

Biorazgradnja polistirena i poli(vinil-klorida) bakterijama izoliranih iz okoliša

Patrčević, Paula

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:174561>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Paula Patrčević

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Paula Patrčević

**Biorazgradnja polistirena i poli(vinil-klorida) bakterijama izoliranih iz
okoliša**

DIPLOMSKI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

dr. sc. Matija Cvetnić

Zagreb, rujan 2021.



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.

ZAHVALA

Najljepša hvala mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na svim stručnim savjetima, prenesenom znanju, strpljenju, motivaciji i pomoći pri izradi mog diplomskog rada.

Veliko hvala i asistentici mag. ing. oecoling. Martini Miloloži na savjetima i uputama za rad u laboratoriju, uloženom trudu, uvijek pozitivnoj radnoj atmosferi te prenesenom znanju, kao i ostalim djelatnicima Zavoda za industrijsku ekologiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva tehnologije te tvrtke Comprehensive Water Technology d.o.o. koji su uvijek bili spremni pomoći.

Hvala mojim dragim roditeljima i sestri koji su mi uvijek bili motivacija i bezuvjetna podrška, kao i svim mojim kolegicama i dragim ljudima koji su mi uljepšali studentske dane.

SAŽETAK

Plastika se široko koristi u gotovo svakom aspektu svakodnevnog života, a neka od svojstava koja tome pogoduju su niska cijena, trajnost, mala gustoća i dobra rastezljivost. Zanimljivo je kako je godišnja globalna proizvodnja plastike premašila 300 milijuna tona, zbog čega njezino nakupljanje u kopnenom i morskom okolišu postupno privlači sve veću pažnju znanstvenika. Znanstvenici su tokom 1970-ih prvi puta izvijestili o malim plastičnim česticama u oceanu – mikroplastici. Mikroplastika predstavlja bilo koju sintetičku čvrstu česticu plastike ili polimernu matricu (netopivu u vodi), pravilnog ili nepravilnog oblika i veličine od 1 µm do 5 mm.

U ovom radu proučavana je biorazgradnja dviju vrsta mikroplastike – polistirena (PS) i poli(vinil-klorida) (PVC) pomoću dviju bakterijskih kultura – gram-negativne bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes* i gram-pozitivne bakterijske kulture *Bacillus subtilis*. Plan eksperimenta je napravljen prema Taguchi dizajnu što znači da su definirani određeni čimbenici koji su ispitivani pri svojoj minimalnoj i maksimalnoj vrijednosti – pH vrijednost, temperatura, broj okretaja, veličina mikroplastike, koncentracija mikroplastike, optička gustoća i dodatak glukoze.

U svrhu utvrđivanja značajnih čimbenika tijekom biorazgradnje mikroplastike PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis* u ovom istraživanju provedeno je nekoliko analiza. Osim logaritamske vrijednosti ukupnog broja živih bakterijskih stanica, log CFU, pratila se i optička gustoća, koncentracija ukupnog ugljika, ukupnog organskog ugljika i ukupnog anorganskog ugljika, koncentracije kationa i aniona, toksičnost filtrata pomoću bakterijske kulture *Vibrio fischeri*, FTIR-ATR spektroskopska analiza mikroplastike, produkti biorazgradnje te prisutstvo aditiva tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Naposljetku su određeni značajni čimbenici za provedene procese biorazgradnje za obje bakterije i obje vrste MP-a, uz ANOVA statističku analizu eksperimentalnih podataka. Značajnijim čimbenicima u pokusu s bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* pokazali su se broj okretaja, veličina čestica MP-a, dok su značajniji čimbenici u pokusu s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* bili pH-vrijednost, broj okretaja, veličina čestica mikroplastike, optička gustoća i koncentracija dodane glukoze.

Ključne riječi: Mikroplastika; Biorazgradnja; Polistiren; Poli(vinil-klorid); *Pseudomonas alcaligenes*; *Bacillus subtilis*

SUMMARY

Plastics are widely used in all aspects of daily life due to their properties such as low price, durability, light weight and good malleability. The global annual production of plastics exceeds 300 million tons, so the accumulation of plastics in the terrestrial and marine environment has attracted the attention of scientists. As early as the 1970s, scientists reported small plastic particles in the ocean - microplastics. Microplastic is defined as any synthetic solid plastic particle or polymeric matrix (water insoluble) with regular or irregular shape and size from 1 μm to 5 mm.

In this study, the biodegradation process of two types of microplastics - polystyrene (PS) and polyvinyl chloride (PVC) - was observed using two different bacterial cultures - gram-negative *Pseudomonas alcaligenes* and gram-positive *Bacillus subtilis*. This experiment was conducted according to Taguchi design, therefore all the observed factors had their minimum and maximum value - pH, temperature, rpm, microplastic particle size, microplastic concentration, optical density and added glucose.

In order to determine significant factors during the biodegradation of microplastics - PS and PVC with bacterial cultures of *Pseudomonas alcaligenes* and *Bacillus subtilis*, several analyzes were performed in this study. In addition to the logarithmic value of the total number of live bacterial cells, log CFU, optical density, total carbon, total organic carbon and total inorganic carbon concentration, cation and anion concentrations, filtrate toxicity with bacterial culture *Vibrio fischeri*, FTIR-ATR spectroscopic microplastic analysis, monitoring of biodegradation products and the presence of additives using liquid high performance chromatography (HPLC). Finally, significant factors for the conducted biodegradation processes for both bacteria and both types of MP were determined, with ANOVA statistical analysis of the experimental data. Significant factors in the experiment with bacterial culture of *Pseudomonas alcaligenes* were the number of revolutions of the mixer per minute, particle size of MP, while more significant factors in the experiment with bacterial culture of *Bacillus subtilis* were pH value, number of revolutions of microplastic, particle size, optical density and concentration of added glucose.

Keywords: Microplastics; Biodegradation; Polystyrene; Polyvinyl chloride; *Pseudomonas alcaligenes*; *Bacillus subtilis*

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Plastika.....	3
2.2. Vrste plastike	5
2.2.1. Poli(etilen-terftalat)	5
2.2.2. Polietilen.....	5
2.2.3. Polipropilen	6
2.2.4. Polistiren.....	7
2.2.5. Poli(vinil-klorid).....	7
2.3. Mikroplastika.....	9
2.3.1. Primarna mikroplastika	9
2.3.2. Sekundarna mikroplastika	10
2.4. Mikroplastika u okolišu	10
2.5. Ekotoksičnost mikroplastike.....	12
2.5.1. Određivanje toksičnosti primjenom bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	17
2.6. Uklanjanje mikroplastike iz okoliša	18
2.6.1. Biorazgradnja mikroplastike	19
2.6.1.1. Bakterije roda <i>Pseudomonas</i>	20
2.6.1.2. Bakterije roda <i>Bacillus</i>	22
2.7. Postupci određivanja prisutnosti mikroplastike u okolišu	23
3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1. Materijali	26
3.1.1. Mikroplastika	26
3.1.2. Mikroorganizmi.....	26
3.1.3. Hranjiva podloga	27
3.1.4. Etanol	28
3.1.5. Mineralni medij.....	28
3.1.6. Fiziološka otopina	28
3.1.7. Priprema otopina za određivanje toksičnosti primjenom morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	29
3.1.7.1. Čista kultura bakterije	29
3.1.7.2. Otopina za resuspenziju	29
3.1.7.3. 2%-tna otopina NaCl.....	29
3.2. Instrumenti.....	29
3.3. Metode	30
3.3.1. Priprema mikroplastike	30
3.3.2. Priprema bakterijskih suspenzija.....	30
3.3.3. Postavljanje pokusa	30
3.3.4. Analize	31
3.3.4.1. Mjerenje optičke gustoće (OG).....	31
3.3.4.2. Određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija (CFU)	31
3.3.4.3. TOC i TC analiza	33
3.3.4.4. Ionska kromatografija	33
3.3.4.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	33
3.3.4.6. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama	33
3.3.4.7. Metoda određivanja toksičnosti vodene faze	33

1. UVOD

Glavni materijali koji su se tijekom prošlosti koristili za skladištenje i pakiranje organskih proizvoda, poput stakla, drva, pletenja od pruća i tekstila, u posljednje su vrijeme sve češće zamijenjeni plastičnim materijalima. Nagli porast u proizvodnji plastike nakon Drugog svjetskog rata posljedica je njenih povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava koja joj omogućuju širok raspon primjena u usporedbi sa tradicionalnim materijalima. Istovremeno je došlo do naglog porasta broja stanovnika koji se u razdoblju od 1950. do 2017. godine povećao sa 2,5 milijardi na 7,6 milijardi, pa se tako između 1950. i 2019. godine postotak svjetskog stanovništva koje živi u urbanim područjima povećao s 30 % (751 milijun stanovnika) na 55% (4,2 milijarde stanovnika). Približno 50 % proizvoda od plastike namijenjeno je za jednokratnu uporabu, a samo 20 % - 25 % za dugotrajnu uporabu. [1] Povećanom uporabom plastičnih materijala povećana je i količina nastalog otpada; od 8300 milijuna tona plastike koliko je proizvedeno u svijetu između 1950. i 2015. godine, nastalo je 4900 milijuna tona otpada. [1] Procjenjuje se da godišnja proizvodnja plastike iznosi oko 320 milijuna tona, a relativno niske stope recikliranja te nepravilno odlaganje otpada dovode do nakupljanja sve veće količine plastičnog otpada u okolišu. [2] Plastični otpad naposljetku se raspada na čestice mikroplastike (MP). [3]

Thompson i sur. (2004) prvotno su definirali MP-e kao mikroskopske čestice plastike koje se talože u morskom sedimentu i vodenom okolišu. Danas se MP-e definira kao svaka sintetička čvrsta čestica ili polimerna matrica, pravilnog ili nepravilnog oblika i veličine od 1 μm do 5 mm, koja može biti primarnog ili sekundarnog proizvodnog podrijetla, a netopiva je u vodi. [4] Kako je proces razgradnje MP-a izrazito spor, MP-e se dugotrajno zadržava u okolišu čime predstavlja prijetnju cjelokupnom ekosustavu. [5] Bakterije prirodnim putem pretvaraju složene molekule različitih tvari u niže složene molekule metaboličkim ili enzimskim djelovanjem u ekosustavima, što je poznato kao proces biorazgradnje. Do formiranja MP-a ili nanoplastičnih čestica dolazi zbog biorazgradnje makroplastike u ekosustavu. Karakteristike nekih materijala poput hrapavosti površine, topografije, površinske slobodne energije, površinskih elektrostatičkih interakcija i površinske hidrofobnosti omogućuju stvaranje bakterioloških biofilmova. Pa tako potencijalno može doći do formiranja bakterioloških biofilmova na polistirenu i polietilenu. Neki mikroorganizmi poput npr. *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Thermobifida fusca*, *Alcaligenes sp.*, *Comamonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, *P. aeruginosa* E7, *A. beijerinckii* HM121 i *Serratia marcescens* luče enzime zbog kojih igraju veliku ulogu u biorazgradnji plastičnih fragmenata na prirodan način u ekosustavima. [6]

U ovom radu provedeno je ispitivanje značajnih čimbenika za proces biorazgradnje dviju različitih vrsta MP-a – polistirena (PS) i poli(vinil-klorida) (PVC). Za provedbu procesa biorazgradnje MP-a korištene su dvije bakterijske kulture – gram negativna bakterijska kultura *Pseudomonas alcaligenes* i gram pozitivna bakterijska kultura *Bacillus subtilis*. Tijekom provedbe pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a, praćena je logaritamska vrijednost ukupnog broja živih stanica bakterija, log CFU koja se koristila kao odziv, koncentracija ukupnog ugljika, te ukupnog organskog ugljika i ukupnog anorganskog ugljika, koncentracije kationa i aniona te toksičnost filtrata pomoću bakterijske kulture *Vibrio fischeri*. Biorazgradnja se pratila i FTIR-ATR analizom mikroplastike, a produkti biorazgradnje MP-a praćeni su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Pomoću računalnog programa Design Expert 7,0 određeni su značajni čimbenici za provedene procese biorazgradnje za obje bakterije i obje vrste MP-a, uz ANOVA statističku analizu eksperimentalnih podataka.

