

Bioremedijacija vode onečišćene mikroplastičnim česticama polistirena primjenom bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes*

Puškarčić, Marika

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:149:182833>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-25**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
DIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO

Marika Puškarić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja Marika Puškarić

Predala je izrađen diplomski rad dana: 21. rujna 2022.

Povjerenstvo u sastavu:

Doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Dr. sc. Matija Cvetnić, poslijedoktorand, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 26. rujna 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
DIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO

Marika Puškarić

**Bioremedijacija vode onečišćene mikroplastičnim česticama
polistirena primjenom bakterijske kulture *Pseudomonas
alcaligenes***

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

Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na pruženoj prilici za rad na ovako opsežnom projektu radi kojeg sam imala priliku steći nove vještine i naučiti mnogo toga o gorućoj temi po pitanju zaštite okoliša. Sve pohvale za ažurnu komunikaciju, pristupačnost i razumijevanje mojih ideja.

Nadalje, hvala Martini Miloloži, mag. ing. oecoing., koja mi je od prvog dana asistirala u provođenju pokusa i bila na raspolaganju u svakom trenutku. Asistenta toliko posvećenog radu sa studentima nije lako pronaći. Zbog Vas je sve ovo bilo lakše prehodati.

Hvala Kristini Bule, mag. ing. oecoing. te Viktoriji Prevarić, mag. ing. cheming. za izdvojeno vrijeme i pripomaganje s analitičkim tehnikama.

Za kraj hvala i ostatku Zavoda za industrijsku ekologiju na odličnoj atmosferi i međusobnom poticanju te podršci tijekom vremena provedenog u laboratoriju.

Posebnu zahvalu zaslužuju moja majka Željka koja je vjerovala u mene više nego ja sama, dečko Bartol i najbolji prijatelji Nikolina i Luka koji su mi služili kao inspiracija i oslonac da studij privedem kraju.

SAŽETAK

Razgradnja pogrešno zbrinutog ili nezbrinutog polimernog otpada u okolišu dugotrajan je proces s neželjenim i zabrinjavajućim produktima. Na taj način, uslijed klimatskih utjecaja, dolazi do slabljenja fizikalnih i kemijskih svojstava plastičnog materijala, ali i njegova propadanja što pak otvara mogućnost migracije zrakom ili vodom do živih organizama. Takve čestice, kojima se još uvijek ne zna točan rizik, a predstavljaju veliku zabrinutost, nazivamo mikroplastika (MP). MP kategoriziramo kao polimerne čestice veličine manje od 5 mm. Glavni fokus do sada bio je na ekotoksikološkim istraživanjima, a sada i na pokušaj dizajna alternativnog sustava za bioremedijaciju glavnih sastavnica okoliša u svrhu zaštite od potencijalnih štetnih učinaka na ekosustave. Cilj ovog rada bio je razgradnja MP-a polistirena (PS) i poli(vinil-klorida) (PVC) pomoću bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes* u vodenom okolišu i evidentiranje potencijalnih štetnih učinaka nepoznatih metabolita koji pritom mogu nastati. Primijenjen je puni faktorski plan (eng. *Full factorial design*) za postavljanje pokusa s tri čimbenika na tri razine. Glavni ispitivani čimbenici u pokusu s PS-om bili su veličina čestica, broj okretaja i optička gustoća (OG), a s PVC-om pH-vrijednost, koncentracija MP-e i OG. Pokus se provodio tijekom 30 dana, a uzorci za analizu izuzimani su u 0., 3., 7., 14., 21. i 30. danu. U navedenim danima pratila se koncentracija organskog i anorganskog ugljika, OG, CFU i nastajanje nusprodukata procesa HPLC-MS analizom. Analiza promjena u strukturi čestica PS-a i PVC-a nakon pokusa provedena je FTIR-ATR spektroskopijom, a toksičnost filtrata određena je bakterijom *V. fischeri*. Svim navedenim analizama potvrđeno je da u procesu uistinu dolazi do promjena u strukturi plastike što indicira da se ona biorazgrađuje. Analizom varijance (ANOVA) potvrđeno je da je model značajan u oba pokusa, a da su optimalni uvjeti za provođenje pokusa s PS-om: broj okretaja od 180 o/min, veličina MP-a 203 μm i OG 0,27. U pokusu s PVC-om idealni su uvjeti pH 7, γ_{MP} 50 mg/L i OG 0,3.

Ključne riječi: mikroplastika, *Pseudomonas alcaligenes*, bioremedijacija, puni faktorski plan, polistiren, poli(vinil-klorid)

ABSTRACT

Decomposition of incorrectly disposed or unmanaged polymer waste in the environment is a long-term process with unwanted and worrying products. In this way, climatic influences enable weakening of physical and chemical properties of plastic material but also its decay, which in turn opens the possibility of migration by air or water to living organisms. Such particles, whose exact risk is still unknown and of great concern, are called microplastics (MP). They are categorized as polymer particles smaller than 5 mm in size. The main focus so far has been on ecotoxicological research, but now also on trying to design an alternative system for bioremediation of the main components of the environment in order to protect the ecosystems against potential adverse effects. The aim of this study was to biodegrade polystyrene and polyvinyl chloride MP by use of *Pseudomonas alcaligenes* bacterial culture in an aquatic environment and to record the potential adverse effects of unknown metabolites that may occur. A Full factorial design was applied to set up a three-factor experiment on three levels. The main factors in the PS experiment were particle size, number of revolutions, and optical density (OG) and with PVC there were pH value, MP concentration and optical density (OG). The experiment was conducted for 30 days and samples were taken on the 0., 3., 7., 14., 21. and 30. day. In aforementioned days we monitored the concentration of organic and inorganic carbon, OG, CFU and by-products formation with HPLC-MS analysis. Analysis of changes in the PS and PVC particle structure after the experiment was carried out by FTIR-ATR spectroscopy and the toxicity of the filtrate was determined by use of bacteria *V. fischeri*. All the aforementioned analyzes confirmed that the process actually causes changes in the structure of the plastic, which indicates that it biodegrades. Analysis of variance (ANOVA) confirmed that the model is significant in both experiments and that the optimal conditions for conducting experiments with PS are: number of revolutions of 180 rpm, MP size 203 μm and OG 0,27. In the experiment with PVC, the ideal conditions are pH 7, γ_{MP} 50 mg/L and OG 0,3.

Keywords: microplastics, *Pseudomonas alcaligenes*, bioremediation, Full factorial design, polystyrene, polyvinyl chloride

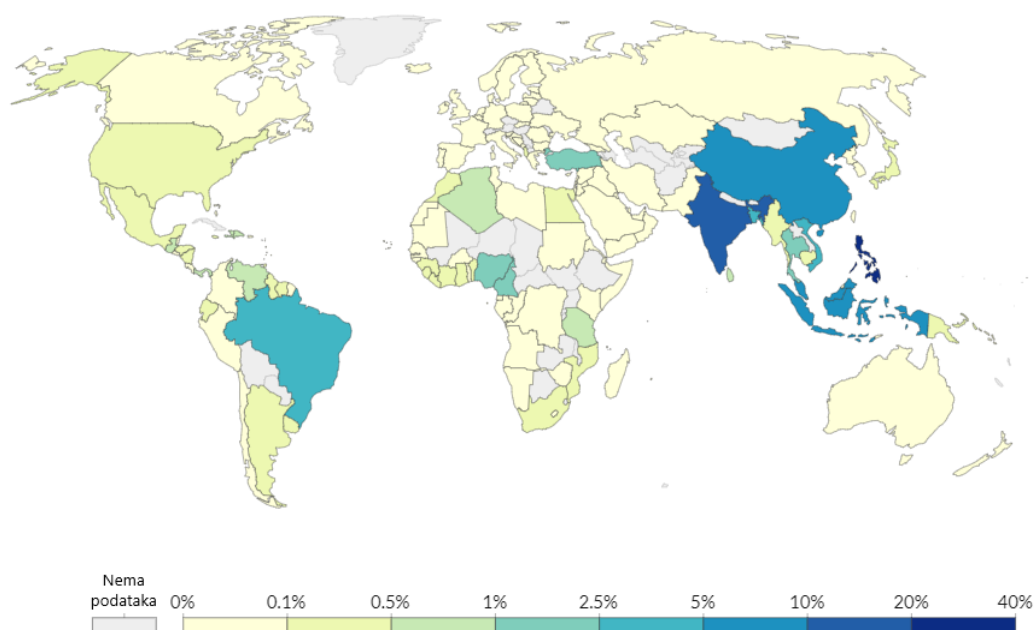
Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	OPĆI DIO	4
2.1.	Mikroplastika	4
2.2.	Biorazgradnja mikroplastike u vodenom okolišu.....	6
2.3.	Biorazgradnja polistirena.....	10
2.4.	Biorazgradnja poli(vinil-klorida)	15
2.5.	Toksičnost mikroplastike.....	17
2.6.	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	19
2.7.	Enzimi kao pokretači biorazgradnje.....	21
2.8.	Predobrada mikroplastike – ubrzanje procesa biorazgradnje	22
2.9.	Dizajn eksperimenta	23
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1.	Materijali	26
3.1.1.	Mikroplastika	26
3.1.2.	Mikroorganizam.....	26
3.2.	Kemikalije i mediji.....	26
3.2.1.	Mineralni medij.....	26
3.2.2.	Hranjiva podloga	27
3.2.3.	Fiziološka otopina	27
3.2.4.	Etanol.....	27
3.3.	Mjerni instrumenti i oprema	27
3.4.	Metode rada	28
3.4.1.	Dobivanje i sterilizacija MP-a.....	28
3.4.2.	Uzgoj bakterijske kulture <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	29
3.4.3.	Biorazgradnja PS-a i PVC-a pomoću kulture <i>Pseudomonas alcaligenes</i> prema punom faktorskom planu	29
3.4.4.	Određivanje CFU	32
3.4.5.	Određivanje organskog (TOC) i anorganskog (TIC) ugljika	32
3.4.6.	HPLC-MS analiza	32
3.4.7.	FTIR-ATR spektroskopija	32
3.4.8.	Test toksičnosti produkata biorazgradnje pomoću <i>Vibrio fischeri</i>	32
4.	REZULTATI.....	34
4.1.	Rezultati biorazgradnje mikroplastičnih čestica polistirena	34
4.1.1.	Rezultati promjene logaritamske CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje polistirena primjenom bakterije <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	34
4.1.2.	Rezultati promjena koncentracije TOC i TIC tijekom biorazgradnje polistirena primjenom bakterije <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	37

4.1.3.	Rezultati praćenja otpuštenih aditiva s površine čestica polistirena HPLC-MS analizom ...	38
4.1.4.	Rezultati toksičnosti vodene faze nakon provedbe pokusa biorazgradnje polistirena primjenom bakterije <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	43
4.1.5.	Rezultati usporedbe strukture čestica polistirena prije i nakon biorazgradnje FTIR-ATR spektroskopijom.....	44
4.1.6.	Rezultati statističke analize varijance za pokus P1 s polistirenom.....	45
4.2.	Rezultati biorazgradnje mikroplastičnih čestica poli(vinil-klorida).....	48
4.2.1.	Rezultati promjene logaritamske CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje poli(vinil-klorida) primjenom bakterije <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	48
4.2.2.	Rezultati promjena koncentracije TOC i TIC tijekom biorazgradnje poli(vinil-klorida) primjenom bakterije <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	51
4.2.3.	Rezultati praćenja otpuštenih aditiva s površine čestica poli(vinil-klorida) klorida HPLC-MS analizom.....	53
4.2.4.	Rezultati toksičnosti vodene faze nakon provedbe pokusa biorazgradnje poli(vinil-klorida) primjenom bakterije <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	58
4.2.5.	Rezultati usporedbe strukture čestica poli(vinil-klorida) prije i nakon biorazgradnje FTIR-ATR spektroskopijom	59
4.2.6.	Rezultati statističke analize varijance za pokus P2 s poli(vinil-kloridom)	60
5.	RASPRAVA	63
5.1.	Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje polistirena i poli(vinil-klorida) primjenom bakterije <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	63
5.2.	Promjena koncentracije TOC i TIC tijekom biorazgradnje polistirena i poli(vinil-klorida) primjenom bakterije <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	66
5.3.	Praćenje otpuštenih aditiva iz mase ili s površine čestica polistirena i poli(vinil-klorida)	67
5.4.	Ispitivanje toksičnosti vodene faze dobivene nakon provedbe pokusa biorazgradnje polistirena i poli(vinil-klorida)	69
5.5.	Usporedbe strukture čestica polistirena i poli(vinil-klorida) prije i nakon biorazgradnje FTIR-ATR spektroskopijom	70
5.6.	Rezultati statističke analize varijance za pokuse biorazgradnje polistirena i poli(vinil-klorida)	71
6.	ZAKLJUČAK	74
7.	LITERATURA.....	75
8.	POPIS SIMBOLA I OZNAKA.....	83

1. UVOD

Pojam mikroplastika (MP) po prvi puta je osmišljen 2004. godine, ali prva istraživanja rasprostranjenosti plastike u vodenom okolišu odvila su se 70-ih godina prošlog stoljeća, tijekom ekspedicije u Sjevernom Atlantiku, što je dvadesetak godine kasnije dovelo do otkrića Velikog tihooceanskog otoka smeća (eng. *Great Pacific Garbage Patch*). Radi se zapravo o nakupini otpada, većinom polimernog tipa, koji se uslijed cirkuliranja morskih struja na području Sjevernog Pacifika formirao oko dvije tisuće kilometara dalje od obale Kalifornije. Površina otoka s vremenom se povećava i svake godine uzrokuje smrt velikog broja morskih sisavaca, kornjača i riba.¹ Osim na površini mora, MP-e je s vremenom pronađena i u pelagijskoj zoni te Arktičkom ledu, uključujući polistiren (PS), polietilen (PE), polipropilen (PP), poliester i druge materijale, a očekivana budućnost MP-a u vodenom okolišu je u bentosu. Postoji niz mehanizama kojima tamo dospijeva s površine poput vertikalnog strujanja, tonjenja gušćeg otpada ili plutajućih krhotina uslijed stvaranja bioloških naslaga, životinjskih migracija itd.² Analiza za 2019. godinu na slici 1. pokazuje da najveće količine pogrešno zbrinutog polimernog otpada potječu iz Kine, Indije i Brazila. Teritorijalni položaj ovih zemalja dodaje vjerojatnosti da sav taj otpad pronade put to oceana i drugih vodenih površina. Nije neobično da se ovdje kao predvodnik nalazi Kina čiji stanovnici unatoč raznim pokušajima zabrane i dalje uvelike koriste upravo jeftine polimerne proizvode kratkog životnog ciklusa.³



Slika 1. Udio plastičnog otpada koji dospijeva u oceane na globalnoj razini.⁴

Zbog diskrepancije između metričkog i imperijalnog sustava mjernih jedinica te zamršene procjene migracija polimernog otpada, donekle je otežano zaključiti koja količina mikroplastičnog otpada dospijeva u oceane svake godine. Europska okolišna agencija objavila je da ta brojka iznosi oko 1,5 milijuna tona godišnje prema istraživanju iz 2017.⁵ Iz tog razloga velik broj država koje predvode u gospodarstvenoj utrci već godinama ističu polimerni otpad kao prominentnu opasnost za vodene ekosustave i čovjeka. SAD su još 2015. godine donijele zakon koji zabranjuje dodavanje plastičnih zrnca u kozmetičke i higijenske proizvode. Slično radi i Europska agencija za kemikalije 2019. godine, prijedlogom koji bi smanjio onečišćenje okoliša MP-om za čak 500 000 tona u razdoblju od 20 godina. Konačna odluka trebala bi biti donesena tijekom ove godine.⁶

Sve češći pronalazak raznog polimernog otpada u nasukanim životinjskim leševima alarmirao je čovječanstvo i znanstvenu zajednicu, što je dovelo do porasta u količini objavljenih znanstvenih radova na temu onečišćenja MP-om za gotovo cijeli red veličine u zadnjih deset godina. Ta zabrinutost pretočila se i u nepoznavanje potencijalnih štetnih učinaka i promjena do kojih može doći u ekosustavu. Utjecaj je evidentan, ali pitanje je koliko je značajan. Godine prikupljanja podataka o bioakumulaciji polimernih čestica u ribama dovele su do zaključka o neizbježnoj biomagnifikaciji kroz proizvodni lanac. Prisutnost MP-e u vodenom okolišu vrlo je složen problem koji se istražuje i opisuje kroz razne varijable. Od različitog sastava, veličine, aditiva, otpornosti i fizikalno-kemijskih svojstava polimera do nepouzdanog ponašanja u nekontroliranim i promjenjivim uvjetima u okolišu, osobito vodenom, sve te minuciozne razlike čine istraživanje dugotrajnim i kompleksnim. Trenutno se koriste razne fizikalne, kemijske i biološke metode za remedijaciju vode onečišćene česticama MP-a. Najučinkovitije metode su korištenje membranskih bioreaktora (>99%) i aktivnog mulja (98%). Prikladne su za tretiranje ulaznih struja različitih sastava na većoj skali, ali troše puno energije te su membrane sklone obraštanju. Postrojenja za obradu otpadnih voda, koja koriste procese koagulacije i aglomeracije za uklanjanje onečišćivala pomoću soli na bazi željeza i aluminija također postižu dobre rezultate (>95%).⁷ Postoji opcija korištenja dinamičkih membrana ili elektrokoagulacije, koje obje postižu učinkovitost preko 90%.⁷ Ipak, velik broj znanstvenika prepoznao je potencijal korištenja autohtonih moskih organizama i bakterija pri razgradnji MP-a. Radi se o prirodnom procesu u kojem organska tvar bakterijama, kvascima ili gljivama služi kao izvor ugljika i energije. Plastične čestice dobar su supstrat za mikroorganizme, osobito kada oni posjeduju odgovarajuće enzime za depolimerizaciju materijala. Glavni produkti biorazgradnje su oligomeri i monomeri, CO₂, voda i minerali.

Jedini problem jest u tome što učinkovitost ovisi o tipu mikrobne zajednice i sukladno tome postiže vrijednosti učinkovitosti od 20% nadalje.⁷

U ovom radu ispitan je bioremedijacijski potencijal bakterijske vrste *Pseudomonas alcaligenes* prilikom razgradnje mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a različitih veličina u vodenom okolišu u svrhu definiranja optimalnih uvjeta za provođenje navedenog procesa. Ekperiment je dizajniran prema punom faktorskom planu koji je omogućio praćenje utjecaja koji različite razine faktora imaju na ishod procesa.

2. OPĆI DIO

2.1. Mikroplastika

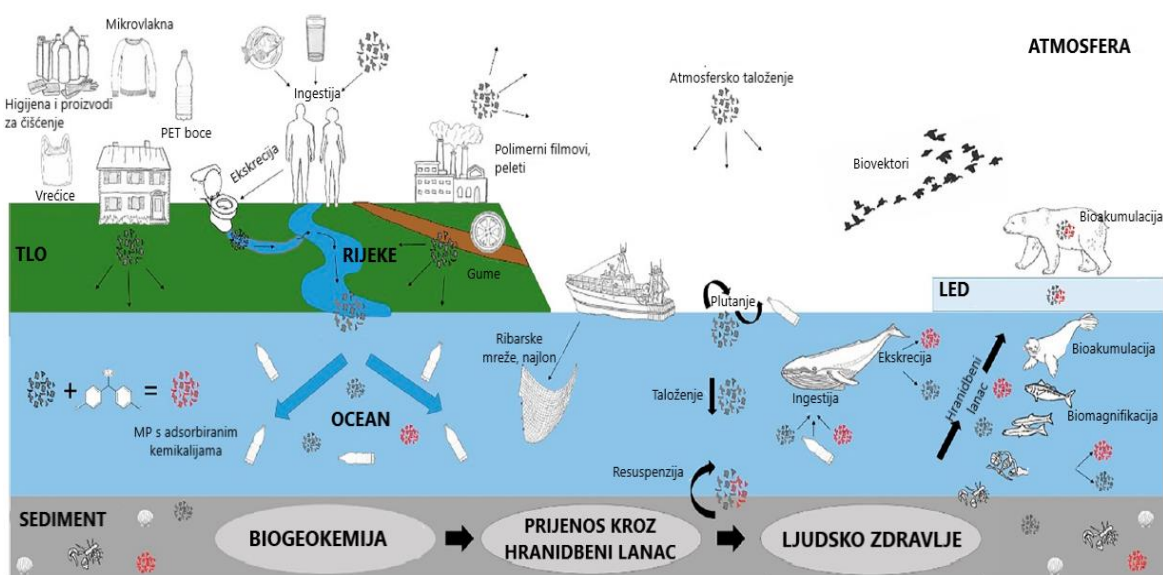
Glavna karakteristika mikroplastike definirana je veličinom 1 μm - 5 mm, a dijeli se na primarni i sekundarni tip. Primarna je originalno proizvedena kao MP u obliku sitnih peleta ili perli dok je češći nastanak sekundarne MP-e fizikalno-kemijskom transformacijom većih komada plastike.¹ Na slici 2. vidljiva je mješavina karakterističnih tipova. Primarna je prepoznatljiva prema pravilnijem obliku nalik sferi, dok sekundarna ima nepravilne rubove zbog nejednolike štete koja na njoj nastaje djelovanjem okolišnih uvjeta.



Slika 2. Morfološka razlika između primarne i sekundarne mikroplastike.⁸

Još manje čestice, veličine ispod 100 nm, nazivaju se nanoplastika (NP), a nastaju istim putem kao i MP. S obzirom na svoju veličinu i specifičnu površinu posjeduju još veću vjerojatnost apsorpcije ili adsorpcije i samim time akumulacije hidrofobnih tvari s visokim udjelom ugljika. Zato je ukupni volumen plastike i mikroplastičnih čestica u vodi zapravo heterogena mješavina kemijskih tvari koja može biti opasna po okoliš i uvelike utjecati na nepoželjne promjene u njemu.⁹ Prema obliku čestica razlikujemo vlakna, filmove, fragmente i pelete. Najčešći oblik MP-a su vlakna i fragmenti, od čega je fragmente ujedno najteže ukloniti zbog njihove morfologije.¹⁰ Izvori MP-a obično su pogrešno zbrinuti otpad iz kućanstava i industrije s naglaskom na obradu otpadnih voda, industriju plastike, tekstilnu industriju i akvakulturu. Od mjesta gdje je odbačena prema oceanima može putovati riječnim putevima, zrakom i atmosferom, ispiranjem i putem pogrešno zbrinute ili neobrađene otpadne vode.¹

Tragično jest da ribarske mreže, čovjekov alat za pribavljanje hrane iz mora, danas stižu u naš prehrambeni lanac i nehotice postaju jedna od glavnih prijetnji za ljudsko zdravlje. Unatoč rastućoj količini članaka i istraživanja na ovu temu donedavno se ciklus plastike u okolišu sastojao isključivo od migracije s kopna na more. Osim toga, nije bilo neuobičajeno fokusirati istraživanja na segmentirane elemente okoliša poput tla, slatke i morske vode, ali i atmosfere. Takav pristup očigledno nije ispravan kako su svi ti elementi međusobno povezani bez strogih granica. Samim time, iako je uobičajen transport MP-e s kopna u more, nije isključen i povratni proces uslijed intenzivnih vremenskih uvjeta ili oseke.¹¹ Za potrebe boljeg shvaćanja sudbine plastike u okolišu i nepovratnih učinaka koje može imati na životinjski svijet i čovjeka, 2019. godine znanstvenici Bank i Hansson predložili su biogeokemijski ciklus plastike kao proširenu verziju Rochmanovog rada iz iste godine (slika 3.).¹² Do ulaska MP-e u okoliš sve češće dolazi nekonvencionalnim putevima poput odbacivanja poljoprivrednih folija, odjeće (vlakna), abrazijom guma, otpadom s putničkih brodova te kroz sustav odvodnje i kanalizaciju. Velika količina MP-e može se pronaći u otpadnim vodama, ali i površinskim vodama oceana, jezera i rijeka. Vidljivo jest da su polimerne čestice iz različitih antropogenih izvora sveprisutne u svim sastavnicama okoliša, gdje stupaju u interakcije s raznim drugim spojevima. Rezultate tih interakcija često je teško specificirati i pobliže opisati, pošto je nezahvalan posao pokušati obuhvatiti izgleda za međudjelovanje različitih polimera s drugim prisutnim ksenobioticima.



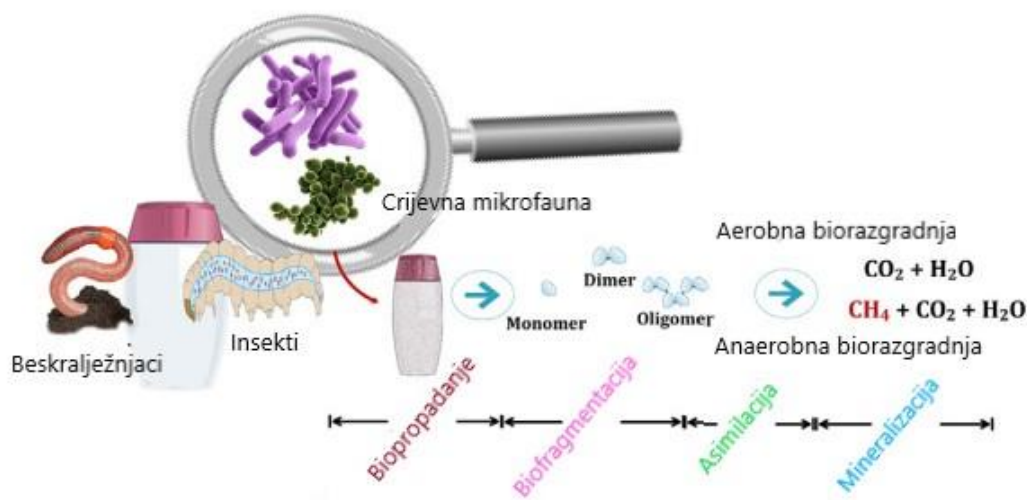
Slika 3. Model životnog ciklusa plastike iz različitih izvora u okolišu.¹²

Morske životinje lako mogu zamijeniti polimerni materijal ili čestice za hranu zbog čega nerijetko dospijevaju u njihov organizam. Različite studije pokazale su posljedice koje MP ostavlja po organizme, od raznih upalnih procesa, promjena u hranjenju do smanjene brzine filtracije i respiracije te smanjenja uspješne reprodukcije i rasta.¹ Kod većih životinja vrećice, slamke i ambalaža nakupljaju se i začepljuju njihov gastrointestinalni trakt dok kod manjih ponovno putuju do vrha piramide putem hranidbenog lanca.¹³ Tu dolazimo i do opasnosti po čovjeka koji se nalazi na vrhu piramide, osobito danas kada se zbog ubrzanog tempa života iz zdravstvenih razloga sve više preporučuje korištenje prehrambenih proizvoda koji potječu iz mora. Aditivi koje sadrže polimeri štetni su za slatkovodne i morske organizme jer se otpuštaju u obliku raznih molekula i smola koje postaju toksične pri dovoljno visokim koncentracijama, odnosno utječu na endokrini sustav i uzrokuju promjene u bihevioralnom i reproduktivnom smislu.⁹ Postojani organski spojevi (POPs) hidrofobni su i lako se adsorbiraju na površinu MP-a u vodenom okolišu. S vremenom ulaze u manje organizme poput račića, a kasnije se dokazano putem hranidbenog lanca bioakumuliraju na višim razinama s dodatnom opasnosti od biomagnifikacije. Za primjer je dan slučaj translokacije benzo(α)pirena od račića *Artemia* sp. do ribe zebrice *Danio rerio* putem hranidbenog lanca.¹⁴ Identificirano je da se adsorbirati lako mogu PCB, PAH, DDT, HCH te toksični metali poput Al^{3+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Cr^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} dok se MP-e s vremenom pretvara u NP-e ili se iz nje mogu otpuštati BPA i PBDE.⁹ Zrnca PS-a i čestice PVC-a primjerice adsorbiraju otpadne Zn^{2+} i Cu^{2+} s antimikrobnim djelovanjem iz boje što znači da mogu biti vektori za teške metale.¹⁵ Tijekom godine postoje različite humanitarne akcije vađenja većih komada otpada iz vodenog okoliša, ali velik rizik predstavljaju MP-e i NP-e koje nisu lako prepoznatljive. S obzirom na nisku gustoću, MP-e čestice obično dugo plutaju na površini vode zbog čega smanjuju dospijeće zraka sunčeve svjetlosti do većih dubina i samim time mogućnost fotosinteze.¹³

2.2. Biorazgradnja mikroplastike u vodenom okolišu

Mikroorganizmi imaju tendenciju koristiti MP-e kao stanište i izvor ugljika. Oni koloniziraju čestice MP-a i na njoj stvaraju biofilm. Takav ekosustav dobio je naziv plastisfera, a sastoji se od mikroorganizama povezanih s organskim i anorganskim tvarima. Nakon vezanja za površinu polimera, mikroorganizmi proizvode izvanstanične polimerne tvari visoke molekulske mase koje biofilmu daju strukturnu cjelovitost i određuju fizikalno-kemijska svojstva. Zbog njih je olakšano vezanje stanica za površinu MP-a, a nadalje i metabolički proces.¹⁶ Do razgradnje većih komada plastike na manje pa čak i sitne mikro i

nano dijelove dolazi pucanjem veza unutar lanaca ugljikovodika uslijed fizikalnih, kemijskih i bioloških promjena u njihovom okruženju. Abiotički stresovi, mehanički, svjetlosni ili temperaturni te biotički procesi koje provode bakterije, alge i gljive, faktori su koji tijekom određenog vremena utječu na biorazgradnju polimera. Tijekom biorazgradnje dolazi do fizikalno-kemijske promjene materijala kako mu se smanjuju veličina i težina, ali i sastav. Produkti aerobne razgradnje su CO_2 , H_2O , minerali i biomasa, a anaerobne CO_2 , CH_4 i huminska tvar.¹⁸ Biorazgradnja MP-a sastoji se od nekoliko ključnih faza (slika 4.). Započinje razgradnjom većih čestica na sve manje dijelove, zatim na oligomere, dimere i monomere te konačno dolazi do njene mineralizacije. U tom procesu mikroorganizmi koriste izvanstanične enzime poput esteraza, lipaza, depolimeraza i peroksidaza čime se povećava hidrofilnost MP-e što pak olakšava adheziju mikrobne biomase i daljnje stvaranje biofilma.¹⁸ To može dovesti i do površinske razgradnje odnosno nastanka pukotina na površini MP-e. Međutim, detaljnije informacije o unutarstaničnim enzimima koje koriste mikroorganizmi u ovom procesu i dalje nisu široko istražene, ali naglasak se logično stavlja na detaljnije proučavanje biokemijskih svojstava i aktivnosti enzima depolimeraze. Neki od ključni predstavnika koji proizvode depolimerazu su *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia* sp., i *Azotobacter* sp.¹⁸ Podrazumijeva se da kako bi ovakav proces bio ikako provediv i dovoljno učinkovit, moraju biti zadovoljeni određeni uvjeti. Mikroorganizmi svakako moraju posjedovati adekvatne enzime za razgradnju, a na učinkovitost dodatno utječu uvjeti pH, temperature, vlage i veličine čestica.¹⁸ Najveći utjecaj na učinkovitost procesa imaju svojstva površine (hidrofilnost, veličina), struktura polimera (molekularna težina, raspored atoma, linearnost i razgranatost lanca) te fizikalno-kemijska svojstva (staklište, talište, modul elastičnosti, kristalna struktura).¹⁷



Slika 4. Koraci u biorazgradnji MP-a.¹⁹

Uglavnom vrijedi da su polimeri koji imaju linearne lance više biorasploživi, a povećanjem razgranatosti lanca mikroorganizmima je teže kolonizirati plastične čestice.²⁰ Isto tako, amorfni polimeri su podložniji mikrobnj razgradnji kao i oni s višom hidrofilnosti. Porastom hidrofilnosti smanjuje se kontaktni kut između vode i polimera zbog čega se mikroorganizmi lakše prihvaćaju za površinu polimera. Prema tome, plastici se u vlažnim uvjetima povećava topljivost i vjerojatnost razgradnje uslijed hidrolize.²⁰ Tako dolazi do cijepanja lanaca i stvaranja mjesta za prihvaćanje mikroorganizama te je iz tog razloga i veća vjerojatnost za učinkovitiju biorazgradnju MP-a u vodenom, odnosno morskom okolišu nego što je to na kopnu. Hidrofilnost je moguće povećati dodatkom surfaktanata Tween 80 ili natrijevog dodecil sulfata.²¹

