mogu pripisati terc-butilnim skupinama koje zamjenjuju Cl atome tvoreći etere. U oksidacijskim uvjetima, terminalne dvostruke veze konjugiranih sustava mogu uhvatiti kisik te stvoriti keton ili može zaostati epoksid koji će s dodatkom vode tvoriti diol. Pik na valnoj duljini od 1736 cm⁻¹ je indikacija za takvu ketonsku skupinu. Apсорpcijske vrpce istezanja C-Cl skupine na 700 cm⁻¹ i 616 cm⁻¹ karakteristične su samo za PVC te se mogu pojaviti samo pri većem udjelu PVC-a (>80 mas.%). Nestanak ovih vrpce ukazuje na uklanjanje atoma klora iz PVC-a, što rezultira smanjenjem njihovog broja u kemijskoj strukturi PVC-a, a s time dolazi i do slabljenja intermolekularnih interakcija.



Slika 4.20. FTIR spektar PVC-a snimljen prije (crna linija) i nakon biorazgradnje (crvena linija) uz *Bacillus licheniformis* u pokusu P-2.

Na slici 4.21. prikazani su FTIR spektri PVC-a prije i nakon provedenog procesa biorazgradnje uz pomoć bakterije *Bacillus licheniformis* u pokusu P-10. Usporedbom tih dvaju spektara vidi se da nema većih promjena u označenim pikovima. Pikovi su nešto slabijeg intenziteta, ali ne kao kod pokusa s PS-om. Promjena se primjećuje tek pri valnim

duljinama manjim od 500 cm^{-1} , koji prema literaturi¹⁰⁸ odgovaraju području tzv. *fingerprinta*. Najznačajnije smanjenje intenziteta primjećuje se pri valnoj duljini od $\sim 1255\text{ cm}^{-1}$ koji odgovara C-H deformaciji u ravnini, a slijedi ga pik pri $\sim 616\text{ cm}^{-1}$ koji odgovara istezanju C-Cl veze. S obzirom da preklapanjem ovih dvaju spektara ne uviđamo dodatne promjene i nastajanje novih pikova, može se zaključiti da u pokusu P-10 *Bacillus licheniformis* ipak nije razgradio PVC u tolikoj mjeri kao u prethodnom pokusu, ili kao što je razgradio PS.



Slika 4.21. FTIR spektar PVC-a snimljen prije (crna linija) i nakon biorazgradnje (crvena linija) uz *Bacillus licheniformis* u pokusu P-2.

4.5. Ispitivanje ekotoksičnosti filtrata pomoću bakterijske vrste *Vibrio fischeri*

Tijekom provođenja procesa biorazgradnje u vodenoj fazi, enzimskim aktivnostima bakterije *Bacillus licheniformis* u vodenoj fazi mogu se naći neke nove tvari. Takve tvari mogu pokazati svojstva toksičnosti, a u suspenziju dospijevaju ili otpuštanjem sa površine čvrstih čestica MP, ili kao razgradni produkti istih. Nakon provedenog pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus licheniformis*, filtrat svakog pokusa podvrgnut je ispitivanju ekotoksičnosti na morskoj bakteriji *Vibrio fischeri*, a postupak je detaljnije opisan u poglavlju 3.3.5.

4.5.1 Ispitivanje ekotoksičnosti filtrata u pokusima s polistirenom

U tablici 4.9. prikazani su rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata svih pokusa biorazgradnje PS-a uz pomoć bakterije *Bacillus licheniformis*. Rezultati su izraženi kroz EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti, dok je toksični učinak (TU) svakog uzorka izračunat kao jedinica toksičnosti prema formuli (4)¹¹⁰:

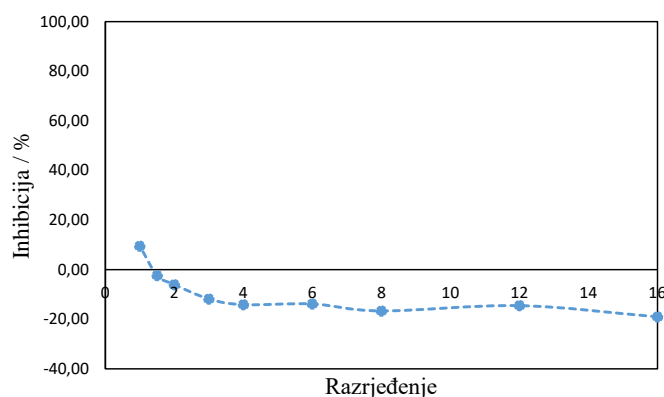
$$TU(\%) = \left(\frac{1}{EC_{50}} \right) \cdot 100\% \quad (4)$$