2. OPĆI DIO

2.1. Plastika

Plastika se definira kao polimerni spoj nastao reakcijom polimerizacije ili polikondenzacije, te dopijeva u vodena područja ispuštanjem otpadnih voda, odlaganjem otpada, poljoprivredom i na mnoge druge načine. [7] To je jeftin, lagan, jak i izdržljiv materijal koji je otporan na koroziju, te ga odlikuju svojstva visoke toplinske i električne izolacije. [8] Osim navedenih svojstava, plastični materijali imaju malu gustoću, dugotrajni su i lako dostupni za široku uporabu. [9] Raznolikost polimera i brojnost njihovih povoljnih svojstava omogućuje dobivanje širokog spektra proizvoda koji dovode do medicinskog i tehnološkog napretka, uštede energije i brojnih drugih društvenih koristi.[8]

Najčešće korištene vrste plastike su polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), poli(etilen-tereftalat) (PET) i poli(vinil-klorid) (PVC). Kako većina otpadne plastike naposljetku završi u morskom okolišu, u tablici 2.1. navedene su vrste plastike koje su najzastupljenije u morskim vodama, postotak njihove proizvodnje i proizvodi koji su izvor navedene otpadne plastike. [10]

Tablica 2.1. Klasifikacija plastičnih materijala najčešće prisutnih u morskom okolišu [10]

Vrsta plastike	Skraćenica	Postotak proizvodnje	Izvor otpadne plastike
Polietilen niske gustoće	LDPE	21 %	Plastične vrećice, boce, ribarske mreže, slamke
Polietilen visoke gustoće	HDPE	17 %	Boce za mlijeko i sokove
Polipropilen	PP	24 %	Užad, čepovi za boce, ribarske mreže
Polistiren	PS	6 %	Plastično posuđe, posude za hranu
Polistirenska pjena			Pluta, kutije za mamce, plastične čaše
Najlon	PA	<3 %	Ribarske mreže i mamci
Poli(etilen-tereftalat)	PET	7 %	Plastične boce
Poli(vinil-klorid)	PVC	19 %	Plastični filmovi, boce i čaše
Celulozni acetat	CA		Filteri cigareta

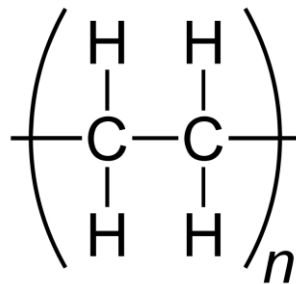
Prema istraživanju provedenom 2014. godine od strane Eriksena i suradnika, najmanje 2,25 bilijuna plastičnih čestica mase 268,940 tona prisutno je u morskim vodama diljem svijeta. Globalna proizvodnja plastike naglo je porasla s 1,5 milijuna tona 1950. godine na 348 milijuna tona u 2018. godini. [11] Ostaci plastike dobiveni iz morskih izvora (najčešće ribarskim aktivnostima) i kopnenih izvora nakupljaju se u otvorenom moru i oceanima, kao i u dubokom

moru te kopnenom i slatkovodnom okolišu. [11] Plastični otpad u oceanima predstavlja veliku prijetnju globalnim morskim ekosustavima s očekivanim negativnim posljedicama za morski životinjski svijet, kao i za zdravlje ljudi. Negativni utjecaji plastičnih onečišćivala na morsku biotu uključuju tjelesne ozljede povezane sa zapetljavanjem, kao i fiziološke, biokemijske i poremećaje ponašanja uzrokovane gutanjem plastike i štetnih kemikalija koje ona sadrži. Sitni dijelovi plastike pronađeni su u gastrointestinalnom traktu više od 2200 različitih morskih vrsta, od zooplanktona do viših predatora.[12]

Glavne strategije koje se koriste za upravljanje plastičnim otpadom uključuju mehaničko recikliranje, spaljivanje i odlaganje na odlagališta otpada.[13] Bez obzira na mogućnost recikliranja, približno 50 % proizvedene plastike od premale je vrijednosti kako bi njeno recikliranje bilo ekonomski isplativo. U razdoblju od 1950.godine do danas reciklirano je samo 2 % plastičnog otpada, 6 % je spaljeno, a 92 % nalazi se na odlagalištima otpada ili u okolišu.[1] Recikliranje bi, kao jedna od uspješnih metoda raspolaganja otpadom, trebala spriječiti ulazak plastičnog otpada u okoliš, što pogoduje ekonomskim i ekološkim interesima. Međutim, heterogenost plastičnog otpada u smislu različitih vrsta polimera predstavlja velik izazov pri mehaničkom recikliranju zbog velike kemijske i fizikalne nekompatibilnosti.[2]

Budući da je plastika petrokemijskog podrijetla, ona ima visoku kalorijsku vrijednost. Na taj se način ponovno može pretvoriti u koristan oblik energije. Na primjer, kilogram plastike ima sadržaj energije ekvivalentan kilogramu dizela, jedna plastična vrećica ima dovoljno energije za napajanje lampe od 60 W tijekom deset minuta, a posuda za jogurt može napajati niskoenergijsku lampu do pet sati. [14] Prevođenje plastičnog otpada u energiju čini se kao privlačna opcija s obzirom da mnoge vrste plastike gore bolje od drva ili ugljena. Međutim, spaljivanje plastike u svrhu proizvodnje električne energije ima učinkovitost od 25 %, što je znatno manje od 55 % učinkovitosti plinskih elektrana. Nadalje, sagorijevanjem plastike u atmosferu se oslobađa CO₂ i druge otrovne kemikalije, poput klorovodične kiseline, sumporova dioksida, dioksina, furana i teških metala što dodatno pridonosi onečišćenju zraka i stalnom porastu globalnog atmosferskog CO₂. [12]

U usporedbi s drugim vrstama PE-a (npr. polietilen niske gustoće), HDPE je tvrd, čvrst i težak materijal, ali je manje duktilan i lakši od vode. Ovaj se polimerni materijal može lijevati, obrađivati i zavarivati, a otpornost HDPE-a na vremenske uvjete može se poboljšati korištenjem UV-stabilizatora. HDPE se proizvodi od nafte, a fizički mu je izgled sličan vosku - bez sjaja i neproziran. [20] HDPE ima široku primjenu u industriji zbog svojih vrhunskih fizikalnih i mehaničkih svojstava.

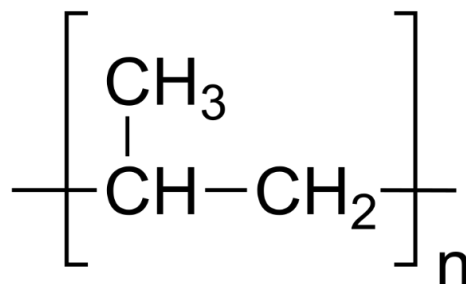


Slika 2.2. Strukturna formula polietilena [20]

LDPE je bistar i proziran plastični materijal koji ima svojstva fleksibilnosti, kemijske otpornosti i hidroizolacijske sposobnosti. Koristi se u proizvodnji širokog spektra proizvoda, uključujući vrećice za namirnice, plastične folije i filmove, fleksibilne materijale za pakiranje i dijelove injekcija. [21] Pretjerana izloženost ovom polimernom materijalu može uzrokovati rak i bolesti reproduktivnog sustava. [18]

2.2.3. Polipropilen

Prema istraživanju iz 2018. godine koje su proveli Lopez i sur., poliolefini čine više od polovice proizvedene plastike, od čega 19,2% čini PP koji se primjenjuje za ambalažu (39,9%), u građevinskim materijalima (19,7%) i u automobilske industriji (8,9%). PP je atraktivan termoplastičan materijal zbog svojstava poput netoksičnosti, male gustoće, niskih troškova proizvodnje, jednostavnosti obrade i mogućnosti recikliranja, a njegova strukturna formula je prikazana na slici 2.3.

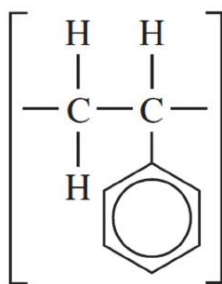


Slika 2.3. Strukturna formula polipropilena [22]

Nedostatak PP-a je lomljivost pri niskim temperaturama i niska otpornost na udarce, zbog čega se često primijenjuju određeni postupci za učvršćivanje materijala. [22]

2.2.4. Polistiren

Polistiren (PS) je polimerni materijal dobiven iz monomera stirena prikazanog na slici 2.4., koji se lako oblikuje. Nalazi se u posudicama za mliječne proizvode (jogurt, deserti, itd.), slatkiše, raznim prehrambenim ambalažama, šalicama, pladnjevima, hladnjacima, vratima i policama, kozmetici, bocama, igračkama, kasetama, priboru za izolaciju, te su od njega sačinjene PS pjenaste ploče. [14]



Slika 2.4. Strukturna formula polistirena [23]

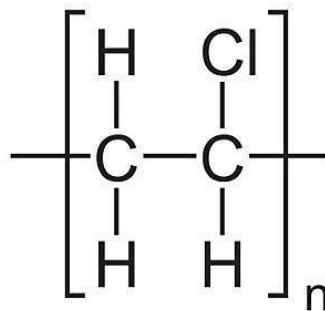
PS je plastični materijal na bazi nafte poznat po svojim izolacijskim svojstvima i maloju gustoći, a neki od nedostataka njegove uporabe uključuju pretjeranu proizvodnju, uporabu i odbacivanje. Tako je prema podacima nekih istraživanja, na globalnoj razini 2012. godine proizvedeno 32,7 milijuna tona PS-a. [24]

S obzirom da je monomer stirena kancerogen, on predstavlja ozbiljnu prijetnju vodenim organizmima. Polistirenske mikrokuglice veličine 20-50 μm uzrokuju ozbiljne štete ponajviše morskim organizmima, uključujući ribe, rakove, školjke, morske ježeve i mikroalge, a čestice ovog polimernog materijala su lagane i mobilne te se putem invazivnih vrsta lako šire morskim vodama. [24] Osim onečišćenja okoliša, ovaj polimer i njegovi spojevi imaju negativan utjecaj na ljudsko zdravlje i cjelokupni ekosustav. [25] Izloženost ovom polimernom materijalu uzrokuje nadraživanje očiju, migriranje u hranu i skladištenje u tjelesnim mastima, povećanu stopu limfnih i hematopoeznih tumora kod radnika, a visoka izloženost može uzrokovati promjene vida, usporene reakcije, probleme s ravnotežom te pojavu karcinoma. [18]

2.2.5. Poli(vinil-klorid)

Poli(vinil-klorid) jedna je od pet najvećih termoplastičnih sintetičkih smola, drugi po proizvodnji nakon PE-a i PP-a. Ima dobra mehanička svojstva, otporan je na koroziju i teško

sagorijeva. [26] PVC nastaje polimerizacijom vinil-klorida slobodnim radikalima, a strukturna formula PVC-a prikazana je na slici 2.5. Ovaj je materijal relativno jeftin, te ima široku industrijsku primjenu zbog mogućnosti povezivanja s osnovnim sirovinama i njegovih superiornih svojstava kao što su vrhunska kemijska stabilnost, trajnost, netoksičnost, visoka biokompatibilnost, fleksibilnost te dobra otpornost na agresivna okruženja. Zbog svega navedenog, PVC je pogodan za proizvodnju ožičenja, kabela, kućnih materijala kao i mnogih medicinskih instrumenata što pogoduje njihovoj sigurnosti i transparentnosti. [27]



Slika 2.5. Strukturna formula poli(vinil-klorida)[28]

Nakon kontakta s biološkim tekućinama na PVC-u je, kao i kod drugih plastičnih materijala, moguć nastanak bakterijskih filmova, čemu su razlog njegove hidrofobne karakteristike.[29] Tipično nema inherentna antibakterijska svojstva, što je važno obilježje pri prevenciji infekcija kod ljudi ili propadanja materijala potaknutog mikroorganizmima prisutnima u okolišu. Iz tog se razloga, kako bi se dobio antimikrobni materijal, trenutno proučavaju modifikacije PVC-a što bi smanjilo rizik od infekcija i unakrsnog onečišćenja u industrijskim procesima. Jedna od mogućih antibakterijskih strategija temelji se na uporabi biocidnih sredstava, koja se vežu za površinu ili ispuštaju u okoliš. A iako je ugradnja nekih antibiotika poput nisina ili triclosana moguća u PVC proizvode, najčešće korišteno antibakterijsko sredstvo je srebro. [29] Upotreba PVC materijala ipak je ograničena zbog krute prirode samog polimera. Iz tog se razloga često kombinira sa plastifikatorima kako bi dobio veću fleksibilnost i žilavost za različite primjene. [30] Plastifikatori smanjuju napetost deformacije, tvrdoću, gustoću, viskoznost i elektrostatički naboj polimera, istodobno povećavajući fleksibilnost polimernog lanca, njegovu otpornost na lom i dielektričnu konstantu. Većina plastifikatora priprema se reakcijama esterifikacije između odgovarajućih kiselina / anhidrida i alkohola u prisutnosti kiselih katalizatora. [31]

Negativni učinci na ljudsko zdravlje prilikom izloženosti ovom polimernom materijalu uključuju nadraživanje očiju, migriranje u hranu i skladištenje u tjelesnim mastima, povećanu

stopu limfnih i hematopoeznih tumora kod radnika, a visoka izloženost može uzrokovati promjene vida, usporene reakcije, probleme s ravnotežom te rak. [18]

2.3. Mikroplastika

Čestice plastike prema veličini se mogu podijeliti u 5 kategorija – nanoplastika (čestice veličine 1-100 nm), mikroplastika (čestice veličine 0,05 – 0,5 cm), mezoplastika (čestice veličine 0,5 – 5 cm), makroplastika (čestice veličine 5 – 50 cm) i megaplastika (čestice veće od 50 cm). [32,33] MP-e se definira kao skupina sintetičkih polimera dimenzija manjih od 5 mm, a sastoji se od sitnih čestica plastike koje se međusobno razlikuju po veličini, specifičnoj gustoći, kemijskom sastavu i obliku. Čestice MP-a se prema izvoru dijele u dvije skupine; one proizvedene namjerno za određenu industrijsku ili domaću primjenu (primarna MP-e) te one nastale raspadanjem većih predmeta od plastike pod utjecajem ultraljubičastog zračenja ili mehaničkom abrazijom (sekundarna MP-e). [32,34] Zbog male veličine čestica, velike specifične površine i jake hidrofobnosti, MP-e lako može adsorbirati teške metale i organske onečišćujuće tvari u okolišu. [7] Nadalje, MP-e sadrži štetne aditive poput ftalata i tvari koje usporavaju proces gorenja.[7]

Zbog sve šire distribucije čestica MP-a u okolišu, potencijalni štetni učinci MP-a privukli su značajnu pozornost znanstvenika. Brojna istraživanja odnose se na toksične učinke MP-a na morske organizme. MP-e u morskom okruženju može dospjeti u probavni sustav raznih organizama poput riba i zooplanktona, što utječe na njihov rast, ponašanje, reprodukciju i metabolizam, a taj učinak ostavlja posljedice u cijelom hranidbenom lancu. [7]

2.3.1. Primarna mikroplastika

Plastika koja se sintetizira u obliku sitnih čestica poznata je kao primarna MP-e koja u vodeni okoliš dopijeva putem raznih industrijskih i lokalnih proizvoda za čišćenje. Najčešće prisutna primarna MP-e nalazi se u obliku pilinga u sredstvima za čišćenje ruku ili pastama za zube te u raznim drugim kozmetičkim proizvodima i proizvodima za njegu kože.[18]