Pri odabiru organizama za bioremedijaciju u Europi je potrebno poštovati Europsku legislativu. Pritom je zabranjeno koristiti organizme čije bi zdravlje i preživljavanje bilo kompromitirano kao rezultat izloženosti MP-u. To su svakako kralježnjaci, deseteronošci i glavonošci. Važno je da su unos i metabolizam MP-a brzi te da se čestice ne vraćaju u okoliš, a preporučuje se da se koriste autohtoni organizmi ili oni koji imaju rašireno stanište i koje je lako koristiti i kontrolirati.¹⁰

Biorazgradnja predstavlja ekološki prihvatljiv pristup kao dodatak svjetlosnoj, mehaničkoj i toplinskoj obradi i razgradnji, ali i zahtjevan i kompleksan proces s osjetljivim rasponom uvjeta ovisnim o primijenjenom mikroorganizmu i tipu polimera. Iz tog razloga od iznimne je važnosti dobro razumjeti detalje mehanizama i uvjeta biorazgradnje. Pored toga, osim autekoloških istraživanja provesti sinkološka ispitivanja učinkovitosti bakterijskih konzorcija. Trenutno je prepoznato oko 250 vrsta koje imaju relevantan potencijal k polimernoj razgradnji.¹⁷ Prepoznata koljena kojima pripadaju, njihova najčešća nalazišta te važnost za biorazgradnju prikazani su u tablici 1. Glavni predstavnik, govoreći o sposobnosti biorazgradnje iz koljena Proteobakterija je rod *Pseudomonas* s 216 identificiranih vrsta. Od Firmikuta se najviše ističe *Bacillus* s 282 identificirane vrste. Ova dva roda zauzimaju 21% i 15% ukupnih istraživanja biorazgradnje polimera odnosno 17% ako se koriste kao zajednički konzorcij.¹⁷

S vremenom se segmenti bioremedijacije unaprjeđuju, a istraživanja proširuju na kloniranje, korištenje čistih izoliranih kultura i matematičko modeliranje procesa. Kroz napredna istraživanja dokučeno je kako vrste iz rodova *Pseudomonas*, *Escherichia* i *Bacillus* imaju najviši bioremedijacijski potencijal na području plastičnog onečišćenja, a mogu se pronaći u raznim okruženjima poput odlagališta, reciklažnih dvorišta, crijevima insekata te u vodenom okolišu.²⁰ Njihova učinkovitost leži u prirodnom potencijalu da razgrade

dugolančane masne kiseline, a pokazalo se da *Pseudomonas* prednjači sa svojim bioremedijacijskim potencijalom u okolišu onečišćenom česticama MP-a zbog čega je i najšire istraživani rod od navedenih.²⁰

Tablica 1. Koljena iz kojih potječe najveći udio bakterija ispitivanih na biorazgradnju MP-a.¹⁷

Koljeno	Udio u istraživanjima	Nalazišta i primjena	Svojstva i važnost
Proteobakterije	48,0%	- medicina, industrija, agrikultura - najzastupljenija vrsta u aktivnom mulju u sustavima za obradu otpadnih voda, morskom sedimentu i različitim tipovima tla	- najveće i metabolički najraznolikije koljeno - gram-negativne - kemolitotrofne, kemoorganotrofne i fototrofne vrste - anaerobi i fakultativni aerobi - štapićaste, kuglaste i nitaste
Firmikuti	37,4%	- tlo - proizvodnja antibiotika i insekticida	- gram-pozitivne (većina), tvore endospore - aerobi i fakultativni anaerobi - ekstracelularni hidrolitički enzimi koji razgrađuju kompleksne polimere
Aktinobakterije	9,8%	- tlo i biljni materijal - proizvodnja antibiotika i mliječnih proizvoda	- gram-pozitivne - štapićaste ili nitaste - većinom aerobne

Nekoliko je izvještaja zadnjih godina sumiralo nastojanja u istraživanju procesa biorazgradnje, ali s izraženim poteškoćama kako ne postoji standardizacija prema kojoj bi različite rezultate bilo jednostavnije usporediti. Važno je dobro definirati tip razrjeđenja, obogaćivanje nutrijentima, izolaciju i skrining (eng. *screening*) kultura kako bi osigurali vjerodostojnost rezultata i konzistentnost te ponovljivost istraživanja.¹⁷ Prema kritičkom osvrtu Matjašič i sur. (2021.), nakon provedene literaturne sistematizacije s ciljem standardizacije bioremedijacijskih postupaka, može se naglasiti važnost istraživanja čestih polimernih onečišćivala poput PE, PP, PS, PAH, i PET. Zatim izolirati kulture s kontaminiranih lokacija poput odlagališta, aktivnog mulja iz postrojenja za obradu otpadnih voda, kontaminiranog tla i sedimenta te probavnog trakta beskralježnjaka. Preporučuje se

predobrada polimera UV ili sunčevom svjetlosti pri blagim temperaturama i mehaničkom abrazijom. Neobično jest da su u nekim studijama nerijetko nedovoljno detaljno opisani i klasificirani korišteni mikroorganizmi i tipovi polimera te eksperimentalni uvjeti (temperatura, pH, hranjivi medij, trajanje procesa, početna količina, veličina i stanje MP, optička gustoća). S obzirom na to da je FTIR spektroskopija često korištena kao dobar alat za uvid u biokemijske promjene u sustavu biorazgradnje, predloženo je da upravo ona postane dio standardnog ispitivanja, po mogućnosti u kombinaciji s drugim metodama poput HPLC-a za identifikaciju nastalih međuprodukata i ispuštenih aditiva ili pak metodama koje mogu pomoći s pobližom interpretacijom FTIR-a poput DSC, NMR, XPS ili GPC.¹⁷ Prema tome, u tablici 2. prikazano je koji elementi ovog rada zadovoljavaju prethodno navedene potrebe za jasnije razumijevanje i jednostavniju usporedbu, odnosno standardizaciju procesa mikrobne biorazgradnje MP-e.

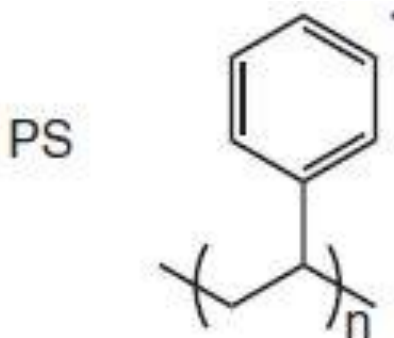
Tablica 2. Pregled zadovoljenih predispozicija ovog rada kako bi ga bilo moguće usporediti s literaturnim podacima.

Aspekt	Zadovoljava
Istraživanje učestalo korištene plastike	DA
Izolacija mikroorganizma iz autohtone sredine	DA
Predobrada	NE
Klasifikacija mikroorganizma i plastike	DA
Evidencija eksperimentalnih uvjeta	DA
Analiza pomoću FTIR i HPLC-MS	DA

2.3. Biorazgradnja polistirena

Polimer stirena pripada termoplastičnom tipu polimera s obzirom na fizikalno-mehanička svojstva, što znači da ga se može lako oblikovati i reciklirati. Prvi put je sintetiziran iz stiraksa po čemu je dobio svoj komercijalni naziv. Sinteza se vrši mehanizmom slobodnih radikala u suspenziji, otapalu ili polimerizacijom u masi. Reakcija je egzotermna i potrebno je hlađenje. Amorfne je strukture (slika 5.) i sadrži fenilni prsten uz svaki drugi atom ugljika glavnog lanca. Odlikuju ga dobra tvrdoća, krutost i prozirnost, ali zbog krтости materijala često se provodi kopolimerizacija zbog čega u konačnici poprima kvalitetna svojstva polimera od kojih je dobiven. Uobičajen primjer je kopolimer s

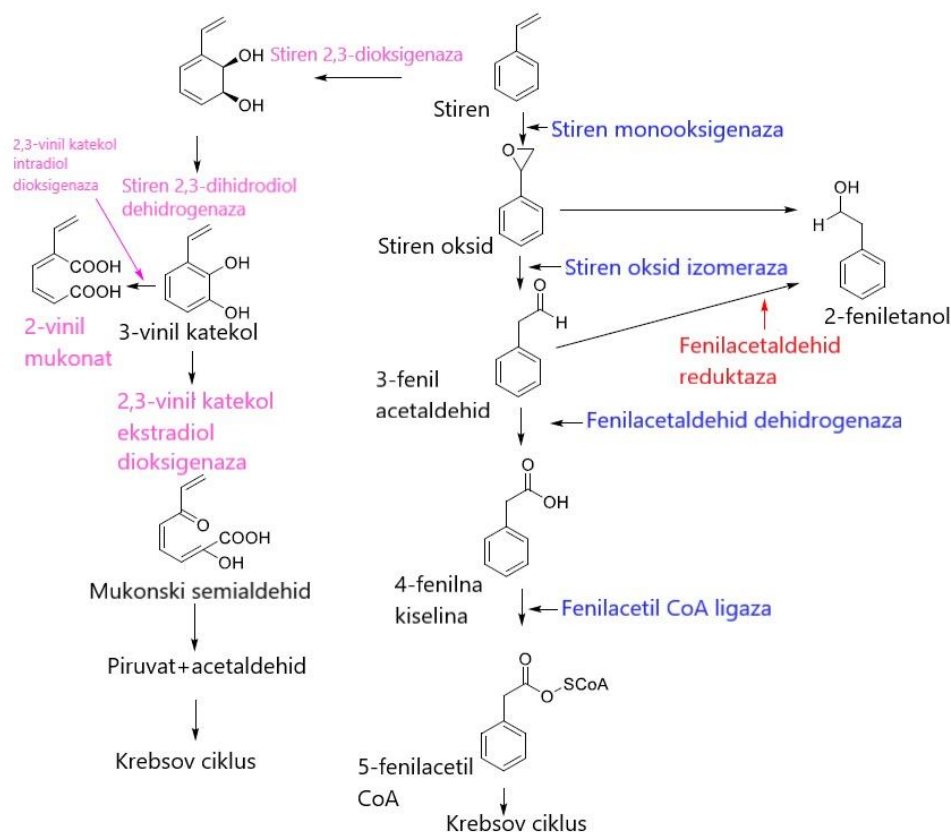
akrilonitrilom (SAN), butadienom (SBR) ili oboje (ABS). Uslijed relativno niske temperature taljenja i temperature staklastog prijelaza, omekšava već u kipućoj vodi i smatra se zapaljivim. Slabopropusan je za vodu i kisik, ali poprima žutu boju uslijed izlaganja UV zračenju.²²



Slika 5. Strukturna formula komercijalnog polistirena.²³

Polistiren je peti najčešće korišteni tip plastike u raznim industrijama zbog čega ga je važno uzeti u fokus istraživanja.²⁴ Zbog niske cijene često se koristi za proizvodnju ambalaže, jednokratnog posuđa, čaša, izolaciju i slično. Široka upotreba i slab biodegradacijski potencijal čine ga velikom prijetnjom za budućnost zbrinjavanja polimernog otpada. Struktura koja se sastoji od glavnog lanca, čiji su atomi ugljika naizmjenično povezani s fenilnim grupama, otežavaju biorazgradnju PS-a. Unatoč tome, istražuje se sposobnost različitih mikro- i makroorganizama da razgrade ovaj polimer. Literaturni podaci iz 2021. godine ističu mogućnost korištenja bakterijskih kultura *Acinetobacter johnsonii* i *Pseudomonas lini*.²⁵ Visoka molekulska masa i hidrofobnost polistirena otežavaju njegovo metaboliziranje. Sam proces razgradnje može započeti prije ingestije polimera, izlučivanjem izvanstaničnih enzima koji cijepaju polimerne lance hidrolitičkim mehanizmima djelujući na površinu polimera.²⁶ Nakon asimilacije supstrata unutarstanični enzimi nastavljaju depolimerizirati materijal. Neki od identificiranih enzima koji sudjeluju u metabolizmu stirena putenim niza reakcija su stiren monooksidaza, stiren oksid izomeraza, fenilacetaldehid dehidrogenaza i fenilacetil koenzim A ligaza.²⁰ Na taj način polistiren se depolimerizira u stiren koji se pak oksidira u fenilacetat i postaje dio Krebsovog ciklusa.²⁰ Na slici 6. prikazan je metabolički put kojim se polimer razlaže do trenutka kada može dospjeti u Krebsov ciklus što su prema različitim istraživanjima, koje navode Bhatt i sur. (2021), sposobni provesti mikroorganizmi rodova *Xanthomonas*,

Sphingobacterium, Bacillus, Rhodococcus, Microbacterium, Paenibacillus, Pseudomonas, Rhizopus, Aspergillus i *Exiguobacterium*.¹³



Slika 6. Put razgradnje PS-a i ulazak produkata u ciklus limunske kiseline.¹³

Bioraspoloživost PS-a moguće je povećati kroz kopolimerizaciju ili dodatak prooksidansa koji inhibiraju antioksidativna svojstva, primjerice metalne soli željeza, kobalta ili mangana. Metali u tragovima ubrzavaju oksidativnu razgradnju PS-a i samim time cijepaju lanac na manje dijelove koji sadrže hidrofilne oksidirane grupe koje potom mikroorganizmi mogu lakše razgraditi.²⁶ Biorazgradnju i njene rezultate dodatno otežava prisutnost aditiva u plastici koji se intenzivno istražuju i unaprjeđuju. Radi se o tvarima raspodijeljenim unutar polimernog materijala koji modificiraju svojstva materijala tijekom preradbe i poboljšavaju svojstva krajnjeg proizvoda te se učestalo koriste kako bi produljili njihovu postojanost. Postoje dodaci koji modificiraju fizikalna svojstva polimera poput plastifikatora, punila, bojila i maziva te dodaci koji pokazuju zaštitni učinak prema starenju i degradaciji materijala odnosno razni stabilizatori, antioksidansi, sredstva protiv UV starenja, usporivači gorenja i biocidi. Neki od tipičnih aditiva koji se koriste u proizvodnji polistirena su navedeni u tablici 3.

Tablica 3. Aditivi koji se učestalo dodaju za poboljšanje svojstava PS-a.²⁶

Funkcija	Aditivi
UV stabilizator	2-(20-hidroksi-50-metilfenil)benzotriazol (Tinuvin P)
UV stabilizator	bis (2, 2, 6, 6-tetrametil-4-piperidil)sebakat (Tinuvin 770)
Antioksidans	oktadecil 3,5-di-tert-butil-4-hidroksicinaminska kiselina (Irganox 1076)
Antioksidans	tris-nonilfenil fosfit (Wytox)
Usporivač gorenja	dekabromodifenil etan (S-8010) dekabromodifenil oksid 1-(1,2-dibrometil)-3,4-dibromcikloheksan (Saytex BCL-462) Tetrabromobisfenol A
Maziva	Acrawax Mineralno ulje Cink stearat

Primjeri korištenih mikroorganizama u biorazgradnji PS-a su aktinomicete *Rhodococcus ruber* gdje većina kulture prijanja na površinu PS unutar nekoliko sati i u narednom periodu nastavlja formirati biofilm, ali nakon osam dana inkubacije dolazi do minimalnog smanjenja u masi polimera.²⁷ Uspješni su *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Rhodococcus ruber*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*.²⁰ Grupa znanstvenika Ward, Goff i Donner (2006) okušala se u indirektnoj biorazgradnji pomoću kulture *Pseudomonas putida*. Prije same biorazgradnje pirolizirali su polistiren do ulja stirena u reaktoru s fluidiziranim slojem te ga uz pomoć bakterija pretvorili polihidroksialkanoat (PHA).²⁸ Osim bakterija za razgradnju PS-a korištene su i gljive. Pokazalo se kako gljiva *Culvularia* sp. može donekle penetrirati kroz površinu čestica MP-e ako su one prethodno tretirane oksidansom. U istraživanju su korišteni kombinacije oksidansa s kompleksima prijelaznih metala i anorganskih kiselina. Samo su u potonjem slučaju hife uspjele penetrirati površinu PS-a nakon devet tjedana.²⁹ Međutim radi se o doista zastarjelim studijama te se veći broj radova danas bavi istraživanjem bioremedijacijskog potencijala makroorganizama larvi i glista poput *Tenebrio molitor*, *Tenebrio obscurus*, *Tribolium castaneum*, *Plesiophtalmus davidis* i *Zophobas astratus* čija uspješnost zapravo također ovisi o crijevnoj mikrofauni.²⁵ Ispitivanjem biorazgradnje uz dodatak antibiotika smanjuje se stupanj razgradnje polimera što je indirektni dokaz da razgradnja ovisi upravo o mikrofauni probavnog trakta makroorganizma.²⁴ U tablici 4. dan je dodatan pregled literature po pitanju ispitivanih

mikroorganizama korištenih za biorazgradnju PS-a s obzirom na njihovo porijeklo, procesne uvjete i krajnje rezultate pokusa.

Tablica 4. Često ispitivani sojevi mikroorganizama u razgradnji PS-a.¹⁷

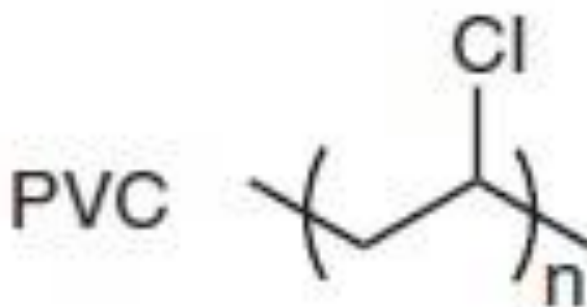
Koljeno	Rod i vrsta	Podrijetlo kulture	Uvjeti i trajanje	Rezultati i analize
Aktinobakterije	<i>Aquihabitans</i> sp., <i>Xanthomonadaceae</i> ³⁰	ostalo*	25 °C, 70% vlage, 32 dana	Smanjenje mase za $0,57 \pm 0,12$ g i molekulske mase za $12,8 \pm 3,1\%$; identifikacija novih pikova FTIR spektroskopijom i ¹ H-NMR-om
	<i>Paenibacillus urinalis</i> ³¹		30 °C, 120 o/min, 8 tjedana	Detektirani metaboliti HPLC analizom: 1-fenil-1,2-etandiol i 2-fenil-etanol
Firmikuti, Proteobakterije, Tenerikuti	<i>Spiroplasmataceae</i> , <i>Enterococcaceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> ³²	ostalo*	25 °C, 70% vlage, 31 dan	Smanjenje molekulske mase za 26,03%; identifikacija funkcionalnih skupina intermedijera FTIR spektroskopijom
Firmikuti	<i>Bacillus</i> spp. ³³	onečišćena lokacija**	30 °C, 200 o/min, 30 dana	Smanjenje mase filma za 23,7%; formiranje alifatskog lanca s bromom identificirano putem NMR-a; smanjenje intenziteta pikova skupina C-H, C=O i C=N identificirano FTIR spektroskopijom; površinske promjene opisane SEM analizom
	<i>B. gottheilii</i> , <i>B. cereus</i> ³⁴	ostalo*	25 °C, UV predobrada, 40 dana	Smanjenje mase za 5,8% (<i>B. gottheilii</i>) i 7,4% (<i>B. cereus</i>); elongacija i redukcija pikova identificirana FTIR spektroskopijom; morfološke promjene identificirane SEM analizom
	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> DR11, <i>E. undae</i> DR14 ³⁵		30 °C, 30 dana	Smanjenje mase za 0,4%; promjena u morfologiji površine identificirana ATM analizom; identifikacija novih funkcionalnih skupina FTIR spektroskopijom
	<i>Exiguobacterium</i> sp. YT2 ³⁶		25 °C, 120 o/min, 60 dana	Smanjenje težine za $7,4 \pm 0,4\%$; površinska razgradnja identificirana SEM analizom; formiranje karbonilnih skupina i otpuštanje nusprodukata identificirano XPS analizom; smanjenje molekulske mase za 7–11% identificirano GPC-om
<i>Alcaligenes</i> sp., <i>Azospirillum</i> sp., <i>Cupriavidus</i> sp.	onečišćena lokacija**		/	/
Proteobakterije	<i>Alcaligenes</i> sp., <i>Citrobacter sedlakii</i> , <i>Enterobacter</i> sp. ³⁷	onečišćena lokacija**	30 °C, 150 o/min, 30 dana	Smanjenje mase za 12,4%; promjene u kemijskoj strukturi identificirane FTIR i NMR analizama te na površini SEM analizom; intermedijeri identificirani HPLC analizom
	<i>Acinetobacter</i> sp. ³⁸	ostalo*	27 °C, 140 o/min, 30 dana	Smanjenje mase za 12,1% i molekulske mase za 13-25%; promjene na površini identificirane SEM analizom; formiranje funkcionalnih skupina identificirano NMR-om

*ostalo - mangrov, tlo, sediment, slatkovodni tokovi, morski okoliš, probavni trakt životinja

**onečišćena lokacija - odlagališta, aktivni mulj, kontaminirano tlo itd.

2.4. Biorazgradnja poli(vinil-klorida)

PVC također je sintetički termoplastični tip polimera koji se koristi za širok spektar proizvoda. Na slici 7. vidljiva je njegova struktura, a lanci su mu linearni s minimalnim grananjem. Sadrži heteroatom klora uz svaki drugi atom ugljika glavnog lanca.²⁵ U osnovi je to dosta krut materijal pa mu se dodaju razni aditivi za poboljšanje fleksibilnosti, a obično su to ftalati. Dobiva se mehanizmom slobodnih radikala u suspenziji, emulziji ili polimerizacijom u masi. Obradeni materijal koristi se za proizvodnju cijevnih sustava, prozorskih okna, izolacije za električne kablove, umjetnu kožu, gramofonske ploče itd. Kako slabo propušta kisik i vodu, dobar je za održavanje svježine zapakiranih namirnica. Upravo zbog toga što sadrži ftalatne plastifikatore, kancerogene monomere vinil klorida i dioksine predstavlja visok rizik za ljudsko zdravlje ako se nepravilno odlaže na kraju životnog ciklusa. Poput PS-a, karakterizira ga visoka otpornost na kemikalije, ali s druge strane je osjetljiv na fotodegradaciju.²⁵ Po pitanju biorazgradivosti nažalost ne pokazuje visoku kompatibilnost.



Slika 7. Strukturna formula PVC lanca.²³

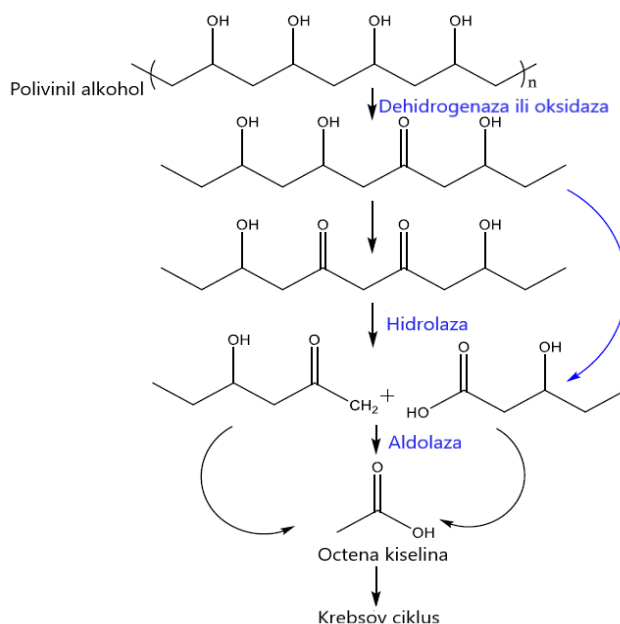
Istraživanja o mogućnosti biorazgradnje streme sličnim putanjama kao i kod PS-a. Istražuju se gljivice poput *Phanerochaete chrysosporium*, bakterije i njihovi konzorciji (*Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas citronellolis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus flexus*, *Chelatococcus daeguensis*) i larve (*Tenebrio molitor*).^{32,39,40} Širi pregled literaturnih podataka na ovu temu dan je u tablici 5.

Tablica 5. Često ispitivani sojevi mikroorganizama sa sposobnosti biorazgradnje PVC-a.¹⁷

Koljeno	Rod i vrsta	Podrijetlo kulture	Uvjeti i trajanje	Rezultati i analize
Aktinobakterije	<i>Micrococcus</i> sp. ⁴¹	onečišćena lokacija	30 °C, 180 o/min, 87 dana	Mineralizacija 8,9% PVC-a
Firmikuti	<i>Bacillus</i> sp. ⁴²	ostalo	30 °C, 180 o/min, UV predobrada, 3 mjeseca	Smanjenje mase za 0,26 ± 0,02%; SEM i AFM analize površine čestica; identifikacija promjena u strukturi FTIR spektrometrijom
	<i>Bacillus flexus</i> ²⁸	banka/SM*	30 °C, 150 o/min, pH-vrijednost 6, 30 dana	Smanjenje mase za 19%
Proteobakterije	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Achromobacter</i> sp. ⁴³	onečišćena lokacija	180 dana	Mineralizacija 35,65% i 34,62% mase čestica; smanjenje sadržaja klora za 9,4% i 10,2%

*SM – sintetska mješavina

Metabolički put razgradnje polimera može se opisati kroz metabolizam polimera PVA koji ima alkoholnu funkcionalnu skupinu gdje PVC sadrži klor i prikazan je na slici 8. Djelovanjem dehidrogenaze ili oksidaze dolazi do depolimerizacije izvan stanice i cijepanja glavnog lanca. Nakon toga hidrolazom ili aldolazom produkti se prevode u octenu kiselinu koja pak ulazi u Krebsov ciklus.²³



Slika 8. Put razgradnje PVA-a i ulazak produkata u ciklus limunske kiseline.¹³

2.5. Toksičnost mikroplastike

Široka upotreba plastike i dug životni vijek u nekontroliranim uvjetima omogućili su njenu akumulaciju u raznim okolišnim medijima, a nastojanje inženjerske struke da poboljša svojstva otpornosti plastike na različite uvjete pretvorila su ju u teško pokolebljivog protivnika, ne samo biorazgradnji, već i raznim pokušajima kemijske i fizikalne manipulacije. Učestalo dodavanje aditiva s antimikrobnim i antioksidativnim djelovanjem te raznih drugih stabilizatora čine plastiku nevjerovatno otpornom na vanjske utjecaje. Koliko god to činilo komercijalni proizvod besprijekornim, posljedice takvih praksi postaju iznimno zabrinjavajuće na kraju životnog ciklusa proizvoda i otežavaju adekvatno zbrinjavanje plastičnih materijala. Polimerni otpad u velikoj je mjeri podložan recikliranju ukoliko postoji organizirana i stroga infrastruktura za to. Međutim, u većini zemalja generalno je i dalje nezahvalno uopće govoriti o pravilnom postupanju s otpadom, a kamoli o okolišno prihvatljivom i savjesnom rukovanju plastičnom ambalažom. Pohrana, transport, priprema i konzumacija hrane i pića u plastičnim posudama dozvoljavaju učestali kontakt s ljudima i moguću neplaniranu ingestiju zbog ispiranja ili mehaničkih oštećenja. Evidentiranje takvih događaja i dobivanje reprezentativnih informacija o potencijalnom štetnom učinku koji to povlači za sobom kompleksan je posao bez standardiziranih koraka. Zabrinutost zbog mikroplastičnog onečišćenja naglo je doživjela procvat, ali nestandardizirane metode otežavaju jezgrovito dokazivanje svih štetnih aspekata ovog onečišćivala.

Ekotoksikološka ispitivanja razlikuju se prema testnim organizmima, vrsti, obliku i veličini čestica te ispitivanjima u laboratoriju ili *in situ*.²⁵ Većina ispitivanja provodi se na vodenim organizmima kako se pretpostavlja da su oni podložniji unosu čestica MP-e kako prehranom tako i respiracijom. Njihova veličina i gustoća utječu na bioraspoloživost vodenim organizmima pa će tako organizmi u pelagijskoj zoni biti podložniji kontaktu s česticama manje gustoće, a bentos onima veće gustoće koje će lakše potonuti. Prema tome ispitni organizmi obično su ribe, mekušci, rakovi, morski sisavci, bodljikaši, žarnjaci, spužve, reptili i rotifere.²⁵ Rezultati obično pokazuju promjene u ponašanju, oksidativni stres, neurotoksični i genotoksični učinak, reproduktivna ograničenja i oštećenja jetre, a obično se izražavaju kroz koncentraciju ksenobiotika koji ima određeni utjecaj na ispitivanu populaciju. Prema tome razlikujemo slijedeće pojmove:

LC₅₀ (eng. *Lethal Concentration*) – koncentracija koja uzrokuje smrt 50% populacije

EC₅₀ (eng. *Effective Concentration*) – koncentracija koja uzrokuje štetan učinak kod 50% populacije

NOEC (eng. *No Observed Effect Concentration*) – najviša koncentracija pri kojoj nema štetnog učinka na populaciju

LOEC (eng. *Lowest Observed Effect Concentration*) – najniža koncentracija pri kojoj postoji značajan štetan učinak na populaciju

Kod rakova i mekušaca MP-e uzrokuje promjene u genskom izražaju, upale, promjene u načinu hranjenja, slabiji rast, reprodukciju, filtraciju i respiraciju te dakako višu stopu smrtnosti.⁴⁴ Drugi radovi nerijetko pokazuju kako MP ne šteti ispitnim organizmima zbog čega postaje jasno kako su interpretacije ovih studija donekle nedorečene i kompleksne te se tiču širokog seta parametara. Čak i male razlike u veličini, obliku, boji i tvarima adsorbiranim na čestice mogu drastično promijeniti rezultate testa toksičnosti što znatno otežava standardizaciju ispitivanja toksičnog učinka MP-e kao i evaluaciju štete koju može prouzročiti u većoj mjeri. Dodatni čimbenici koji pritom imaju utjecaj su vrsta plastike, ispitni organizam, koncentracija i trajanje ispitivanja.⁴⁴ Prema obuhvatnom preglednom radu Buccia i sur. (2020), ispitivanja toksičnog učinka na zooplanktonu u 139 studija polučila su rezultatima širokog spektra LC_{50} vrijednosti. Ispitivanje PE, PS i PP različitih oblika i veličina (200 nm – 57 μ m) pokazalo je da LC_{50} dosežu 71,43 – 10^6 čestica/mL odnosno 0,04 – 65 mg/L te da najmanje čestice (reda veličine 10 nm) i najveće čestice (0,01 – 0,1 mm) uzrokuju značajnije posljedice nego što je to kod srednje veličine čestica (reda veličine 0,001 mm).⁴⁴ Trendovi studija na PS-u pokazuju kako utjecaj na reprodukciju organizama raste povećanjem koncentracije odnosno smanjenjem veličine čestica.⁴⁴