Prema literaturi¹¹¹ EC₂₀ se definira kao koncentracija tvari koja će imati štetni učinak na 20% ispitivane populacije. Dakle, što je ova vrijednost manja, štetni učinak tvari je veći. Iz tablice 4.9. može se primijetiti da je u pokusima P-8 i P-9 izmjerena najniža vrijednost EC₂₀, što čini ta dva uzorka najtoksičnija. U ovom slučaju, to znači da će koncentracija tvari koja se nalazi u filtratima tih pokusa u iznosu od 6,05% i 5,83% izazvati negativan učinak na 20% kulture *Vibrio fischeri*. Ovaj rezultat pokusa P-9, koji je dodatno prikazan slikom 4.23., slaže se s rezultatima CFU analize, gdje je dobivena najveća razlika CFU vrijednosti između PS-a i SP-a. Dokaz je ovo uspješnog procesa biorazgradnje PS-a, obzirom da se razgradnjom polimernih čestica otpuštaju razni aditivi koje PS sadrži, a mogu imati toksični učinak na bakteriju *Vibrio fischeri*, kao što je to potvrđeno literaturom¹¹². Za pokus P-1 nije određena vrijednost EC₂₀ i EC₅₀, ali iz grafičkog prikaza inhibicije u odnosu na razrjeđenja na slici 4.22., vidljivo je da uzorak ne pokazuje toksičnost, odnosno inhibicija je pri najmanjem razrjeđenju i dalje niska. To upućuje da čestice MP nisu razgrađene u tolikoj mjeri kao u pokusu P-9, ali analize poput primjerice FTIR-a mogu vjerodostojnije potvrditi ovakav rezultat. Najveću vrijednost EC₂₀ pokazali su pokusi P-5 i P-15 što znači da je njihova toksičnost najniža od ispitanih. Razlog može biti slabije odvijanje biorazgradnje MP-a što opet potkrjepljuje analiza CFU, jer je njome dobiveno da su vrijednosti SP-a više od vrijednosti PS-a, što ukazuje da bakterija *Bacillus licheniformis* nije koristila PS kao supstrat. Dalje, vrijednost TU prikazana u tablici 4.9. označava relativnu toksičnost, koja se prema literaturi¹¹⁰ kategorizira kao: <1% = netoksično, 1-40% = otrovno, 40-100% = vrlo otrovno, >100% = izuzetno otrovno. Prema dobivenim rezultatima TU vrijednosti, uzorci filtrata dobiveni nakon provedenog pokusa biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus licheniformis* u pokusima P-3, P-8, P-9 i P-13 imaju toksični učinak na morsku bakteriju *Vibrio fischeri*.

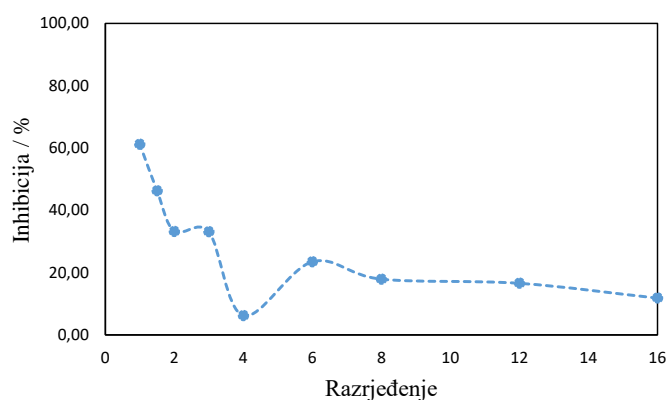
Tablica 4.9. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata svih pokusa biorazgradnje polistirena primjenom *Bacillus licheniformis*.

POKUS	EC ₂₀ / %	EC ₅₀ / %	TU / -
P-1	/	/	/
P-3	7,63	29,61	3,38
P-5	29,42	/	/
P-8	6,05	29,01	3,44
P-9	5,83	33,46	2,99
P-11	/	/	/
P-13	10,26	39,78	2,51
P-15	30,23	/	/

Na slici 4.22.-4.23. grafički su prikazane izmjerene vrijednosti luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* izmjerene na luminometru za pokuse P-1 i P-9 pri razrjeđenjima pripremljenim metodom linearnog niza.



Slika 4.22. Grafički prikaz promjene vrijednosti inhibicije luminiscencije *Vibrio fischeri* pri različitim razrjeđenjima filtrata za pokus P-1.



Slika 4.23. Grafički prikaz promjene vrijednosti inhibicije luminiscencije *Vibrio fischeri* pri različitim razrjeđenjima filtrata za pokus P-9.

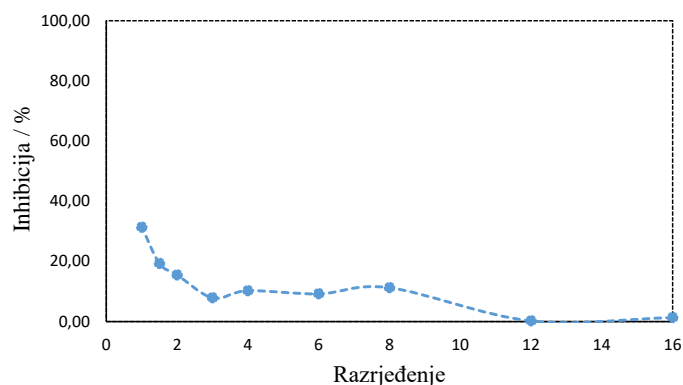
4.5.2 Ispitivanje ekotoksičnosti filtrata u pokusima s poli(vinil-kloridom)

Prema dobivenim rezultatima ispitivanja ekotoksičnosti filtrata bakterijske suspenzije nakon provedenog pokusa biorazgradnje PVC-a primjenom *Bacillus licheniformis*, uočljivo je da su vrijednosti EC₂₀ najniže kod pokusa P-7 i P-16 te iznose 7,66% i 7,56%. To znači da će koncentracije tvari iz vodene faze u tim iznosima imati toksičan učinak na 20% izložene bakterijske kulture *Vibrio fischeri*. U ovom slučaju ovi rezultati se ne podudaraju s rezultatima CFU analize. CFU rezultati pokusa P-7 i P-16 nisu pokazali razliku između PVC-a i SP-a u korist PVC-a, već su se bakterije više razmnožavale u SP-u. Pokusi P-2 i P-10 koji su u ovom radu odabrani kao primjeri u kojima je CFU vrijednost pokazivala potencijalnu biorazgradnju PVC-a, nemaju visoku toksičnost, sudeći po EC₂₀ vrijednosti. Razlog tomu može biti da aditivi iz PVC-a, koji su potencijalno dospjeli u vodenu fazu, jednostavno ne pokazuju značajniji toksični učinak prema bakteriji *Vibrio fischeri*. Međutim, iz grafičkog prikaza na slikama 4.24. i 4.25. može se vidjeti da ipak dolazi do inhibicije luminiscencije *Vibrio fischeri* pri manjim razrjeđenjima ispitivanog filtrata. U pokusu P-2 pri minimalnom razrjeđenju od 1x dolazi do inhibicije luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* u iznosu od ~31%, dok u pokusu P-10 pri istom razrjeđenju inhibicija bakterije *Vibrio fischeri* iznosi čak ~56%, što je također jasni pokazatelj toksičnosti uzorka. Prema izračunatim vrijednostima TU i kategorizaciji iz literature¹¹⁰, u pokusima P-4, P-7, P-10 i P-16 potvrđen je toksični učinak filtrata na ispitivanu bakteriju *Vibrio fischeri*.