Najčešće prisutna vrsta MP-a u proizvodima za čišćenje je PE (93%). MP-e se također primjenjuje u naftnoj industriji u tekućinama i abrazivima. Prilikom procesa proizvodnje abraziva, najčešće su prisutni polimerni materijali u obliku poliestera (PES), polistirena (PS), melamina, te akrilne i poli-alil-diglikol-karbonatne MP-e. Mnogi su proizvodi od plastike u obliku raznih smola ili pahuljica smole te prašaka, te se oni ispuštaju kao primarna MP u različitim industrijskim djelatnostima. Prilikom transporta ili proizvodnje ta se MP-e ispušta u vodeni i oceanski okoliš. Prema jednom su istraživanju primijećene visoke koncentracije

kuglica od smole u vodenom okolišu u razdoblju između 1970. i 1990. godine u područjima koja se nalaze u blizini postrojenja za preradu i proizvodnju plastike.[18]

MP-e se također koristi za prijenos aktivnih supstanci lijekova, nakon čega u obliku farmaceutskog ostatka dospijeva u otpadne vode i ulazi u slatkovodne i oceanske ekosustave. Nadalje, važan izvor MP-a u vodenom okolišu su fragmenti oprane odjeće koji dospijevaju u okoliš putem otpadnih voda. [18]

2.3.2. Sekundarna mikroplastika

Velike molekule plastike usitnjene u manje fragmente ili krhotine definiraju se kao sekundarna MP-e. Za prisutnost sekundarne MP-e u morskom i vodenom okruženju zaslužne su velike količine plastičnog otpada iz kopnenih i oceanskih resursa. Procjenjuje se da su kopneni i oceanski izvori odgovorni za otprilike 75 % - 90 % odnosno 10 % - 25 % plastike u slatkovodnim ekosustavima. Plastika može biti nošena vjetrom te se na taj način prenositi s odlagališta otpada do slatkovodnih ekosustava. Štoviše, krhotine plastike mogu dospijeti u morske vode, posebno u nerazvijenim zemljama bez učinkovitog načina upravljanja odlagalištima otpada, a tamo dospijevaju iz neograđenih odlagališta tijekom prirodnih katastrofa poput plimnog vala, oluje i tornada. Iako trajnost plastike nije jasno definirana, poznato je da ona stoljećima može ostati unutar ekosustava. Nakon ulaska u oceanske ekosustave, ostaci veće plastike fragmentirani su u sitnije dijelove raznim fizikalnim, kemijskim ili biološkim procesima. Glavni faktor koji utječe na razgradnju plastike je vremenski utjecaj zajedno sa Sunčevom svjetlošću. Izloženost plastike svjetlosnom zračenju dovodi do prekida kemijskih veza što uzrokuje raspad polimerne matrice. Zbog niskih temperatura, brzina razgradnje plastike smanjena je u slatkovodnim i oceanskim ekosustavima u usporedbi s plažama ili kopnenim uvjetima. [18] Nadalje, reakcija oksidacije inducirana UV zračenjem otežana je površinskim nečistoćama i smanjuje vremensku degradaciju.

2.4. Mikroplastika u okolišu

Za svakodnevne ljudske aktivnosti neophodna je voda, a vodeni okoliš predstavlja najveći rezervoar MP-a. Čestice MP-a prenose se vodenim okolišem prirodnim protokom voda. Ovaj proces ovisi o samim karakteristikama čestica MP-a te o fizikalnim i kemijskim svojstvima vodenog okoliša kao što su hidrodinamika, međusobna povezanost i unos vodenih organizama, što naposljetku izravno utječe na položaj, resuspenziju i udaljenost prijenosa čestica plastike te njihovu sudbinu u okolišu.[35] Zastupljenost čestica MP-a u vodenom okolišu diljem svijeta prikazana je u tablici 2.2. [36]

Tablica 2.2. Zastupljenost čestica MP-a u vodenom okolišu [36]

Vodeni okoliš	Zastupljenost MP-e [%]	Koncentracija MP-e
Sjeveroistični dio Atlantskog oceana	89	2,46 čestica/m ³
Arktičke polarne vode	95	0 - 1,31 čestica/m ³
Laurentijsko veliko jezero	20	43000 - 466000 čestica/km ²
Zaljev Jade, južni dio Sjevernog mora	70	1770 čestica/L
Sjeverozapadni dio Atlantskog oceana	60	2500 čestica/km ²
Portugalska obala	53	332 - 362 čestica/m ²
Meditersko more	74	0,90 ± 0,10 čestica/g
Ušće Yangtze i Istočno kinesko more	90	0 - 144 čestica/m ³
Plaže Guanabara zaljeva, jugoistočni Brazil	56	12 - 1300 čestica/m ²
Švedska obala	-	15 - 2400 čestica/m ³ do 68000-102000 čestica/m ³
Bohai more (Kina)	-	63 - 201 čestica/kg

Većina čestica MP-a iz kopnenih izvora ispušta se izravno u rijeke i jezera s otpadnim vodama iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda ili površinskim otjecanjem. Općenito, male i lagane čestice plastike suspendirane su na gornjoj površini vode, dok se velike i teške čestice plastike talože na dnu vode. [35] Raznolikost čestica MP-a prisutnih u sedimentima na obalama malazijskih poluotoka prikazana je na slici 2.6. [36] Mnoštvo je prirodnih anorganskih i organskih čestica i mikroorganizama u okolišu koji mogu agregirati sa česticama MP-a što mijenja izvornu gustoću plastike i time utječe na vrijeme taloženja i zadržavanja plastičnih čestica. [35]

**Slika 2.6.** Čestice MP-a različitih veličina i boja prisutne u sedimentima na obalama malazijskih poluotoka [36]

MP-e u kopnenom okruženju uglavnom se prenose vanjskim silama, kao što su protok voda te životinjske i ljudske aktivnosti. Tlo predstavlja složen ekosustav sa složenim strukturama pora i bogatom biološkom zajednicom, zbog čega se rezultati nekih istraživanja mogu razlikovati od stvarnog stanja okoliša. Razvitak suvremene poljoprivrede rezultirao je širokom uporabom poljoprivrednih membrana i mulja, kao i promjenama u načinu navodnjavanja, zbog čega velike količine MP-a zaostaju na površini tla. Štoviše, čestice plastike s površine tla mogu migrirati prema dnu ili se širiti uokolo te naposljetku dospjeti u podzemne vode. [35]

Gliste, kao jedna od najčešće prisutnih životinjskih organizama u tlu, na površini svoga tijela imaju sloj viskozne tjelesne tekućine što im omogućuje vezivanje čestica MP-a te na taj način kretanja glista uzrokuju prostorni transport plastike. U nedavnim su istraživanjima Rong i sur. predložili tezu da bakterijska zajednica može usporiti prijenos čestica plastike, s obzirom da biofilm sužava put i povećava hrapavost površine medija, a O-H i N-H skupine prisutne na površini stanica mogu formirati vodikove veze s česticama plastike. [35] Zbog slabe fluidnosti tla u usporedbi s oceanskim vodama, koncentracija čestica plastike u kopnenom okolišu s vremenom će se vjerojatno povećavati. Postoji mogućnost akumulacije čestica plastike u višim biljkama, što posljedično može predstavljati veliki rizik za ljudsko zdravlje.[37]

Istraživanja o MP-u u atmosferskom okolišu grubo su podijeljena u sljedeće tri kategorije: suspendirana atmosferska MP (SAMP), atmosferske padaline i prašina (u zatvorenom ili na otvorenom prostoru). Prijenos čestica MP-a na otvorenom pod utjecajem je meteoroloških čimbenika kao što su brzina vjetra, smjer vjetra, količina vlage, kiša i snijeg. [35] Iako na količinu MP-a u zatvorenim prostorima uglavnom utječu ljudske aktivnosti, kretanje i uporaba klima uređaja, na njihovu distribuciju također utječu i temperatura te količina vlage. U nedavnoj su studiji ispitivani prostorni i vremenski trendovi MP-a u različitim zatvorenim prostorijama (spavaćoj sobi, uredu i hodniku). Istraživanjem je dokazano kako je koncentracija MP-a u zatvorenim prostorijama (1,1-59,4 MPs / m³) mnogo veća od one na otvorenom (0,3-1,5 MPs / m³).[35]

2.5. Ekotoksičnost mikroplastike

Ekotoksikologija je moderna znanstvena disciplina u kojoj se kombiniraju znanja iz ekologije i toksikologije, a predstavlja poddisciplinu toksikologije okoliša. Cilj ekotoksikologije je proučavanje toksikoloških utjecaja različitih onečišćivala na floru i faunu od razine jedinke do razine populacije. U ekotoksikološkim istraživanjima koriste se *in vivo* i *in vitro* testovi [38]. *In vitro* test je istraživanje koje se provodi izvan živog organizma, a

najčešće uključuje uporabu izoliranih tkiva, organa ili stanica. Nasuprot tome, *in vivo* test je istraživanje koje se provodi na živim organizmima (npr. štakoru, zecu).[39]

Ekotoksičnost MP-a može se pratiti na podstaničnoj, staničnoj i individualnoj razini. Fiziološki i biokemijski mehanizmi ekotoksičnosti očituju se oksidativnim stresom. U vodenim ekosustavima toksični učinci MP-a mogu dovesti do stanične apoptoze na razne načine, uključujući stvaranje reaktivnih oblika kisika i peroksidativna oštećenja, prijenose s probavnih na unutarnje organe (npr. kardiovaskularne organe), imunomodulaciju, poremećeni prijenos živčanih impulsa i upalne odgovore. Sorpcija kemikalija poput ftalata, bisfenola A (BPA), teških metala, policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH) i polikloriranih bifenila (PCB) može biti povoljna kod nepolarnih čestica MP-a s visokim omjerom površine i volumena, omogućujući njihov daljnji prijenos između organizama. Agregacija mikroorganizama na MP-e može potaknuti genetsku razmjenu i difuziju patogena u svrhu olakšavanja ekotoksičnih odgovora. [40] Molekularna ili genetska osnova toksikoloških mehanizama očituje se oštećenjem DNA, apoptozom, upalom i promjenama u putovima metaboličke i signalne transdukcije. Nadalje, kada je riječ o biotičkoj izloženosti MP-u, ovi molekularni mehanizmi mogu inducirati biološke učinke (npr. promjene u ekspresiji gena i molekularne reakcije), a identificirani su kao genetski biomarkeri. [40]

Prisutnost MP-a u prehrambenom lancu može imati štetne učinke na ljudsko zdravlje. Potencijalni toksični učinci MP-a na ljudsko zdravlje uključuju gastrointestinalni sustav, jetru, reproduktivni sustav i neurotoksičnost. Toksični efekti čestica plastike na specifične organe mogu se biokemijski i genetski manifestirati putem biokemijskih i molekularnih biomarkera. Izloženost ljudi mikrovlaknima u zraku izravnim udisanjem ili njihovim taloženjem (poput prašine u zatvorenom prostoru) na namirnicama može dovesti do zdravstvenih opasnosti, poput lezija u dišnom sustavu. Ti su utjecaji potvrđeni povećanom učestalošću respiratornih problema kod radnika u proizvodnji PVC-a i raka kod radnika u sintetičkom tekstilu. Otkriveno je i da uzorci prašine u zatvorenom prostoru mogu sadržavati opasne ftalatne plastifikatore, koji mogu izazvati alergijske reakcije u odraslih ljudi i djece, no ova teza zahtijeva detaljnija istraživanja. [40]

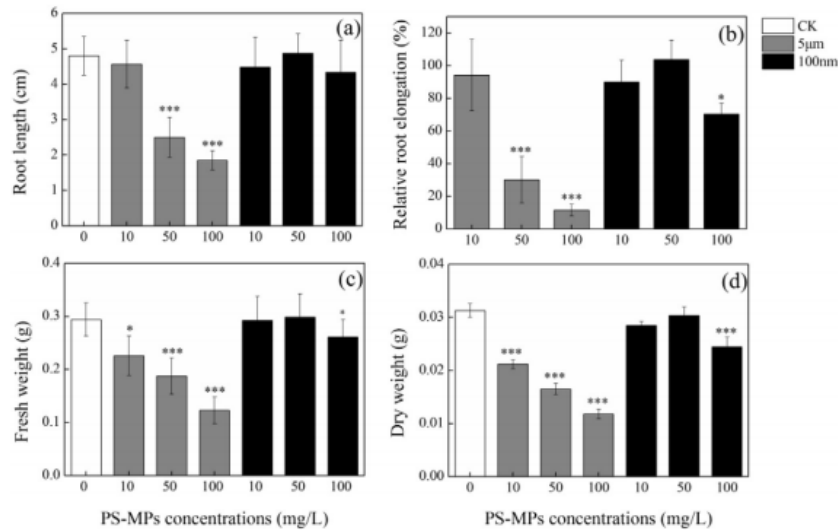
Istraživanjem provedenim 2019. godine [41] ispitivana je ekotoksičnost i genotoksičnost polistirena na višu biljku *Vicia faba* (grah). S obzirom na visoku zastupljenost ove biljke u ljudskoj prehrani, važno je procijeniti toksičnost različitih onečišćujućih tvari na *V. faba*. Za procjenu ekotoksičnosti u ovom se istraživanju se pratila aktivnost antioksidativnih enzima i oksidativno oštećenje te mikronukleus test na genotoksičnost. Budući da pore stanične stijenke korijena *V.faba* imaju prosječan polumjer veličine 7-20 nm, u istraživanju su korištene čestice