Ljudi MP-u najčešće unose putem hrane i pića, obično riba, mekušaca, morske soli, pive, ali i flaširane vode kao i one iz slavine. Procjenjuje se da osoba godišnje konzumira oko 3000 čestica MP-e zbog uporabe plastične ambalaže.⁴⁵ Potencijalno opasan kontakt s MP-om gotovo je neizbježan, a dodatnu zabrinutost predstavljaju adsorbirani teški metali i druga nova onečišćivala koja izazivaju zabrinutost u okolišu (pesticidi, farmaceutici, endokrini disruptori). Na primjer, kadmij apsorbiran na PS pokazuje višu razinu toksičnog učinka kod ribe zebrice jer omogućuje akumulaciju metala u jetri, crijevima i probavnom traktu s posljedicama oksidativnog stresa i upala.⁴⁶ Utvrđeno je da se na PP i PE u nezanemarivim koncentracijama veže i bakar te drugi teški metali poput arsena, olova i kroma.⁴⁷ U drugu ruku, postoji mogućnosti stvaranja biofilma patogenih mikroorganizama koji, ne samo da predstavljaju prijetnju za ljudsko zdravlje, već u nekim slučajevima povećavaju gustoću MP-e zbog čega čestice lakše tonu i prijete životinjama koje se hrane filtriranjem i prosijavanjem čestica iz vode.²⁵ Ipak, put MP-e u ljudskom organizmu i njen

utjecaj nije još dovoljno dobro istražen. Pretpostavka jest da se najveći dio izlučuje fecesom dok se apsorpcija crijevnim epitelom odvija kod čestica manjih od 150 μm , a one manje od 1,5 μm mogu prodrijeti do drugih organa.⁴⁷ Akumulacija MP-e u gastrointestinalnom traktu riba ne predstavlja toliku opasnost za ljude, obzirom da se taj dio obično odstranjuje prilikom konzumacije, ali ne treba zanemariti da se MP može akumulirati i u drugim tkivima, ako se primjerice unosi disanjem. Zato veću opasnost predstavlja konzumacija većih količina malih morskih organizama koji filtriraju vodu. Dobar primjer su dagnje i mekušci kao prirodni čistači, učestali sudionici ljudske prehrane koji mogu biti značajan izvor MP-e. Zatim gavuni, srdele i incuni kao predstavnici otvorenog mora i razni bentonski organizmi koji mogu ukazivati na prisutnost onečišćenja u sedimentu.⁴⁷ Generalni fokus je tako na morskim organizmima, ali zbog pronalaska čestica u pitkoj vodi i konzerviranoj hrani sve se više istražuje hrana biljnog podrijetla, vino i bezalkoholna pića.⁴⁷ Studija iz 2021. po prvi puta je dokazala prisutnost MP-e u ljudskoj posteljici pomoću Ramanove mikrospektroskopije.⁴⁸ Detektirano je 12 fragmenata veličine 5 – 10 μm , no pretpostavka jest da je taj broj u stvarnosti bio i viši kako je ispitano <5% ukupne mase posteljice. Njihove veličine dozvoljavale su mogućnost transporta putem krvi, međutim bilo je moguće samo zaključiti kako sam unos MP respiratornim ili gastrointestinalnim putem dozvoljava njen transport do placente.⁴⁸ Godinu dana kasnije stižu i prvi dokazi prisutnosti MP-e u ljudskoj krvi. Najčešće prisutni bili su tipovi s kojima najviše dolazimo u kontakt konzumacijom flaširane vode (PET), pretpripremljene hrane (PS) i korištenjem plastičnih vrećica (PE).⁴⁹

U ovom radu korištena je bakterija *Vibrio fisheri* kao jednostavan, brz i jeftin izvor određivanja toksičnog učinka filtrata iz pokusa biorazgradnje MP-e, kako bi se izbjegao problem niske osjetljivosti zbog nepropusnosti stijenke za čestice određene veličine. Testom se mjeri smanjenje njoj svojstvene bioluminiscencije kao posljedica izloženosti potencijalno toksičnim nusproduktima biorazgradnje poput monomera i otpuštenih stabilizatora, boja i pigmenta te već spomenutih POPs koji se lako adsorbiraju na površinu MP-e. Monomeri PS-a otrovni su i klasificirani kao potencijalno kancerogene tvari, a nano veličine PS-a mogu prodrijeti u organizme kroz kožu i putovati do dišnog i probavnog trakta.⁴⁷

2.6. *Pseudomonas alcaligenes*

Vrste roda *Pseudomonas* u 19. stoljeću su identificirane kao gram-negativne, aerobne, štapičaste bakterije veličine 0,5 – 0,8 μm s 1,5 – 3,0 μm . Nesporogene su i kreću se jednostrukim polarnim bičem. Do sada je poznato više od 140 vrsta, od kojih su većina heterotrofni, odnosno saprofiti. Vrste iz ovog roda široko su proučavane zbog svoje

sveprisutnosti u morskom i kopnenom okolišu te podobnih karakteristika. Iako su gram-negativne odlikuje ih dobra otpornost na različite biotičke i abiotičke uvjete te koriste ugljik iz različitih izvora za rast i razvoj biofilma. Specifične vrste prilagođene su okolišnim uvjetima, ekstremnijim temperaturama i vlazi, nedostatku kisika, hranjivih tvari, ali i prisutnosti antibiotika.^{50,51}

Prethodno proučavanju bioremedijacijskog potencijala obrade voda onečišćenim česticama MP-a, već su korištene za bioremedijaciju lokacija onečišćenih sirovom naftom, jednostavnim ugljikovodicima, naftalenom, toluenom i drugim hidrofobnim polimerima. Osim izoliranih vrsta proučavaju se i one genetski modificirane, čije težište leži u oksidaciji opasnih aromatskih, alifatskih, terpenskih i PAH-ova.²³ Specifične vrste ciljano utječu na određena onečišćivala što daje indikaciju o mogućnostima korištenja pri različitim bioremedijacijskim postupcima. Primjeri bakterijske vrste i odgovarajućeg ksenobiotika su: *Pseudomonas aeruginosa* (herbicidi i pesticidi), *Pseudomonas alcaligenes* (policiklični aromatični ugljikovodici), *Pseudomonas mendocina* (toluen), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (cijanid), *Pseudomonas resinovorans* (karbazol), *Pseudomonas veronii* (jednostavni aromatski spojevi – benzol, indol, piridin i dr.), *Pseudomonas putida* (toluen, stiren, m- i p-ksilen) i *Pseudomonas stutzeri* (klorirani ugljikovodici).⁵¹

Rod *Pseudomonas* pokazao je potencijal za razgradnju PE, PP, PVC, PS, PU, PET, PES, PEG i PVA. Naravno, učinkovitost razgradnje nije uvijek na istoj razini i ovisi između ostalog o predobradi.²³ Primjerice *Pseudomonas* sp. AKS2 je uspio razgraditi samo 5% LDPE filma unutar 45 dana dok je nedefinirana vrsta istog roda u drugoj studiji razgradila 28,6% LMWPE u steriliziranom kompostu nakon 40 dana. U oba slučaja nije korištena predobrada.^{52, 53} PVA je slične strukture kao PE, ali mu je topljivost u vodi nešto viša zbog hidroksilne funkcionalne grupe što dovodi do zaključka da je i lakše biorazgradiv. Još 70-ih godina prošlog stoljeća objavljeno je kako rod *Pseudomonas* razgrađuje PVA i otada se većina istraživanja bavi upravo ovim rodom.²³ Još jedan polimer koji se smatra dosta podložnim biorazgradnji je PES kojeg prethodno spomenuti *Pseudomonas* sp. AKS2 razgrađuje brzinom 165 mg/dan.⁵² PU sadrže uretanske veze i mogu imati različite funkcije ovisno o strukturi. Prisutnost karbamatnih veza, za razliku od prethodno opisanih polimera čini ih manje topljivim u polarnim otapalima poput vode, acetona ili etanola. Bioraspoloživosti PU-a odmaže i izdržljivost ovog materijala kao posljedica njegova korištenja u svrhu usporavanja gorenja i antimikrobnog efekta. Unatoč tome, studije su izdvojile nekoliko vrsta ovog roda kao potencijalne biorazgrađivače PU-a: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas protegens* i

Pseudomonas chlororaphis.⁵⁴ Neke vrste proizvode različite tvari koje se koriste u industriji poput vanilina, pigmenata ili surfaktanata. Još važnija karakteristika roda *Pseudomonas* je proizvodnja enzima lipaza i proteaza koji se koriste u biotehnologiji i bioremedijaciji. Za biorazgradnju polimernih materijala značajni su izvanstanični enzimi iz grupe hidrolaza: esteraze, lipaze, kutinaze i poliuretanaze.⁵¹

Vrsta *Pseudomonas alcaligenes*, korištena u ovom radu, u istraživanju iz 2006. pokazala je dobru mogućnost bioremedijacije tla onečišćenog karcinogenim i mutagenim PAH-ovima inokuliranjem kulture *Pseudomonas alcaligenes* PA-10.⁵⁵ Biorazgradnja PS-a nije široko izučena, ali jasno je da bi tim procesom bili dobiveni stiren, toluen i benzen koji *Pseudomonas* sp. može metabolizirati.⁵⁶ Najniži potencijal za razgradnju *Pseudomonas* pokazuje prema PP, PVC i PET jer njihovi intermedijeri mogu imati inhibitorni utjecaj na aktivnost enzima.²³

2.7. Enzimi kao pokretači biorazgradnje

Mehanizmi djelovanja prirodnih enzima još uvijek imaju dalek put pred sobom kako bi ih detaljno razumjeli, što bi nam omogućilo njihovu ciljanu primjenu u pojedinim slučajevima. U literaturi se zasad može pronaći samo nekolicina predloženih metaboličkih puteva i konkretno definiranih enzima koji sudjeluju u biorazgradnji MP-e čestica. Za rod *Pseudomonas* izuzetno su važni enzimi lakaza i lipaza.⁵¹ Lakaze osiguravaju mogućnosti primjene u širokom području pH-vrijednosti i temperature, a sam enzim je otporan na često korištena organska otapala. Vrsti *Pseudomonas alcaligenes* pomaže u pretvorbi PAH-ova u kinone, a potom u CO₂.⁵¹ Lipaze dijele prethodno spomenute karakteristike lipaza uz dodatak termostabilnosti, hemo-, regio- i enantioselektivnosti. U svrhu bioremedijacije obično se koriste za tretiranje vode sa organskim sadržajem, zaostalim uljem i otpadnih voda iz industrije. Lipaze su specifične jer omogućuju proizvodnju biorazgradivih biopolimera (PHA, PLA) koje istovremeno mogu razgraditi u odgovarajućem okruženju. Poznato je da većina gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih vrsta posjeduje enzim lipazu.⁵¹ Izvanstanični enzim polimeraza pokazao je dobru tendenciju za razgradnju bromiranog polistirena visoke udarne žilavosti (HIPS), a u razgradnji PEG-a pomoću *Pseudomonas stutzeri* JA1001 sudjelovao je unutarstanični enzim PEG dehidrogenaza proizvevši glikolnu kiselinu.^{33, 57} Tablica 6. prikazuje evidentirane enzime koji sudjeluju u razgradnji široko rasprostranjenih tipova polimera kod različitih vrsta iz roda *Pseudomonas*.

Tablica 6. Karakteristični enzimi koji obično sudjeluju u biorazgradnji polimera.²³

Enzim	Mikroorganizam	Polimer
Hidrolaza	<i>Pseudomonas</i> sp. AK52	LDPE
Alkan hidroksilaza	<i>Pseudomonas</i> sp. E4	LMWPE
Esteraza	<i>Pseudomonas</i> sp.	HIPS
	<i>Pseudomonas</i> sp. AK52	PES
	<i>Pseudomonas vesicularis</i> PD	PVA
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Poliester
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MZA-85	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
Poliuretanaza	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Poliester
Proteaza	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
Lipaza	<i>Pseudomonas</i> sp.	Poliester
	<i>Pseudomonas protegens</i> BC2-12	
	<i>Pseudomonas</i> CHA0	
	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506 i Pf0-1	
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	
	<i>Pseudomonas</i> sp.	PET
PEG dehidrogenaza	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	PEG

2.8. Predobrada mikroplastike – ubrzanje procesa biorazgradnje

Predobrada polimernih čestica, koja prethodi procesu razgradnje, može biti od presudne važnosti za uspješnost procesa. Naručito kod PE, PP, PS i PVC-a koji ne sadrže hidrolizirajuće skupine u glavnom lancu što otežava njihovu biorazgradnju.⁵⁸ Svrha kemijske i fizikalne predobrade čestica je destabilizacija kemijskih veza u strukturi polimera kako bi se ubrzalo i pospješilo njihovo iskorištavanje u obliku supstrata. Korištenje HNO₃ učestala je metoda kemijske predobrade gdje se uslijed oksidacije polimera stvaraju karbonilne skupine i dvostruke veze u glavnom lancu.²³ Druge oksidativne kemikalije na raspolaganju su H₂SO₄, HCl i H₂O₂.²³ Fizikalna predobrada podrazumijeva termičku obradu ili radijaciju UV zračenjem inducirajući fotooksidativnu razgradnju.⁵⁸ Fotooksidacijom putem mehanizma slobodnih radikala dobivaju se manje molekule koje mikroorganizmi lakše konzumiraju. Djelovanjem UV svjetlosti i toplinskom obradom ubrazava se starenje materijala i stvaraju se nove funkcionalne skupine. Jaki oksidansi stvaraju hidroksilne radikale koji su visokoaktivni i neselektivni spram organskih zagađivala zbog redoks potencijala od 2,80 V. Povišena temperatura i inače uzrokuje depolimeriziranje materijala

čime se pogoduje stvaranju karbonilnih skupina i manjih ili nesavršenih kristala, a ti uvjeti pozitivno utječu na proces biorazgradnje.⁵⁸

Poticanje mikroorganizama na stvaranje biosurfaktanata također može imati povoljan utjecaj na svojstvo biorasploživosti plastike. Razne vrste prirodno ih proizvode, a amfifilna struktura (daje hidrofilan i hidrofoban karakter) omogućuje povećanje specifične aktivne površine i veću biorasploživost inače hidrofobne površine MP. Postupci uključuju unos dodatnih tvari u sustav (glukoza, sukroza, etanol, glicerol) ili optimiranje procesnih parametara (pH-vrijednost, temperatura, brzina miješanja, koncentracija otopljenog kisika).⁵⁹ Unos dodatnih tvari u sustav, koje bi služile kao nutrijenti za bakterijsku kulturu, nije univerzalno rješenje. Primjerice, dodatak biorazgradivih aditiva poput škroba ili palmitinske kiseline može pozitivno utjecati na proces, dok dodatak glukoze u sustav s rodom *Pseudomonas* može sniziti njegovu kataboličku aktivnost.²⁰ S druge strane, aditivima se može utjecati i na biorasploživost plastike dodatkom oksidativnih sredstava poput hidroklorne kiseline, vodikovog peroksida, sumporne i dušične kiseline, koja oksidiraju površinu polimera radikalskim mehanizmom.²⁰ U istraživanju iz 2003. godine pokazalo se kako uvjeti bogati ugljikom uz deficit dušika doprinose sniženju stvaranja biofilma kulture *Pseudomonas* sp. Suvišak ugljika uzrokuje povišenu proizvodnju izvanstaničnih polisaharida zbog čega raste hidrofilnost površine stanice pa se manje stanica uspijeva vezati za površinu polimera. Ako su uvjeti obrnuti, u uvjetima bogatim dušikom povišeni je sadržaj izvanstaničnih proteina što pak utječe na povišeni stupanj hidrofobnosti i bolje vezanje stanica.⁶⁰ U drugoj studiji se događa sličan efekt gdje, dodatkom amonijeva sulfata u hranjivi medij, raste hidrofobnost površine stanica kulture *Pseudomonas* sp. AKS2.⁵²

Dodacima se može utjecati ne samo na kulturu već i na polimer, poput predobrade. Tako dodatak željeza ili mangana može imati oksidativni utjecaj na plastiku, ali to je također ovisno o konkretnom slučaju. Važno je paziti da bilo koji dodatak koji pozitivno utječe na biorasploživost polimera istovremeno nema inhibitorni utjecaj na proizvodnju enzima bakterijske kulture kao što je to imao dodatak kobalta i nikla u slučaju biorazgradnje PVA pomoću *Pseudomonas* sp. O-3.⁶¹ Zato svaka predobrada mora biti individualno selektirana ovisno o zahtjevima procesa, ali svakako je poželjan korak.

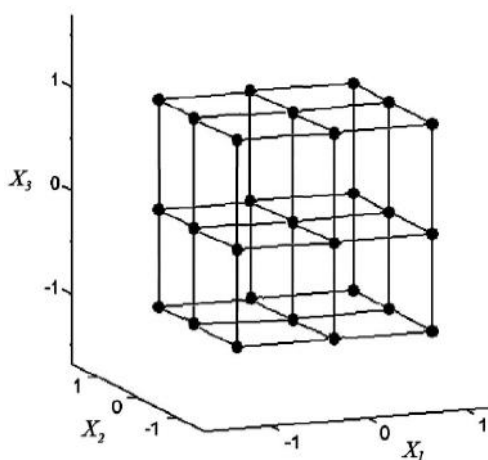
2.9. Dizajn eksperimenta

Planiranje pokusa i korištenje statističkih metoda provodi se u svrhu reduciranja broja potrebnih pokusa i dobivanja dubljeg uvida u značaj pojedinih procesnih čimbenika. Na taj način dobivamo puno informacija o sustavu istovremeno štedeći vrijeme i trošak

ekstenzivnih laboratorijskih ispitivanja. Puni faktorski plan osmišljen je 1935. godine i daje najbolji uvid u proučavani sustav. Može se predočiti metodom crne kutije (eng. *black-box*) gdje su specificirani ulaz i izlaz dok je sadržaj nepoznat. Odnosno, proces je okarakteriziran nezavisnim ulaznim i zavisnim izlaznim (odziv) varijablama. Metoda crne kutije obično se temelji na metodi pokušaja i pogreške gdje se procjenjuju razni parametri i uspoređuju krajnji rezultati. Istovremenom varijacijom više ulaznih čimbenika (faktora) ustanovljavamo stupanj njihovog međudjelovanja i utjecaj na odziv. U ovom radu korišten je dizajn s tri čimbenika na tri razine ili 3^k , gdje k označava broj faktora i jednak je tri. Prema tome dobivamo 27 kombinacija izvjesna tri čimbenika na minimalnoj, srednjoj i maksimalnoj razini slikovito prikazana na slici 9.⁶² Utjecaji faktora obično se procjenjuju linearnim modelom, ali ako se radi o nelinearnom sustavu potrebno je utvrditi funkciju odziva statističkom metodom odzivnih površina. Stoga se odziv aproksimira u obliku polinoma drugog reda koji sadrži tri linearna, tri kvadratična i tri člana međudjelovanja, (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC \quad (1)$$

gdje je β_0 vrijednost fiksnog odziva u centralnoj točki dizajna, β_1 , β_2 i β_3 su linearni koeficijenti, β_{11} , β_{22} i β_{33} su kvadratični koeficijenti, a β_{12} , β_{13} i β_{23} su regresijski članovi koeficijentata učinka interakcije. A, B i C su razine nezavisnih varijabli, a Y predviđeni odziv.⁶³ Matrica sadrži 27 redaka s uvjetima pojedinog pokusa i tri kolone razina na način da je osigurana ortogonalnost plana tj. da je suma svih vrijednosti razina za svaki čimbenik jednaka nuli. To omogućuje međusobno nezavisnu procjenu utjecaja pojedinog čimbenika, ali i njihovog međudjelovanja.⁶⁴



Slika 9. Grafički prikaz punog faktorskog plana s tri čimbenika na tri razine za opis nelinearnih odziva.

Osnovna statistička metoda za analizu osjetljivosti čimbenika i validaciju modela je analiza varijance (ANOVA).⁶⁴ ANOVA služi za uspoređivanje aritmetičkih sredina više uzoraka i definiranje razlika u odstupanjima rezultata od srednjih vrijednosti, a temeljem F-testa donosi se zaključak o značajnosti njihovih razlika.^{64, 65} Na taj način može se analizirati utjecaj više nezavisnih varijabli na odziv. Pritom se definira nul-hipoteza kojom se pretpostavlja da su srednje vrijednosti svih uzoraka jednaki, a varijacija je posljedica pogreške. Odnosno, da određeni faktor ne djeluje značajno na odziv. Alternativnom hipotezom pretpostavlja se suprotno. Ovisno o broju ispitivanih faktora, testira se veći broj hipoteza. Značajno velike *F*-vrijednosti govore da su srednje vrijednosti uzoraka različite i da faktor utječe na njih.⁶⁴

Metoda odzivnih površina statistička je metoda koja se često koristi za modeliranje i analizu procesa u kojima više varijabli ima utjecaj na odziv koji želimo optimirati.⁶⁶ Provedbom pokusa s navedenim kombinacijama čimbenika dizajniranih punim faktorskim planom dobit ćemo odzivnu plohu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroplastika

Čestice polistirena i poli(vinil-klorida), u rasponu veličina <300, 300 – 500 i 500 – 700 μm, dobivene su usitnjavanjem svakodnevnih polimernih predmeta, odnosno jednokratnog pribora (plastičnih žlica i ambalaže).

3.1.2. Mikroorganizam

Za provedbu pokusa biorazgradnje korištena je gram-negativna bakterijska kultura *Pseudomonas alcaligenes* izolirana iz uzorka sedimenta, pohranjena u Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Kemikalije i mediji

3.2.1. Mineralni medij

Mineralni medij volumena 2 L pripremio se kako bi se osigurali prikladni uvjeti za razvoj mikroorganizma. Čine ga mineralne soli i deionizirana voda u odgovarajućim omjerima. Po potrebi se pH-vrijednost MM-a podešava s 1 M HCl i 1 M KOH. Njegov sastav prema Kyaw i sur. (2012), prikazan je u tablici 7., a prije njegove upotrebe bila je neophodna sterilizacija u autoklavu.

Tablica 7. Sastav korištenog mineralnog medija.⁶⁷

Tvar	Masa / g/L
K ₂ HPO ₄	12,5
KH ₂ PO ₄	3,8
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,1
5 mL elemenata u tragovima:	
H ₃ BO ₃	0,232
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0,174
FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ x6H ₂ O	0,116
CoSO ₄ x7H ₂ O	0,096
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x4H ₂ O	0,022
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,008
MnSO ₄ x4H ₂ O	0,008

3.2.2. Hranjiva podloga

U pokusu s PS-om, kao hranjiva podloga korišten je hranjivi agar (HA), dok je u pokusu s česticama PVC-a korištena dodatna hranjiva podloga *Tryptic Soy Agar* (TSA) koja sadrži kompleksne dušične spojeve, glukozu kao izvor ugljika i energije, NaCl za održavanje osmotske ravnoteže te dikalijev fosfat kao pufer uz održavanje pH-vrijednosti podloge.⁶⁸ Bogatiji sastav ove hranjive podloge potiče rast bakterija roda *Pseudomonas* i pospješuje njen uzgoj dok istovremeno ima inhibitorni utjecaj na razne vrste entrobakterija.⁶⁹ Obje podloge vagane su prema uputama proizvođača i grijane tri puta do vrenja uz učestalo homogeniziranje. Poput MM-a, i njih je bilo potrebno sterilizirati prije upotrebe.

3.2.3. Fiziološka otopina

Za potrebe određivanja CFU (eng. *Colony-forming units*) pripremala se 0,9%-tna fiziološka otopina (FO), otapanjem 9 g NaCl-a u 1 L deionizirane vode. Zatim su se punile epruvete s volumenom od 9 mL koje je nakon toga bilo potrebno sterilizirati u autoklavu.

3.2.4. Etanol

Za sterilizaciju čestica MP-a koristio se 70%-tni etanol.

3.3. Mjerni instrumenti i oprema

Za usitnjavanje polimera korišten je kriomlin nadopunjen s tekućim dušikom (*Retsch, Haan, Njemačka*), a za prosijavanje MP-a mehanička sita (*W. S. Tyler RX-86-1 Sieve shaker, USA*) te analitička vaga KERN ALJ 220-4NM. Nakon sterilizacije etanolom, MP-e je bilo potrebno odvojiti od vodene faze postupkom filtracije. U tu svrhu primijenio se graduirani membranski lijevak s vakuum pumpom. Za zadržavanje čestica koristili su se sterilni nitrocelulozni membranski filtri Ahlstrom ReliaDiscTM, promjera pora 0,45 μm . Za sterilizaciju svih kemikalija, medija, staklenog i metalnog posuđa korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija. Za potrebe provođenja pokusa koristila se rotacijska tresilica (SIA BIOSAN PSU-10i Orbital Shaker, Latvija). Bakterije su se uzgajale u termostatu Termomedicinski aparati, Hrvatska pri 37 °C, a optička gustoća ($\lambda = 600 \text{ nm}$) određena je na spektrofotometaru Hach, Model DR/2400, SAD. pH-vrijednost, koncentracija otopljenog kisika i temperatura određivani su prije i nakon završetka pokusa pomoću pH elektrode SenTix® 940 i kisikove elektrode FDO® 925 i prijenosnog mjerača WTW Multi 340i. Za određivanje CFU bilo je potrebno koristiti homogenizator (Heidolph, REAX top), a zaostale

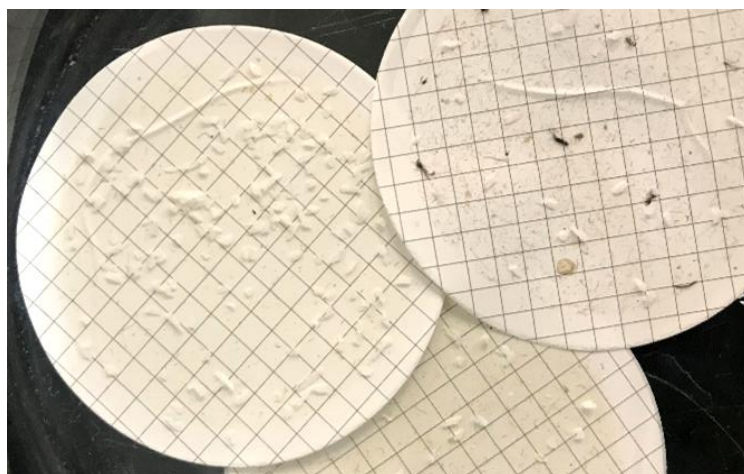
su se čestice MP-a nakon završetka pokusa i filtriranja sušile u sušioniku (Sterimatic ST-11, Instrumentaria, Hrvatska).

Kvalitativne i kvantitativne analize provedene su pomoću analitičkih instrumenata tvrtke CWT (eng. *Comprehensive Water Technology*) na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Organski i anorganski ugljik određeni su pomoću TOC-V, Shimadzu, a kvantitativni sastav uzoraka dan je kroz rezultate masene spektrometrije iz kombiniranog uređaja za HPLC-MS (HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU). Čestice MP-a, nakon završetka pokusa, okarakterizirane su IR spektroskopijom s Fourierovom transformacijom signala na FTIR-ATR spektrometru, PerkinElmer, Spectrum One, dok je toksičnost filtrata određena na instrumentu Lumistox 300, Dr Lange GmbH, Njemačka.

3.4. Metode rada

3.4.1. Dobivanje i sterilizacija MP-a

Plastični proizvodi iz svakodnevne upotrebe usitnjeni su na kriomlinu nadopunjenim tekućim dušikom. Čestice su potom osušene na zraku 24 – 48 h i prosijane mehaničkim sitom u svrhu odvajanja različitih veličina čestica: <300, 300 – 500 i 500 – 700 μm za PS i 300 – 500 μm za PVC. Čestice su sterilizirane u etanolu tijekom 10 minuta pri 160 o/min na tresilici i sobnoj temperaturi te su izdvojene vakuum filtracijom na prethodno steriliziranoj aparaturi. Čestice zaostale na stjenkama isprane su deioniziranom vodom kako bi se što preciznije prenijele u tikvice u kojima se provodio eksperiment. Na filtru zaostale su se čestice (slika 10.) prenijele pomoću sterilnog pribora u sterilizirane Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL.



Slika 10. Sterilizirane plastične mikročestice.

3.4.2. Uzgoj bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes*

Bakterijska kultura *Pseudomonas alcaligenes* uzgojena je na dvije vrste hranjive podloge, HA i TSA. Za pokuse s PVC-om (P2 kao oznaka za pokus s PVC-om), bakterija je uzgojena na TSA i HA, a za pokus s PS-om (P1 kao oznaka za pokus s PS-om) bakterija je uzgojena na HA. Kako bi se bakterija prilagodila na ispitivane eksperimentalne uvjete i izbjegla faza prilagodbe (tzv. lag faza) bakterijskog rasta tijekom pokusa, dan prije postavljanja oba pokusa 24-tna kultura je suspendirana u mineralnom mediju odgovarajuće pH-vrijednosti te stavljena na rotacijsku tresilicu pri 160 o/min i sobnoj temperaturi.

3.4.3. Biorazgradnja PS-a i PVC-a pomoću kulture *Pseudomonas alcaligenes* prema punom faktorskom planu

Dizajn oba pokusa (P1 i P2) proveden je prema punom faktorskom planu (eng. *Full factorial design*) kojim je dobivena matrica koja kombinira tri čimbenika na tri razine. U pokusu s PS-om (P1) ispitivani čimbenici su bili OG, veličina čestica i broj okretaja, dok su za pokus s PVC-om (P2) odabrani pH-vrijednost, koncentracija MP-a i OG. Iz tog razloga bilo je potrebno pripremiti 27 Erlenmeyerovih tikvica od 250 mL s radnim volumenom 100 mL u koje su implementirani odgovarajući uvjeti (slika 11.). Dodatno su pripremljene tikvice kao slijepo probe (SP), čiji sastav je bio jednak drugim eksperimentalnim tikvicama uz izuzetak prisutnosti čestica MP-a. Tikvice su potom stavljene na rotacijske tresilice tijekom 30 dana pri sobnoj temperaturi, a izuzimanje uzoraka provedeno je u 0., 3., 7., 14., 21. i 30. danu pokusa.



Slika 11. Tikvice s odgovarajućom kombinacijom čimbenika postavljene na rotacijsku tresilicu.

U tablici 8. raspisani su početni uvjeti za pokus P1 s PS-om. Pritom je koncentracija MP-a bila jednaka u svim tikvicama i iznosila je 500 mg/L, pH-vrijednost mineralnog medija je iznosila 7,3, temperatura je bila 23,7 °C, a koncentracija otopljenog kisika iznosila je 8,64 mg/L. Matrica koja predstavlja kombinaciju ispitivana tri čimbenika na tri razine (minimalna, srednja i maksimalna vrijednost čimbenika) za pokus P1 prikazana je u tablici 9. Radi se o 27 tikvica raspoređenih na tri rotacijske tresilice s obzirom na ispitivana tri broja okretaja, veličine čestica PS-a i OG bakterijske suspenzije. U tablici 10. raspisani su početni uvjeti za pokus P2 s PVC-om. Pritom je veličina MP-a bila jednaka u svim tikvicama i iznosila je 300 – 500 µm. Broj okretaja rotacijske tresilice znosio je 150 o/min, temperatura je bila 24,3 °C, a koncentracija otopljenog kisika iznosila je 8,64 mg/L.

Tablica 8. Početni uvjeti za pokus biorazgradnje P1 s PS primjenom bakterije *P. alcaligenes*.

MP	OG ₀ / -	γ(O ₂) ₀ / mg/L	pH / -	T ₀ / -	logCFU / -	γ(TOC ₀) / mg/L	γ(TIC ₀) / mg/L
PS	0,1	8,64	7,3	23,7	7,51	6,79	2,80
	0,3	8,64	7,3	23,7	7,81	6,15	2,26
	0,5	8,64	7,3	23,7	5,314	4,19	5,31

Tablica 9. Matrica po kojoj se provodio pokus P1 prema punom faktorskom planu.

Pokus	OG ₀ / -	Veličina čestica / µm	Broj okretaja / o/min
P1-1	0,3	<300	100
P1-2	0,1	300-500	
P1-3	0,5	500-700	
P1-4	0,5	<300	
P1-5	0,1	<300	
P1-6	0,1	500-700	
P1-7	0,3	500-700	
P1-8	0,3	300-500	
P1-9	0,5	300-500	
P1-10	0,5	300-500	
P1-11	0,3	300-500	150
P1-12	0,1	500-700	
P1-13	0,1	<300	
P1-14	0,1	300-500	
P1-15	0,3	<300	
P1-16	0,3	500-700	
P1-17	0,5	500-700	
P1-18	0,5	<300	
P1-19	0,3	300-500	200
P1-20	0,5	300-500	
P1-21	0,5	500-700	
P1-22	0,3	500-700	
P1-23	0,1	<300	
P1-24	0,1	<300	
P1-25	0,5	300-500	
P1-26	0,3	500-700	
P1-27	0,1	<300	

Tablica 10. Početni uvjeti za pokus biorazgradnje P2 s PVC-om primjenom bakterije *P. alcaligenes*.

MP	OG ₀ / -	pH / -	$\gamma(\text{O}_2)_0$ / mg/L	T_0 / -	logCFU / -	$\gamma(\text{TOC}_0)$ / mg/L	$\gamma(\text{TIC}_0)$ / mg/L
PVC	0,1	6	8,19	24,30	7,65	5,54	4,78
		7					
		8					
	0,3	6	8,19	24,30	7,81	4,20	3,69
		7					
		8					
	0,5	6	8,64	24,0	7,29	9,63	4,51
		7					
		8					

Matrica koja predstavlja kombinaciju ispitivana tri čimbenika na tri razine (minimalna, srednja i maksimalna vrijednost čimbenika) za pokus P2 prikazana je u tablici 11. Radi se o 27 tikvica raspoređenih na tri rotacijske tresilice s različitim kombinacijama pH-vrijednosti mineralnog medija, koncentracije PVC-a i OG bakterijske suspenzije.