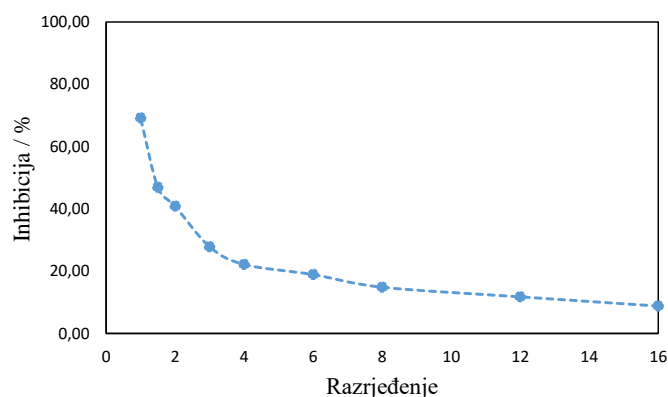
Tablica 4.10. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata svih pokusa biorazgradnje poli(vinil-klorida) uz *Bacillus licheniformis*.

POKUS	EC ₂₀ / %	EC ₅₀ / %	TU / -
P-2	22,74	/	/
P-4	21,69	45,75	2,19
P-6	/	/	/
P-7	7,66	27,04	3,69
P-10	17,84	40,30	2,48
P-12	28,74	/	/
P-14	44,62	/	/
P-16	7,56	34,90	2,87

Na slici 4.24.-4.25. grafički su prikazane izmjerene vrijednosti luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* izmjerene na luminometru za pokuse P-2 i P-10 pri razrjeđenjima pripremljenim metodom linearnog niza.



Slika 4.24. Grafički prikaz promjene vrijednosti inhibicije luminiscencije *Vibrio fischeri* pri različitim razrjeđenjima filtrata za pokus P-2.



Slika 4.25. Grafički prikaz promjene vrijednosti inhibicije luminiscencije *Vibrio fischeri* pri različitim razrjeđenjima filtrata za pokus P-10.

4.6. Određivanje značajnih čimbenika statističkom analizom varijance (ANOVA)

Rezultati ovih pokusa koji su osmišljeni u programskom paketu *Design Expert 7.0* prema Taguchi metodi, analizirani su tako da se ispitivao utjecaj određenog faktora na odgovor, ovisno o tome koji se faktor razine promatra. Analizom varijance (ANOVA) potvrđen je utjecaj pojedinog faktora prateći odgovor sustava.¹¹³

U tablici 4.11. prikazani su doprinosi pojedinih čimbenika na proces biorazgradnje PS-a i PVC-a koristeći bakteriju *Bacillus licheniformis*. Za biorazgradnju PS-a najznačajnijim čimbenikom s doprinosom od 84,23% pokazala se optička gustoća suspenzije bakterije *Bacillus licheniformis* koja se dodavala u tikvice. Obzirom da je optička gustoća direktan pokazatelj koncentracije bakterija, a bakterije su odgovorne za provođenje procesa biorazgradnje, ovakav rezultat nije iznenađujući. Čimbenik koji ima najveći doprinos, u iznosu od 98,66%, u biorazgradnji PVC-a je, također, optička gustoća. Kao što je već rečeno, veća optička gustoća znači veću koncentraciju bakterijske suspenzije, što u ovom pokusu

znači potencijalno uspješniju provedbu procesa biorazgradnje. *Damayanti i sur.*¹¹⁴ su eksperimentom ispitali biorazgradnju plastike pomoću *Pseudomonas aeruginosa*, te se proces biorazgradnje pratio preko parametra smanjenja mase početnog uzorka. Dokazali su da se u uzorcima s većom optičkom gustoćom bakterijske kulture dobilo veće smanjenje mase, odnosno veća optička gustoća omogućila veći stupanj biorazgradnje plastičnog materijala. Programski paket *Design Expert 7.0* pokazao je signifikantnost čimbenika OG na proces biorazgradnje obje vrste MP-a bakterijom *Bacillus licheniformis*.

Tablica 4.11. Popis ispitivanih čimbenika i njihov doprinos u procesu biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijom *Bacillus licheniformis*.