MP-e polistirena veličine 5 nm i 100 nm. Toksični učinci polistirena procjenjivani su mjerenjem rasta, oksidativnih oštećenja i genotoksičnosti u *V. faba*. Kako bi se točno odredilo specifično mjesto vezanja MP-e na stanice *V. fabe* na vrhu korijena, koristile su se fluorescentne mikrosfere polistirena (5 nm i 100 nm) s pobudom i emisijom valne duljine 580 nm i 630 nm. Distribucija čestica polistirena pratila se dinamičkim raspršenjem svjetlosti (eng. „*Dynamic light scattering*“, skraćeno DLS) i prijenosnom elektronskom mikroskopijom (eng. „*Transmission electron microscopy*“, skraćeno TEM) za obje veličine čestica. Duljina korijena sjemena *V. faba* mjerena je prije i nakon 48 sati izloženosti česticama polistirena. Kako bi se utvrdilo specifično mjesto vezivanja PS-a u stanicama *V. faba*, korištena je mikroskopija laserskim konfokalnim skeniranjem (eng. „*laser confocal scanning microscopy*“, skraćeno LCSM). Za utvrđivanje učinka PS-a na aktivnost antioksidativnih enzima i oksidativno oštećenje stanica vrha korijena *V. faba*, izmjerena je aktivnost enzima katalaze (CAT), superoksid dismutaze (SOD) i peroksidaze (POD), kao i razina malondialdehida (MDA) nakon 48 sati izloženosti česticama PS-a. Rezultati istraživanja pokazuju kako izloženost česticama PS-a veličine oko 5 nm uzrokuju značajno smanjenje duljine korijena samo pri većim koncentracijama od 50 i 100 mg/L kao što je prikazano na slici 2.7. Pri izloženosti česticama PS-a veličine oko 100 nm nema promjena u duljini korijena, a relativno produljenje korijena značajno se smanjilo samo pri koncentraciji od 100 mg/L u usporedbi s kontrolnim uzorcima (slika 2.7.(a) i (b)). Iz slike 2.7. (c) i (d) može se vidjeti da je izloženost 5 nm PS-u izazvala značajno smanjenje „mokre“ i „suhe“ mase korijena *V. faba* pri svim korištenim koncentracijama (10, 50 i 100 mg/L) u usporedbi s kontrolom. Nasuprot tome, pri izloženosti 100 nm PS-u pri koncentracijama od 10 i 50 mg/L nije vidljiv inhibitorni učinak, dok je koncentracija od 100 mg/L pokazala značajan inhibitorni učinak u usporedbi s kontrolom. [41]

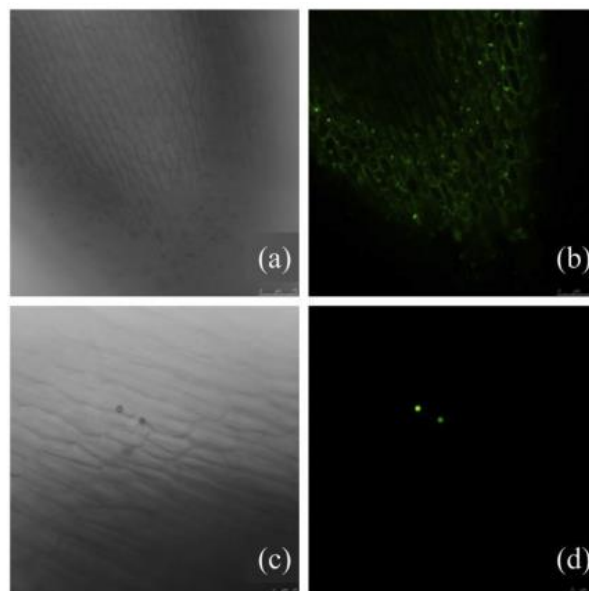
Slika 2.8. prikazuje vrhove korijena *V. faba* izložene PS-u veličine čestica 100 nm i 5 nm pod LCSM -om. Iz slike 2.8. (a) i (b) može se vidjeti da je velik broj čestica PS-a veličine 100 nm ušlo u vrhove korijena *V. faba* u usporedbi s česticama PS veličine 5 nm čija je prisutnost u vrhovima korijena *V. faba* bila vrlo oskudna. [41]

Rezultati su pokazali značajno povećane aktivnosti SOD i POD kod vrhova korijena *V. faba* nakon izlaganja 10 mg/L, 50 mg/L i 100 mg/L PS veličine čestica 5 nm u usporedbi s kontrolom. Dok su pokazane aktivnosti SOD i POD vrhova korijena *V. faba* izloženih PS veličine 100 nm manje, ali značajno rastu kod najniže koncentracije, zatim opet dolazi do porasta pri 50 mg/L i opet laganog povećanja (SOD) ili čak smanjenja (POD) u odnosu na kontrolu. Aktivnosti enzima CAT smanjene su pri izloženosti česticama PS veličine 5nm, a značajno povećane pri izloženosti česticama PS veličine 100 nm. Aktivnosti enzima MDA nisu

promijenjene pri izloženosti česticama PS veličine 5nm, a pri izloženosti česticama PS veličine 100 nm dolazi do smanjene aktivnosti za koncentraciju 50 mg/L, te povećane aktivnosti pri koncentraciji 100 mg/L u usporedbi s kontrolom. [41]

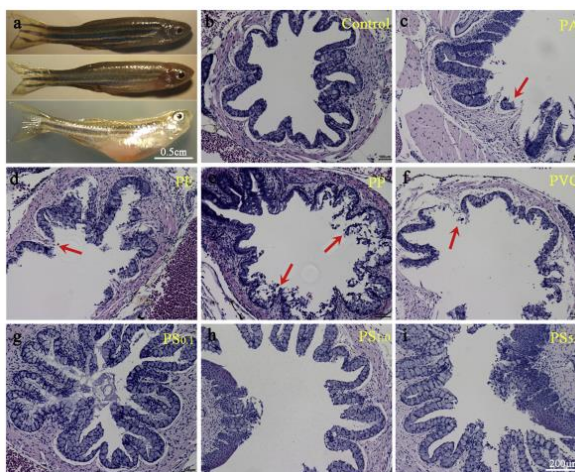


Slika 2.7. Duljina korijena (a), Relativno produljenje korijena (b), mokra masa (c) i suha masa (d) korijena biljke *V. faba* izložena česticama polistirena različitih koncentracija (0, 10, 50 and 100 mg/L)[41]



Slika 2.8. Slika svijetlog polja (a) i tamnog polja (b) vrhova korijena *V. faba* izloženih 100 nm PS pri 100 mg/L tijekom 48 sati pod LCSM-om; slika svijetlog polja (c) i tamnog polja (d) vrhova korijena *V. faba* izloženih 5 µm PS pri 100 mg/L tijekom 48 sati pod LCSM. [41]

U istraživanju provedenom 2018. godine [42] provela su se ekotoksikološka ispitivanja na organizmima *Danio rerio* i *Caenorhabditis elegans* u svrhu procjene ekotoksičnosti MP-e u pelagijskim i bentoskim sredinama. Odabrano je pet uobičajenih vrsta MP-e: poliamidi (PA), PE, PP, PVC i PS. *D. rerio* i *C. elegans* bili su izloženi nizu koncentracija MP čestica gotovo iste veličine (PA, PE, PP, PVC) ili različitih veličina (PS). Stope preživljavanja i histopatološke promjene ispitivane su za vrstu *D. rerio*, a rezultati su prikazani na slici 2.9. Koristeći fluorescentno označene transgene nematode, nakon kronične izloženosti navedenim materijalima dodatno su ispitani smrtnost, veličina tijela i reproduktivna toksičnost, oksidativna oštećenja i razina kalcija u crijevima. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti i usporediti otrovne učinke navedenih pet vrsta MP-e za prethodno navedena dva organizma.[42]

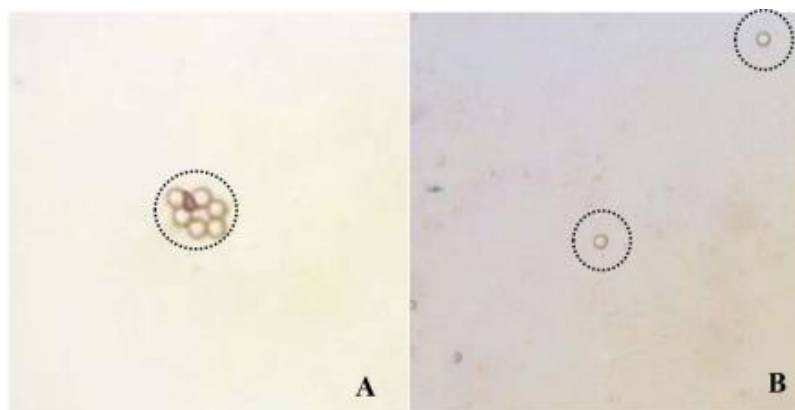


Slika 2.9. Vanjski izgled (a) i crijevna mikrografija organizma *D. rerio* (b-i) pri izloženosti česticama MP-e (PA, PE, PP i PVC) gotovo iste veličine, koncentracije 1,0 mg/L (c – f), te česticama PS veličine 0,1 µm (g), 1,0 µm (h) i 5,0 µm (i) [42]

Rezultati istraživanja pokazali su kako je kod organizma *D. rerio* MP-e uzrokovala pucanje resica i cijepanje enterocita. Kod organizma *C. elegans* primjećeno je da je MP-e uzrokovala oksidativni stres i promjene razine kalcija u crijevima. Navedeni negativni učinci više ovise o veličini čestica MP-a nego o njenom kemijskom sastavu. [42]

U istraživanju provedenom 2017. godine [43] ispitivana je prisutnost i način djelovanja PS mikročestica u različitim tkivima organizma *Scrobicularia plana* u svrhu procjene potencijalnog ekotoksikološkog rizika. Prisutstvo navedene MP-a u škrgama i probavnoj žlijezdi *S. plana* praćeno je infracrvenom spektroskopijom u načinu difuzne refleksije i korištenjem baterije biomarkera oksidativnog stresa, a ispitivane su i genotoksičnost, neurotoksičnost i oksidativna oštećenja. Rezultati istraživanja pokazali su nakupljanje čestica

MP-a ponajviše u škragama i probavnim žlijezdama ovog organizma. Specifična osjetljivost tkiva javila se kao odgovor na izloženost organizma česticama MP-a pri čemu je došlo do povećanog oksidativnog stresa što je izraženije u škragama nego u probavnoj žlijezdi. Dokazano je kako se genotoksičnost PS-a povećavala s vremenom. Prisutnost PS-a u hemolimfi opažena pod optičkim mikroskopom prikazana je na slici 2.10. [43]



Slika 2.10. PS MP u hemolimfi (A i B), promatrana pod optičkim mikroskopom (povećanje 40 ×). Prisutnost PS-a istaknuta je tamno zasjenjenim krugovima. [43]

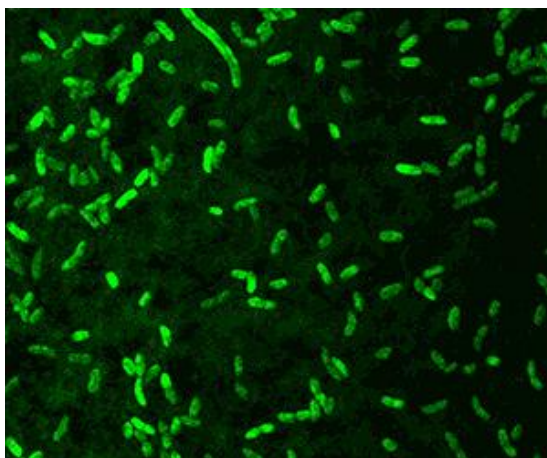
2.5.1. Određivanje toksičnosti primjenom bakterije *Vibrio fischeri*

Procjena toksičnosti otpadnih voda, vodotoka, onečišćenih prostora i kemikalija od primarne je važnosti kako bi se izbjegao negativan utjecaj na žive organizme i onečišćenje okoliša.[44] Bioluminiscencija predstavlja vrstu kemiluminescencije potaknutu enzimskom katalizom. Luminiscentne bakterije su sveprisutne u okolišu te prvenstveno naseljavaju morski ekosustav kao slobodni ili parazitski organizmi. Trenutno se u biološkim testovima za ispitivanje toksičnosti široko koriste prirodno bioluminiscentne bakterije kao što su *Vibrio fischeri*, *Vibrio harvey*, *Pseudomonas fluorescens* te *Pseudomonas leiognathi*. [44] Kod bioluminiscentnih testova koriste se tipične morske luminiscentne bakterije ili organizmi izolirani iz okoliša koji se testiraju te genetski modificiraju u luminiscentne sojeve. Temeljni princip bioluminiscentnih ispitivanja je korelacija promjena kinetičkih svojstava bioluminiscentne reakcije s toksičnošću ispitivane tvari. [44]

Najčešće korištene metode za utvrđivanje toksikološkog rizika u vodenom mediju su testovi inhibicije, a najčešći bakterijski *in vitro* biotest koji se koristi uključuje bakteriju *Vibrio fischeri* (metoda je opisana u skladu s normom HRN/EN ISO 11348). Spomenuti test inhibicije može se okarakterizirati kao najbrži, najisplativiji test s visokom osjetljivošću i ponovljivošću. Koristi se kao standardni (eko) toksikološki biološki test u Europi. Ovaj se test uspješno koristi

za utvrđivanje toksičnosti konvencionalnih organskih spojeva već dulje od dva desetljeća. Nadalje, predstavlja brz način određivanja akutne toksičnosti vodenih spojeva mjerenjem smanjenja izlazne svjetlosti kod luminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*. Emisija svjetlosti izravno je proporcionalna s metaboličkom aktivnošću bakterijske populacije, te bilo kakva inhibicija enzimske aktivnosti uzrokuje odgovarajuće smanjenje luminiscencije.[45]

Vibrio fischeri (poznat i pod nazivom *Photobacterium fisheri*, nazvan po Bernhardu Fischeru, njemačkom bakteriologu) je gram-negativna, štapičasta, bičevita, nepatogena bakterija (što je vidljivo na slici 2.11.), široko prisutna u subtropskim i morskim staništima. Postoji ili kao slobodnoživeći (planktonski) organizam ili kolonizira u organ koji proizvodi svjetlost (fotofor) kod određenih vrsta liganja i riba kao uzajamni simbiot, dajući im time svojstvo luminiscencije namijenjene maskiranju ili privlačenju plijena od strane domaćina. Neprekidno razmnožavanje bakterija unutar svjetlosnih organa dovodi do njihove trajne simbioze. [44]