Tablica 11. Matrica po kojoj se provodio pokus P2 prema punom faktorskom planu.

Pokus	OG ₀ / -	γ_{MP} / mg/L	pH-vrijednost / -
P2-1	0,1	500	8
P2-2		50	6
P2-3		1000	7
P2-4		1000	6
P2-5		50	7
P2-6		1000	8
P2-7		50	8
P2-8		500	6
P2-9		500	7
P2-10		0,3	500
P2-11	50		6
P2-12	1000		6
P2-13	500		8
P2-14	500		7
P2-15	1000		7
P2-16	1000		8
P2-17	50		7
P2-18	50	8	
P2-19	0,5	500	6
P2-20		50	7
P2-21		50	8
P2-22		50	6
P2-23		1000	7
P2-24		1000	8
P2-25		1000	6
P2-26		500	8
P2-27		500	7

3.4.4. Određivanje CFU

Za određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija izuzimali su se uzorci sterilnom tehnikom rada iz tikvice, pomoću poluautomatske pipete. Uzorci su se prenosili u epruvete sa sterilnom FO, čija je priprema opisana u poglavlju 3.2.3. Pripravljena su razrjeđenja 10^{-5} i 10^{-6} st/mL. Iz pripremljenih razrjeđenja sterilnom tehnikom rada se, uz prethodno homogeniziranje, prenijelo 1 mL uzorka u sterilne Petrijeve zdjelice. U zdjelice se za kraj dolila tekuća hranjiva podloga i homogenizirala na radnoj površini u obliku broja osam. Nakon što je podloga očvrstnula, Petrijeve su stavljene u termostat na 37 °C tijekom 24 sata, nakon čega su se brojale izrasle kolonije.

3.4.5. Određivanje organskog (TOC) i anorganskog (TIC) ugljika

Za TC i TOC analizu bilo je potrebno izuzeti po 0,5 mL uzorka suspenzije na 0., 3., 7., 14., 21. i 30. dan. Uzorak je profiltriran kroz 0,45 µm okrugli filter i dobivena je vodena faza koja je razrijeđena 20 puta, dodatkom 9,5 mL deionizirane vode. U uzorke za TOC analizu dodano je 3 kapi 1 M H₂SO₄ koja uklanja anorganski ugljik. TOC upućuje na organske produkte biorazgradnje polimera i prisutnost aditiva koja je neminovna, ako se radi o komercijalnim polimerima. TIC pak ukazuje na produkt metabolizma bakterija u vidu CO₂.

3.4.6. HPLC-MS analiza

Preostali volumen uzorka nakon provedbe TC analize korišten je za detekciju otpuštenih polimernih aditiva prisutnih u uzorcima PS-a i PVC-a. Uzorci su stavljeni u vijale iz kojih je uređaj uzimao po 5 µL uzorka čije su se sastavnice razdvajale po masi. Prema m/z omjeru iz literature je bilo moguće definirati prisutne aditive.

3.4.7. FTIR-ATR spektroskopija

Po završetku pokusa, suspenzije iz svake tikvice profiltrirane su kroz membranski filterar veličina pora 0,45 µm. Na filteru tako zaostaju čestice MP-a koje su okarakterizirane spektroskopski u rasponu valnih brojeva od 4000 cm⁻¹ do 400 cm⁻¹. Dobivene pikove potom je bilo moguće usporediti s originalnim uzorkom i zamijetiti strukturne promjene do kojih dolazi uslijed biorazgradnje.

3.4.8. Test toksičnosti produkata biorazgradnje pomoću *Vibrio fischeri*

Za potrebe provedbe testa toksičnosti prema standardnoj metodi HRN EN ISO 11348-3:2010 bilo je potrebno uzgojiti bakterijsku kulturu *Vibrio fischeri* na čvrstoj hranjivoj

podlozi, koja je prethodno sterilizirana (slika 12.). Optimalna luminiscencija postignuta je nakon dva dana inkubacije pri 15 °C. Nakon uzgoja, dio kulture resuspendiran je u hranjivoj izoosmotskoj otopini koristeći sterilnu tehniku rada, a kao radna otopina koristio se 2%-tni NaCl. pH-vrijednost obje otopine morale iznositi između 6,8 i 7,2, a podešavane su koristeći 1 M NaOH i 1 M HCl. Suspenzija bakterijske kulture termostatirana je pri 15 °C tijekom 15 minuta na termostatnom bloku. Radi veće preciznosti korišten je linearni niz razrjeđenja originalnog uzorka. Inokuliranim bakterijama mjerila se luminiscencija prije dodatka razrijeđenih uzoraka te 30 minuta kasnije. Prema vrijednostima luminiscencija dobivene su EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti, koje predstavljaju koncentraciju tvari pri kojoj dolazi do 20 i 50%-tnog pada luminiscencije.



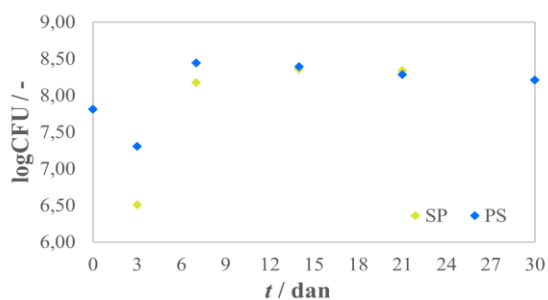
Slika 12. Izrasla biomasa luminiscirajuće bakterijske kulture *Vibrio fischeri*.

4. REZULTATI

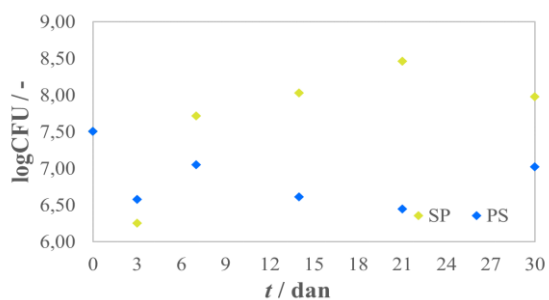
4.1. Rezultati biorazgradnje mikroplastičnih čestica polistirena

4.1.1. Rezultati promjene logaritamske CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje polistirena primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*

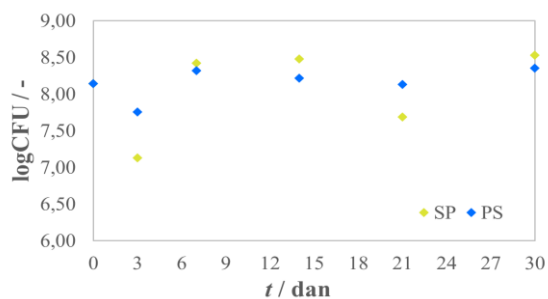
Na slikama 13. a) – ab) prikazane su promjene živih stanica bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes* izražene preko CFU vrijednosti, praćene tijekom 30 dana biorazgradnje PS-a.



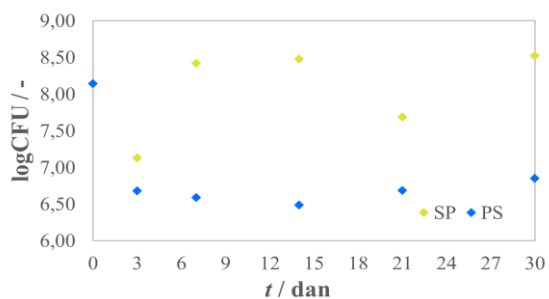
a)



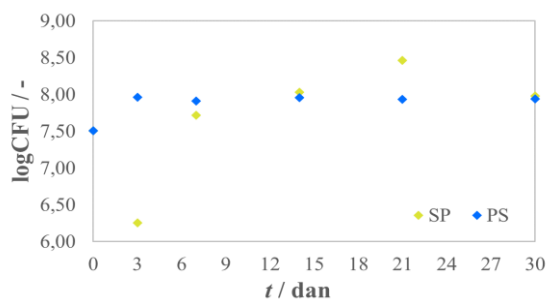
b)



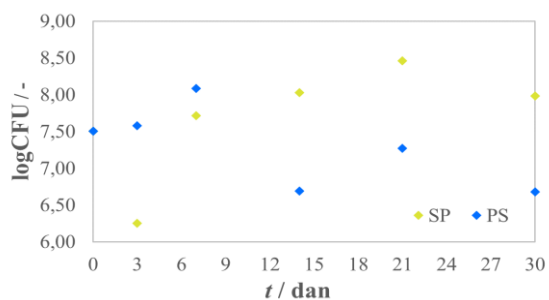
c)



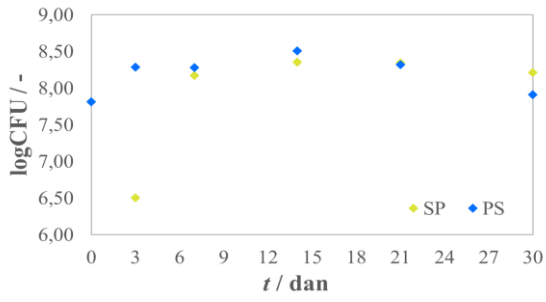
d)



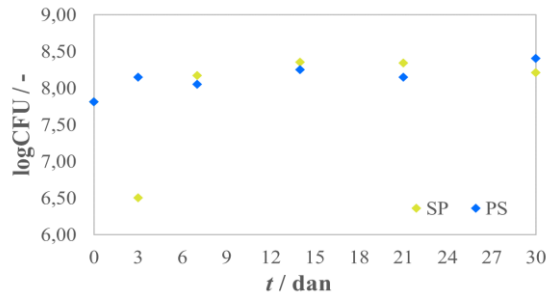
e)



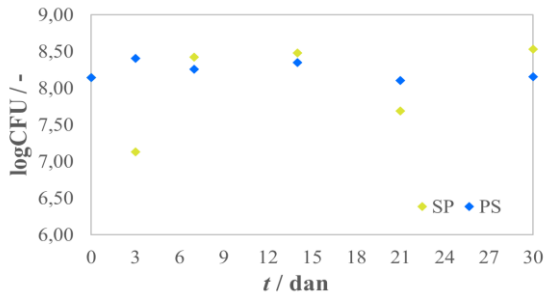
f)



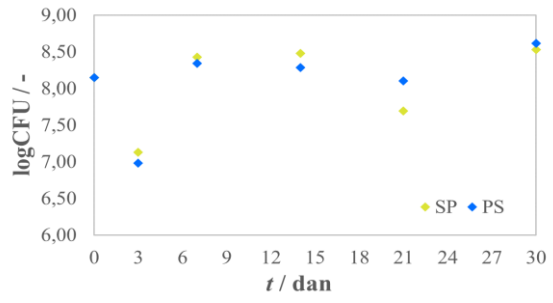
g)



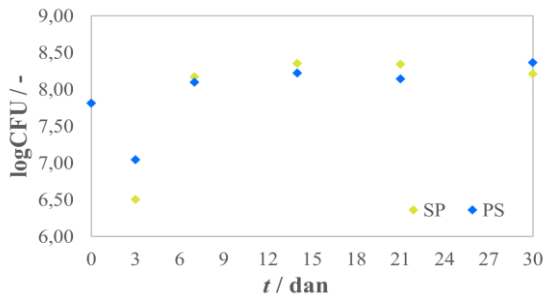
h)



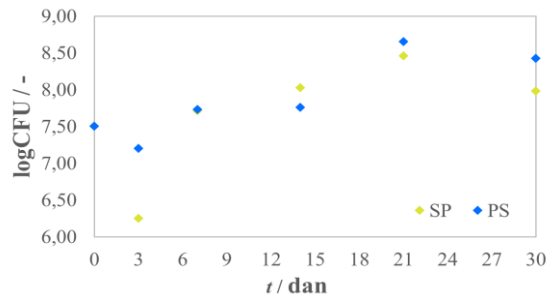
i)



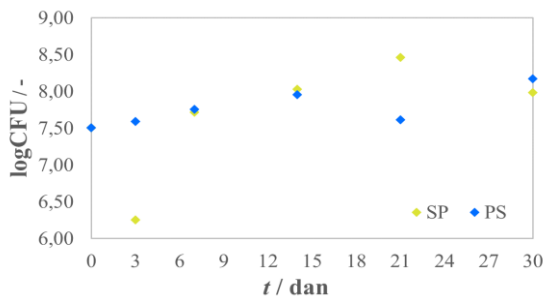
j)



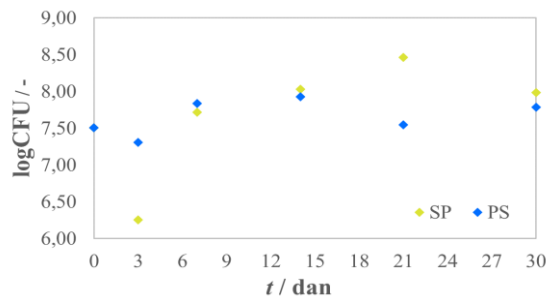
k)



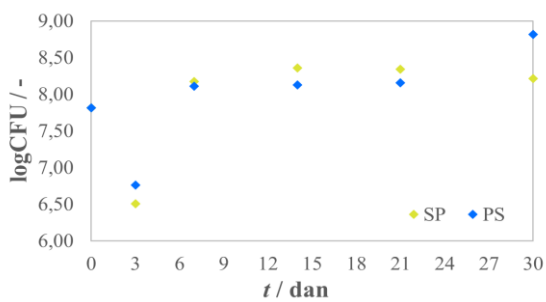
l)



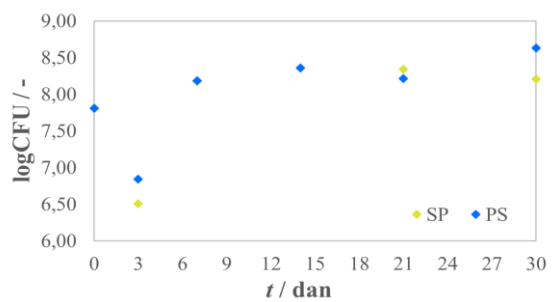
m)



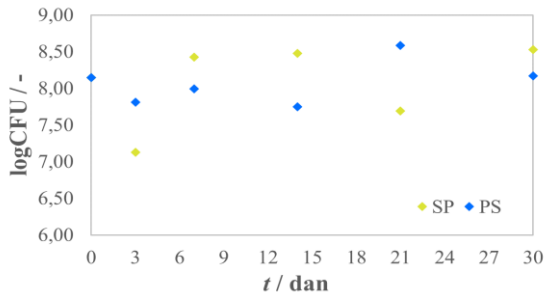
n)



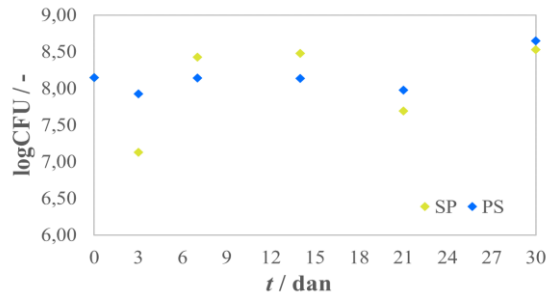
o)



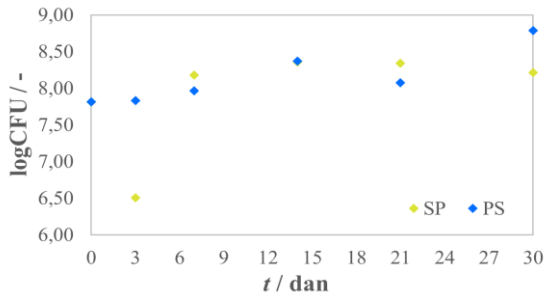
p)



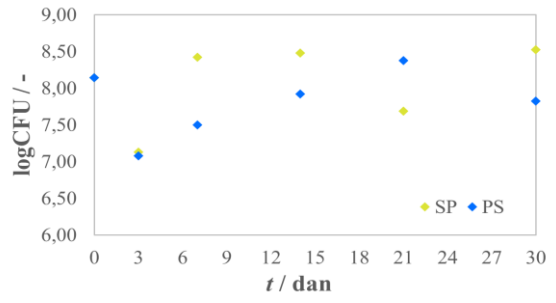
q)



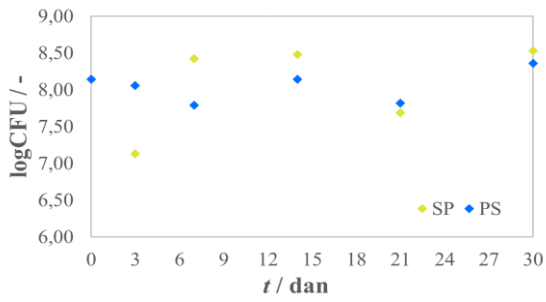
r)



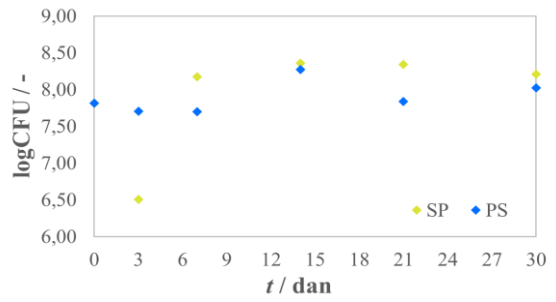
s)



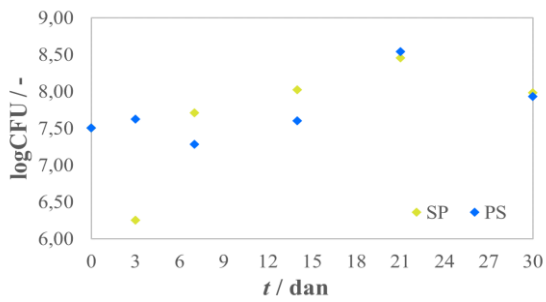
t)



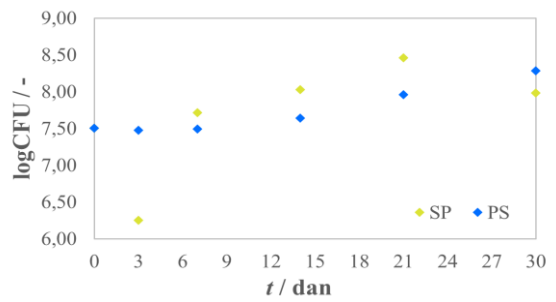
u)



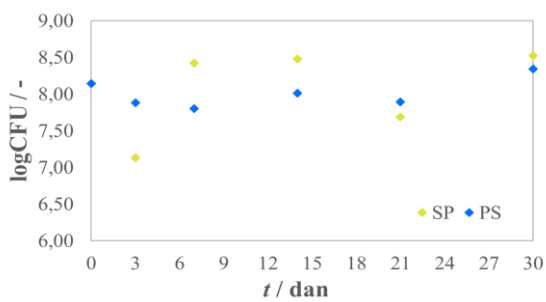
v)



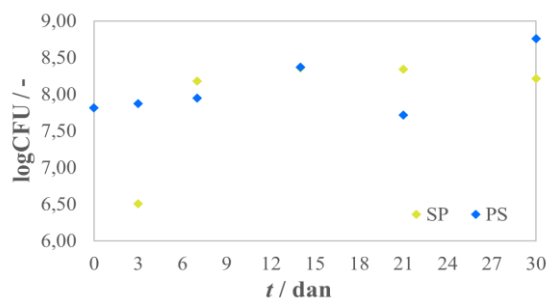
w)



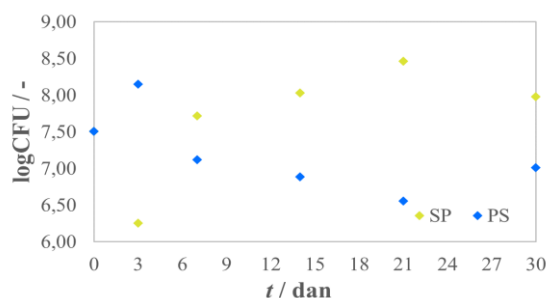
x)



y)



z)



ab)

Slika 13. Promjena logaritamske CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* za pokus a) P1-1; b) P1-2; c) P1-3; d) P1-4; e) P1-5; f) P1-6; g) P1-7; h) P1-8; i) P1-9; j) P1-10; k) P1-11; l) P1-12; m) P1-13; n) P1-14; o) P1-15; p) P1-16; q) P1-17; r) P1-18; s) P1-19; t) P1-20; u) P1-21; v) P1-22; w) P1-23; x) P1-24; y) P1-25; z) P1-26 i ab) P1-27 tijekom 30 dana.

4.1.2. Rezultati promjena koncentracije TOC i TIC tijekom biorazgradnje polistirena primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*

U tablicama 13. – 15. prikazana je promjena sadržaja organskog i anorganskog ugljika tijekom biorazgradnje PS-a primjenom *P. alcaligenes* za uvjete pokusa P1-13, P1-19 i P1-9.

Tablica 13. Promjena vrijednosti TOC i TIC tijekom procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* za pokus P1-13 tijekom 30 dana.

<i>t</i> / dan	TOC (P1-13) / mg/L	TOC (SP) / mg/L	TIC (P1-13) / mg/L	TIC (SP) / mg/L
0.	6,79	6,79	2,80	2,80
3.	7,80	9,20	1,97	5,26
7.	3,02	5,57	1,92	0,40
14.	8,20	9,36	2,10	2,51
21.	6,29	3,63	0,57	0,73
30.	5,64	9,23	1,04	3,02

Tablica 14. Promjena vrijednosti TOC i TIC tijekom procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* za pokus P1-19 tijekom 30 dana.

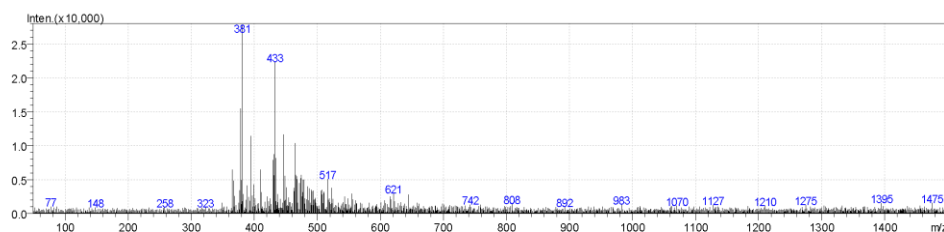
<i>t</i> / dan	TOC (P1-19) / mg/L	TOC (SP) / mg/L	TIC (P1-19) / mg/L	TIC (SP) / mg/L
0.	6,15	6,15	2,26	2,26
3.	6,84	8,78	2,31	5,29
7.	4,31	7,74	0,95	1,91
14.	10,03	10,02	3,23	2,11
21.	4,71	4,76	0,15	0,69
30.	7,80	5,52	2,07	0,20

Tablica 15. Promjena vrijednosti TOC i TIC tijekom procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* za pokus P1-9 tijekom 30 dana.

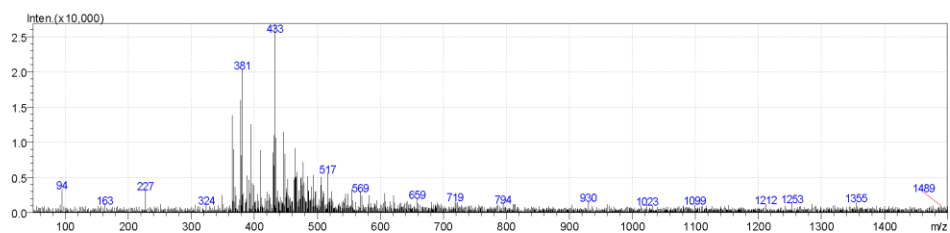
<i>t</i> / dan	TOC (P1-9) / mg/L	TOC (SP) / mg/L	TIC (P1-9) / mg/L	TIC (SP) / mg/L
0.	5,31	5,31	1,13	1,13
3.	10,28	5,18	6,45	2,22
7.	3,04	6,01	0,59	0,15
14.	3,63	8,44	4,70	0,33
21.	4,15	5,55	2,12	1,33
30.	6,78	4,43	2,14	1,50

4.1.3. Rezultati praćenja otpuštenih aditiva s površine čestica polistirena HPLC-MS analizom

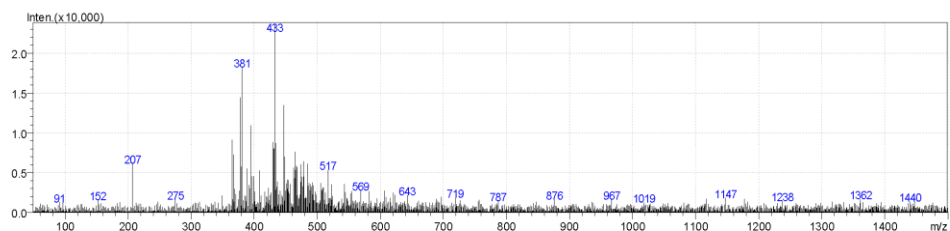
Na slikama 14. – 16. prikazani su spektri pikova dobiveni HPLC-MS analizom za uvjete pokusa P1-13, P1-19 i P1-9. U tablicama 16. – 18. navedeni su aditivi koji su detektirani tijekom procesa biorazgradnje PS-a.



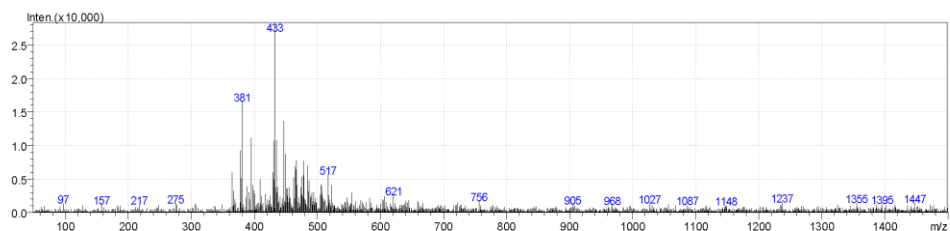
a)



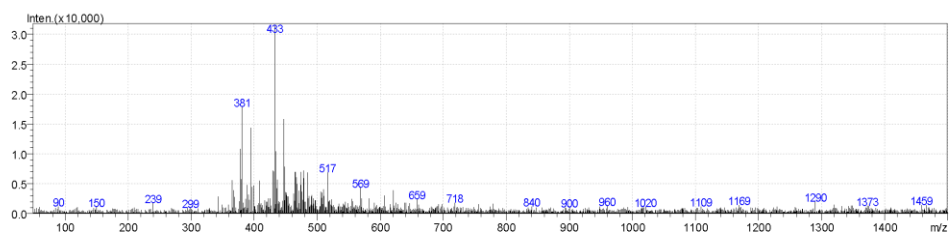
b)



c)



d)

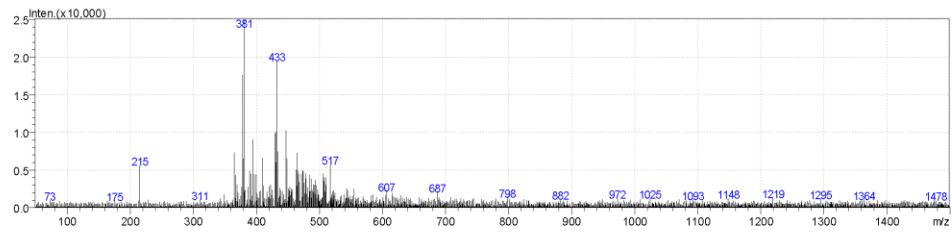


e)

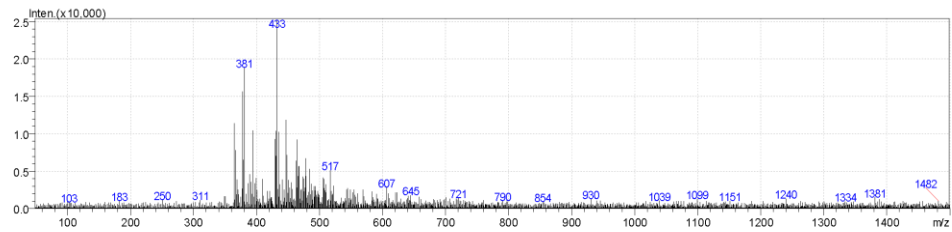
Slika 14. Maseni spektrometri za pokus P1-13 biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *P. alcaligenes* u: a) 3., b) 7., c) 14., d) 21. i e) 30. danu.

Tablica 16. Identificirani spojevi prisutni u pokusu P1-13 tijekom 30 dana.

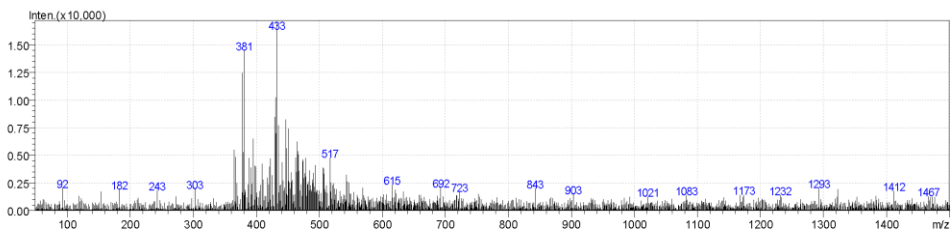
Dan	m/z omjer	Forma iona	Spoj
3, 7., 14., 21., 30.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
	517	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₈ O ₄ S DDTDP diauril tiodipropionat, antioksidans



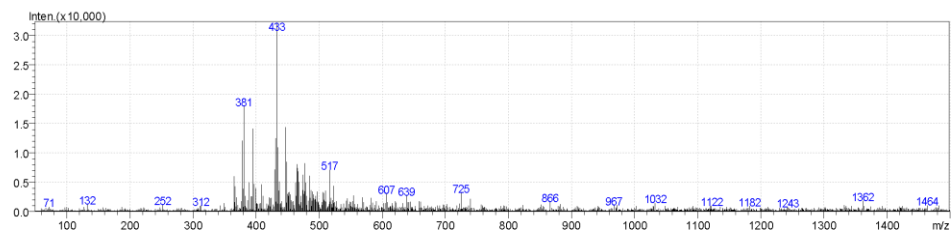
a)



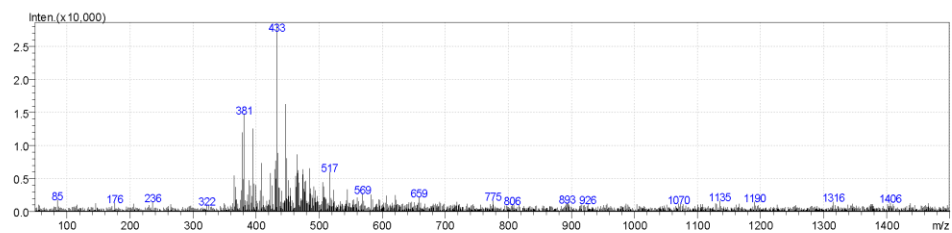
b)



c)



d)

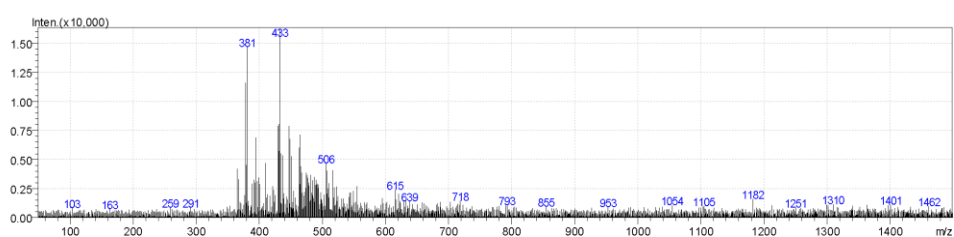


e)

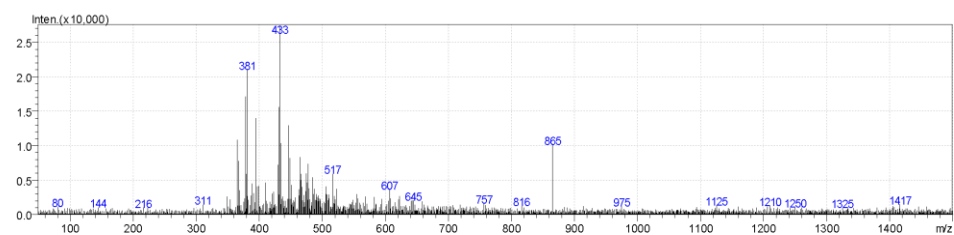
Slika 15. Maseni spektrometri za pokus P1-19 biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *P. alcaligenes* u: a) 3., b) 7., c) 14., d) 21. i e) 30. danu.