POLIMER	ČIMBENICI	DOPRINOS / %
PS	$T / ^\circ\text{C}$	1,36
	Broj okretaja / min^{-1}	1,84
	pH-vrijednost / -	4,47
	Veličina MP / μm	0,12
	$\gamma(\text{MP}) / \text{g/L}$	2,39
	OG / -	84,23
	$\gamma(\text{glukoza}) / \text{g/L}$	5,60
PVC	$T / ^\circ\text{C}$	/
	Broj okretaja / min^{-1}	0,20
	pH-vrijednost / -	0,04
	Veličina MP / μm	0,20
	$\gamma(\text{MP}) / \text{g/L}$	/
	OG / -	98,66
	$\gamma(\text{glukoza}) / \text{g/L}$	0,90

U tablici 4.12. prikazani su rezultati analize varijance (ANOVA) dobiveni u programskom paketu *Design Expert 7.0* za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a uz *Bacillus licheniformis*. Zbroj razlika (eng. *sum of squares*) odnosi se na zbroj kvadrata razlika između ukupnog prosjeka i količine varijacija pokusa. Viši rezultat zbroja kvadrata ukazuje na veliki stupanj varijabilnosti unutar skupa podataka, dok niži rezultat ukazuje da podaci ne odstupaju značajno od srednje vrijednosti.¹¹⁵ U pokusu biorazgradnje PS-a ta vrijednost iznosi 1,06, dok

za pokus biorazgradnje PVC-a iznosi 1,23. Vrijednost dF upućuje na broj stupnjeva slobode, odnosno, koji je broj parametara korišten za izračunavanje zbroja kvadrata.¹¹⁵ Za oba pokusa, obzirom da je jedan čimbenik značajan, taj broj iznosi 1. *F* vrijednost služi kao test za usporedbu srednjeg kvadrata izvora s rezidualnim srednjim kvadratom. Što je veća *F*-vrijednost u ANOVA-i, veća je varijacija između srednjih vrijednosti uzorka u odnosu na varijaciju unutar uzoraka. Što je veća *F*-vrijednost, niža je odgovarajuća *p*-vrijednost.¹¹⁶ U pokusu biorazgradnje PS-a ta vrijednost iznosi 32,05, dok za pokus biorazgradnje PVC-a iznosi 6722,45. Kako bi se odredilo je li razlika između srednjih vrijednosti grupe statistički značajna, prati se *p*-vrijednost koja odgovara *F*-statistici.¹¹⁶ U pokusu biorazgradnje PS-a *p*-vrijednost iznosi 0,0013, a za pokus biorazgradnje PVC-a iznosi <0,0001. *p*-vrijednost manja od 0,0500 indicira da je član modela značajan, što je u ovom slučaju potvrđeno.

Tablica 4.12. Rezultati analiza varijance (ANOVA) za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a uz *Bacillus licheniformis*.

	PS	PVC
Zbroj razlika	1,06	1,23
df	1	1
<i>F</i>	32,05	6722,45
<i>P</i>	0,0013	<0,0001

5. Zaključak

Plastika je jedinstveni materijal današnjice, koji zbog svoje izdržljivosti i prilagodljivosti pronalazi primjenu u svim aspektima svakodnevnog života. Upravo zbog otpornosti i dugotrajne razgradnje takvih materijala, akumulacija plastičnog otpada danas je ozbiljan ekološki i društveni problem. Pojava mikroplastike u okolišu dodatno je zabrinula javnost, jer raznim putevima može dospjeti u čovjekov organizam te potencijalno narušiti zdravlje. MP predstavlja specifičan problem, jer je uklanjanje iz okoliša zbog malih dimezija gotovo nemoguće. Posljednjih godina, kao jedno od ekološki prihvatljivih rješenja tog problema, javlja se biorazgradnja sintetske plastike koristeći mikroorganizme i njihov enzimski potencijal, čime se nudi mogućnost razvoja tehnologije biološke obrade plastičnog otpada.

U ovom radu tako je predstavljen pokus biološke razgradnje mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a korištenjem bakterijske vrste *Bacillus licheniformis*, te su određivani značajni čimbenici tog procesa. Tijekom 30 dana praćenja procesa biorazgradnje i provođenjem CFU, TOC, LC/MS i FTIR/ATR analize može se zaključiti sljedeće:

- pH vrijednost se tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje uz *Bacillus licheniformis* nije značajnije mijenjala.
- Iz rezultata CFU analize može se zaključiti da je u pokusima P-1 i P-9 za PS, i P-2 i P-10 za PVC, biorazgradnja najintenzivnija zbog najveće razlike između ispitivanog uzorka i slijepe probe. Ta razlika pokazuje da je *B. licheniformis* koristila PS i PVC kao izvor ugljika i energije.
- CFU vrijednosti su nešto više u pokusima sa PS-om što upućuje da je PS dostupniji za biorazgradnju.
- Iz TOC analize su oba procesa biorazgradnje (PS-a i PVC-a) bila podjednako uspješna.
- Masenom spektrometrijom utvrđena je promjena intenziteta postojećih pikova u vidu smanjenja, što govori o smanjenju koncentracije određenih spojeva kao posljedica razgradnje.
- Masenom spektrometrijom identificirani su novi ionski oblici koji su prisutni zbog otpuštanja aditiva s površine i unutrašnjosti PS-a i PVC-a uslijed biorazgradnje.
- Iz analize snimljenih FTIR spektara prije i poslije provedenog pokusa biorazgradnje, zbog nastanka većih promjena u materijalu PS-a, može se zaključiti da je *B. licheniformis* bolje razgradila PS nego PVC.

- Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti na morskoj bakteriji *Vibrio fischeri* pokazali su da pokusi P-1 i P-2 nemaju toksični filtrat, dok je kod pokusa P-9 i P-10 potvrđena toksičnost filtrata.
- Određivanjem značajnih čimbenika statističkom analizom varijance (ANOVA) dobiveno je da je značajni čimbenik u pokusima razgradnje PS-a i PVC-a uz pomoć *B. licheniformis*-a optička gustoća, čimbenik koji govori o koncentraciji bakterijske kulture u pokusima.