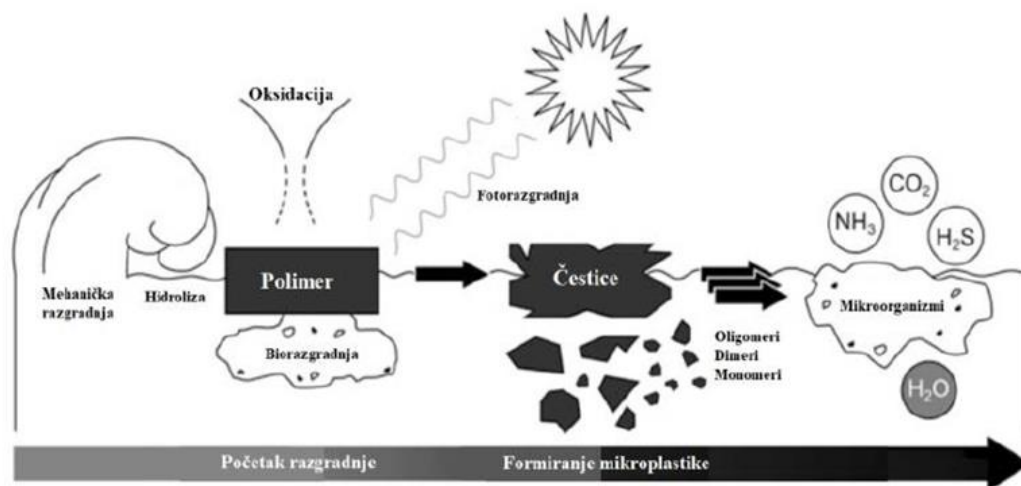


Slika 2.11. *Vibrio fischeri* [46]

2.6. Uklanjanje mikroplastike iz okoliša

Otpornost plastičnih materijala na utjecaj okoline je svojstvo koje se posljednji niz godina smatralo jednom od njenih glavnih prednosti, no današnja prekomjerna proizvodnja plastičnih materijala rezultirala je činjenicom da njihova otpornost postaje jedan od osnovnih nedostataka njihove uporabe. Naime, visoka otpornost rezultira niskim stupnjem razgradnje materijala i duljim vremenom zadržavanja unutar okoliša. Ovisno o raznolikim fizikalnim, kemijskim i biološkim čimbenicima, razgradnja plastičnih materijala može se kategorizirati kao biotička i abiotička. Proces razgradnje uključuje raspad polimera na manje strukturne jedinice (npr. oligomere, monomere ili kemijski modificirane verzije) i njihovu potpunu mineralizaciju. [47] Nadalje, najznačajniji procesi u kojima dolazi do razgradnje sintetskih polimera mogu se

podijeliti na fizikalno – kemijske procese i biološke procese (kao što je prikazano na shematskom prikazu na slici 2.12.) [48]



Slika 2.12. Shematski prikaz razgradnje sintetskih polimera [48]

2.6.1. Biorazgradnja mikroplastike

Biorazgradnja je proces kojim se onečišćujuće tvari prisutne u okolišu mineraliziraju do CO₂ i H₂O primjenom mikroorganizama. Biorazgradnja se može odvijati samo unutar biosfere s obzirom da mikroorganizmi imaju središnju ulogu u procesu biorazgradnje. Četiri su moguća okoliša u kojima dolazi do biorazgradnje polimera i proizvoda od plastike: tlo, vodene površine, odlagališta i kompost. Svaki okoliš sadrži različite mikroorganizme i ima različite uvjete biorazgradnje.[49]

Biorazgradnja sintetskih polimera može se odvijati u dva različita okruženja - aerobnom i anaerobnom. Doseg razgradnje polimera do produkata CO₂, H₂O, N₂, H₂, CH₄, soli, minerala i biomase (mineralizacija) može biti potpun ili djelomičan. Djelomična ili primarna degradacija polimernog lanca dovodi do stabilnih ili privremeno stabilnih proizvoda transformacije. Da bi došlo do procesa biorazgradnje potrebno je zadovoljiti sljedeća tri kriterija:

- 1) Moraju biti prisutni mikroorganizmi koji mogu depolimerizirati ciljanu tvar i mineralizirati monomerne spojeve enzimima odgovarajućim metaboličkim putem.
- 2) Okolišni parametri, kao što su temperatura, pH, vlaga i salinitet moraju osigurati uvjete koji su potrebni za biorazgradnju.
- 3) Morfologija polimernih čestica mora omogućiti vezanje mikroorganizama i stvaranje biofilma, dok struktura polimernog supstrata, npr. kemijske veze, stupanj

polimerizacije, stupanj grananja i parametri poput hidrofobnosti ili kristaliničnosti, ne smiju ometati djelovanje mikroba.

Budući da su sintetički polimeri općenito prevelike molekule da bi prošle kroz membranu stanice mikroorganizama, prvi korak biotske razgradnje je cijepanje bočnih lanaca ili polimerne okosnice te stvaranje manjih polimernih jedinica (monomera ili oligomera) izvanstaničnim enzimima. U većini slučajeva prvi korak depolimerizacije uključuje enzimski kataliziranu hidrolizu amida, estera ili uretanske veze. Nastale manje molekule mikroorganizmi mogu apsorbirati i metabolizirati. Abiotička hidroliza također može rezultirati međuproduktima koji se zatim metaboliziraju mikroorganizmima. [50] Dosadašnja istraživanja vezana uz biorazgradnju MP-a prikazana su u tablici 2.3.

2.6.1.1. Bakterije roda *Pseudomonas*

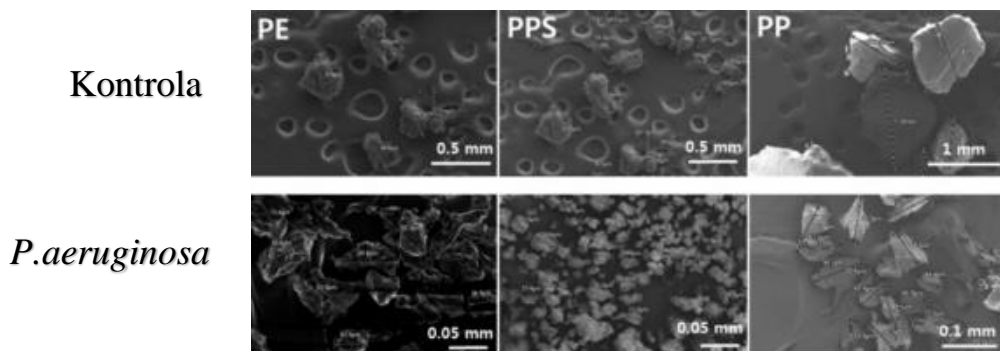
U Tablici 2.3. navedena su neka od dosadašnjih istraživanja o mogućnosti biorazgradnje različitih vrsta MPa nekim bakterijskim kulturama roda *Pseudomonas*. Tako je bakterijska kultura *P. aeruginosa* u istraživanju iz 2020. [60] pokazala izuzetnu mogućnost biorazgradnje polimernih materijala PE i PPS, gdje je detektiran 0,64%-ni gubitak sveukupne mase PE po danu i 0,53%-ni gubitak sveukupne mase PPS po danu unutar 15 dana istraživanja. Gubitak mase polimera PS i PP po danu bio je znatno manji (0,098 % i 0,025 %) čime je *P.aeruginosa* pokazala različitu mogućnost biorazgradnje ovisno o vrsti ispitivane MP-e, što je vidljivo na slici 2.13.[51]

P. aeruginosa klasificirana je kao aerob ili fakultativni anaerob te može preživjeti i razmnožavati se u aerobnim i u anaerobnim uvjetima. Nadalje, *P. aeruginosa* može preživjeti na raznim staništima, uključujući tlo, drvo, vodu, smetlišta, morski okoliš i utrobu crva, što upućuje na njenu visoku prilagodljivost.[51]

Pseudomonas alcaligenes je gram negativna aerobna bakterija koja pripada porodici Pseudomonadaceae (slika 2.14.). Ova je bakterija također poznata kao rijedak oportunistički humani patogen. Međutim, malo je poznato o kliničkoj važnosti *Pseudomonas alcaligenesa* i čimbenicima njegove virulencije, uglavnom zbog poteškoća pri identificiranju i razlikovanju ove bakterije od usko povezanih vrsta *Pseudomonasa* u medicinskim uvjetima. [57] *Pseudomonas alcaligenes* čest je stanovnik tla i voda te je izoliran iz različitih dijelova okoliša. Nadalje, ovaj organizam je izoliran iz kliničkih uzoraka, poput urina, gdje njegova uloga u ljudskim bolestima nije dokazana. [58]

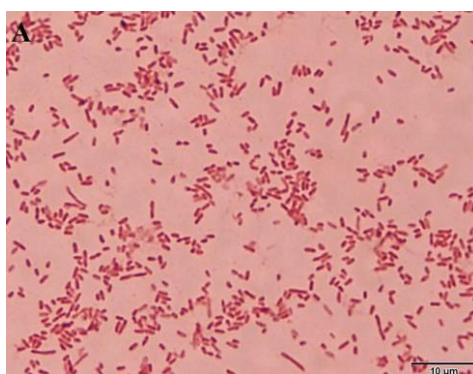
Tablica 2.3. Dosadašnja istraživanja vezana uz biorazgradnju MP-a pomoću različitih mikroorganizama

Vrsta MP-a	Mikroorganizam	Trajanje istraživanja	Rezultati istraživanja	Literatura
PE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15 dana	Uspješnost biorazgradnje se pratila promjenom mase MP-e, a istraživanje je pokazalo dobre rezultate biorazgradnje za PE i poli(fenilen-sulfid) (PPS), te smanjenu mogućnost biorazgradnje PS i PP mikroorganizmom <i>P.aeruginosa</i>	[51]
PS				
PPS				
PP				
PE	<i>Bacillus subtilis</i>	42 dana	Istraživanje je pokazalo mogućnost biorazgradnje MP-e pomoću mikroorganizama <i>B. subtilis</i> i <i>P. putida</i> , uz zapažanje da je mikroorganizam <i>P.putida</i> pokazao mogućnost brže biorazgradnje	[52]
	<i>Pseudomonas putida</i>			
PVC	<i>Bacillus flexus</i>	90 dana	Oba ispitivana mikroorganizma pokazala su mogućnost biorazgradnje PVC filmova, a važna je činjenica kako je <i>P. citronellolis</i> pokazao mogućnost djelomične biorazgradnje nesteriliziranih PVC filmova nakon samo 30 dana	[53]
	<i>Pseudomonas citronellolis</i>			
PPS	<i>Pseudomonas sp.</i>	10 dana	<i>Pseudomonas sp.</i> pokazao je visoku uspješnost biorazgradnje PPS, zahvaljujući činjenici da se plastične kuglice u tekućim uvjetima razgrađuju znatno brže od plastičnih filmova	[54]
PP	<i>Bacillus sp.</i>	40 dana	Oba mikroorganizma pokazala su mogućnost biorazgradnje PP, što je potkrijepljeno zabilježenim strukturnim, morfološkim i kemijskim promjenama promatrane MP-e SEM i FTIR analizom	[55]
	<i>Rhodococcus sp.</i>			
LDPE	<i>Aspergillus flavus</i>	30 dana	<i>A.flavus</i> pokazao je mogućnost biorazgradnje LDPE i HDPE što je detektirano promjenama na površini ispitivanih čestica i smanjenjem njihove mase, rezultati su potkrijepljeni FTIR analizom	[56]
HDPE				



Slika 2.13. Rezultati SEM analize PE,PPS i PS kuglica inkubiranih bakterijskom kulturom *Pseudomonas aeruginosa* [51]

Bakterije roda *Pseudomonas* imaju perspektivne biotehnoške potencijale u poljoprivredi, kemijskoj industriji i bioremedijaciji okoliša zbog svoje metaboličke raznovrsnosti. Plazmidi su važni pri istraživanju procesa razgradnje jer često kodiraju kataboličke gene te pružaju sredstvo za genetski prijenos između rodova. [59]



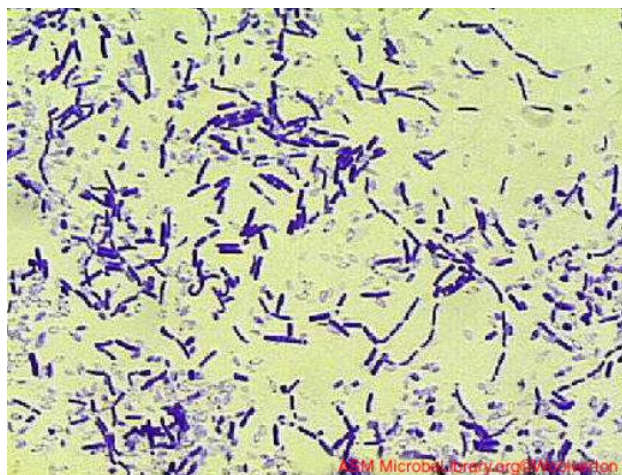
Slika 2.14. *Pseudomonas alcaligenes* [60]

2.6.1.2. Bakterije roda *Bacillus*

Bacillus subtilis je termofilna gram-pozitivna i sporulirajuća bakterija (slika 2.15.). Spore koje proizvodi *Bacillus subtilis* otporne su na visoke temperature, jako kisela te jako lužnata okruženja kao i na ostale nepovoljne uvjete. *Bacillus subtilis* izlučuje mnoge enzime, kao što su proteaza, celulaza, amilaza i fitaza, koji mogu nadomjestiti enzime koji nedostaju drugim mikroorganizmima kako bi pospješili njihov rast. [61]