Tablica 17. Identificirani spojevi prisutni u pokusu P1-19 tijekom 30 dana.

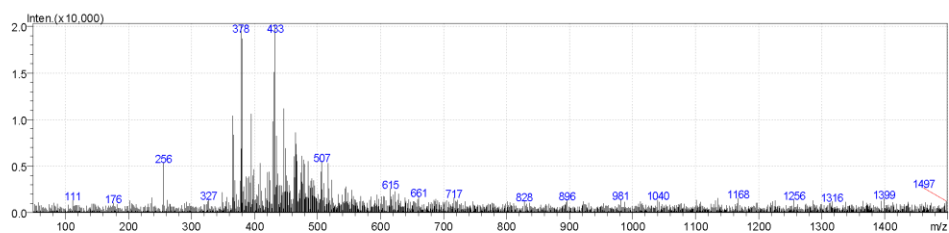
Dan	m/z omjer	Forma iona	Spoj
3.	215	$[A_3B+Na]^+$	$[C_3H_6O]_nH_2O$ PPG Polipropilen glikol
	433	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator
	517	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{58}O_4S$ DDTDP diauril tiodipropionat, antioksidans
7.	433	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator
	517	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{58}O_4S$ DDTDP diauril tiodipropionat, antioksidans
14.	303	$[M+Na]^+$	$C_{16}H_{22}O_4$ Dibutil ftalat, plastifikator
	433	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator
	517	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{58}O_4S$ DDTDP diauril tiodipropionat, antioksidans
21., 30.	433	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator
	517	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{58}O_4S$ DDTDP diauril tiodipropionat, antioksidans



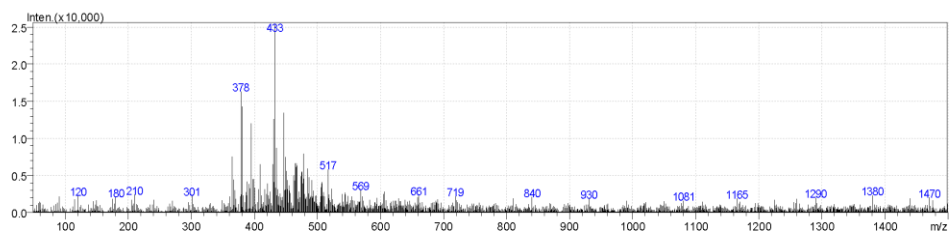
a)



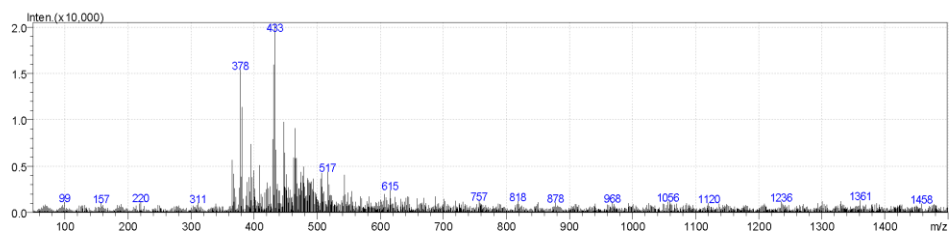
b)



c)



d)



e)

Slika 16. Maseni spektrometri za pokus P1-9 biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *P. alcaligenes* u: a) 3., b) 7., c) 14., d) 21. i e) 30. danu.

Tablica 18. Identificirani spojevi prisutni u pokusu P1-9 tijekom 30 dana.

Dan	m/z omjer	Forma iona	Spoj
3.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
	506	[A _s B+Na] ⁺	[C ₃ H ₆ O] _n H ₂ O PPG Polipropilen glikol
7.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
	517	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₈ O ₄ S DDTDP diauril tiodipropionat, antioksidans
14., 21., 30.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator

4.1.4. Rezultati toksičnosti vodene faze nakon provedbe pokusa biorazgradnje polistirena primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*

U tablici 19. dani su rezultati toksičnosti vodene faze nakon provedene biorazgradnje PS-a.

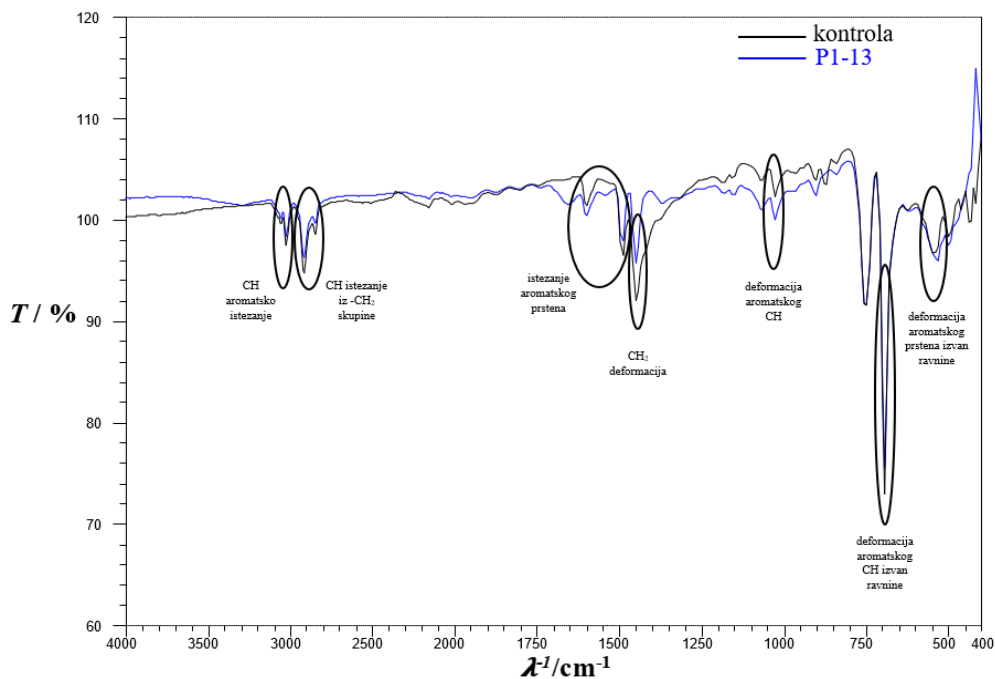
Tablica 19. Rezultati toksičnosti vodene faze dobivenih nakon provedbe pokusa P1 uz vrijednosti inhibicije luminiscencije bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (INH) te 20%-tne, (EC₂₀), odnosno 50%-tne efektivne koncentracije (EC₅₀).

Pokus	INH / %	EC ₂₀ / %	EC ₅₀ / %
P1-1	53,36	/*	/*
P1-2	45,17	12,50	/*
P1-3	45,89	/*	/*
P1-4	41,21	28,57	/*
P1-5	49,93	/*	/*
P1-6	51,79	11,00	/*
P1-7	28,81	2,24	/*
P1-8	36,31	23,96	/*
P1-9	18,36	/*	/*
P1-10	32,70	/*	/*
P1-11	11,65	/*	/*
P1-12	59,86	/*	8,25
P1-13	44,28	34,97	/*
P1-14	32,26	0,30	12,12
P1-15	8,02	0,34	7,54
P1-16	40,08	16,67	/*
P1-17	27,45	/*	/*
P1-18	20,43	/*	/*
P1-19	32,89	23,32	/*
P1-20	73,11	17,54	/*
P1-21	40,44	/*	/*
P1-22	32,84	28,57	/*
P1-23	28,01	/*	/*
P1-24	46,92	16,67	/*
P1-25	33,59	/*	/*
P1-26	46,79	33,30	/*
P1-27	43,74	18,18	/*

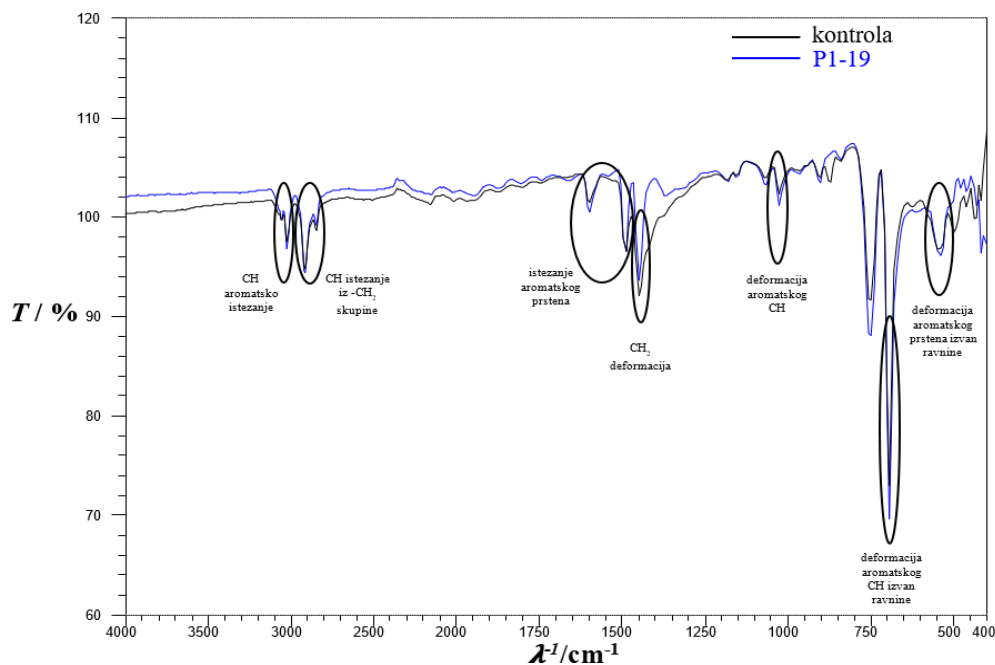
*vrijednosti nisu mogle biti procijenjene

4.1.5. Rezultati usporedbe strukture čestica polistirena prije i nakon biorazgradnje FTIR-ATR spektroskopijom

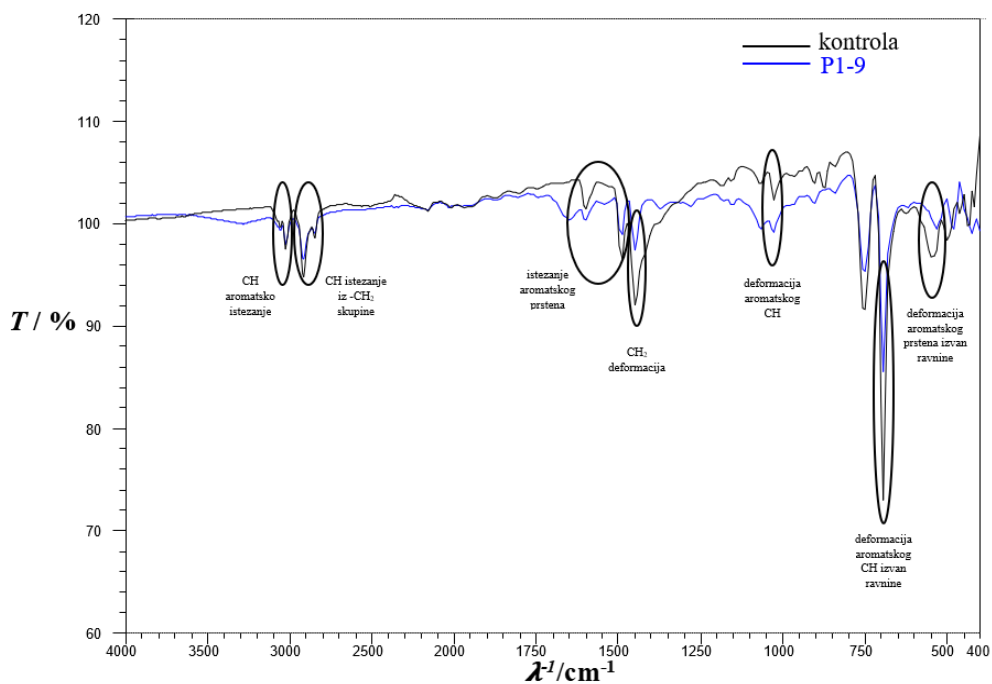
Čestice MP-a analizirane su spektroskopski prije i nakon provedenog pokusa te su pikovi uspoređeni na slikama 17. a) – c) za uvjete pokusa P1-13, P1-19 i P1-9.



a)



b)



c)

Slika 17. Prikaz FTIR spektara za PS prije i nakon biorazgradnje za pokuse: a) P1-13; b) P1-19; c) P1-9.

4.1.6. Rezultati statističke analize varijance za pokus P1 s polistirenom

Devijacija od F -vrijednosti omogućuje identifikaciju statistički značajnih čimbenika, a p -vrijednost pokazuje razinu značajnosti odnosno testira valjanost F -vrijednosti.⁶⁴ Značajnost čimbenika potvrđuje se ako je $p < 0,05$, ali preporuka je da se navodi njena konkretna vrijednost. Analiza varijance (ANOVA) primijenila se kako bi se ispitao utjecaj sva tri čimbenika pokusa na odziv (logaritamska vrijednost CFU) u procesima biorazgradnje (tablica 20.). U tablici 21. navedeni su statistički podaci koji opisuju kvalitetu modela za pokus biorazgradnje PS-a pomoću bakterije *Pseudomonas alcaligenes*.

Tablica 20. Eksperimentalne vrijednosti parametara modela prilikom biorazgradnje PS-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* (pokus P1).

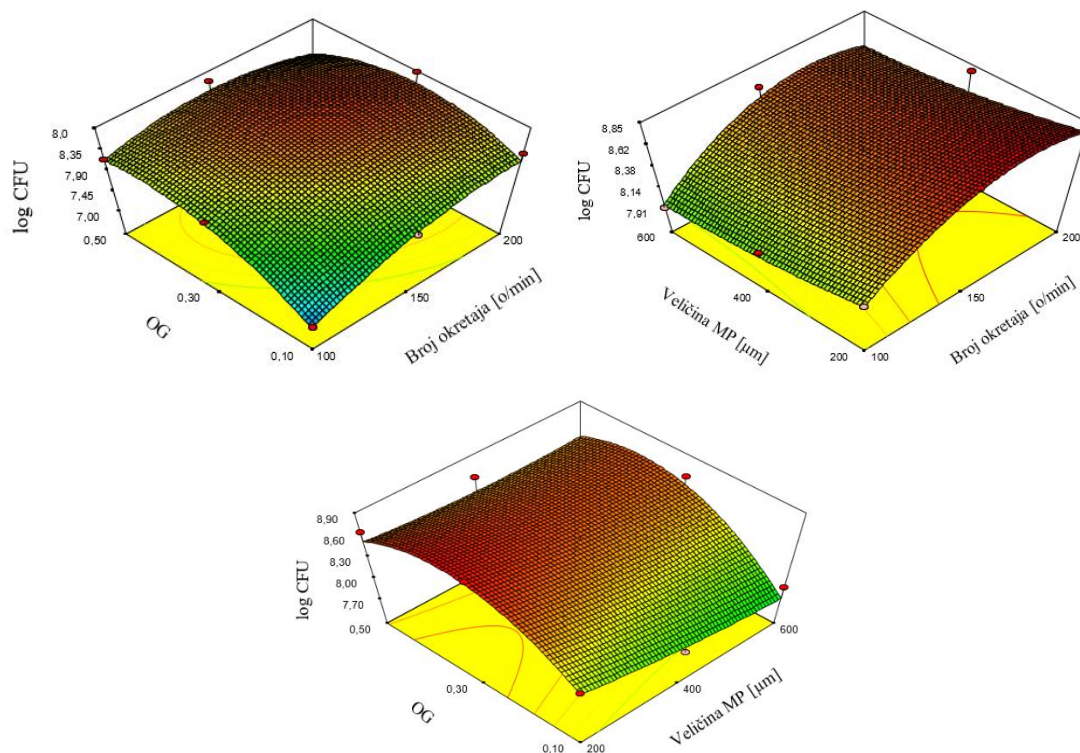
	Zbroj kvadrata	df	Srednji kvadrat	F-vrijednost	p-vrijednost Vjv. > F
Model	5,97	9	0,66	18,12	<0,0001
A: broj okretaja / o/min	1,41	1	1,41	38,53	<0,0001
B: veličina MP / μm	0,29	1	0,29	7,88	0,0121
C: OG / -	1,47	1	1,47	40,23	<0,0001
AB	$4,083 \cdot 10^{-4}$	1	$4,083 \cdot 10^{-4}$	0,011	0,9171
AC	0,93	1	0,93	25,38	0,0001
BC	0,11	1	0,11	3,06	0,0982
A ²	0,54	1	0,54	14,85	0,0013
B ²	0,019	1	0,019	0,51	0,4867
C ²	1,19	1	1,19	32,60	<0,0001
Ostatak	0,62	17	0,037	/	/
Ukupno	6,59	26	/	/	/

df = stupnjevi slobode

Tablica 21. Statistički podaci prema ANOVA modela za pokus P1 s česticama PS-a.

σ	R^2	Srednja vrijednost	R^2_{adj}	C.V. %	R^2_{pred}	PRESS	Odgovarajuća preciznost
0,19	0,9056	8,14	0,8556	2,35	0,7365	1,74	16,72

Optimalni uvjeti za provedbu procesa, dobiveni su primjenom punog faktorskog plana uz pomoć programskog alata Design Expert na osnovi podataka o promjeni vrijednosti log CFU tijekom 30 dana. Na slici 18. prikazani su odzivne površine za ispitivane čimbenike (OG, broj okretaja, veličina MP) i utjecaj njihova međudjelovanja na broj razvijenih kolonija. Crvena boja ukazuje na najintenzivniji utjecaj varijabli na log CFU, zelena srednji, a plava najniži.



Slika 18. 3D prikazi odzivnih površina za pokus P1 s PS koji prikazuju utjecaj međuovisnosti ispitivanih čimbenika na rast broja stanica bakterija: a) OG i broj okretaja, b) veličina MP i broj okretaja, c) OG i veličina MP.

Tablicom 22. prikazani su čimbenici koji imaju najznačajniji utjecaj na proces te odgovarajuće razine pri kojima bi proces biorazgradnje bio optimalan.

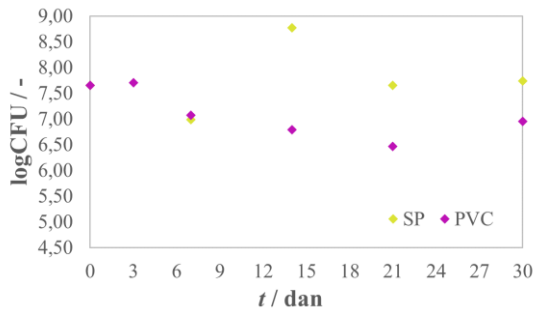
Tablica 22. Optimalni uvjeti za biorazgradnju PS-a primjenom kulture *Pseudomonas alcaligenes*.

Broj okretaja / o/min	Veličina čestica / μm	OG / -
180	203	0,27

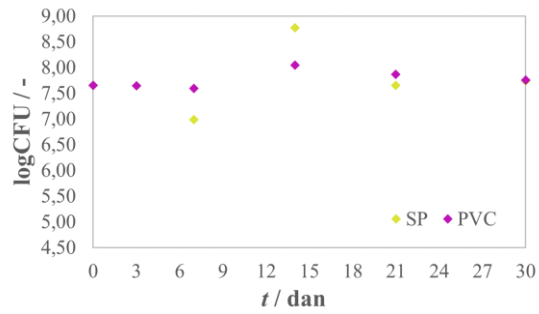
4.2. Rezultati biorazgradnje mikroplastičnih čestica poli(vinil-klorida)

4.2.1. Rezultati promjene logaritamske CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje poli(vinil-klorida) primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*

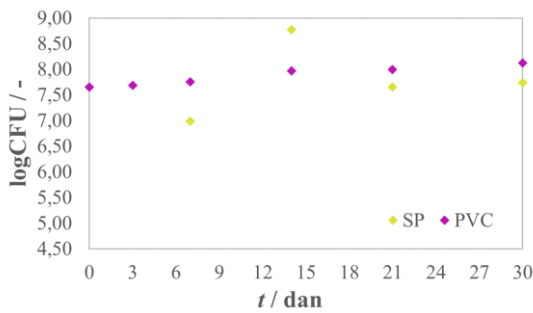
Na slikama 19. a) – ab) prikazane su promjene logaritamske CFU vrijednosti bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes*, praćene tijekom 30 dana biorazgradnje PVC-a.



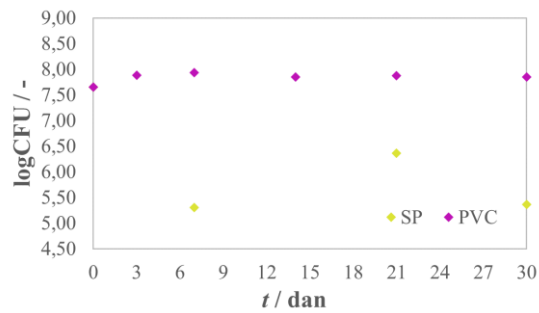
a)



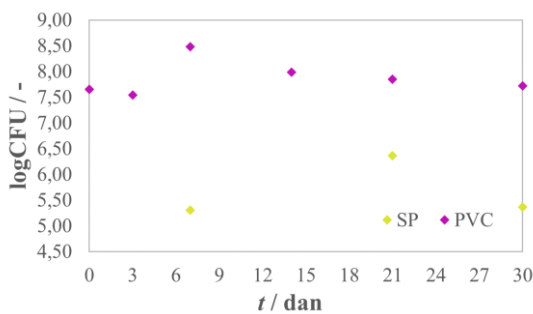
b)



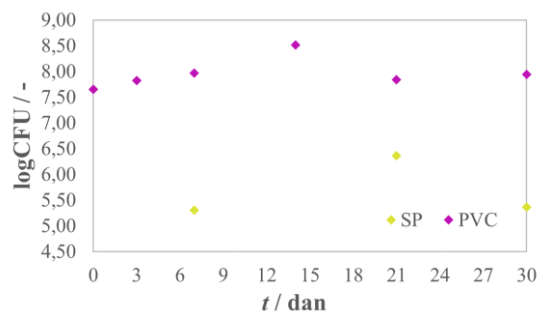
c)



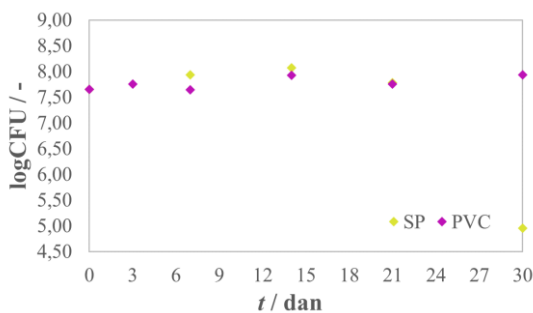
d)



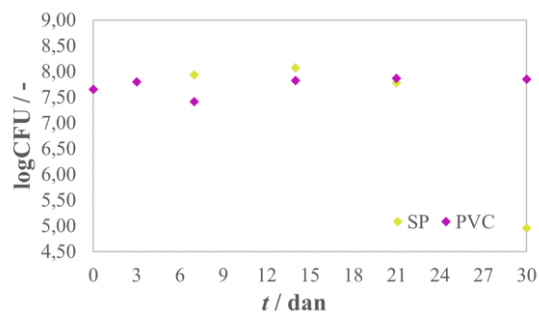
e)



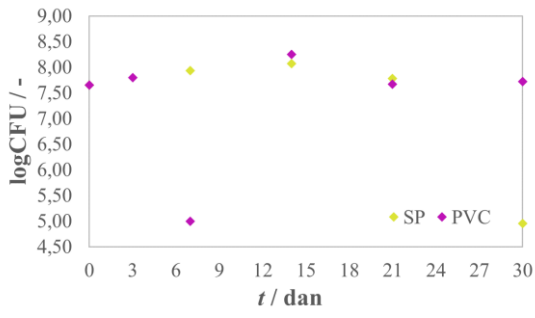
f)



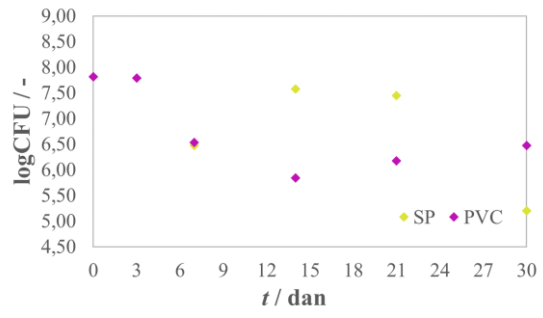
g)



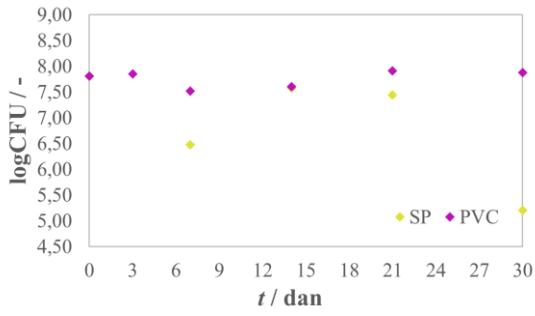
h)



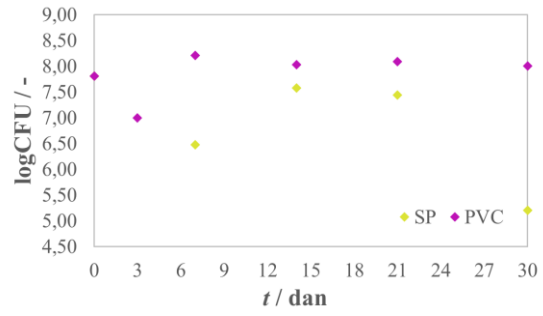
i)



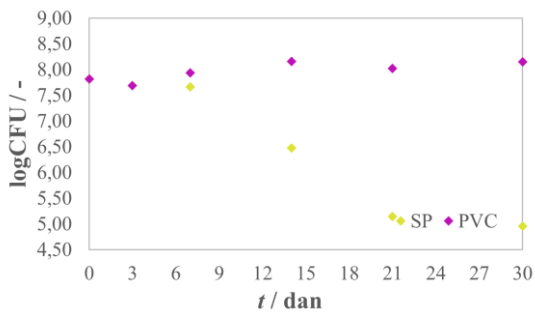
j)



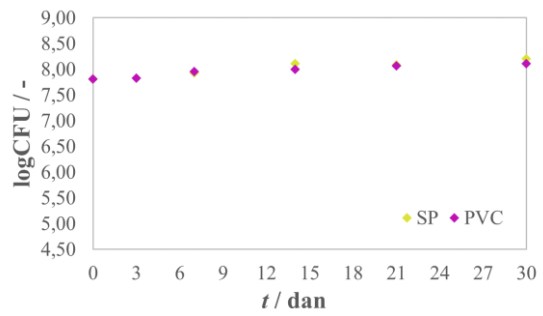
k)



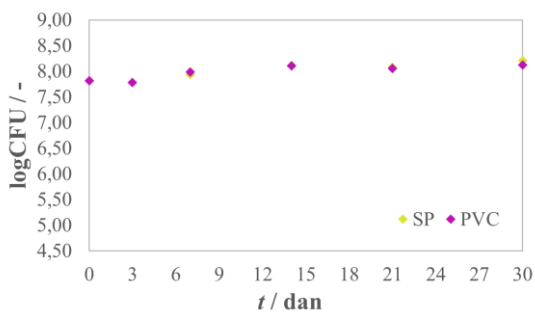
l)



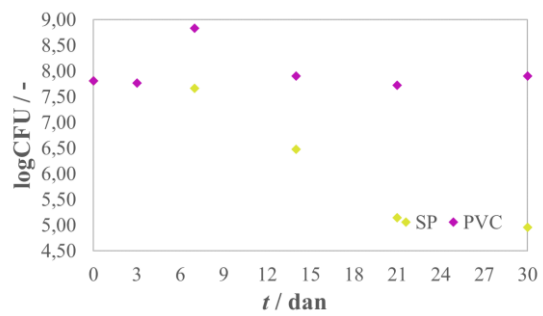
m)



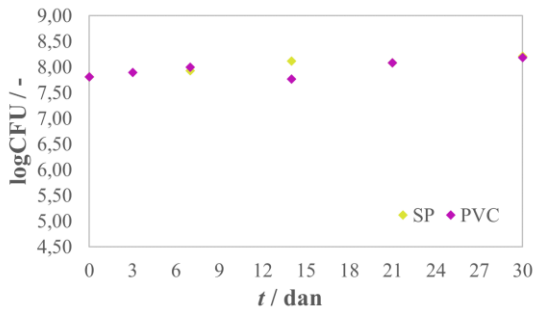
n)



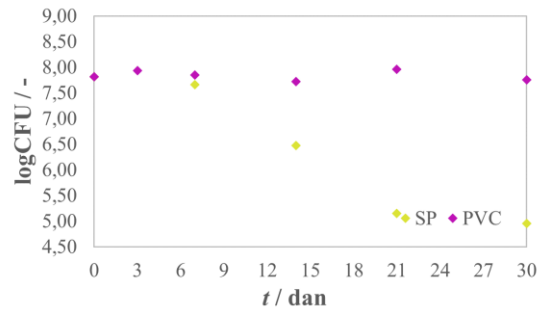
o)



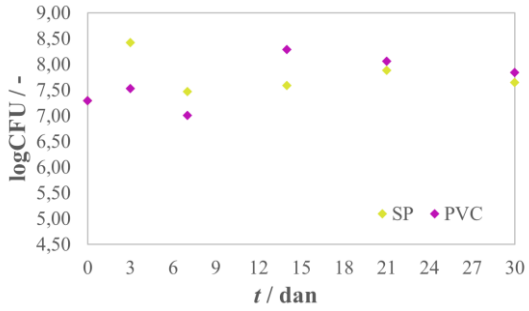
p)



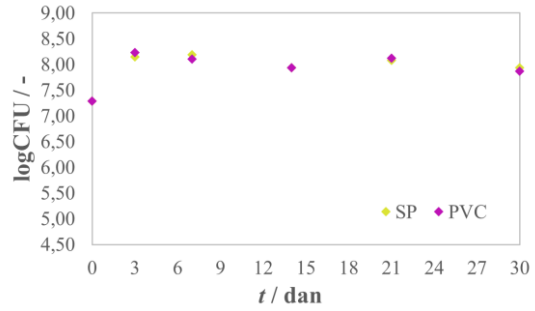
q)



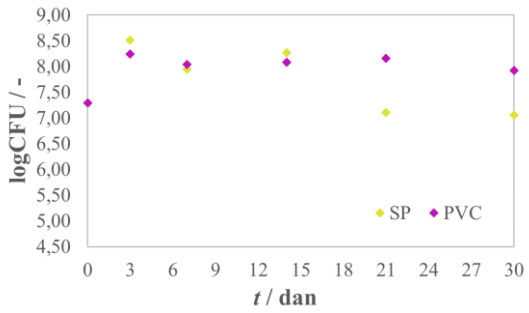
r)



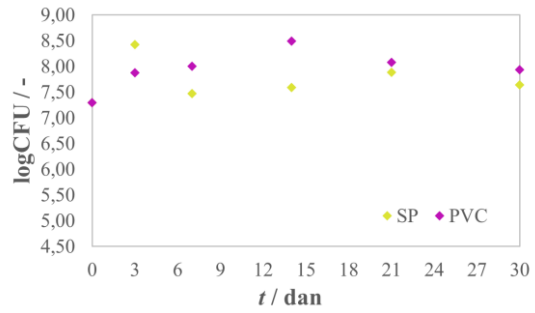
s)



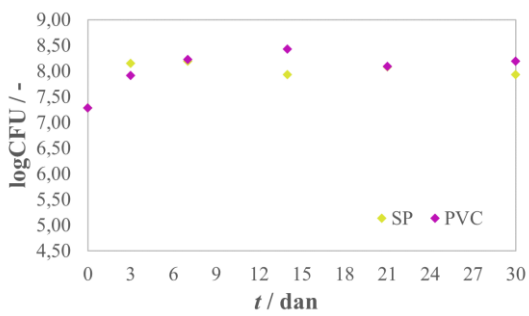
t)



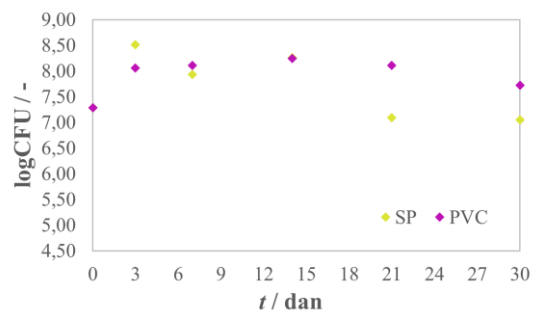
u)



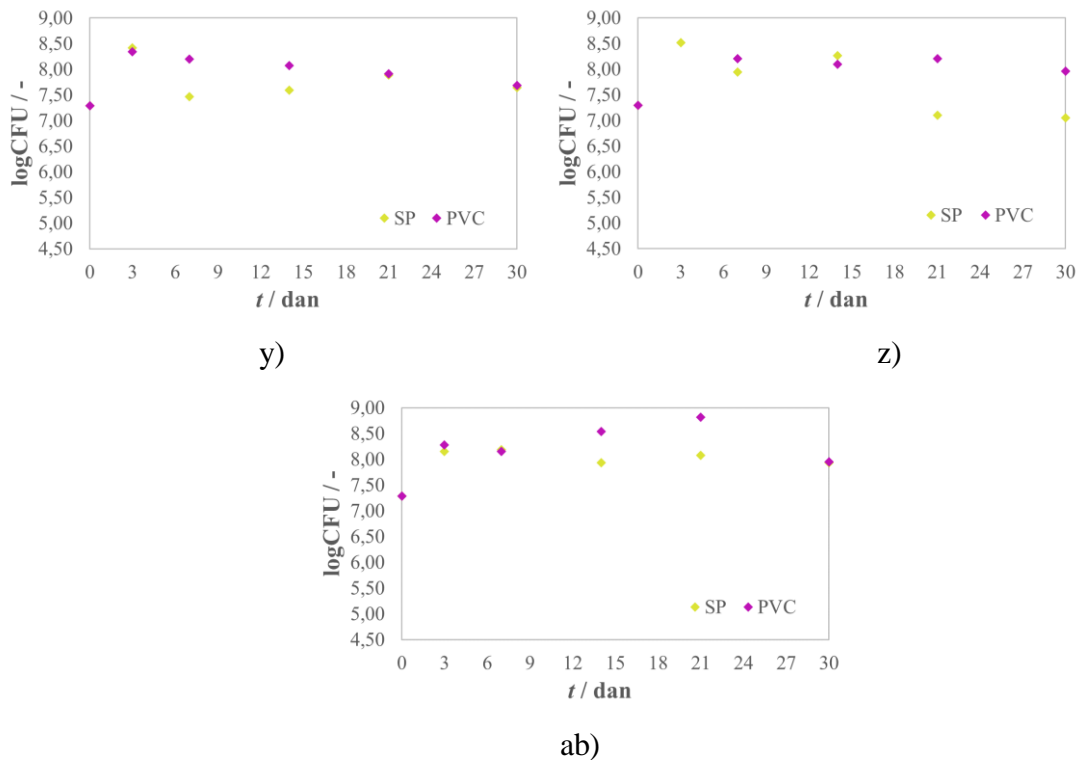
v)



w)



x)



Slika 19. Promjena logaritamske CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* za pokus a) P2-1; b) P2-2; c) P2-3; d) P2-4; e) P2-5; f) P2-6; g) P2-7; h) P2-8; i) P2-9; j) P2-10; k) P2-11; l) P2-12; m) P2-13; n) P2-14; o) P2-15; p) P2-16; q) P2-17; r) P2-18; s) P2-19; t) P2-20; u) P2-21; v) P2-22; w) P2-23; x) P2-24; y) P2-25; z) P2-26 i ab) P2-27 tijekom 30 dana.