6. Popis simbola i kratica

Simboli i mjerne jedinice

w	maseni udio, %
M	molarna masa, g/mol
ρ	gustoća, kg/L
T	temperatura, °C
γ	masena koncentracija, g/L
ω	broj okretaja, min ⁻¹
t	vrijeme, dan

Kratice

PS	polistiren
PVC	poli(vinil-klorid)
PE	polietilen
PP	polipropilen
PET	poli(etilen-tereftalat)
PU	poliuretan
LDPE	polietilen niske gustoće
HDPE	polietilen visoke gustoće
BPA	bisfenol A
HCl	klorovodična kiselina
KOH	kalij hidroksid
MP	mikroplastika
MAP	makroplastika
MEP	mezoplastika
MMP	mini-mikroplastika
NP	nanoplastika
PCB	poliklorirani bifenil
DDT	diklorodifeniltrikloroetan
CO ₂	ugljikov dioksid
H ₂ S	sumporovodik
H ₂ O	voda
TCA	ciklus trikarboksilne kiseline
acetil-CoA	acetil koenzim A
HA	hranjivi agar
CFU	broj živih stanica bakterija po mililitru

TOC	ukupni organski ugljik
IC	anorganski ugljik
FTIR/ATR	infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama
OG	optička gustoća
LC-MS	tekućinska kromatografija-masena spektrometrija
SP	slijepa proba

Indeksi

0	početne vrijednosti
°	stupanj Celzijus

7. Literatura

1. Blair, C., Crawford B. Q.: Microplastic Pollutants 1st Edition, 2016, str 7., 66.-77., 85.,86.
2. Hrnjak Murgić Z., Zbrinjavanje polimernog otpada, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
3. Govorčin Bajsić E., Prerada polimera, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
4. S. H. Pinner, W. G. Simpson: Plastics: Surface and Finish, 1971., str. 9.
5. PlasticsEurope, 2021, An analysis of European plastics production, demand and waste data, the Facts 2021
6. Geyer R., Jambeck J.R. and Lavender Law K.: Production, use, and fate of all plastics ever made, Science Advances, 3, (2017.), 1-6.
7. <https://www.epa.gov/facts-and-figures-about-materials-waste-and-recycling/plastics-material-specific-data> pristup 17.06.2022.
8. <https://www.oecd.org/environment/plastic-pollution-is-growing-relentlessly-as-waste-management-and-recycling-fall-short.html> pristup 17.06.2022.
9. Paić, A., Određivanje toplinskih karakteristika mješavina poli(3-hidroksibutirat) /poli(etilen-oksidi), diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2010.
10. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S., 2008., Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnology Advances, 26(3), 246–265.
11. Chinaglia, S., Tosin, M., Degli -Innocenti, F., 2018., Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level. Polymer degradation and stability 147.
12. Hrnjak Murgić Z., Polimeri i polimerizacijski procesi, nastavni materijali, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
13. https://atlas.geog.pmf.unizg.hr/e_skola/geo/mini/pet_ambalaza/plastika.html pristup 28.06.2022.
14. Kratofil Krehula, Lj., Polimeri i polimerizacijski procesi, nastavni materijali, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
15. Govorčin Bajsić E., Polimerni inženjerski materijali, nastavni materijali, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

16. Nguyen, T., Evaluation of environmental conditions on the sorption of PAHs onto synthetic and natural fibres, Master's thesis in Environmental Toxicology and Chemistry, Norwegian University of Science and Technology, Norveška, 2019., str. 1–26.
17. <https://www.scrantonproducts.com/different-types-of-plastics-and-the-spi-codes/> pristup 15.6.2022.
18. <https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/dodatni/437306.pdf> pristup 15.6.2022.
19. R. Geyer, J. R. Jambeck, K. L. Law, Production, use, and fate of all plastics ever made.
20. Wypych, G.: PS polystyrene. Handbook of Polymers, (2012). 541–547.
21. Satterthwaite, K., Plastics Based on Styrene, u: Gilbert, M., Brydson's Plastics Materials, 2017., str. 61–62, 311–328.
22. Sameh S. Ali, Tamer Elsamahy, Rania Al-Tohamy, Daochen Zhu, Yehia A.-G. Mahmoud, Eleni Koutra, Metwally A. Metwally, Michael Kornaros, Jianzhong Sun, Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects, Science of The Total Environment, Volume 780, 2021
23. Satterthwaite, K., Plastics Based on Styrene, u: Gilbert, M., Brydson's Plastics Materials, 2017., str. 61–62, 311–328
24. Crawford, C. B., & Quinn, B., Physiochemical properties and degradation, Microplastic Pollutants, 2017., 57–100
25. <https://www.ambalazain.com/pribor-za-jelo/> pristup 07.06.2022.
26. <https://pizzashop.hr/wp-content/uploads/2022/02/Stiropor-kutija-za-hranu-MB3-bela-600x600-1.jpg> pristup 07.06.2022.
27. Akovali, G. (2012). Plastic materials: polyvinyl chloride (PVC). Toxicity of Building Materials, 23–53.
28. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=49251> pristup 19.6.2022.
29. <http://pg-pak.com/sr/pvc-i-pp-ambalaza/pvc-ambalaza-1000ml> pristup 20.06.2022.
30. Xu, C., Zhang, B., Gu, C., Shen, C., Yin, S., Aamir, M., Li, F., 2020a. Are we underestimating the sources of microplastic pollution in terrestrial environment? J. Hazard. Mater. 400, 123-228
31. Crawford, C. B., Quinn, B., Microplastics, standardisation and spatial distribution i The interactions of microplastics and chemical pollutants, u: Microplastic Pollutants, Amsterdam (2017) 101–130, 131–157