Istraživanje iz 2020. [52] pokazalo je mogućnost biorazgradnje PE fragmenata i mikrokuglica pomoću bakterijske kulture *Bacillus subtilis*. Rezultati istraživanja bilježili su se svakih 7 dana tokom 6 tjedana, a pokazali su kako je bakterijska kultura *Bacillus subtilis* u drugom tjednu istraživanja razgradila 51,50% plastike brzinom od 0,0003 g po tjednu, a u

trećem tjednu 11,50% plastike brzinom od $6 \cdot 10^{-5}$ g po tjednu. Na kraju istraživanja donesen je zaključak kako je *Bacillus subtilis* razgradila 2% manje fragmenata PE i 22% manje mikrokuglica PE u usporedbi s drugom ispitivanom bakterijskom kulturom – *Pseudomonas putida*. [52]



Slika 2.15. *Bacillus subtilis* [62]

Ova se bakterija koristi u mnogim istraživanjima zbog svoje niske patogenosti, snažne sposobnosti izlučivanja proteina i svoje dobro razvijene tehnologije fermentacije. Uz činjenicu da se *Bacillus subtilis* smatra relativno sigurnom bakterijom, njezine su prednosti i dobra kompatibilnost s okolišem, mala vjerojatnost stvaranja otpornosti te mogućnost lučenja raznih enzima i antibiotika. Nadalje, prilagodljiva je genetskom inženjeringu, bez sklonosti određenim kodonima, te se uzgaja jednostavnim i jeftinim metodama u velikim količinama. *Bacillus subtilis* ima širok spektar upotrebe u područjima medicine, poljoprivrede i industrije. [63]

2.7. Postupci određivanja prisutnosti mikroplastike u okolišu

Analiza MP-a uglavnom se sastoji od dva koraka: ekstrakcije/pročišćavanja te kvantificiranja i/ili identifikacije. MP-e se najprije mora odvojiti od početne matrice kako bi se poboljšao i pojednostavio kasniji postupak kvantifikacije i/ili identifikacije. [64] Metode koje se najčešće koriste za kvantitativnu i kvalitativnu analizu MP-a dijele se na vizualne, spektroskopske, kromatografske i druge metode. U vizualne metode ubraja se mikroskopsko brojanje pri čemu su prethodno obrađeni uzorci identificirani mikroskopom, a čestice se izravno broje. Čestice veličine u rasponu nekoliko mikrometara (mm) moguće je identificirati pomoću stereomikroskopa. Uzorci koji sadrže visoku količinu velikih čestica MP-a mogu se brzo identificirati ovom metodom, u kratkom vremenu i po niskoj cijeni. Kako se priroda ispitivanih

uzoraka ne može utvrditi ovom metodom, potrebno je istu kombinirati sa metodama identifikacije navedenim u daljnjem tekstu. [64]

Spektroskopske metode određivanja MP-a uključuju FTIR, Ramanovu spektroskopiju i elektronski mikroskop. U FTIR metodi uzorci se podvrgavaju infracrvenom zračenju s definiranim rasponom i vibracijama koje ovise o sastavu i molekulskoj građi tvari. Čestice većih veličina > 500 mogu se analizirati pomoću ATR-FTIR, dok se manje čestice do 20 mm mogu analizirati mikroskopom u kombinaciji sa FTIR metodom. Metode temeljene na FTIR -u ne oštećuju uzorak već su brze, mirne i pouzdane. Uzorci moraju biti IC aktivni, a uzorci s česticama veličina ispod 20 mm zbog nedovoljne apsorpcije možda neće davati interpretabilne spektre. Neprozirne čestice teško je analizirati ovom metodom. Detekcija tvari ovisi o okolišnom matriksu (npr. stvaranje biofilma na polimeru), koji može stvarati poteškoće u tumačenju podataka. Uzorak mora biti prethodno obrađen kako bi se uklonila IC aktivna voda. [64]

U Ramanovoj spektroskopiji (RS) dolazi do interakcije ozračenog laserskog svjetla s molekulama i atomima uzorka što rezultira razlikama u frekvenciji stražnje raspršenog svjetla i laserske zrake. Može se detektirati Ramanov pomak te nastaju Ramanovi spektri specifični za određene tvari. Metoda koja kombinira mikroskopsku sa Ramanovom spektroskopijom prikladna je za čestice veličine >1mm, te je to jedina metoda dostupna za čestice koje se nalaze u rasponu veličina od 1 do 20 mm. Mikroskopija u kombinaciji sa RS-om omogućava analizu sitnih čestica veličine između 1 do 20 mm s visokom prostornom rezolucijom i relativno niskom osjetljivošću na vodu. Primjenom ove metode moguće je analizirati neprozirne i tamne čestice; ona omogućuju brzo kemijsko mapiranje što dovodi do brzog i automatskog prikupljanja i obrade podataka. Postoje velike smetnje za fluorescenciju u obliku bioloških organskih i anorganskih nečistoća što ometa mogućnost identifikacije MP-a. Uzorak zahtijeva pročišćavanje prije analize; pri čemu su važni Ramanski parametri akvizicije (npr. valna duljina, snaga lasera i izbjeljivanje fotografija). Automatsko mapiranje mikro RS-a još je uvijek u razvoju, a analiza metodom RS -a oduzima puno vremena. [64]

Kod elektronske mikroskopske slike uzoraka nastaju interakcijom elektronskog snopa s uzorkom kako bi se izmjerili sekundarni ioni. Mogu se analizirati čestice veličine do mikro skale, a provođenjem ove metode dobiva se slika uzorka visoke revolucije. Uzorci moraju biti premazani u vakuumu. [64]

Kromatografske metode određivanja MP-a uključuju termoanalitičke metode poput pirolize, GC/MS i tekućinske kromatografije. U termoanalitičkim metodama uzorci se termički obrađuju u okolišnim uvjetima i oslobođeni plinoviti spojevi su zarobljeni i naknadno

premješteni u GC stupac, koji je spojen na četveropolni - MS. Spektar dobivenih produkata pirolize zatim se uspoređuje s bazom podataka uobičajenih vrsta plastike. Ova je metoda pogodna za uzorke s česticama veličine > 500 nm s kojima se može ručno rukovati pincetom. Uzorak se može analizirati zajedno s organskimplastičnim aditivima bez upotrebe otapala čime se izbjegavaju pozadinska onečišćenja. Metoda je jednostavna i pouzdana, a dostupni su i podaci o spektrima najčešće korištenih polimernih materijala. Baza podataka za pirolizu dostupna je samo za određene polimerne materijale poput PE-a i PP-a. [64]

Kod tekućinske kromatografije uzorci se otapaju pomoću odabranih otapala. Različita raspodjela molarne mase mjeri se kromatografijom isključenjem veličine, a kvantifikacija se temelji na HPLC analizi. Uzorak mase nekoliko miligrama dovoljan je za kemijsku ekstrakciju kako bi se moglo provesti željeno ispitivanje. Nedostatak ove metode je taj što se njome mogu analizirati samo specifični polimerni materijali poput PS-a i PET-a. [64]

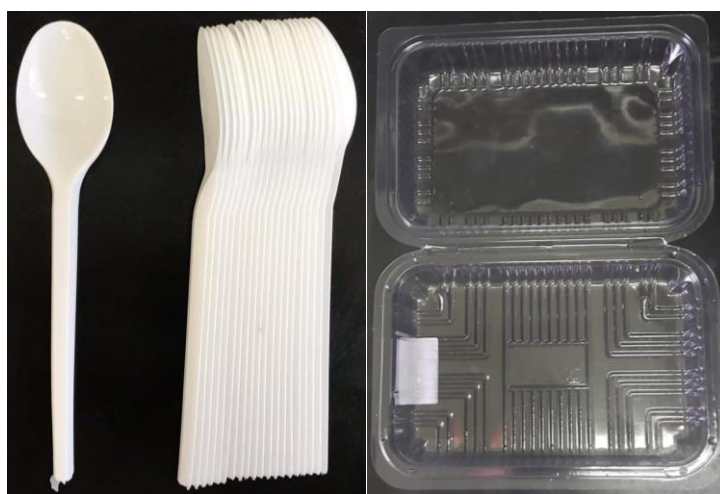
Od nekih drugih metoda koje se koriste za određivanje MP-a, najvažnije je spomenuti metodu označavanja u kojoj se hidrofobna boja adsorbira na površinu MP-a i čini je fluorescentnom kada se ozrači plavim svjetlom, nakon čega je fluorescentne čestice moguće prebrojati i identificirati. Ova metoda je jednostavna i omogućuje brzu identifikaciju MP-a s niskim troškovima. [64]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroplastika

U svrhu ispitivanja značajnih čimbenika za proces biorazgradnje MP-a primjenom bakterijskih kultura, koristila su se dva različita tipa MP-a –PS i PVC (slika 3.1). Čestice mikroplastike različitih veličina (300-710 μm) dobivene su usitnjavanjem jednokratne ambalaže pomoću kriomlina nadopunjenim s tekućim dušikom.



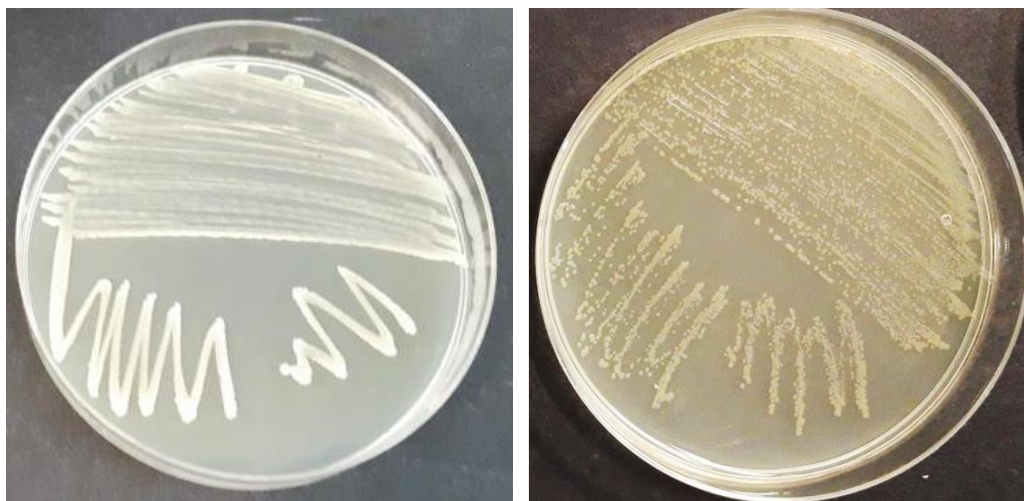
(a)

(b)

Slika 3.1. Prikaz materijala korištenih za dobivanje čestica MP-a PS-a (a) i PVC-a (b).

3.1.2. Mikroorganizmi

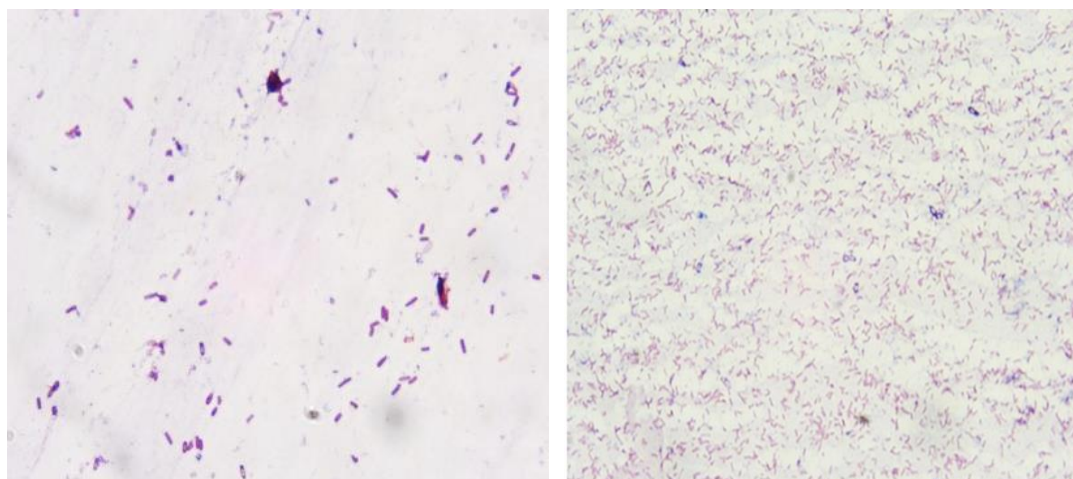
Za provedbu procesa biorazgradnje mikroplastike korištene su dvije bakterijske kulture – gram negativna bakterijska kultura *Pseudomonas alcaligenes* i gram pozitivna bakterijska kultura *Bacillus subtilis*. Kulture su pohranjene u zbirci mikroorganizama na Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Bakterija *Pseudomonas alcaligenes* izolirana je iz riječnog sedimenta, dok je *Bacillus subtilis* izolirana iz uzorka komposta. Kulture su uzgajane na hranjivome agaru tijekom 24-48 h pri 37 °C (slika 3.2). Morfologija stanica bakterijskih kultura snimljena je mikroskopom pri povećanju od 1000x, kao što je prikazano na slici 3.3.



(a)

(b)

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



(a)

(b)

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

3.1.3. Hranjiva podloga

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

3.1.4. Etanol

Za sterilizaciju čestica mikroplastike korišten je $w = 70\%$ etanol pripremljen u odmjernoj tikvici od 1000 mL tako da je odmjereno 730 mL etanola ($w = 96\%$, $M = 46,07$ g/mol, $\rho = 0,805$ kg/L) i stavljeno u tikvicu koja je potom nadopunjena do oznake deioniziranom vodom.

3.1.5. Mineralni medij

Za biorazgradnju mikroplastike pripremljena je 1 L mineralog medija za svaku pH-vrijednost 6 i 8. pH-vrijednost mineralnog medija podešavala se s 1 M KOH ili 0,1 M H₂SO₄. Sastav mineralnog medija koji je korišten za pripremu bakterijske suspenzije, kao i za provedbu procesa biorazgradnje, prikazan je u Tablici 3.1. [65]

Tablica 3.1. Sastav mineralnog medija.