4.2.2. Rezultati promjena koncentracije TOC i TIC tijekom biorazgradnje poli(vinil-klorida) primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*

Rezultati za tri odabrana čimbenika dobiveni TOC analizom prikazani su u tablicama 23. – 25. Prikazana je promjena sadržaja ukupnog, organskog i anorganskog ugljika tijekom biorazgradnje PVC-a primjenom *P. alcaligenes* za uvjete pokusa P2-2, P2-17 i P2-24. Ova tri pokusa odabrana su kroz usporedbu s optimalnim uvjetima, zbog pravilnog ponašanja log CFU i mogućnosti usporedbe sve tri OG.

Tablica 23. Promjena vrijednosti TOC i TIC tijekom procesa biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* za pokus P2-2 tijekom 30 dana.

<i>t</i> / dan	TOC (P2-2) / mg/L	TOC (SP) / mg/L	TIC (P2-2) / mg/L	TIC (SP) / mg/L
0.	5,54	5,54	4,78	4,78
3.	6,37	6,83	3,76	3,66
7.	7,11	6,98	1,71	1,41
14.	3,58	4,35	0,96	1,30
21.	7,96	5,37	0,56	0,38
30.	3,22	1,33	0,23	0,23

Tablica 24. Promjena vrijednosti TOC i TIC tijekom procesa biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* za pokus P2-17 tijekom 30 dana.

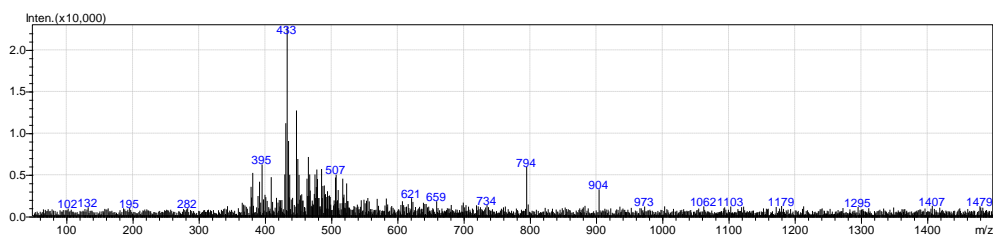
<i>t</i> / dan	TOC (P2-17) / mg/L	TOC (SP) / mg/L	TIC (P2-17) / mg/L	TIC (SP) / mg/L
0.	4,20	4,20	3,69	3,69
3.	6,69	2,48	3,09	1,12
7.	4,12	6,17	0,53	1,68
14.	5,08	5,12	0,20	0,38
21.	6,03	4,06	0,91	1,93
30.	2,88	0,40	1,88	0,10

Tablica 25. Promjena vrijednosti TOC i TIC tijekom procesa biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes* za pokus P2-24 tijekom 30 dana.

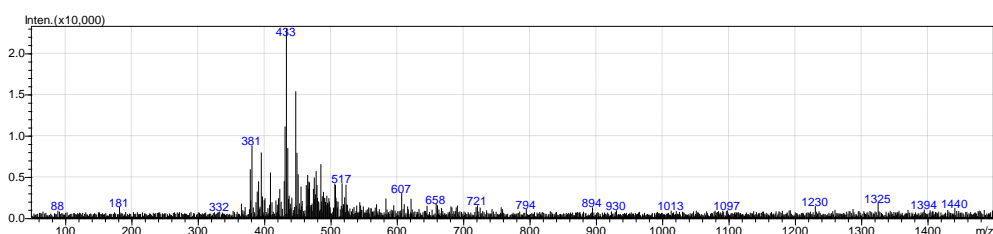
<i>t</i> / dan	TOC (P2-24) / mg/L	TOC (SP) / mg/L	TIC (P2-24) / mg/L	TIC (SP) / mg/L
0.	9,63	9,63	4,51	4,51
3.	3,86	3,20	1,49	0,88
7.	5,07	5,18	0,57	1,17
14.	5,70	4,47	0,04	0,74
21.	9,62	3,62	3,63	0,89
30.	5,46	0,97	4,85	0,79

4.2.3. Rezultati praćenja otpuštenih aditiva s površine čestica poli(vinil-klorida) klorida HPLC-MS analizom

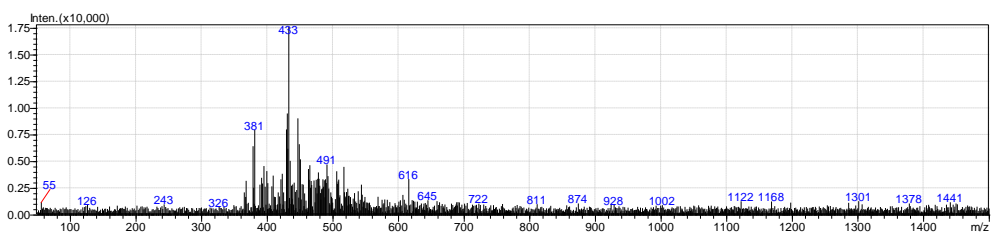
Na slikama 20. – 22. prikazani su spektri pikova dobiveni HPLC-MS analizom za pokuse P2-2, P2-17 i P2-24. Na pripadajućim tablicama 26. – 28. ispod svakog pokusa prema definirani su značajniji pikovi po pojedinom danu.



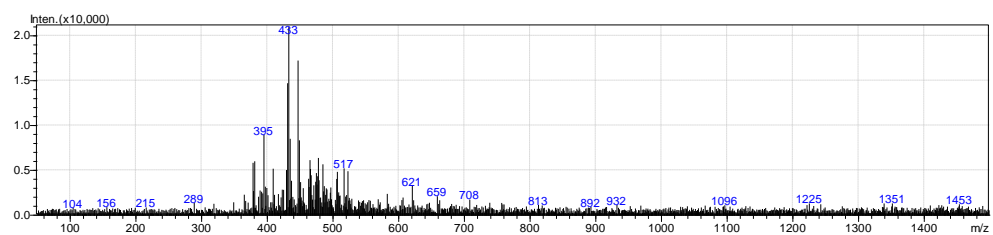
a)



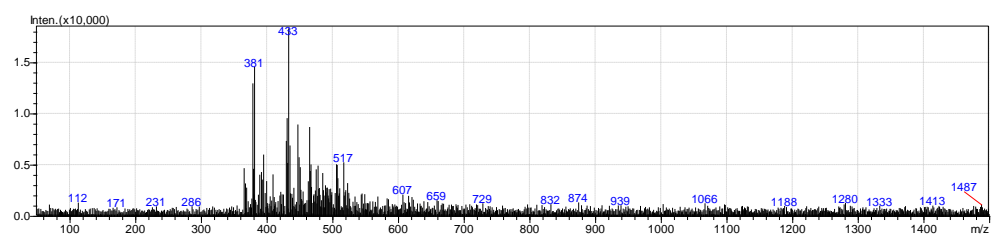
b)



c)



d)

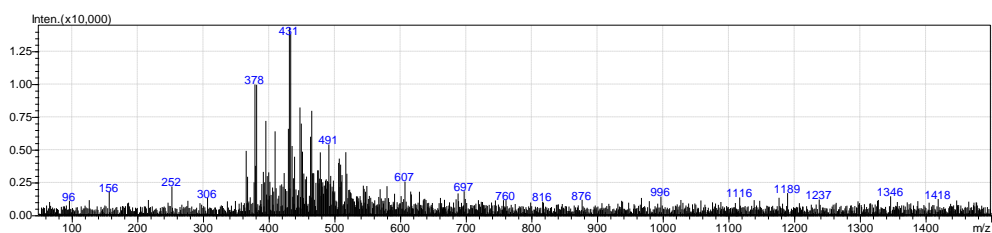


e)

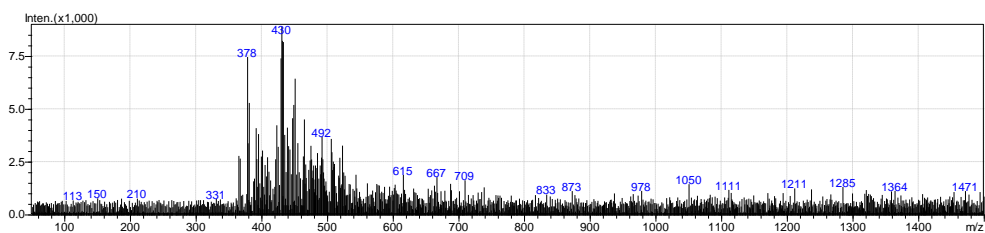
Slika 20. Maseni spektrometri za pokus P2-2 biorazgradnje PVC-a primjenom bakterijske kulture *P. alcaligenes* u: a) 3., b) 7., c) 14., d) 21. i e) 30. danu.

Tablica 26. Definirani značajni pikovi prema HPLC-MS analizi za pokus P2-2.

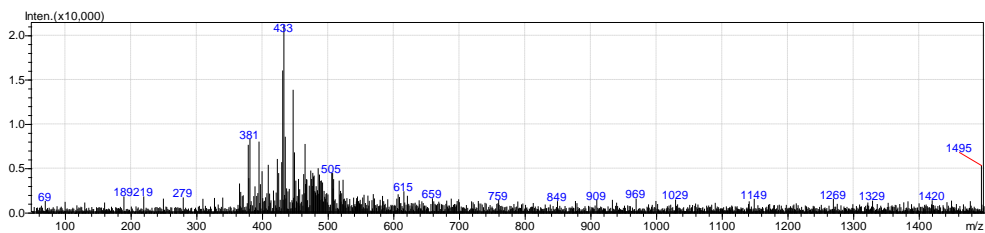
Dan	m/z omjer	Forma iona	Spoj
3.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
	794	[A ₁₃ B+Na] ⁺	[C ₃ H ₆ O] _n H ₂ O PPG Polipropilen glikol
7.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
	517	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₈ O ₄ S DDTDP diairil tiodipropionat, antioksidans
14.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
21.	395	[A ₈ B+Na] ⁺	[C ₂ H ₄ O] _n H ₂ O PEG Polietilen glikol
	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
	517	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₈ O ₄ S DDTDP diairil tiodipropionat, antioksidans
30.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
	517	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₈ O ₄ S DDTDP diairil tiodipropionat, antioksidans



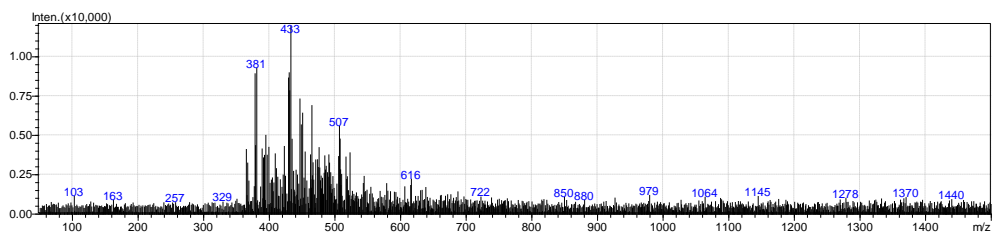
a)



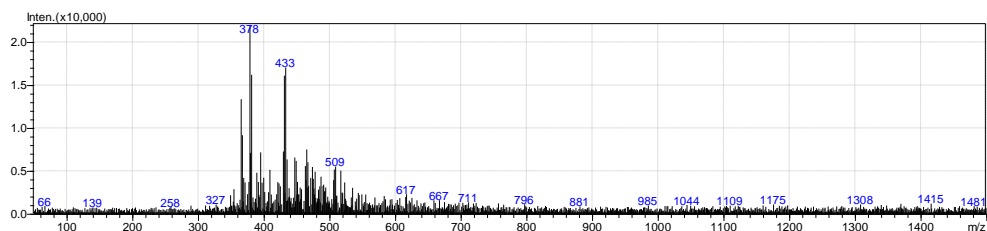
b)



c)



d)

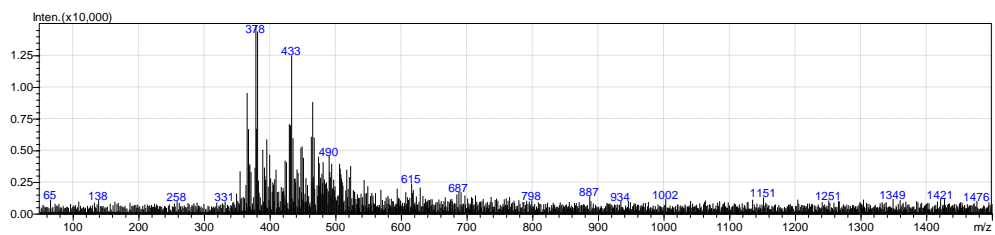


e)

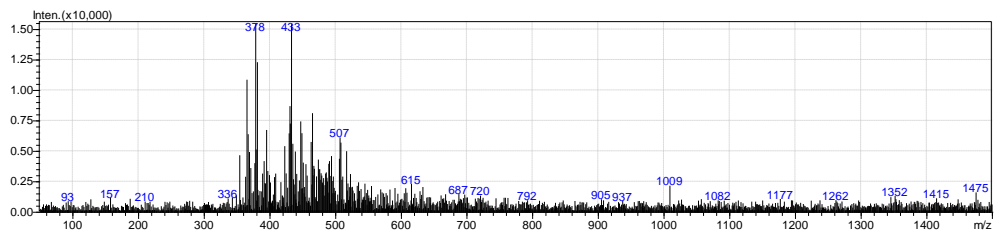
Slika 21. Maseni spektrometri za pokus P2-17 biorazgradnje PVC-a primjenom bakterijske kulture *P. alcaligenes* u: a) 3., b) 7., c) 14., d) 21. i e) 30. danu.

Tablica 27. Definirani značajni pikovi prema HPLC-MS analizi za pokus P2-17.

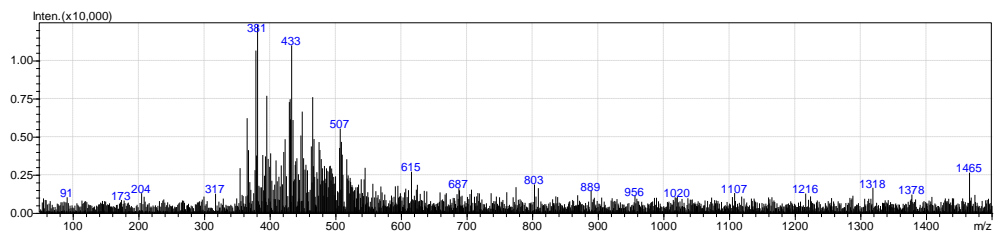
Dan	m/z omjer	Forma iona	Spoj
3.	378	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₄₂ O ₄ DOA Dioktil adipat, plastifikator
	431	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
7.	378	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₄₂ O ₄ DOA Dioktil adipat, plastifikator
	430	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
14.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
	505	[A ₈ B+Na] ⁺	[C ₃ H ₆ O] _n H ₂ O PPG Polipropilen glikol
21.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
30.	433	[M+K] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Diizooktil ftalat, plastifikator
	378	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₄₂ O ₄ DOA Dioktil adipat, plastifikator



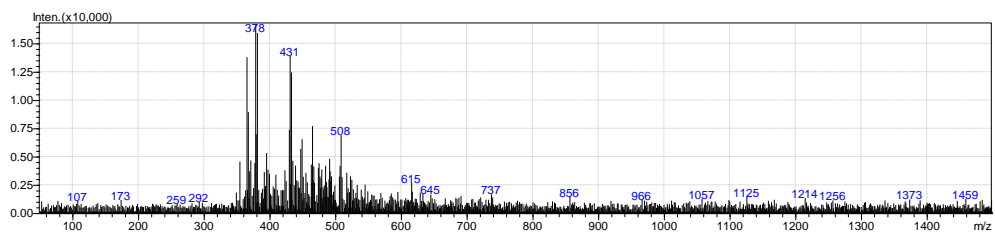
a)



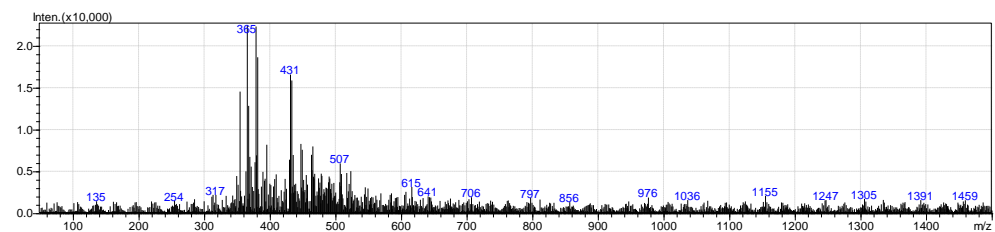
b)



c)



d)



e)

Slika 22. Maseni spektrometri za pokus P2-24 biorazgradnje PVC-a primjenom bakterijske kulture *P. alcaligenes* u: a) 3., b) 7., c) 14., d) 21. i e) 30. danu.

Tablica 28. Definirani značajni pikovi prema HPLC-MS analizi za pokus P2-24.

Dan	m/z omjer	Forma iona	Spoj
3.	378	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{42}O_4$ DOA Dioktil adipat, plastifikator
	433	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator
7.	433	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator
	1009	$[A_{17}B+H]^+$	$[C_3H_6O]_nH_2O$ PPG Polipropilen glikol
14.	433	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator
	803	$[M_2+Na]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator
21.	378	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{42}O_4$ DOA Dioktil adipat, plastifikator
	433	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator
30.	365	$[A_7B+K]^+$	$[C_2H_4O]_nH_2O$ PEG Polietilen glikol
	433	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator

4.2.4. Rezultati toksičnosti vodene faze nakon provedbe pokusa biorazgradnje poli(vinil-klorida) primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*

U tablici 29. dani su rezultati ispitivanja toksičnosti vodene faze nakon provedene biorazgradnje PVC-a.

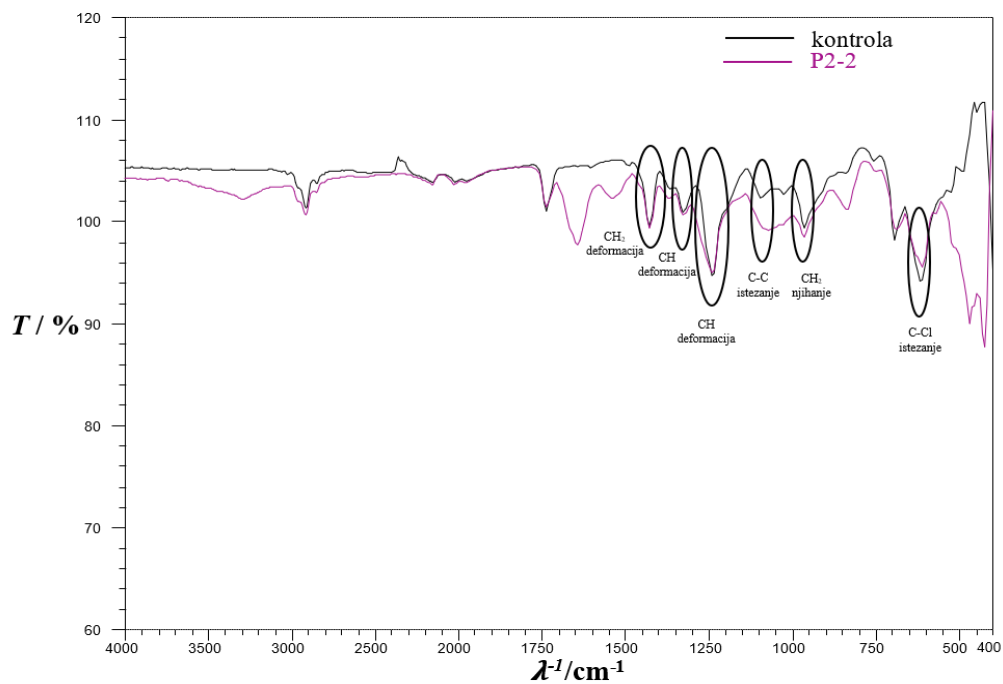
Tablica 29. Rezultati testova toksičnosti vodenih faza dobivenih nakon provedbe pokusa P2 uz vrijednosti inhibicije luminiscencije bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (INH) te 20%-tne, (EC₂₀), odnosno 50%-tne inhibicije luminiscencije (EC₅₀).

Pokus	INH / %	EC ₂₀ / %	EC ₅₀ / %
P2-1	57,52	24,65	47,03
P2-2	72,25	3,69	16,87
P2-3	50,07	14,05	45,06
P2-4	64,34	6,12	22,62
P2-5	46,68	14,86	/*
P2-6	52,71	44,45	/*
P2-7	45,41	/*	/*
P2-8	58,65	18,83	41,06
P2-9	17,60	/*	/*
P2-10	65,09	22,22	28,23
P2-11	62,91	12,33	34,47
P2-12	61,13	29,92	45,86
P2-13	31,75	30,94	/*
P2-14	67,97	4,60	26,54
P2-15	19,21	/*	/*
P2-16	47,20	/*	/*
P2-17	/*	/*	/*
P2-18	63,93	29,76	43,85
P2-19	59,25	9,11	34,53
P2-20	72,89	3,68	18,41
P2-21	46,75	32,83	/*
P2-22	56,78	35,71	44,96
P2-23	55,41	21,29	46,29
P2-24	55,08	6,21	45,93
P2-25	62,42	3,24	23,31
P2-26	72,56	/*	14,01
P2-27	50,56	4,07	32,57

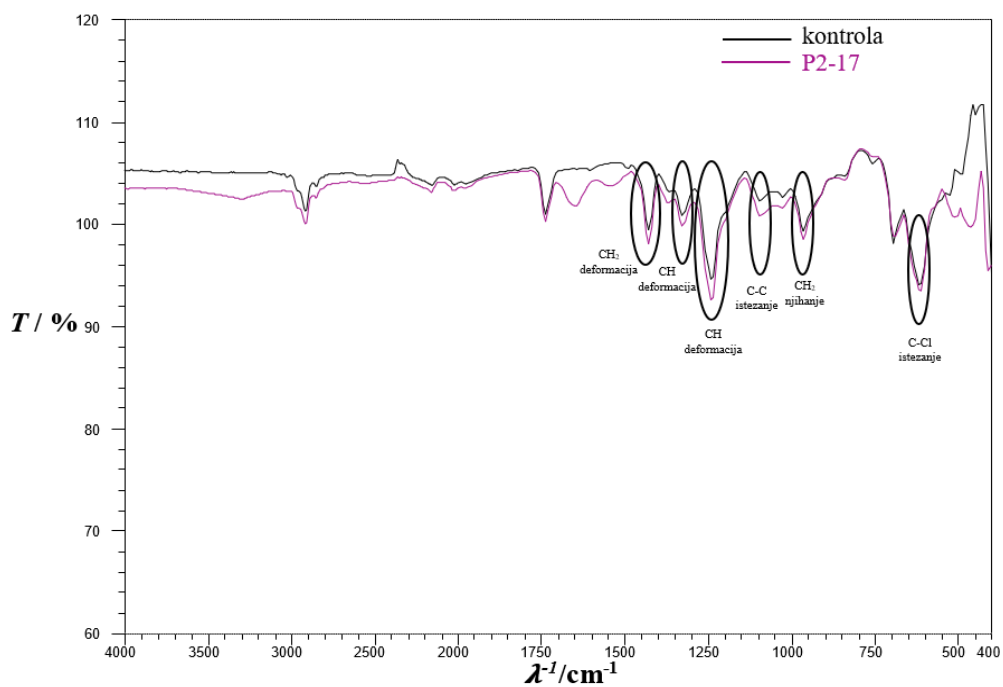
*vrijednosti nisu mogle biti procijenjene

4.2.5. Rezultati usporedbe strukture čestica poli(vinil-klorida) prije i nakon biorazgradnje FTIR-ATR spektroskopijom

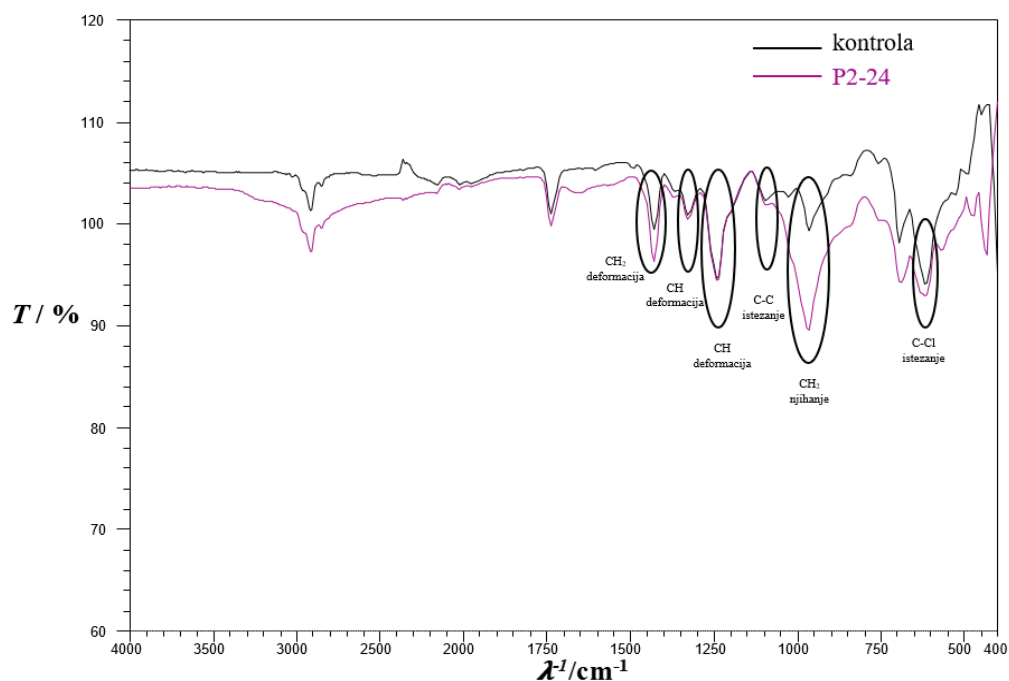
Čestice MP-e analizirane su spektroskopski prije i nakon provedenog pokusa te su pikovi uspoređeni na slikama 23. a) – c) za uvjete pokusa P2-2, P2-17 i P2-24.



a)



b)



c)

Slika 23. Prikaz FTIR spektara za PVC-a prije i nakon biorazgradnje za pokuse: a) P2-2; b) P2-17; c) P2-24.

4.2.6. Rezultati statističke analize varijance za pokus P2 s poli(vinil-kloridom)

Analiza varijance provedena je u istu svrhu kao što je to opisano za pokus P1, a njeni rezultati u obliku statističkih podataka modela i parametara analize istaknuti su u tablicama 30 i 31. Optimalni uvjeti za provedbu procesa, dobiveni su primjenom punog faktorskog plana uz pomoć programskog alata Design Expert na osnovi podataka o promjeni vrijednosti CFU tijekom 30 dana. Na slici 24. prikazani su odzivne površine za glavne ispitivane čimbenike i njihov utjecaj na broj razvijenih kolonija.

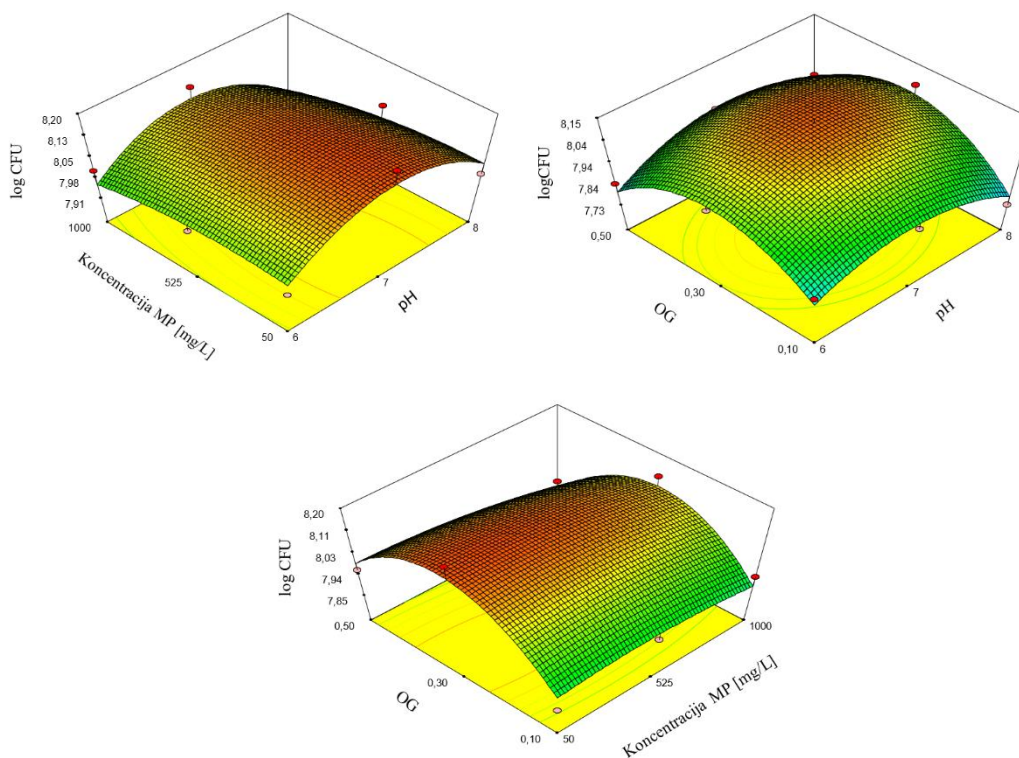
Tablica 30. Eksperimentalne vrijednosti parametara modela prilikom biorazgradnje PVC-a bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* (pokus P2).