32. Dioses-Salinas D. C., Pizarro-Ortega C. I., De-la-Torre G. E.:A methodological approach of the current literature on microplastic contamination in terrestrial environments: Current knowledge and baseline considerations,Universidad San Ignacio de Loyola, Lima, Peru (2020.)
33. He, D., Luo, Y., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Microplastics in soils: analytical methods, pollution characteristics and ecological risks, Trends in Analytical Chemistry, 2018., 109
34. Carpenter, E. J., Smith, K. L., Plastics on the Sangrasso Sea Surface, Science 175 (1972) 1240-1241.
35. Rands, M.R.W., Adams, W.M., Bennun, L., Butchart, S.H.M., Clements, A., Coomes, D. Entwistle, A., Hodge, I., Kapos, V., Scharlemann Jr., P.W. Sutherland, W.J., Vira, B., 2010. Biodiversity conservation: challenges beyond 2010. Science 329, 1298–1303.
36. Nerland I. L., Halsband C., Allan I., Thomas K. V., 2014. Microplastics in marine environments: Occurrence, distribution and effects. Norwegian Institute for Water Research.
37. C. Li, R., 2020., Busquets and L.C. Campos, Assessment of microplastics in freshwater systems: A review, Science of the Total Environment
38. Derraik, J.G.B., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Marine Pollution Bulletin 44, 842–852.
39. Boucher, J.; Friot, D. Primary Microplastics in the Oceans: a Global Evaluation of Sources; IUCN: Gland, Switzerland, 2017
40. De Falco, F., Cocca, M., Avella, M., & Thompson, R. C. (2020). Microfibre release to water, via laundering, and to air, via everyday use: a comparison between polyester clothing with differing textile parameters. Environmental Science & Technology.
41. <https://www.europarl.europa.eu/news/hr/headlines/society/20181116STO19217/mikroplastika-izvori-posljedice-rjesenja> pristup 19.6.2022
42. Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Thompson, R. C. (2009). International Pellet Watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. Marine Pollution Bulletin, 58(10), 1437–1446
43. F. Galgani, and et al. (2010) Marine strategy framework directive Task Group 10 Report Marine litter, Report for JRC and DG ENV, April 2010.

44. Sherrington, C., Darrah, C., Hann, S., Cole, G., Corbin, M., Microplastics in Cosmetics Products u Study to support the development of measures to combat a range of marine litter sources, Report for the European Commission DG Environment (2016) 201-292.
45. M. Cole, P. Lindeque, C. Halsband, T. S. Galloway; Microplastics as contaminants in the marine environment: A review, *Marine Pollution Bulletin* 62, 2011., 2588–2597.
46. Chen G, Feng Q, Wang J. Mini-review of microplastics in the atmosphere and their risks to humans. *The Science of the Total Environment*. (veljača 2020.)
47. Guo, J.-J., Huang, X.-P., Xiang, L., Wang, Y.-Z., Li, Y.-W., Li, H, Cai, Q.-Y., Mo, C. H., Wong, M.-H., 2020., Source, migration and toxicology of microplastics in so *Environment International*, 137, 105263
48. 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
49. Lebreton L., Egger M. & Slat B., 2019., A global mass budget for positively buoyant macroplastic debris in the ocean. *Nature Scientific Reports*
50. Horton, A.A., Svendsen, C., Williams, R.J., Spurgeon, D.J., Lahive, E., 2017. Large microplastic particles in sediments of tributaries of the River Thames, UK – abundance, sources and methods for effective quantification., *Marine pollution bulletin*. 114, 218–226
51. Li, C., Busquets, R., & Campos, L. C. (2020). Assessment of microplastics in freshwater systems: A review. *Science of The Total Environment*, 707, 135578.
52. Free, C.M., Jensen, O.P., Mason, S.A., Eriksen, M., Williamson, N.J., Boldgiv, B., 2014. Highlevels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake., *Marine pollution bulletin*. 85, 156–163
53. Panno, S.V., Kelly, W.R., Scott, J., Zheng, W., McNeish, R.E., Holm, N., Hoellein, T.J. Baranski, E.L., 2019. Microplastic contamination in karst groundwater systems. *Groundwater* 57, 189–196
54. Wong, K. H. J., Lee, K. K., Tang, K. H. D., & Yap, P.-S., 2020., Microplastics in the freshwater and terrestrial environments: Prevalence, fates, impacts and sustainable solutions. *Science of The Total Environment*, 137-512
55. Mintenig, S.M., Löder, M.G.J., Primpke, S., Gerdts, G., 2019. Low numbers of microplastics detected in drinking water from ground water sources., *The Science of the total environment*. 648, 631–635