Tvar	γ / g/L
K ₂ HPO ₄	12,5
KH ₂ PO ₄	3,8
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
H ₃ BO ₃	0,232
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,174
FeSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	0,116
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,096
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,022
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,008
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,008

3.1.6. Fiziološka otopina

Za pripremu 0,9 % fiziološke otopine potrebno je izvagati 0,9 g natrijeva klorida (NaCl) na 100 mL deionizirane vode. Fiziološka otopina korištena je za pripremu decimalnih razrjeđenja.

3.1.7. Priprema otopina za određivanje toksičnosti primjenom morske bakterije

Vibrio fischeri

3.1.7.1. Čista kultura bakterije

Za održavanje čiste kulture potrebno je prirediti čvrstu podlogu otapanjem 30 g NaCl, 15 g agara, 10 g glicerola, 5 g CaCO₃ i 3 g kvašćevog ekstrakta u 1 litri deionizirane vode te zagrijavanjem dobivene otopine do vrenja. Potom se otopina sterilizira u autoklavu pri 121 °C tijekom 15 minuta. Petrijeve zdjelice u kojima se nalazi čista kultura bakterija potrebno je čuvati na temperaturi između 15 °C i 22 °C.

3.1.7.2. Otopina za resuspenziju

Za resuspenziju čiste bakterijske kulture priređena je hranjiva izoosmotska otopina otapanjem 20 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 0,5 g CaCl₂, 0,2 g MgSO₄, 0,5 mL glicerola, 10 g glukoze i 10 g rafinoze u 1 litri deionizirane vode. Dobivena se otopina prokuhala i ohladila, te se podesila pH-vrijednost u rasponu između 6,8 i 7,2 pomoću 1 M NaOH i HCl.

3.1.7.3. 2%-tna otopina NaCl

Za pripremu ove otopine, izvaže se 2 g NaCl u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni deioniziranom vodom do oznake. pH-vrijednost otopine potrebno je podesiti u rasponu između 6,8 i 7,2, a podešava se pomoću 1 M NaOH i/ili HCl. 2%-tna otopina NaCl predstavlja radnu otopinu za pripremu niza razrijeđenja.

3.2. Instrumenti

Za vaganje koristila se analitička vaga KERN ALJ 220-4NM, a pokusi su se provodili na rotacijskoj tresilici Heindolph Unimax 1010.

Za praćenje koncentracije kisika, pH-vrijednosti i temperature korišten je prijenosni uređaj WTW Multimetar 3430, a optička gustoća se određivala pomoću spektrofotometra HACH, DR2400, SAD. Tijekom pokusa suspenzije su se homogenizirale na homogenizatoru REAX top. Za uzgoj bakterijskih kultura pri 37 °C koristio se termostat proizvođača Termomedicinski aparati, Hrvatska, dok se za provedbu pokusa biorazgradnje na temperaturi 15 °C koristio termostat proizvođača Nuve, ES 120, Turska. Za vlažnu sterilizaciju hranjivih podloga te čistog i nečistog staklenog posuđa korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija.

Pomoću TOC-V_{CSH}, Shimadzu, određivao se ukupni ugljik (TC), ukupni organski ugljik (TOC) i ukupni anorganski ugljik (IC). Na uređaju za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU, koji se koristio za praćenje produkata

biorazgradnje MP-a te prisutstva određenih aditiva, uzorci su se razdvajali po masi. Ioni (anioni i kationi) su se detektirali na ionskom kromatografu, DIONEX ICS SERIES, AS – DV. Uređaji se nalaze u firmi CWT na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilište u Zagrebu. Materijali, LDPE i PS karakterizirani su pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom tj. FTIR-ATR spektrometru, PerkinElmer, Spectrum One. Uređaj korišten za ispitivanje toksičnosti je luminometar LUMIStox 300 zajedno s termostatom LUMIStherm, Hach-Lange GmbH.

3.3. Metode

3.3.1. Priprema mikroplastike

U ovom pokusu korišteni su materijali koji se koriste u svakodnevnoj upotrebi. Za PS je korišten jednokratni plastični pribor (plastične žlice), dok je za PVC korištena jednokratna ambalaža. Navedeni materijali su prvo usitnjeni škarama te potom u kriomlinu proizvođača CryoMill Retsch, Njemačka nadopunjenim s tekućim dušikom. Osušene čestice su potom prosijavane na mehaničkim sitima u svrhu raspodjele veličine čestica u rasponima, <300 μm te 500-710 μm . Prije postavljanja pokusa čestice MP-a su izvagane u sterilne tikvice te sterilizirane u 70% etanolu. Čestice su se vakuumskom filtracijom izdvojile iz etanola te dodatno isprale sterilnom destiliranom vodom.

3.3.2. Priprema bakterijskih suspenzija

Bakterijske kulture su se uzgojile na hranjivome agaru tijekom 24 h pri 37 °C. Potom su pripremljene suspenzije svake pojedine bakterije u mineralnom mediju te su kulture stavljene na preduzgoj u novonastalim uvjetima u svrhu postizanja logaritamske faze rasta.

3.3.3. Postavljanje pokusa

Postavljanje pokusa uključuje pripremu bakterijske suspenzije u mineralnom mediju. Pokus se provodio u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 250 mL, a radnog volumena 100 mL tijekom 30 dana. Tikvice su sadržavale određeni volumen bakterijske suspenzije, mineralnog medija odgovarajuće pH-vrijednosti (pH = 6 ili pH = 8) te sterilizirane čestice MP-a. Početne vrijednosti optičke gustoće u sustavu prilikom postavljanja pokusa podešene su na 0,1 ili 0,5 pri valnoj duljini $\lambda = 600 \text{ nm}$.

Tijekom provedbe pokusa biorazgradnje, praćena je optička gustoća (OG), ukupan broj živih stanica bakterija (CFU), koncentracija TC-a, TOC-a i IC-a, ionski sastav vodene faze, te prisutnost razgradnih produkata i/ili otpuštenih aditiva s čestica mikroplastike. Nakon 30 dana

provedbe pokusa biorazgradnje, čestice su vakuumskom filtracijom odvojene od vodene faze u kojoj se određivala toksičnost primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*. Čestice MP-a su okarakterizirane FTIR-ATR spektroskopijom. pH-vrijednost, koncentracija otopljenog kisika ($\gamma(\text{O}_2)$) i temperatura (T) određivani su na početku i na kraju pokusa. U tablici 3.2. dani su ispitivanih 7 čimbenika na dvije razine – minimalna i maksimalna vrijednost. Plan pokusa biorazgradnje osmišljen je prema Taguchi dizajnu prema kojemu se dobiva kombinacija, odnosno L_8 ortogonalna matrica, ispitivanih čimbenika s obzirom na razine (prikazana u tablici 3.3.).

Tablica 3.2. Popis ispitivanih čimbenika za proces biorazgradnje mikroplastike na dvije razine.

Čimbenik	Minimalna vrijednost	Maksimalna vrijednost
pH-vrijednost / -	6	8
$T / ^\circ\text{C}$	15	25
Veličina čestica mikroplastike / μm	<300	500-710
$\gamma_{\text{MP}} / \text{mg/L}$	10	1000
Broj okretaja / o/min	100	200
OG / -	0,1	0,5
$\gamma_{\text{GLU}} / \text{mg/L}$	0,0	100,0

3.3.4. Analize

3.3.4.1. Mjerenje optičke gustoće (OG)

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

3.3.4.2. Određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija (CFU)

U svrhu određivanja CFU, pripremaju se decimalna razrjeđenja. U Petrijeve se zdjelice izuzima 1 mL svakog pripremljenog razrjeđenja te se zaljeva s hranjivim agarom. Nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 24-48 h, broje se izrasle kolonije. Kolonije bakterijskih kultura broje se polazeći od činjenice da iz jedne bakterijske stanice nastaje jedna kolonija. Broj izraslih kolonija određuje se na Petrijevim zdjelicama na kojima je prisutno 30 - 300 kolonija, a izvodi

se vizualno. Zatim se iz broja izraslih kolonija računa CFU (eng. *Colony Forming Units*) prema sljedećoj jednadžbi 1:

$$CFU = \frac{\text{broj izraslih kolonija}}{\text{volumen upotrijebljenog uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost upotrijebljenog razrjeđenja} \left[\frac{\text{stanica}}{\text{mL}} \right] \quad (1)$$

Tablica 3.3. L₈ ortogonalna matrica za svaki ispitivani čimbenik prema Taguchi dizajnu za pokus P1 s bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* i pokus P2 s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* za PS i PVC.

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

3.3.4.3. TOC i TC analiza

Za određivanje koncentracije TC-a i TOC-a izuzimalo se 0,5 mL, uzorka profiltriranog kroz filtar veličine pora 0,45 µm, uz dodatak 9,5 mL destilirane vode. U uzorke za određivanje TOC-a dodaje se i sumporna kiselina radi neutralizacije anorganskog ugljika. Iz dobivenih vrijednosti koncentracija TC-a i TOC-a, za svaki je pojedini uzorak moguće izračunati koncentraciju ukupnog anorganskog ugljika (IC) prema jednadžbi 2:

$$IC = TC - TOC \left[\frac{mg}{L} \right] \quad (2)$$

3.3.4.4. Ionska kromatografija

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

3.3.4.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

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

3.3.4.6. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

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

3.3.4.7. Metoda određivanja toksičnosti vodene faze

Metoda određivanja toksičnosti utemeljena je na procjeni smanjenja fiziološke aktivnosti bakterijske kulture *Vibrio fischeri* u prisustvu toksičnih tvari. Prati se smanjenje intenziteta bioluminiscencije morske bakterije *Vibrio fischeri*. Mjeri se intenzitet luminiscencije na početku testa i nakon 30 minuta izloženosti *Vibrio fischeri* razrijeđenjima ispitivane tvari, u ovome slučaju profiltrirana vodena faza nakon provedbe procesa biorazgradnje, pripremljena

prema linearnom nizu. Ova je metoda opisana u skladu s normom HRN/EN ISO 11348 [lit]. Instrument očitava dva rezultata efektivne koncentracije, EC₂₀ i EC₅₀ koji predstavljaju volumni udio uzorka pri kojem dolazi do 20%-tnog i 50%-tnog pada luminiscencije. Provedbom testova toksičnosti dobivene su vrijednosti luminiscencija za početne uvjete (0 minuta) i nakon 30 minuta. Za svako su se razrjeđenje, po linearnom nizu, radile dvije paralele te se rezultati računaju upotrebljavajući srednje vrijednosti luminiscencija. Inhibicija, izražena u postotku, računa se prema sljedećoj jednadžbi 3:

$$INH = \frac{LU_0 - LU_{uz}}{LU_0} \times 100\% \quad (3)$$

gdje je LU₀ srednja vrijednost luminiscencija kontrole nakon inkubacijskog vremena, $t = 30$ min, a LU_{uz} srednja vrijednost luminiscencija uzorka nakon inkubacijskog vremena, $t = 30$ min. EC₂₀ i/ili EC₅₀ vrijednost izražena u postotcima je dobivena preko uređaja Lumistox ili procijenjena nakon provedbe testa pomoću bakterije *Vibrio fischeri*.

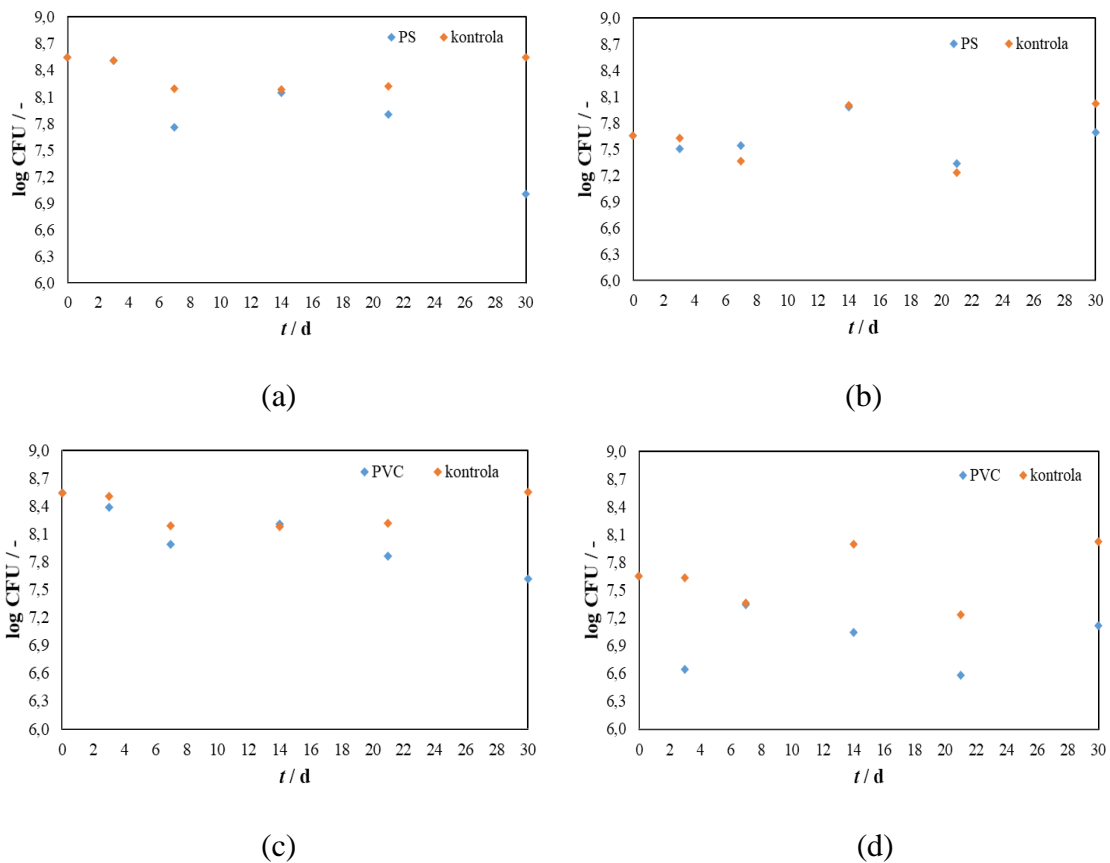
3.3.4.8. Određivanje značajnih čimbenika za proces biorazgradnje MP-a primjenom bakterija *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*