	Zbroj kvadrata	df	Srednji kvadrat	F-vrijednost	p-vrijednost Vjv. > F
Model	0,4	9	0,044	17,60	<0,0001
A: pH / -	$2,722 \cdot 10^{-0,004}$	1	$2,722 \cdot 10^{-0,004}$	0,11	0,7457
B: koncentracija MP / mg/L	0,021	1	0,021	8,25	0,0106
C: OG / -	$4,05 \cdot 10^{-0,003}$	1	$4,05 \cdot 10^{-0,003}$	1,62	0,2207
AB	$1,2 \cdot 10^{-0,003}$	1	$1,2 \cdot 10^{-0,003}$	0,48	0,4983
AC	$8,008 \cdot 10^{-0,003}$	1	$8,008 \cdot 10^{-0,003}$	3,20	0,0917
BC	$6,533 \cdot 10^{-0,003}$	1	$6,533 \cdot 10^{-0,003}$	2,61	0,1248
A ²	0,1	1	0,1	40,81	<0,0001
B ²	$4,46 \cdot 10^{-0,003}$	1	$4,46 \cdot 10^{-0,003}$	1,77	0,2004
C ²	0,25	1	0,25	99,54	<0,0001
Ostatak	0,62	17	0,037	/	/
Ukupno	6,59	26	/	/	/

Tablica 31. Statistički podaci prema ANOVA modela za pokus P2 s česticama PVC-a.

σ	R^2	Srednja vrijednost	R^2_{adj}	C.V. %	R^2_{pred}	PRESS	Odgovarajuća preciznost
0,05	0,9031	7,91	0,8518	0,63	0,7198	0,12	14,12

Optimalni uvjeti za provedbu procesa, dobiveni su primjenom punog faktorskog plana uz pomoć programskog alata Design Expert na osnovi podataka o promjeni vrijednosti log CFU tijekom 30 dana. Na slici 24. prikazani su odzivne površine za ispitivane čimbenike (γ_{MP} , pH-vrijednost, OG) i utjecaj njihova međudjelovanja na broj razvijenih kolonija. Crvena boja ukazuje na najintenzivniji utjecaj varijabli na log CFU, zelena srednji, a plava najniži.



Slika 24. 3D prikazi modela odzivnih površina za pokus P2 s PVC-om koji prikazuju utjecaj međuovisnosti ispitivanih čimbenika na rast broja stanica bakterija: a) γ_{MP} i pH-vrijednost, b) OG i pH-vrijednost, c) OG i γ_{MP} .

Tablicom 32. su prikazani čimbenici koji imaju najznačajniji utjecaj na proces te odgovarajuće razine pri kojima bi proces biorazgradnje bio optimalan.

Tablica 32. Optimalni uvjeti za biorazgradnju PVC-a primjenom kulture *Pseudomonas alcaligenes*.

pH-vrijednost / -	Koncentracija čestica / mg/L	OG / -
7,05	208	0,32

5. RASPRAVA

Raznovrsna svojstva plastike osigurala su njen značaj i dovela do hiperprodukcije tijekom 20. i 21. stoljeća. Jednokratna uporaba, brzo odbacivanje i postojanost u okolišu postali su jasan i zabrinjavajući problem za ekosustave najudaljenije od ekvatora i površine mora. U vodene sustave dopijeva kroz otpadne vode, nemarno odlaganje plastičnog otpada koji s vremenom generira sve manje fragmente osnovnog proizvoda ili u nesretnim slučajevima. Godine 2021., blizu obale Šri Lanke, potonuo je teretni brod zajedno s oko 1680 tona polimerne sirovine u obliku sitnih peleta, što je proglašeno većom katastrofom od izlivanja nafte uslijed iste nesreće.⁷⁰ Nekada do onečišćenja dolazi nehotice, tijekom akvakulturnih i marikulturnih djelatnosti te ribarenja. Iz tog razloga se znanstvena zajednica okreće modeliranju procesa koji bi pomogli s uklanjanjem tog problema. To naravno nije dovoljno već je potrebno uvoditi ozbiljnije sankcije u vezi nepravilnog i nedopuštenog odlaganja otpada, divljih odlagališta i poticati korištenje biomaterijala, pravilno odlaganje i reciklažu te zabraniti proizvodnju jednokratnih materijala s toliko dugim životnim ciklusom.

Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnosti provedbe procesa bioremedijacije vode onečišćene MP česticama polistirena i poli(vinil-klorida) pomoću bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes* te odrediti optimalne uvjete za provedbu procesa. Zaključci su izvedeni kroz rezultate dobivene provedbom biorazgradnje čestica tijekom 30 dana u vodenom mediju. Za vrijeme trajanja procesa praćene su vrijednosti raznih parametara koji upućuju na odvijanje promjena u sustavu. Vrijednosti pH i temperature na početku i kraju oba pokusa bile su poprilično podjednake, a koncentraciju otopljenog O₂ prati blagi pad, kako se radi o aerobnom procesu. Kao glavni pokazatelji odvijanja procesa biorazgradnje bili su promjena CFU vrijednosti, vrijednosti TIC/TOC, otpušteni aditivi praćeni HPLC-MS analizom i rezultati FTIR-ATR spektroskopije polimernih čestica.

5.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje polistirena i poli(vinil-klorida) primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*

Promjena broja stanica tijekom biorazgradnje u oba pokusa, P1 i P2, sastojala se od eksponencijalne faze i stacionarne faze. Faza prilagodbe odvila se prije samog postavljanja pokusa, što je omogućilo da se bakterija tijekom preduzgoja prilagodi na uvjete mineralnoga medija. Iz slike 13. a) – ab) vidljivo je da je u većini slučajeva eksponencijalna faza rasta u P1 uglavnom trajala od 0. do 7. dana kada je nastupila stacionarna faza, u kojoj je broj kolonija bio podjednak do kraja pokusa (broj živih i mrtvih stanica je jednak). Početne

vrijednosti CFU za pokuse P1-13, P1-19 i P1-9 iznosile su redom $3,2 \cdot 10^7$ st/mL, $6,5 \cdot 10^7$ st/mL i $1,4 \cdot 10^8$ st/mL. Kod P1-13 i P1-19 najveći broj stanica od $9,0 \cdot 10^7$ st/mL i $2,3 \cdot 10^8$ st/mL postignut je u 14. danu, a kod P1-9 već u 7. danu maksimalni CFU dostiže $2,2 \cdot 10^8$ st/mL. Nakon postignutih maksimuma, vrijednosti padaju u sva tri pokusa. Međutim, u zadnjem danu došlo je do znakovitog skoka u broju stanica na $1,48 \cdot 10^8$ st/mL (P1-13), $6,1 \cdot 10^8$ st/mL (P1-19) i $4,1 \cdot 10^8$ st/mL (P1-19), a isto se dogodilo s TOC vrijednostima, što će biti objašnjeno u poglavlju 5.2. Razlika je u tome što su TOC vrijednosti više tokom ekspanzijske faze što bi išlo u prilog tome da je biorazgradnja najintenzivnija upravo u 14. danu za P1-13 i P1-19, odnosno u periodu od 3. do 7. dana za P1-9.

Na slici 13. b), d), f) i ab) prikazana je promjena CFU vrijednosti tijekom 30 dana, a mogu se uočiti veće razlike između vrijednosti CFU za uzorke i SP, što je posljedica pojave kolonija *Bacillus* sp. Naime, dolazi do kompeticije za supstratom između *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus* sp., što je u skladu s većim razlikama između CFU vrijednosti uzoraka i SP. Kod SP, CFU generalno pada nakon 21. dana, dok je kod uzoraka s MP-om to i dalje stacionarna faza. U pokusima P1-2, P1-4, P1-6 i P1-27 došlo je do značajnijeg odstupanja od kontrole gdje je broj kolonija izrazito niži i prema tome se mogu pripisati eksperimentalnoj pogrešci. Slično se događa i kod P2-1 i P2-10. Kako bakterije koriste MP kao izvor energije jasno je da je porast CFU vrijednosti ovisan o raspoloživosti izvora ugljika. Zato je CFU viši kada su čestice PS-a veličine $<300 \mu\text{m}$ zbog veće specifične aktivne površine na koju se biomasa može vezati, odnosno kada je koncentracija PVC-a nešto viša poput 500 ili 100 mg/L. Niže vrijednosti CFU prisutne su kod uzoraka u pokusu P1 rotiranih pri najnižem broju okretaja od 100 o/min. Naime, bakterija *P. alcaligenes* je obvezni aerob zbog čega mora imati pristup kisiku koji joj je nužan za rast i razmnožavanje.⁷¹ Iz tog razloga je koncentracija otopljenog kisika mjerena na početku i kraju pokusa služila kao dodatan indikator odgovarajućih uvjeta potrebnih za razvoj kulture. Nadalje, bakterije roda *Pseudomonas* imaju različitu prilagodljivost na uvjete pH-vrijednosti i temperature, ali generalno se može reći da je rast podržan u širokom temperaturnom intervalu od 25 °C do 42 °C, dok im pogoduju neutralne pH-vrijednosti, iako im rast nije narušen pri pH 6 i 8.⁷²⁻⁷⁴ Iz tog razloga su, kao optimalni, implementirani uvjeti pH 7 i sobne temperature (24,3 °C) u svim slučajevima pokusa P1. U pokusima P1-1, P1-7, P1-16, CFU je nešto viši od kontrole, što znači da čestice služe kao valjan izvor ugljika i energije za bakterije.⁷⁵ U pokusu P1-1 ispitivane su čestice najmanje veličine ($<300 \mu\text{m}$) i promjena CFU se podudara s prethodno navedenim činjenicama o specifičnoj površini čestica, dok se niže vrijednosti uočavaju u pokusima P1-7 i P1-16 u kojima su ispitivne čestice najveće veličine (500-700 μm). U

ostalim pokusima odnos vrijednosti CFU-a s kontrolom varira pa je u određenim danima viši, odnosno niži od kontrole, što bi išlo u prilog tome da je PS barem djelomično poslužio kao izvor ugljika.

Što se tiče pokusa P2 s PVC-om, gotovo svi pokusi pokazuju pravilne faze rasta bakterijskih stanica uz nekolicinu odstupanja s istim uzrokom kao u pokusu s PS-om. Pokusi P2-4, P2-5, P2-6, P2-11, P2-12, P2-13, P2-16, P2-18, P2-22, P2-24, P2-25, P2-26 i P2-27 pokazuju više CFU vrijednosti od kontrole, što upućuje na intenzivniju biorazgradnju PVC-a (Slika 19.). Ostali pokusi ponovno pokazuju slične vrijednosti s kontrolom, što ukazuje da je došlo do djelomičnog iskorištavanja MP-a kao supstrata. Početne vrijednosti CFU za pokuse P2-2, P2-17 i P2-24 iznosile su redom $4,5 \cdot 10^7$ st/mL, $6,5 \cdot 10^7$ st/mL i $2,0 \cdot 10^7$ st/mL. Tako su CFU vrijednosti za P2-2 postigle maksimum već u 3. danu ($5,0 \cdot 10^7$ st/mL), a za pokus P2-17 najviše CFU vrijednosti bile su vidljive u 7. danu ($1,0 \cdot 10^8$ st/mL) nakon čega su počele padati, ali u 30. danu ponovno su imale skok ($1,6 \cdot 10^8$ st/mL). U P2-24 najviši broj stanica bio je postignut u 14. danu ($1,8 \cdot 10^8$ st/mL), što je ujedno pokus u kojem je tijekom cijelog perioda trajanja pokusa broj bakterijskih stanica bio najviši što bi išlo u prilog najvišoj razini optičke gustoće (0,5) i korištenju TSA kao hranjive podloge, a sugerira najbolje iskorištavanje supstrata od tri navedena pokusa.

Općenito se za razne vrste PS-a (polistiren opće namjene (GPPS, eng. *general purpose polystyrene*), polistiren visoke udarne žilavosti (HIPS, eng. *high-impact polystyrene*), polistirenska pjena i ekstrudirani polistiren) navodi da su zbog svojstva stabilnosti te visoke molekulske mase i hidrofobnog karaktera iznimno otporni na biorazgradnju.⁷⁶ Glavni lanac odupire se enzimatskom cijepanju zbog čega se provodi velik broj studija s različitim procesnim uvjetima kako bi se s vremenom dokučilo koji su najbolji uvjeti biorazgradnje ovih polimera. Glavni problem PS-a leži u stabilnom aromatskom prstenu koji ne ulazi u reakcije te pridonosi hidrofobnom karakteru i otežava vezanje biomase za površinu. Procjenjuje se da je vrijeme poluživota PS-a veličine 20 mm, odnosno PVC-a debljine 10 mm, zakopanima u zemlji, preko 2500 godina.⁷⁷ Ti podaci upućuju na važnost modeliranja procesa biorazgradnje i inokulacije specifičnih vrsta i konzorcija u procesu. PS je potpuno amorfne strukture, dok je PVC djelomično amorfan uz niski udio kristalinične strukture. Amorfni materijali podložniji su biorazgradnji u vodenoj fazi jer lakše apsorbiraju vodenu fazu, ali u ovom slučaju teško je raditi usporedbu kada PS sadrži fenilni prsten. Osim toga, na uspješnu biorazgradnju utječu dimenzije i molekulska masa plastičnih čestica. Što je molekulska masa veća, dulje će trajati proces (bio)razgradnje.⁷⁸ Molekulske mase PS-a i PVC-a iznose 104,1 g/mol te 62,5 g/mol, što pak ide u prilog lakšoj

razgradivosti PVC-a. Veći dio studija s PS-om provodi biorazgradnju tijekom 30 dana, a ispitivanja duljih trajanja provedena su primjerice s *Curvularia* sp. i *Rhodococcus ruber* tijekom 9 i 8 tjedana.⁷⁶ *Curvularia* je bila primijenjena na ekspanzirani PS debljine 150 µm (5x5 cm) pri 25 °C te je uspješno kolonizirala uzorke i penetrirala kroz njihovu površinu do te mjere da ih je bilo nemoguće oporaviti uzorke.²⁶ S druge strane *Rhodococcus ruber* bila je primijenjena na pahulje polistirena veličine 10 – 50 µm što je rezultiralo sa smanjenjem mase za svega 0,8% u navedenom periodu.⁷⁹ Kod PVC-a situacija je nešto drugačija, gdje je veći broj studija pokusa proveden pri 90 dana uključujući korištenje *Pseudomonas citronellolis*, *Pseudomonas otitidis*, *Bacillus flexus* i *Bacillus cereus*, ali uz izražene razlike u učinkovitosti.⁷⁶

5.2. Promjena koncentracije TOC i TIC tijekom biorazgradnje polistirena i poli(vinil-klorida) primjenom bakterije *Pseudomonas alcaligenes*

U tablicama 13. – 15. te 23. – 25. prikazane su promjene koncentracija TOC i TIC za tri slučaja pokusa P1 i P2. Vrijednosti TOC-a indikativne su o prisutnosti organskih tvari u vodenoj fazi čija bi se koncentracija trebala smanjivati kako bakterijska kultura s vremenom iskorištava susprtat. Ukoliko TOC vrijednost s vremenom raste, kao što je to u oba pokusa P1 i P2, njene se vrijednosti povezuju s otpuštanjem novonastalih razgradnih polimernih produkata i/ili aditiva s površine čestica MP-a, dok TIC ukazuje na prisutnost razvijenog CO₂ kao produkt metabolizma bakterijske kulture. U P1-13 (8,20 mg/L) i P1-19 (10,03 mg/L) TOC doseže maksimum u 14. danu, a P1-9 (10,28 mg/L) u 3. danu. Ove promjene TOC vrijednosti slažu se s promjenama CFU vrijednosti za pokuse P1-13 i P1-19 u kojima CFU vrijednost raste do 14. dana i dostiže $9,0 \cdot 10^7$ st/mL, odnosno $2,3 \cdot 10^8$ st/mL, što odgovara i najvišim TOC vrijednostima u istom danu. Za pokus P2, TOC vrijednosti generalno dosežu maksimum tek u 21. danu (P2-2 7,96 mg/L, P2-17 6,03 mg/L, P2-24 9,62 mg/L). Za razliku od pokusa s PS-om, u sva tri navedena pokusa s PVC-om TOC vrijednosti nisu pratile iste trendove kao CFU vrijednosti. Naime, CFU vrijednosti u pokusu P2-2 postigle su maksimum već u 3. danu, iako su TOC vrijednosti bile najviše u 21. danu; za pokus P2-17 najviše CFU vrijednosti bile su vidljive u 7. danu, dok su TOC vrijednosti bile najviše u 3. i 21. danu. U pokusu P2-24 najviši broj stanica bio je postignut u 14. danu, iako su TOC vrijednosti rasle prema 21. danu. Ipak, u većini slučajeva kod oba pokusa nije došlo do drastičnog pada CFU vrijednosti po završetku pokusa, što je u skladu s TOC vrijednostima. Vrijednosti TIC-a generalno prate iste trendove, kao i TOC promjene. U

uzorcima SP obično se ne očekuju promjene TOC-a, ali do njih ipak može doći uslijed liziranja stanica, što je osobito izraženo u sva tri navedena pokusa s PS-om. Liziranje označava pucanje stanične membrane i smrt stanice zbog čega dolazi do ispuštanja staničnog sadržaja koji povećava vrijednosti TOC-a. Kako bi osigurale rast i razmnožavanje, bakterijske stanice moraju održavati unutarstanični tlak višim nego što je u vodenoj fazi. Promjene u osmotskom tlaku otopine koje dovode to hipotoničnih uvjeta mogu uzrokovati bubrenje stanica i u krajnjoj liniji liziranje.⁸⁰

Usporedbom promjene CFU vrijednosti tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje (slika 13.), prije 14. dana, odnosno tijekom eksponencijalne faze rasta, TOC i TIC vrijednosti su generalno više (tablice 13. – 15. i 23. – 25.), nego u stacionarnoj fazi bakterijskog rasta. P1-13 i P1-19 pokazuju donekle bolje rezultate nego što je to kod P1-9 (potencijalno zbog niskog broja okretaja, 100 o/min), dok su u drugom pokusu P2-2 uočene najviše vrijednosti TOC i TIC. Kod nekih pokusa P1 u 30. danu, vrijednosti TOC nisu drastično pale u usporedbi s ranijim danima što otvara mogućnost za produljivanje trajanja procesa. Za pokus P2 ta je razlika po završetku pokusa nešto primjetnija, gdje su TOC i TIC izrazito niskih vrijednosti, osobito za P2-2, što se može dovesti u vezu s time da je to pokus s najnižom ispitivanom koncentracijom MP-e, kao i OG. S druge strane moguće je da su niske vrijednosti indikativne o završetku procesa biorazgradnje, osobito u pokusu P1-19 čiji uvjeti odgovaraju optimalnim uvjetima. Moguće jest da bi dodatak nutrijenata omogućio veću mikrobnu aktivnost i nastavak razgradnje ili je raspoloživost polimera naprosto dosegla svoju granicu. Da bismo bili sigurni na koji sadržaj konkretno ukazuju podaci za organski ugljik provedene su HPLC-MS analiza i FTIR spektroskopija.

5.3. Praćenje otpuštenih aditiva iz mase ili s površine čestica polistirena i poli(vini-klorida)

HPLC-MS analiza filtrata iz pokusa s PS-om pokazuje slične rezultate za sva tri navedena pokusa kao što je prikazano u tablicama 16. – 18. U P1-13 na početku se pojavljuje polietilen glikol (PEG) koji se može koristiti za presvlačenje polistirenskih perli u svrhu potiskivanja apsorpcije biomolekula na njihovu površinu.⁸¹ PEG nije štetna tvar i učestalo se koristi u dodacima za hranu, farmaceuticima, biomedicini i slično.⁸² Osim toga, u svim danima kad su izuzeti uzorci prisutni su plastifikator diizooktil ftalat (DOP) i antioksidans diauril tiodipropionat (DDTDP). Ftalati se nerijetko dodaju polimerima kako bi im se snizilo staklište i povećala fleksibilnost, ali uslijed prekomjerne izloženosti putem zraka ili

onečišćene vode može imati štetne posljedice po ljude.⁸³ U ljudskom tijelu obično se ne bioakumuliraju već se lako razgrađuju u primarne i sekundarne monoestere u probavnom traktu. Upravo su ti monoesteri odgovorni za razne toksične učinke, a posebno su opasni za djecu zbog igračkaka koje stavljaju u usta kao i kod korištenja raznih kozmetičkih proizvoda u odraslih.⁸⁴ Obično nemaju visoku oralnu toksičnost, ali subkronični testovi na životinjama pokazali su jak utjecaj na zdravlje jetre i bubrega te u manjoj mjeri na štitnjaču.⁸² DDTDP se kao antioksidans češće koristi u PP, PE i kompozitnim materijalima poput ABS-a kako bi im produžio životni vijek i zaštitio od utjecaja svjetlosti. Koristi se i u filmovima za pakiranje hrane obzirom da se ne smatra visokotoksičnim, no LD₅₀ doza nakon oralnog unosa u štakora iznosi <2500 mg/kg.⁸⁵

U P1-19 pojavljuju se još polipropilen glikol (PPG) u 3. danu te plastifikator dibutil ftalat u 14. danu koji slovi kao dodatak nižeg toksičnog učinka. Ipak, obzirom na čestu uporabu i mogućnost isparavanja uslijed upotrebe proizvoda koji ga sadrže i dalje se ispituju indikacije da pri višim koncentracijama može ometati proizvodnju spolnih hormona progesterona i estradiola.⁴¹ U pokusu P1-9 ponovno su najčešće prisutni DDTPD i DOP, te se pojavljuju razni pikovi koji sugeriraju prisutnost deterdženata Triton 101 i Tween 40, ali se u literaturi upotreba deterdženata u proizvodnji plastike ne spominje često. Pokazalo se da se uvođenjem neionskog surfaktanta Triton X-100 prilikom elektropredenja različitih polimera (PVA, PEG, kitosan) za proizvodnju (nano)vlakana poboljšava njihova homogenost i izbjegava stvaranje kuglica. PVA nanovlakna koriste se za sustave gorivih ćelija, meke elektroničke materijale, katalitičke uređaje, detekciju zračenja i filtraciju.⁸⁶ Osim toga, isti aditiv koristi se za poboljšanje međučestične interakcije te smanjuje brzinu isparavanja suspenzija na bazi metanola koje sadrže koloidne nanočestice PS-a koje se koriste za prevlačenje premazom (eng. *spin-coating*) odnosno nanošenje monosloja nanosfera. Umjesto Tritona-100 može se koristiti i etilen glikol, ali obje tvari posjeduju visoku viskoznost što otežava proizvodnju jednolikog monosloja.⁸⁷ Tween surfaktanti istražuju se na PS-u kao premazi otporni na proteine.⁸⁸ Također, navodi se kako deterdženi mogu biti neophodni kod ispiranja adsorbiranih reaktanata za uklanjanje steričnih smetnji uzorkovanih nakupljanjem reaktanata na površini. Triton 20 i Tween-100 optimalni su za MaxiSorp ELISA polistirenskih ploča za mikrotitraciju.⁸⁹ Izvan ovih uporaba teško je sugerirati da su prisutni u komercijalnom PS-u.

Iz HPLC-MS analize filtrata PVC-a, prikazanih u tablicama 26. – 28. vidljivo jest da se u sva tri pokusa pojavljuje PEG koji se koristi u mnoge industrijske, medicinske i kozmetičke svrhe, a među ostalim može služiti kao mazivo. U 3. danu P2-2, 14. danu P2-17

i 7. danu P2-24 pojavljuje se i polipropilen glikol, površinski aktivno sredstvo koje se koristi u mnogim poliuretanskim formulacijama. Kao i kod PS-a kontinuirano se otpušta plastifikator DOP koji uzrokuje polineuritis uslijed trovanja i utječe na reprodukciju i razvoj kod miševa i štakora.⁴² Ftalati su vrlo česte sastavnice komercijalnog PVC-a, te njihov udio može iznositi i do 45% ukupne težine konačnog proizvoda ovisno o namjeni.⁸⁴ U pokusu P2-2 još je vidljiva pojava DDTDP-a, koji se koristi kao stabilizator u folijama za pakiranje hrane, odnosno oksidans čest u poliolefinima i kopolimerima sa stirenom. Na početku biorazgradnje kod pokusa P2-17 pojavljuje se još jedan aditiv, usporivač gorenja i plastifikator trifenil fosfat koji pokazuje efekte akutne toksičnosti prilikom oralnog i dermalnog kontakta, a može se dovesti u vezu s reproduktivnim, razvojnim i metaboličkim smetnjama te uzrokovati neuritis.⁹⁰ Za mačke kobne su bile niske koncentracije od 0,3 – 1 g/kg, a kod miševa smanjuje aktivnost kolin esteraze pri koncentracijama 10 – 500 mg/kg. U *in vitro* studijama pokazalo se kako inhibira vezanje za estrogenske receptore dok kod mladih zebrica uzokuje pojačanu produkciju hormona štitnjače.⁹¹ Europska agencija za kemikalije klasificirala ga je kao iznimno toksičnu tvar za morske organizme. U pokusima P2-17 i P2-24 nerijetko se otpušta i plastifikator dioktil adipat (DOA) kao vrlo čest dodatak u komercijalnom PVC-u jer mu daje dobru fleksibilnost, toplinsku stabilnost, električna svojstva te usporava starenje materijala.⁹² Često se koristi u pakiranjima za hranu, međutim istraživanja su pokazala da mogu migrirati u same namirnice, isparavati iz prevlaka za madrace i otpuštati iz dječjih igračaka. LD₅₀ doza za štakora iznosi >20,000 mg/kg i ne smatra se da uzrokuje značajan toksičan učinak na ljude nakon ponovljenog doziranja pošto nema uočenih utjecaja na muške spolne hormone, nije teratogen ni mutagen.⁹³ Kako svi ovi aditivi imaju određeni sadržaj ugljika, uslijed njihova otpuštanja s čestica MP može doći do povišenja vrijednosti TOC-a, ali i toksičnog učinka na *Vibrio fischeri*.

5.4. Ispitivanje toksičnosti vodene faze dobivene nakon provedbe pokusa biorazgradnje polistirena i poli(vinil-klorida)

Kako bi se postupci biorazgradnje ovog tipa mogli odvijati na poluindustrijskoj ili industrijskoj razini bitno je imati dobar uvid u nusprodukte biorazgradnje. Obzirom da je teško odrediti točan sastav konačne suspenzije, indirektno preko testova ekotoksičnosti možemo odrediti je li taj sastav štetan ako se ispusti u okoliš. Prema dobivenim rezultatima ispuštenih aditiva uslijed promjena u strukturi čestica MP-e bilo je za očekivati da će sadržaj filtrata nakon pokusa sadržavati tvari koje će biti štetne za *V. fischeri* i smanjiti njenu

bioluminiscenciju. U studiji Martinez-Gomez i sur. (2017) čestice PS pokazale su toksičan učinak na oplodnju jajašca morskih ježinaca i rast i razvoj larvi iako su njihove interakcije bile minimalne, a ingestija nezapažena. To upućuje da je istovremeno došlo do ispuštanja monomera, oligomera i aditiva koji su uzrokovali takve rezultate i pridonijeli toksičnom učinku.⁹⁴ Samim time možemo zaključiti da osim što ingestija MP-e sama po sebi može biti štetna za organizme zbog akumulacije u tkivima, ispušteni oligomeri, monomeri i aditivi predstavljaju novu razinu opasnosti koju treba razlikovati i uzeti u obzir jer može doprinijeti toksičnom učinku. Iz tablica 19. i 29. vidljivo jest da se finalna inhibicija luminiscencije bakterijske kulture *Vibrio fischeri* drastično mijenja s obzirom na dane uvjete. Najviša inhibicija vidljiva je kod P1-20 (73,11%) gdje je veličina čestica 300 – 500 μm , a odgovarajuća EC_{20} vrijednost 17,54% što znači da bi ta koncentracija štetnih tvari imala štetan učinak na 20% ispitivane populacije *V. fischeri*. Inhibicija veća od 50% još je vidljiva u pokusima P1-1 (<300 μm), P1-6 (500 – 700 μm) i P1-12 (500 – 700 μm). U pokusu P2 vidljivo je više slučajeva u kojima inhibicija premašuje 70%: P2-2 (50 mg/L), P2-20 (50 mg/L) i P2-26 (500 mg/L). Neočekivano, ne radi se o pokusima gdje su bile prisutne najveće koncentracije MP-PVC. Kada usporedimo inhibicije oba pokusa, vidljivo jest da generalno veće inhibicije prevladavaju u pokusu P2 što upućuje da su metaboliti i otpušteni aditivi tijekom biorazgradnje PVC-a daleko toksičniji za *Vibrio fischeri*. Preko inhibicije dolazi se do EC_{20} i EC_{50} vrijednosti koje označavaju efektivnu koncentraciju onečišćujuće tvari koja uzrokuje štetan učinak na 20 i 50% ukupne populacije. Štetnost je u ovom slučaju uzeta kroz smanjenje intenziteta bioluminiscencije. Što je EC vrijednost niža, veći je toksični učinak. Eluati PS-a potječu od iste koncentracije MP-e od 500 mg/L, dok su za PVC koncentracije varirale između 50, 500 i 1000 mg/L. Eluat PS-a u više navrata bio je toksičniji za *V. fischeri* za pokuse u kojima se ispitivala MP veličine čestica 300 – 500 μm (P1-2, P1-14, P1-24) i 500 – 700 μm (P1-6, P1-7, P1-12, P1-16), te pri nižim brzinama okretaja 100 – 150 o/min. Test ekotoksičnosti definitivno je potvrdio toksičnost vodene faze PVC-a, osobito u pokusima u kojima su početni uvjeti pH-vrijednosti iznosili 6 (P2-2, P2-4, P2-10, P2-25), a koncentracije PVC-a bile na višim razinama (P2-4, P2-14, P2-25, P2-26).