56. Yao, L., Hui, L., Yang, Z., Chen, X., & Xiao, A., 2019., Freshwater Microplastics Pollution: Detecting and Visualizing Emerging trends Based on Citespace II. *Chemosphere*, 125-627
57. C. Li, R. Busquets and L.C. Campos, Assessment of microplastics in freshwater systems: A review, *Science of the Total Environment*, 2019.
58. <https://www.eea.europa.eu/hr/> pristup 20.06.2022.
59. Van Cauwenbergh L., Devriese L., Galgani F., Robbens J., Janssen C. R., 2015., Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research* 111, 5-17
60. Roman, L., Kastury, F., Petit, S., Aleman, R., Wilcox, C., Hardesty, B.D., Hindell, M.A., 2020. Plastic, nutrition and pollution; relationships between ingested plastic and metal concentrations in the livers of two *Pachyptila* seabirds. *Sci. Rep.* 10, 18023.
61. Rudel RA, Attfield KR, Schifano JN, Brody JG. Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. *Cancer*. 2007 Jun 15;109(12 Suppl):2635-66
62. Gray J, Evans N, Taylor B, Rizzo J, Walker M. State of the evidence: the connection between breast cancer and the environment. *Int J Occup Environ Health*. 2009 Jan-Mar;15(1):43-78
63. Benachour N, Aris A. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Dec 15;241(3):322-8
64. Leskovac M., Dodatci za polimerne materijali i proizvode, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2018.-2019.
65. Tickner, J. A., Schettler, T., Guidotti, T., McCally, M., Rossi, M., Health risks posed by use of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: A critical review, *American Journal of Industrial Medicine* 39 (2001) 100-111.
66. <https://www.bioinstitut.hr/blog/kemija/poliklorirani-bifenili-pcb-97/> pristup 29.6.2022.
67. Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Thompson, R. C. (2009). International Pellet Watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Marine Pollution Bulletin*, 58(10), 1437–1446
68. D. J. Martins, DDT and malaria, *Swara*, travanj-lipanj 2003., 14.

69. Browne, M. A., Niven, S. J., Galloway, T. S., Rowland, S. J., & Thompson, R. C., 2013., Microplastic Moves Pollutants and Additives to Worms, Reducing Functions Linked to Health and Biodiversity. *Current Biology*, 23(23), 2388–2392
70. Hui, M., Shengyan, P., Shibin, L., Yingchen, B., Mandal, S., & Baoshan, X., 2020., Microplastics in aquatic environments: Toxicity to trigger ecological consequences. *Environmental Pollution*
71. J.Rhodes C. Plastic pollution and potential solutions. *Science Progress*. 2018; 101(3): 219-253
72. Ng W., Ting Y., 2018., Bacterial surface charge in “layers”: revealed by wash buffers of different ionic strength. *PeerJ Preprints*
73. F.K. Mammo, I.D. Amoah, K.M. Gani, et al., Microplastics in the environment: Interactions with microbes and chemical contaminants, *Science of the Total Environment*, 2020.
74. Pathak, V.M., and Navneet, Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach, *Bioresour. Bioprocess*. 2017; 4:15: 1-25
75. Chinaglia, S., Tosin, M., Degli -Innocenti, F., 2018., Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level. *Polymer degradation and stability* 147, 237-244
76. Tokiwa Y, Calabia B. P., Ugwu C. U., Aiba S. Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009;10: 3722 – 3742
77. Orhan Y, Hrenović J, Büyükgüngör H. Biodegradation of plastic compost bags under controlled siol conditions, *Acta Chimica Slovenica*. 2004;51: 579 – 588.
78. Weigmann, H. (1898). Über zwei an der Käsereifung beteiligte Bakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung*. pp. 820–834.
79. Chester, Frederick D. (1901). *A Manual of Determinative Bacteriology*. New York: The MacMillan Company.
80. Clements, Laura D.; Miller, Brian S.; Streips, Uldis N. (August 2002). "Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *Escherichia coli*". *Systematic and Applied Microbiology*. 25 (2): 284–286.
81. Li, Xiaoyun; Wang, Dong; Cai, Dongbo; Zhan, Yangyang; Wang, Qin; Chen, Shouwen (2017-12-01). "Identification and High-level Production of Pulcherrimin in *Bacillus licheniformis* DW2". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 183 (4): 1323–1335.

82. Muras, Andrea; Romero, Manuel; Mayer, Celia; Otero, Ana (2021-02-16). "Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*". *Critical Reviews in Biotechnology*. 41 (4): 609–627
83. Veith, B., Herzberg, C., Steckel, S., Feesche, J., Maurer, K. H., Ehrenreich, P., Bäumer, S., Henne, A., Liesegang, H., Merkl, R., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. (2004) The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7(4):204-211.
84. <https://www.flickr.com/photos/21997898@N04/14881841629> pristup 29.6.2022.
85. Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Kishore Sakharkar, M., Lim, C. S., Sakharkar, K.R., Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species, *Indian. J. Microbiol.* 52(3) (2012) 411 – 419.
86. Duraković, S., *Primjenjena mikrobiologija*, Durieux, Zagreb, 1996.
87. A. Ganesh Kumar, M. Hinduja, K. Sujitha, N. Nivedha Rajan, G. Dharani, Biodegradation of polystyrene by deep-sea *Bacillus paralicheniformis* G1 and genome analysis, *Science of The Total Environment*, Volume 774, 2021.
88. Eisaku, O., Linn, K., Takeshi, E., Taneaki, O., Yoshinobu, I., 2003. Isolation and characterization of polystyrene degrading microorganisms for zero emission treatment of expanded polystyrene. *Environ. Eng. Res.* 40, 373–379.
89. Mohan, A.J., Sekhar, V.C., Bhaskar, T., Nampoothiri, K.M., 2016. Microbial assisted high impact polystyrene (HIPS) degradation. *Bioresour. Technol.* 213, 204–207.
90. Kumari, A., Chaudhary, D. R., & Jha, Destabilization of polyethylene and polyvinylchloride structure by marine bacterial strain, *Environmental Science and Pollution Research* 26(2) (2019) 1507-1516.
91. Khandare SD, Chaudhary DR, Jha B. Bioremediation of polyvinyl chloride (PVC) films by marine bacteria. *Mar Pollut Bull.* 2021 Aug;169:112566.
92. Giacomucci L, Raddadi N, Soccio M, Lotti N, Fava F. Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. *N Biotechnol.* 2019 Sep 25;52:35-41.
93. Bisutti, I., Hilke, I., Raessler, M., Determination of total organic carbon – an overview of current methods, *TrAC* 23 (2004) 10 – 11.
94. Visco, G., Campanella, L., Nobili, V., Organic carbons and TOC in waters: an overview of the international norm for its measurements, *Microchemical Journal* 79 (2005) 185–191.