5.5. Usporedbe strukture čestica polistirena i poli(vinil-klorida) prije i nakon biorazgradnje FTIR-ATR spektroskopijom

Na slikama 17. i 23. vidljivi su rezultati FTIR spektroskopije za PS i PVC gdje kontrola PS ili PVC prije biorazgradnje. Naznačene su strukturne promjene koje se odvijaju

tijekom biorazgradnje. Kod sva tri uzorka za PS vidljivi su karakteristični pikovi na 3024 cm^{-1} (C-H aromatsko istezanje), 2847 cm^{-1} (C-H istezanje iz $-\text{CH}_2$ skupine), 1601 i 1492 cm^{-1} (istezanje aromatskog prstena), 1451 cm^{-1} (CH_2 deformacija), 1027 (deformacija aromatskog C-H), 694 cm^{-1} (deformacija aromatskog C-H izvan ravnine), 537 cm^{-1} (deformacija aromatskog prstena izvan ravnine).⁴³ U pokusu P1-9 najizraženije su smanjeni intenziteti pikova na 537 cm^{-1} , 694 cm^{-1} i 1451 cm^{-1} , dok kod P1-19 i P-13 te promjene nisu toliko značajne. U pokusima P1-9 i P1-13 može biti zamijećen novi pik na 1650 cm^{-1} , koji se može pripisati kidanju glavnog lanca polimera i nastanku polimernih nusprodukata. Prema literaturi bi se moglo zaključiti kako se radi o istezanju veza $-\text{C}=\text{C}-$ koja potječe od alkena.⁴⁴ Nadalje, kod P1-9 novi pik na 3300 cm^{-1} sugerira istezanje O-H alkoholne grupe.⁴⁵

Što se tiče spektara za PVC karakteristični pikovi su na 1427 cm^{-1} (CH_2 deformacija), 1331 i 1255 cm^{-1} (C-H deformacija), 1099 cm^{-1} (C-C istezanje), 966 cm^{-1} (CH_2 njihanje) i 616 cm^{-1} (C-Cl istezanje).⁴³ Intenziteti pikova nisu značajno padali kao što je to u pokusu sa PS, ali ponavlja se novi pik kod P2-2 i P2-17 na 3300 cm^{-1} vezan za istezanje O-H te u sva tri pokusa na 1650 cm^{-1} istezanje $-\text{C}=\text{C}-$.⁴⁶ Novonastali pik na 1650 cm^{-1} izrazito je intenzivan u pokusu P2-2. Generalno se može reći da *Pseudomonas alcaligenes* ima bolju sposobnost biorazgradnje PS-a nego PVC-a. Nedostatak FTIR spektroskopije leži u preklapanju vrpce preklapanju organskih i anorganskih vrpce s vrpcom polimera što može ometati analizu. Iz tog razloga postoji dodana potreba za predobradu plastičnog materijala kako bi uklonili vlagu, a samim time i interferencije.²²

5.6. Rezultati statističke analize varijance za pokuse biorazgradnje polistirena i poli(vini-klorida)

Statističkom obradom eksperimentalnih podataka o promjeni broja stanica u ovisnosti o glavnim čimbenicima prema punom faktorskom planu, u programu Design Expert utvrđeni su optimalni uvjeti provedbe oba pokusa. Analizom varijance testirana je korelacija čimbenika. Interpolacijom odzivne varijable (empirijski model procesa) omogućena je linearna regresija u svrhu korelacije prikupljenih eksperimentalnih podataka. Standardna devijacija (σ) predstavlja mjeru reprezentativnosti regresije odnosno odstupanje empirijskih vrijednosti zavisne varijable od regresijskih vrijednosti. Čim je manja, podaci su bliži očekivanim vrijednostima tj. manje su raspršeni. R^2 je koeficijent determinacije kao relativni pokazatelj mjere reprezentativnosti regresije te označava mjeru odstupanja od aritmetičke sredine. Što je R^2 bliži 1, promatrani model je reprezentativniji, ali R^2 utoliko je

veći kako raste broj regresorskih varijabli, bez obzira opisuju li one značajno varijaciju zavisne varijable. Zato se često koristi korigirani koeficijent determinacije R^2_{adj} , koji je nepristran jer uzima u obzir broj nezavisnih varijabli k . Ukoliko je $>75\%$ model se smatra značajnim. Predviđeni R^2_{pred} određuje koliko uspješno regresijski model previđa ponašanje sustava. Ukoliko je R^2_{pred} znatno niži od R^2 došlo je do prekomjernog prilagođavanja modela koji neće pouzdano predviđati buduća opažanja. **Odgovarajuća preciznost** je omjer signala i šuma kojom se uspoređuje raspon predviđenog odziva s obzirom na prosječnu pogrešku predviđanja. Vrijednosti veće od 4 upućuju na odgovarajuću diskriminaciju modela. Predviđeni zbroj kvadrata zaostale pogreške (**PRESS**) je mjera neslaganja podataka i modela procjene. Koeficijent varijacije (**C. V.**) omjer je standardne devijacije i srednje vrijednosti. Čim je veći, veće je i rasipanje oko srednje vrijednosti.

Standardna devijacija u pokusu s PS-om iznosi 0,19. Koeficijent determinacije R^2 iznosi 0,9056, što označava da se model dobro slaže s eksperimentalnim rezultatima. R^2_{adj} i R^2_{pred} iznose 0,8556 i 0,7265. Oni ne upućuju na kvalitetu predviđanja modela, već koliko je dobro zavisna varijabla opisana nezavisnim varijablama. Obzirom da se R^2_{adj} uvelike ne razlikuje od R^2 možemo zaključiti da model ne sadrži previše nezavisnih varijabli. R^2_{pred} indicira koliko će model biti odgovarajuć za buduće podatke i zamjetno je niži od R^2_{adj} . Odgovarajuća preciznost iznosi 16,72, što znači da model ima odgovarajući signal i može se koristiti u dizajnu procesa. C.V. iznosi 2,35% što ukazuje da rasipanje podataka oko srednjih vrijednosti nije visoko. Eksperimentalne vrijednosti parametara analize varijance u tablici 20. pokazuju da je model značajan, a značajni čimbenici modela su A, B, C, AC, A^2 i C^2 , odnosno redom, broj okretaja, veličina čestica, OG, međudjelovanje okretaji-OG, broj okretaja² i OG².

Iz 3D prikaza odzivnih površina na slici 18. dobiva se uvid o paralelnom utjecaju dvaju ispitivanih čimbenika na odziv (log CFU). Generalno najveći utjecaj međudjelovanja na log CFU vidljiv je pri najvišim vrijednostima OG (0,5) i broja okretaja (200 o/min), odnosno najmanjoj veličini čestica (<300 μ m). S druge strane najniži utjecaj prisutan je u uvjetima najniže OG (0,1) i broja okretaja (100 o/min) te najveće veličine čestica (500 – 700 μ m). Najviši odziv dobiva se kombinacijama čimbenika veličine MP-a <300 μ m i broja okretaja 200 o/min, dok je najniži odziv pri OG 0,1 i broju okretaja od 100 o/min. Prema dobivenim statističkim podacima i odzivnim površinama određeni su optimalni uvjeti za provođenje procesa s PS-om pri broju okretaja 180 o/min, veličini MP od 203 μ m i OG 0,27 (Tablica 22.) obzirom da se na taj način postiže najbolji rast bakterijske kulture, odnosno CFU. Ovi rezultati u skladu su ostalim rezultatima gdje biorazgradnja ima viši potencijal ako

se implementira viši broj okretaja za bolju homogenizaciju te manja veličina čestica kako bi se stvorila veća specifična aktivna površina za stvaranje biofilma. Pritom je korištena relativno niska koncentracija od 500 mg/L, dok su Mohan i sur. (2016) s ispitivanom koncentracijom bromiranog HIPS-a od 20 000 mg/L postigli značajno smanjenje mase filma za 23,7% pomoću *Bacillus* sp., odnosno <10% pomoću *Pseudomonas* sp., nakon 30 dana pri 30 °C i 200 o/min.³³

Pokus s PVC-om pokazao je slične statističke podatke. Standardna devijacija iznosi 0,05 što znači da su vrijednosti manje raspršene nego kod P1. R^2 , R^2_{adj} i R^2_{pred} iznose 0,9031, 0,8518 i 0,7198, što pokazuje slične trendove kao u P1, ali je rasipanje oko srednjih vrijednosti još niže, a odgovarajuća preciznost od 14,12 upućuje da se i ovaj model može koristiti u dizajnu procesa. Eksperimentalne vrijednosti parametara analize varijance u tablici 30. pokazuju da je model značajan, a značajni čimbenici modela su B, A^2 i C^2 tj. koncentracije MP, pH^2 i OG^2 . Međudjelovanje čimbenika na log CFU, prema modelu odzivnih površina (slika 24.) izraženo je pri srednjim vrijednostima pH (7) i OG (0,3) te najnižim koncentracijama MP-e (50 mg/L). U pokusu s PVC-om su ispitivani drugi čimbenici čije bi optimalne vrijednosti bile za pH 7,05, koncentracija MP-e 208 g/L i OG 0,32 (tablica 32.). Neutralni pH odgovara uvjetima preporučenim za uzgoj bakterija *Pseudomonas*. Giacomucci i sur. (2016) postigli su smanjenje komercijalnog PVC filma od 20%, koristeći konzorcij *P. citronellolis* i *B. flexus*, nakon 30 dana inkubacije pri 30 °C, 150 o/min i pH-vrijednosti 6,7. Film je prethodno razgradnji bio usitnjen na veličinu od 3 cm² te korišten u koncentraciji od 2000 mg/L.⁴⁰

6. ZAKLJUČAK

Izgledno jest da će se u budućnosti mikroorganizmi koristiti za uklanjanje MP-a iz vodenih sredina, upravo zbog svoje široke primjenjivosti u drugim bioremedijacijskim postupcima. Godine istraživanja mogu omogućiti korištenje točno određene vrste organizma na specifično onečišćenje zbog najpovoljnijih uvjeta razgradnje. Ovo je najizglednija tehnologija za rješavanje tog gorućeg problema, ali treba uzeti u obzir da nastajanje MP-a treba odstraniti u izvoru. Obzirom da je upravo čovjek glavni uzročnik njenog nastajanja i dospijevanja u vodeni okoliš, na njemu je glavna odgovornost da kroz pravilne i temeljite edukacije promijeni neodgovorno postupanje s otpadom.

U ovom eksperimentu praćeni su fizikalno-kemijski i mikrobiološki pokazatelji tijekom 30 dana biorazgradnje polistirena i poli(vinil-klorida) u vodenom okruženju pomoću kulture *Pseudomonas alcaligenes* što je omogućilo donošenje sljedećih zaključaka:

- I. Vrijednosti pH, koncentracije otopljenoga kisika i temperature nisu se značajno mijenjale tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje MP-a.
- II. Vidljivo jest da je vrsta *Pseudomonas alcaligenes* dovoljno prilagođena na cijeli niz ispitivanih uvjeta, uključujući pH-vrijednosti u rasponu od 6 do 8.
- III. Podaci za FTIR i TIC/TOC ukazuju na to da *Pseudomonas alcaligenes* može biokemijski utjecati na oba tipa polimernih čestica.
- IV. Više CFU vrijednosti vidljive su pri veličini čestica <math><300\ \mu\text{m}</math> za PS, odnosno većim koncentracijama MP-e PVC-a (500 – 1000 mg/L) što ukazuje na potrebnu ispitivanje različitih uvjeta u svrhu boljeg razumijevanja procesa biorazgradnje MP-a.
- V. Optimalni uvjeti za biorazgradnju PS-a su: 180 o/min, 203 μm i OG 0,27
- VI. Optimalni uvjeti za biorazgradnju PVC-a su: pH 7,05, $\gamma_{\text{MP}}=208\ \text{g/L}$ i OG 0,32.
- VII. Promjene koncentracija organskog i anorganskog ugljika tijekom pokusa ukazuju na nastanak CO_2 i otpuštanje aditiva čija je prisutnost potvrđena HPLC-MS analizom.
- VIII. PVC je u više slučajeva pokazao veću inhibiciju bioluminiscencije *V. fischeri* nego PS.

7. LITERATURA

- 1 Rochman, C.M., The story of plastic pollution: From the distant ocean gyres to the global policy stage. *Oceanography* 33(3) (2020), str. 60-70.
- 2 Obbard, R.W., Sadri, S., Wong, Y. Q., Khitun, A. A., Baker, I., Thompson R. C., Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice, *Earth's Future* 2 (2014), str. 315-320.
- 3 <https://www.statista.com/statistics/225928/export-volume-of-plastic-products-from-china/> pristupljeno 15.5.2022.
- 4 <https://ourworldindata.org/grapher/share-of-global-plastic-waste-emitted-to-the-ocean?country=Africa~Asia~Europe~South+America~North+America~Oceania> pristupljeno 5.6.2022.
- 5 <https://www.eea.europa.eu/publications/microplastics-from-textiles-towards-a> pristupljeno 5.6.2022.
- 6 <https://echa.europa.eu/hr/hot-topics/microplastics> pristupljeno 2.6.2022.
- 7 Padervand, M., Lichtfouse, E., Robert, D., Wang, C., Removal of microplastics from the environment. A review, *Environmental Chemistry Letters*, Springer Verlag, 18(3) (2020).
- 8 <https://www.ospar.org/work-areas/eiha/marine-litter/regional-action-plan/product-packaging-use-and-design/primary-micro-plastics> pristupljeno 17.5.2022.
- 9 Enespa, Chandra, P., Singh, D.P., Microplastic degradation by bacteria in aquatic ecosystem, *Elsevier* 22 (2020), str. 431-467.
- 10 Masiá, P., Sol, D., Ardura, A., Laca, A., Borrell, Y. J., Dopico, E., Laca, A., Machado-Schiaffino, G., Díaz, M., Garcia-Vazquez, E., Bioremediation as a promising strategy for microplastics removal in wastewater treatment plants, *Marine Pollution Bulletin*, 156 (2020), 111252.
- 11 Horton, A. A., Dixon, S. J., Microplastics: An introduction to environmental transport processes, *WIREs Water* (2018), 5:e1268.
- 12 Bank, M. S., Hansson, S. V., The Plastic Cycle: A Novel and Holistic Paradigm for the Anthropocene, *Environmental Science & Technology* 53 (2019), American Chemical Society, str. 7177-7179.
- 13 Bhatt, P., Pathak, V. M., Bagheri, A.R., Bilal, M., Microplastic contaminants in the aqueous environment, fate, toxicity consequences, and remediation strategies, *Environmental Research* 200 (2021), 111762.
- 14 Batel, A., Linti, F., Scherer, M., Erdinger, L., Braunbeck, T., Transfer of benzo[a]pyrene from microplastics to *Artemia nauplii* and further to zebrafish via a trophic food web

experiment: CYP1A induction and visual tracking of persistent organic pollutants, *Environmental Toxicology and Chemistry* 35(7) (2016), str. 1656-66.

15 Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I., Canning-Clode, J., Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 178 (2016), str. 189-195.

16 Afianti, N. F., Rachman, A., Hatmanti, A. *et al.*, Microbial Biofilm of Plastic in Tropical Marine Environment and their Potential for Bioremediation of Plastic Waste, *Journal of Ecological Engineering* 23(4) (2022), str. 261-275.

17 Matjašič, T., Simčič, T., Medvešček, N., Bajt, O., Dreo, T., Mori, N., Critical evaluation of biodegradation studies on synthetic plastics through a systematic literature review, *Science of The Total Environment* 752 (2021), 141959.

18 Miri, S., Saini, R., Davoodi, S. M., Pulicharla, R., Brar, S. K., Magdouli, S., Biodegradation of microplastics: Better late than never, *Chemosphere* 286(1) (2022), 131670.

19 Ali, S. S., Elsamahy, T., Koutra, E., Kornaros, M., El-Sheekh, M., Abdelkarim, E. A., Zhu, D., Sun, J., Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal, *Science of The Total Environment* (2021).

20 Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S. *et al.*, Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes, *Science of the Total Environment* (2020).

21 Ghatge, S., Yang, Y., Ahn, JH. *et al.* Biodegradation of polyethylene: a brief review. *Applied Biological Chemistry* 63(27) (2020).

22 Miloloža, M., Kučić Grgić, D., Bolanča, T., Ukić, Š., Cvetnić, M., Očelić Bulatović, V., Dionysiou, D. D.; Kušić, H., Ecotoxicological Assessment of Microplastics in Freshwater Sources—A Review, *Water* 13(56) 2021.

23 Wilkes, R. A., Aristilde, L., Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges, *Journal of Applied Microbiology* 123(3) (2017), str. 582-593.

24 Kim, H. R., Lee, H. M., Yu, H. C., Jeon, E., Lee, S., Li, J., Kim D.-H., Biodegradation of Polystyrene by *Pseudomonas* sp. Isolated from the Gut of Superworms (Larvae of *Zophobas atratus*), *Environmental Science & Technology* 54 (2020), str. 6987-6996.

25 Kim, H.-W., Jo, J. H., Kim, Y.-B., Le, T.-K., Cho, C.-W., Yun, C.-H., Chi, W. S., Yeom, S.-J., Biodegradation of polystyrene by bacteria from the soil in common environments, *Journal of Hazardous Materials* 416 (2021), 126239.

- 26 Ho, B. T., Roberts, T. K., Lucas, S., An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach, *Critical Reviews in Biotechnology* 38(2) (2018), str. 308-320.
- 27 Mor, R., Sivan, A., Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*: biodegradation of polystyrene, *Biodegradation* 19 (2008), str. 851-858.
- 28 Ward, P. G., Goff, M., Donner, M. *et al.*, A two step chemobiotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable thermoplastic, *Environmental Science & Technology* 40 (2006), str. 2433-2437.
- 29 Motta, O., Proto, A., De Carlo, F. *et al.*, Utilization of chemically oxidized polystyrene as co-substrate by filamentous fungi, *The International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212 (2009), str. 61-66.
- 30 Malawi Brandon, A., Gao, S.-H., Tian, R., Ning, D., Yang, S.-S., Zhou, J., Wu, W.-M., Criddle, C. S., *Environmental Science & Technology* 52(11) (2018), str. 6526-6533.
- 31 Atiq, N., Ahmed, S., Ali, M. I., Andleeb, S., Ahmad, B., Robson, G., Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil, *African Journal of Microbiology Research* 4(14) (2010), str. 1537-1541.
- 32 Peng, B.-Y., Chen, Z., Chen, J., Yu, H., Zhou, X., Criddle, C. S., Wu, W.-M., Zhang, Y., Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: *Tenebrionidae*) larvae, *Environment International* 145 (2020), 106106.
- 33 Mohan, A. J., Sekhar, V. C., Bhaskar, T., Nampoothiri K. M., Microbial assisted High Impact Polystyrene (HIPS) degradation, *Bioresource Technology* (2016).
- 34 Auta, H.S., *et al.*, Screening of Bacillus strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation, *Environmental Pollution* (2017).
- 35 Chauhan, D., Agrawal, G., Deshmukh, S., Roy, S., Priyadarshini, R., Biofilm formation by *Exiguobacterium* sp. DR11 and DR14 alter polystyrene surface properties and initiate biodegradation, *The Royal Society of Chemistry Advances* 8 (2018).
- 36 Yang, Y., Yang, J., Wu, W.-M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R., Jiang, L., *Environmental Science & Technology* 49(20) (2015).
- 37 Sekhar, V. C., Nampoothiri, K. M., Mohan, A. J., Nair, N. R., Bhaskar, T., Pandey, A., Microbial degradation of High Impact Polystyrene (HIPS), an e-plastic with decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide, *Journal of Hazardous Materials* (2016).
- 38 Wang, Z., Xin, X., Shi, X., Zhang, Y., A polystyrene-degrading *Acinetobacter* bacterium isolated from the larvae of *Tribolium castaneum*, *Science of the Total Environment* (2020).

- 39 Nowak, B., Rusinowski, S., Korytkowska-Wałach, A., Chmielnicki, B., The composition of poly(vinyl chloride) with polylactide/poly(butylene terephthalate-co-butylene sebacate) and its biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *International Biodeterioration & Biodegradation* 157 (2021), 105153.
- 40 Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M. Lotti, M., Fava, F., Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*, *New BIOTECHNOLOGY* 52 (2019), str. 35-41.
- 41 Patil, R., Bagde, U. S., Development of novel bacterial strains for enhanced biodegradation of plastic polymers by protoplast fusion, *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences* 18(2) (2016), str. 239-249.
- 42 Kumari, A., Chaudhary, D. R., Jha, B., Destabilization of polyethylene and polyvinylchloride structure by marine bacterial strain, *Environmental Science and Pollution Research* 26(2) (2019), str. 1507-1516.
- 43 Das, G., Bordoloi, N. K., Rai, S- K., Mukherjee, A. K., Karak, N., Biodegradable and biocompatible epoxidized vegetable oil modified thermostable poly(vinyl chloride): thermal and performance characteristics post biodegradation with *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp., *Journal of Hazardous Materials* 209–210 (2012), str. 434-442.
- 44 Bucci, K., Tulio, M., Rochman, C. M., What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review, *Ecological Applications* 30(2) 2020.
- 45 Du, F., Cai, H., Zhang, Q., Chen, Q., Shi, H., Microplastics in take-out food containers, *Journal of Hazardous Materials* 399 (2020).
- 46 Lu, K., Qiao, R., An, H., Zhang, Y., Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere* 202 (2018), str. 514-520.
- 47 Bogdanović, T., Petričević, S., Listeš, I., Pleadin, J., Pojavnost mikroplastike u prehrambenom lancu i njen utjecaj na ljudsko zdravlje, *MESO* 24 (2022).
- 48 Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., Giorgini, E., Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta, *Environment International* 146 (2021).
- 49 <https://www.theguardian.com/environment/2022/mar/24/microplastics-found-in-human-blood-for-first-time> pristupljeno 17.7.2022.

- 50 Iglewski, B. H., *Pseudomonas*, Medical Microbiology 4(27) (1996), Galveston, University of Texas Medical Branch at Galveston.
- 51 Mandić, M. M., Biotehnoški značajni enzimi iz sojeva roda *Pseudomonas*: Identifikacija i rekombinantna ekspresija lakaza i lipaza, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd (2021), str. 1-3, 10, 12.
- 52 Tribedi, P., Sil, A. K., Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm, Environmental Science and Pollution Research 20 (2013), str. 4146-4153.
- 53 Yoon, M. G., Jeon, H. J., Kim, M. N., Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell, Journal of Bioremediation & Biodegradation 3(4) (2012), 1000145.
- 54 Cregut, M., Bedas, M., Durand, M. J., Thouand, G., New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process, Biotechnology Advances 31(8) (2013).
- 55 O'Mahony, M. M., Dobson, A. D., Barnes, J. D., Singleton, I., The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil, Chemosphere, 63(2) (2006), str. 307-314.
- 56 Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., Biological degradation of plastics: A comprehensive review, Biotechnology Advances 26(3) (2008), str. 246-265.
- 57 Obradors, N., Aguilar, J., Efficient biodegradation of high-molecular-weight polyethylene glycols by pure cultures of *Pseudomonas stutzeri*, Applied and environmental microbiology, 57(8) (1991), str. 2383-2388.
- 58 Miloloža, M., Cvetnić, M., Kučić Grgić, D. *et al.* Biotreatment strategies for the removal of microplastics from freshwater systems. A review, Environ Chemistry Letters 20 (2022), str. 1377-1402.
- 59 Martínez-Toledo, A., Rodríguez-Vázquez, R., Ilizaliturri-Hernández, C. A., Culture media formulation and growth conditions for biosurfactants production by bacteria, International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources 10 (2018), str. 117-125.
- 60 Sanin, S.L. *et al.*, Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria, Process Biochemistry 38 (2003), str. 909-914.
- 61 Suzuki, T., Purification and some properties of polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by *Pseudomonas* O-3, Agricultural and Biological Chemistry 40 (1976), str. 497-504.

- 62 <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri339.htm> pristupljeno 17.7.2022.
- 63 Agarry, S., Ogunleye, O., Factorial Designs Application to Study Enhanced Bioremediation of Soil Artificially Contaminated with Weathered Bonny Light Crude Oil through Biostimulation and Bioaugmentation Strategy, *Journal of Environmental Protection* (2012).
- 64 Ukrainczyk, Marko Planiranje pokusa u industriji, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 5(3-4) (2010), str. 96-105.
- 65 Arnerić, J., Protrka, K., Modeli analize varijance (ANOVA), *Matematičko-fizički list*, 70 (2019-2020).
- 66 Aydar, A. Y., Utilization of Response Surface Methodology in Optimization of Extraction of Plant Materials, *Statistical Approaches With Emphasis on Design of Experiments Applied to Chemical Processes* 10 (2018), InTech.
- 67 Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., Sakharkar, K. R., Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species, *Indian Journal of Microbiology* 52(3) (2012), str. 411-419.
- 68 <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=30505> pristupljeno 19.7.2022.
- 69 Verbovsky, P. D., Collins, E. B., Effect of Diamide on Growth of Selected Bacteria, *Journal of Dairy Science* 56(9) (1973), str. 1180-1182.
- 70 <https://www.theguardian.com/environment/2022/jan/25/nurdles-are-everywhere-how-plastic-pellets-ravaged-a-sri-lankan-paradise>
<https://www.theguardian.com/environment/2022/jan/25/nurdles-are-everywhere-how-plastic-pellets-ravaged-a-sri-lankan-paradise> pristupljeno 15.7.2022.
- 71 Suzuki, M., Suzuki, S., Matsui, M., Hiraki, Y., Kawano, F., Shibayama, K., Genome Sequence of a Strain of the Human Pathogenic Bacterium *Pseudomonas alcaligenes* That Caused Bloodstream Infection, *Genome Announcements* 1(5) (2013).
- 72 Tsuji, A., Kaneko, Y., Takahashi, K., Ogawa, M., Goto, S., The Effects of Temperature and pH on the Growth of Eight Enteric and Nine Glucose Non-Fermenting Species of Gram-Negative Rods, *Microbiology and Immunology* 26(I) (1982), str. 15-24.
- 73 LaBauve, A. E., Wargo, M. J., Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Current Protocols in Microbiology* 6E.1.1-6E.1.8 (2012).
- 74 Lin, Q., Pilewski, J. M., Di, Y. P., Acidic Microenvironment Determines Antibiotic Susceptibility and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Frontiers in Microbiology* 12 (2021).

- 75 Kučić Grgić, D., Miloloža, M., Lovrinčić, E., Kovačević, A., Cvetnić, M., Ocelić Bulatović, V., Prevarić, V., Bule, K., Ukić Š., Markić, M., Bolanča, T., Bioremediation of MP-polluted Waters Using Bacteria *Bacillus licheniformis*, *Lysinibacillus massiliensis*, and Mixed Culture of *Bacillus* sp. and *Delftia acidovorans*, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 35(2) (2021), str. 205-224.
- 76 Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., Levin, D. B., *Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics*, *Frontiers in Microbiology* (2020).
- 77 Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., Sangwon Suh, S., *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 8(9) (2020), str. 3494-3511.
- 78 Sastri, V. R., *Plastics in Medical Devices: Properties, Requirements and Applications*, Elsevier Science (2010).
- 79 Mor, R., Sivan, A., Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*: biodegradation of polystyrene, *Biodegradation* 19(6) (2008), str. 851-858.
- 80 Sleator, R. D., Hill, C., Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence, *FEMS Microbiology Reviews* 26(1) (2002), str. 49-71.
- 81 <http://www.nanocs.net/PEG-coated-polystyrene-beads-50nm-1mL.htm> pristupljeno 25.7.2022.
- 82 <https://nanocomposix.com/pages/polyethylene-glycol-peg-surface> pristupljeno 25.7.2022.
- 83 Čačko, S., Pančić, E., Zokić, I., Miloloža, M., Kučić Grgić, D., Aditivi u plastici – potencijalno štetni učinci na ekosustav, *Kemija u Industriji* 71 (1-2) (2022), str. 49–56.
- 84 Puntarić, D., Bošnjir, J., Šercer, M., Ščetar, M., Dimitrov, N., Znanstveno mišljenje o prisutnosti ftalata u hrani, *Zahtjev HAH – Z – 2014 - 4* (2014).
- 85 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dilauryl-thiodipropionate#section=Toxicity> pristupljeno 25.7.2022.
- 86 Araújo, E. S., Nascimento, M. L. F., de Oliveira, H. P., Influence of Triton X-100 on PVA Fibres Production by the Electrospinning Technique. *FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe* 21, 4(100) (2013), str. 39-43.
- 87 Park, B., Na, S. Y., Bae, I.-G., Uniform two-dimensional crystals of polystyrene nanospheres fabricated by a surfactant-assisted spin-coating method with polyoxyethylene tridecyl ether, *Scientific Reports* 9 (2019), 11453.

88 Shen, L., Guo, A., Zhu, X., Tween surfactants: Adsorption, self-organization, and protein resistance, *Surface Science* 605(5-6) (2011), str. 494-499.

89 <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/D19563.pdf>

pristupljeno 15.7.2022.

90 <https://www.analytice.com/en/analysis-of-triphenyl-phosphate-tpp-cas-115-86-6-in-polymers/> pristupljeno 20.7.2022.

91 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triphenyl-phosphate#section=Toxicity-Summary> pristupljeno 20.7.2022.

92 <https://chemceed.com/product-news/product-focus-dioctyl-adipate/> pristupljeno 25.7.2022.

93 CPSC Staff Statement on University of Cincinnati Report “Toxicity Review for Bis(2-ethylhexyl) Adipate (DEHA)”¹ (2018).

94 Martínez-Gómez, C., Leon, V. M., Calles, S., Gomáriz-Olcina, M., Vethaak, A.D., The adverse effects of virgin microplastics on the fertilization and larval development of sea urchins, *Marine Environmental Research* (2017).

8. POPIS SIMBOLA I OZNAKA

BPA – bisfenol A (eng. *bisphenol A*)

CFU – broj živih stanica bakterija koje tvore kolonije (eng. *colony-forming units*), st/mL

DDTDP – diauril tiodipropionat (eng. *dilauryl thiodipropionate*)

DOA – dioktil adipat (eng. *dioctyl adipate*)

DOP – diizooktil ftalat (eng. *diisooctyl phthalate*)

DSC – diferencijalna kalorimetrija skeniranja (eng. *differential scanning calorimetry*)

EC₂₀ – koncentracija koja uzrokuje štetan učinak kod 20% populacije

EC₅₀ – koncentracija koja uzrokuje štetan učinak kod 50% populacije

FO - fiziološka otopina

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom signala (eng. *fourier transform infrared spectroscopy*)

INH – inhibicija bioluminiscencije, %

GPC – kromatografija isključenjem (eng. *gel permeation chromatography*)

GPPS – polistiren opće namjene (eng. *general purpose polystyrene*)

HA – hranjivi agar

HIPS – polistiren visoke udarne žilavosti (eng. *high-impact polystyrene*)

HPLC-MS – visokoučinkovita tekućinska kromatografija - masena spektrometrija (eng. *high performance liquid chromatography - mass spectrometry*)

LD₅₀ – koncentracija koja uzrokuje smrtnost 50% populacije

LDPE – polietilen niske gustoće (eng. *low-density polyethylene*)

LMWPE – polietilen niske molekulske mase (eng. *low-molecular-weight polyethylene*)

MM – mineralni medij

MP – mikroplastika

NMR – nuklearna magnetska rezonancija (eng. *nuclear magnetic resonance*)

NP – nanoplastika

OG – optička gustoća

PS – polistiren

PVC – poli(vinil-klorid)

P1 – pokus s mikroplastičnim česticama polistirena

P2 – pokus s mikroplastičnim česticama poli(vinil-klorida)

PAH – policiklički aromatski ugljikovodici (eng. *polycyclic aromatic hydrocarbons*)

PBDE – polibromirani difenil eteri (eng. *polybrominated diphenyl ethers*)

PE – polietilen

PEG – polietilen glikol
PET – polietilen tereftalat
PHA – polihidroksialkanoati
PLA – polilaktična kiselina
PP – polipropilen
PPG – polipropilen glikol
PVA – polivinil alkohol
SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. *scanning electron microscopy*)
SP – slijepa proba
 T – temperatura, °C
 t – vrijeme, dan
TC – ukupni ugljik (eng. *total carbon*), mg/L
TIC – ukupni anorganski ugljik (eng. *total inorganic carbon*), mg/L
TOC – ukupni organski ugljik (eng. *total organic carbon*), mg/L
TSA – *Tryptic Soy Agar*
UV – ultraljubičasto zračenje
XPS – rendgenska fotoelektronska spektroskopija (eng. *X-ray photoelectron spectroscopy*)
 γ_{MP} – masena koncentracija mikroplastike, mg/L
 $\gamma(O_2)$ – masena koncentracija kisika, mg/L

ŽIVOTOPIS

Marika Puškarić [REDACTED] U Zagrebu je pohađala osnovnu školu „OŠ Jordanovac“ i srednju školu „VII. gimnazija“ te ih završila s odličnim uspjehom. 2016. godine upisala je preddiplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, gdje je završni rad, na temu „Membranska desalinacija - stanje u istraživanju i praksi“, izradila pod mentorstvom prof. dr. sc. Krešimira Košutića na Zavodu za fizikalnu kemiju. Stručnu praksu odradila je na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju. Godine 2020. upisala je diplomski studij Ekoinženjerstva na FKIT-u. Godine 2022. bila je demonstrator na vježbama u Zavodu za industrijsku ekologiju. Od prve godine fakulteta radila je u knjižari Bookara te na odjelu distribucije u Ustanovi Zagreb film. Tijekom 2021. i 2022. vodila je koautorski studentski projekt financiran od strane Studentskog centra Karlovac. Volontirala je na festivalima Zagreb film i Touch me.

Tečno govori engleski jezik te posjeduje DSD diplomu (B2/C1) iz njemačkog jezika i A2 diplomu iz korejskog jezika. Vješto barata MS Office paketom, programima Scientist, SuperPro Designer i Sony Vegas Pro.