95. Keller, B., Sui, J., Young, A. B., Whittal, R. M., Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 627(1) (2008) 71-81.
96. Bailey FE, Koleske JV (2000). "Polyoxyalkylenes". *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH
97. Stone CA, Liu Y, Relling MV, Krantz MS, Pratt AL, Abreo A, et al. (May 2019). "Immediate Hypersensitivity to Polyethylene Glycols and Polysorbates: More Common Than We Have Recognized". *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*. 7 (5): 1533–1540.
98. Wenande E, Garvey LH (July 2016). "Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review". *Clinical and Experimental Allergy*. 46 (7): 907–22.
99. Costa, Diana & Cunha, Vanessa & Perotti, Gustavo & Henriques, Ruan & Júnior, Jorge & Shiguihara, Ana. (2020). Effect of Nonionic Surfactants on the Crystallinity and Thermal Stability of Poly(vinyl alcohol) Film. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*.
100. Lm, Naresh & Sivaprakasam, Senthilkumar. (2016). *Process Design and Optimization for Platform Chemical Biorefinery*.
101. <http://ba.bmcmould.com/info/these-7-materials-can-improve-the-wear-resista-48690502.html> pristup 25.07.2022.
102. Girdthep, Sutinee & Punyodom, Winita & Molloy, Robert & Channuan, Wasinee. (2022). Effect of Tween 80 on the Mechanical and Thermal Properties of Solution-Cast Blends of Poly(lactic acid) and Cellulose Acetate Butyrate Films.
103. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 1030, Propylene glycol.
104. Strong MJ, Garruto RM, Wolff AV, Chou SM, Fox SD, Yanagihara R. N-butyl benzenesulfonamide: a neurotoxic plasticizer inducing a spastic myelopathy in rabbits. *Acta Neuropathol*. 1991.
105. Jung, M. R., Horgen, F. D., Orski, S. V., Rodriguez, C. V., Beers, K. L., Balazs, G. H., Jones, T. T., Work, T. M., Brignac, K. C., Royer, S.-J., Hyrenbach, K. D., Jensen, B. A., Lynch, J. M., Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms, *Marine Pollution Bulletin* 127 (2018) 704– 716.
106. Lin, Hong-Han & Liu, Hsiao-Han. (2020). FTIR Analysis of Biodegradation of Polystyrene by Intestinal Bacteria Isolated from *Zophobas Morio* and *Tenebrio Molitor*. *Proceedings of Engineering and Technology Innovation*.

107. Subramani, M., Sepperumal, U., FTIR analysis of bacterial mediated chemical changes in Polystyrene foam, *Ann. Biol. Res.* 7(5) (2016) 55 – 61.
108. Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., Ragadhita, R., How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material, *Indonesian Journal of Science & Technology* 4(1) (2019) 97-118.
109. Park, E. J., Lee, S. Y., Canlier, A., & Hwang, T. S., Controlled Dehydrochlorination of Poly(vinyl chloride) for Fabrication of Membranes with Polyacetylene-Like Structure: XPS Analysis and Ion Exchange Membrane Discussion, *Macromolecular Research* 27 (2019) 33-47.
110. Ledda, C., Rapisarda, V., Bracci, M., Proietti, L., Professional exposure to basaltic rock dust: assessment by the *Vibrio fischeri* ecotoxicological test, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 8(23) (2013) 1-5.
111. Kučić-Grgić, D., *Ekotoksikologija*, 5. predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2019./2020
112. Xu, Yaqian & Liu, Shu-Shen & Li, Kai & Wang, Ze-Jun & Xiao, Qian-Fen. (2019). Polyethylene glycol 400 significantly enhances the stimulation of 2-phenoxyethanol on *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67 bioluminescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 171. 240-246. 10.1016/j.ecoenv.2018.12.087.
113. Crnjac, M., Gjedlum, N., Bilić, B., The application of Taguchi method for choosing the optimal table construction, International conference “Mechanical Technologies and Structural Materials”, MTSM2017, Split, 21-22.09.2017.
114. Damayanti, N., Sulaiman, N., & Ibrahim, N. (2020). Plastic Biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* UKMCC1011 Using A Modified Winogradsky Column. *Scientific Journal Of PPI - UKM*, 7(2), 43-49.
115. <https://www.statease.com/docs/v11/contents/analysis/anova-output/> pristup 13.06.2022.
116. <https://www.statology.org/anova-f-value-p-value/> pristup 13.06.2022.

ŽIVOTOPIS

Ornella Host [REDACTED] Obrazovanje započinje u Osnovnoj školi „Pehlin“, te nakon toga upisuje srednju Medicinsku školu u Rijeci – smjer: farmaceutski tehničar. Fakultetsko obrazovanje započinje 2015. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer kemijsko inženjerstvo. Preddiplomski studij završava uz temu završnog rada „Biorazgradnja mikroplastike u okolišu“ pod mentorstvom doc. dr. dc. Dajane Kučić Grgić. Stručnu praksu odradila je u tvrtki „Pliva Hrvatska d.o.o.“. Godine 2020. upisuje diplomski studij kemijsko inženjerstvo, modul: kemijsko inženjerstvo u zaštiti okoliša, na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Tijekom studija radi studentski posao u tvrtki „Pliva Hrvatska d.o.o.“, te sudjeluje na Erasmus+ projektu na temu „Environmental education through non-formal learning“ koji se održao u Portugalu.