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

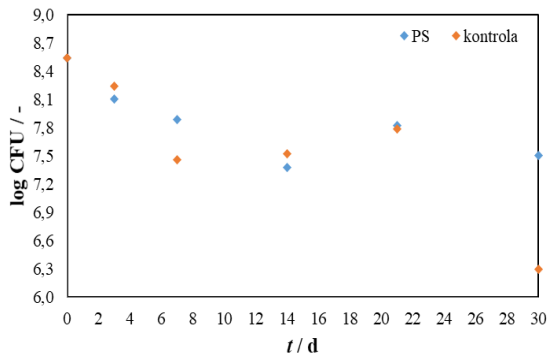
4. REZULTATI

4.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom pokusa biorazgradnje mikroplastike PS i PVC bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*

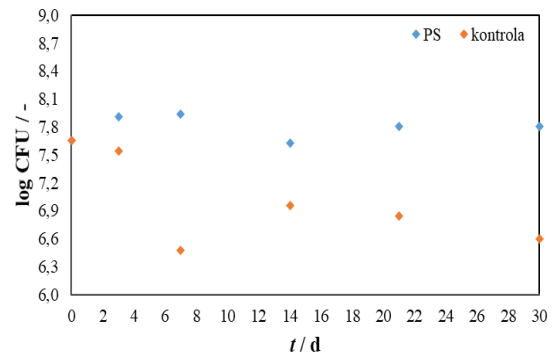
Promjena CFU vrijednosti od 0. do 30. dana pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a mikroplastike prikazana je na slikama 4.1.-4.4 za bakterijsku kulturu *Pseudomonas alcaligenes* te 4.5.-4.8. za *Bacillus subtilis*. Svaka se slika međusobno razlikuje po kombinaciji minimalne i maksimalne vrijednosti dvaju čimbenika – temperature i broju okretaja po minuti, kao što je prethodno prikazano u tablici 3.2. Postupak određivanja ukupnog broja bakterijskih stanica detaljno je opisan u poglavlju 3.3.4.2. ovoga rada.



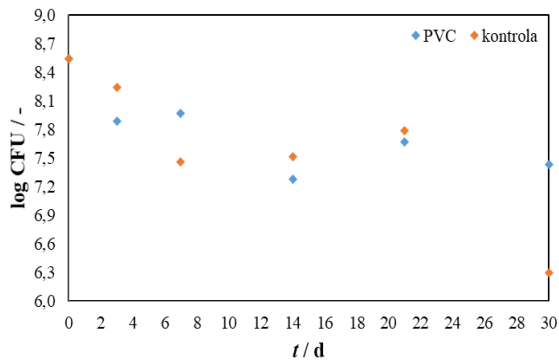
Slika 4.1. Promjena vrijednosti CFU tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* za pokuse: (a) P1-1, (b) P1-2, (c) P1-9, (d) P1-10 ($T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$).



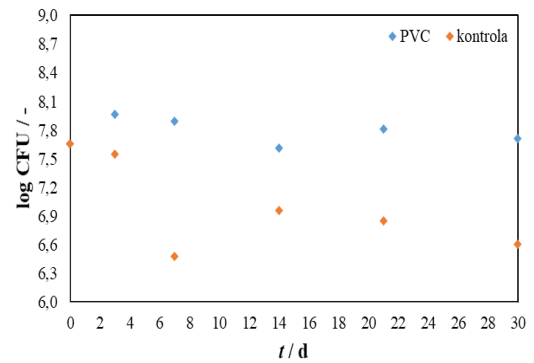
(a)



(b)

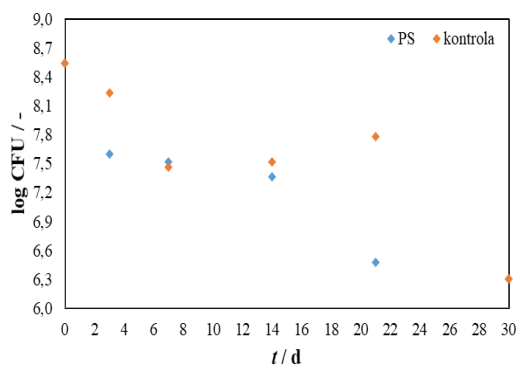


(c)

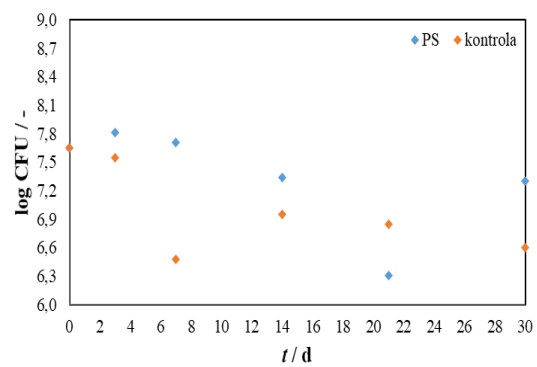


(d)

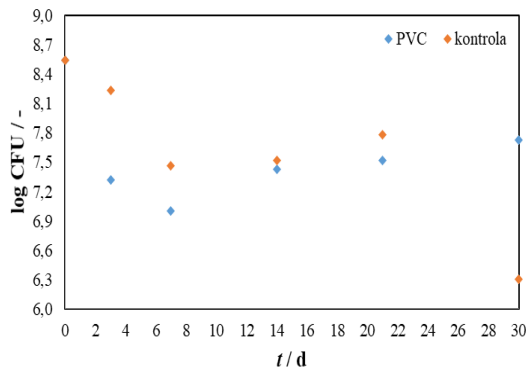
Slika 4.2. Promjena vrijednosti CFU tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* za pokuse: (a) P1-4, (b) P1-3, (c) P1-12, (d) P1-11 ($T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$).



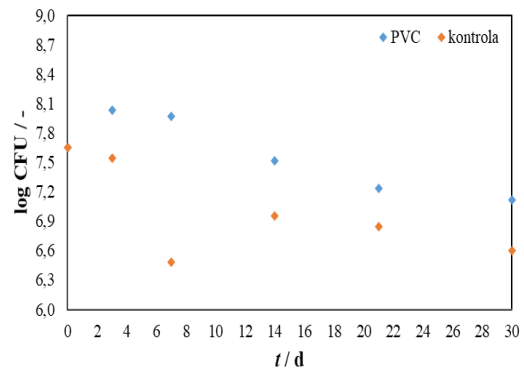
(a)



(b)

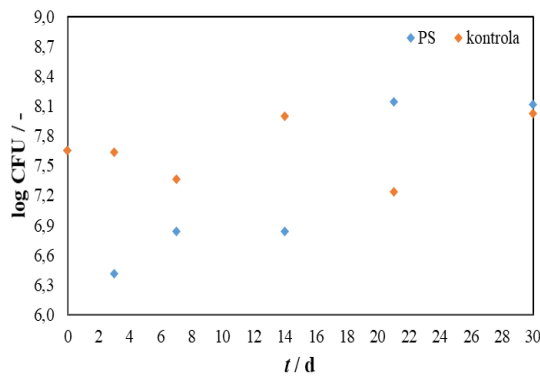


(c)

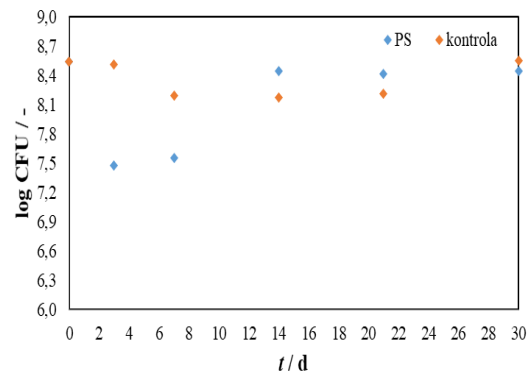


(d)

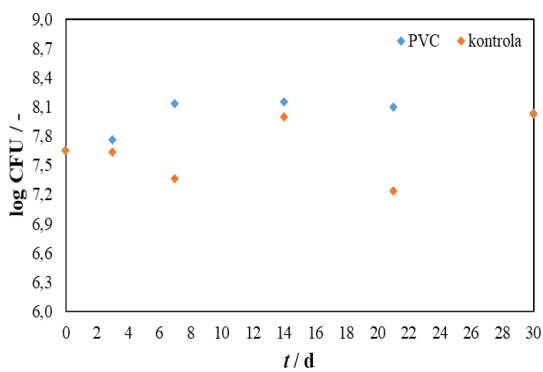
Slika 4.3. Promjena vrijednosti CFU tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* za pokuse: (a) P1-5, (b) P1-6, (c) P1-13, (d) P1-14 pri ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).



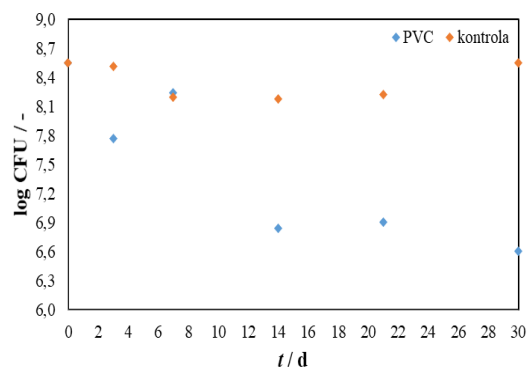
(a)



(b)

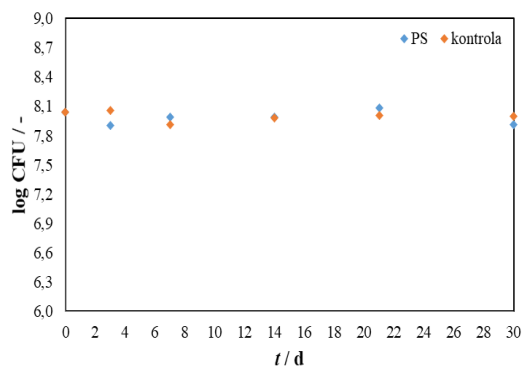


(c)

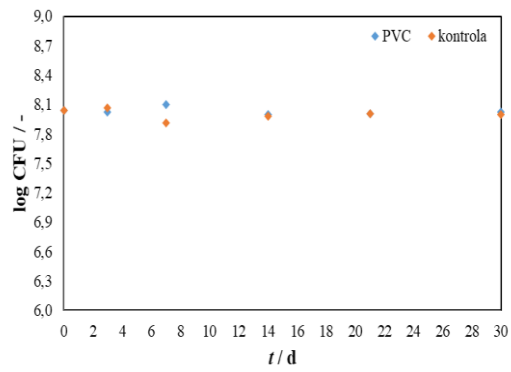


(d)

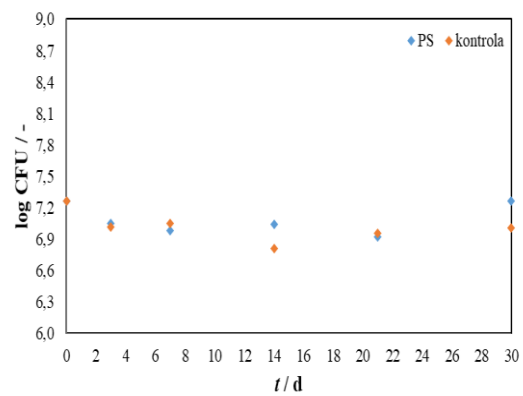
Slika 4.4. Promjena vrijednosti CFU tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* za pokuse: (a) P1-7, (b) P1-8, (c) P1-15, (d) P1-16 ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).



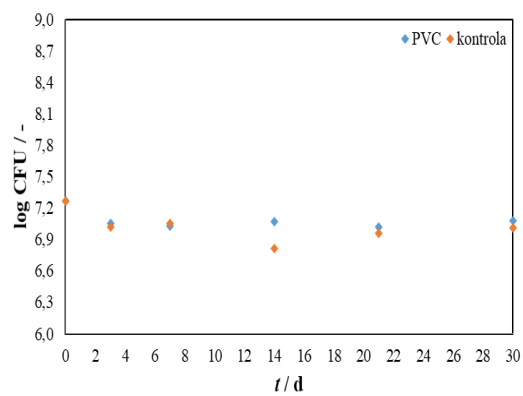
(a)



(b)

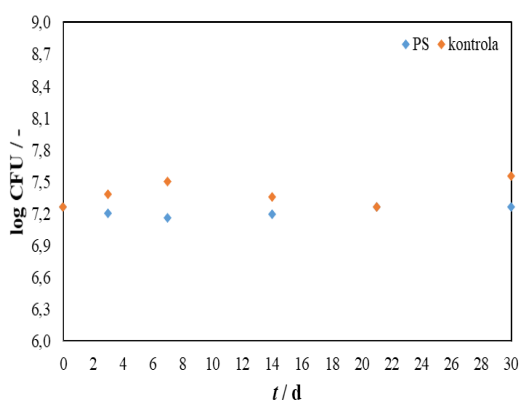


(c)

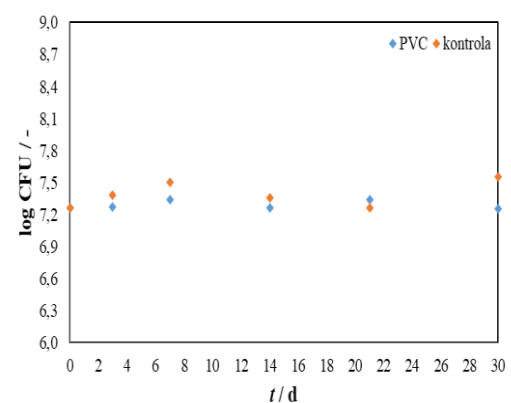


(d)

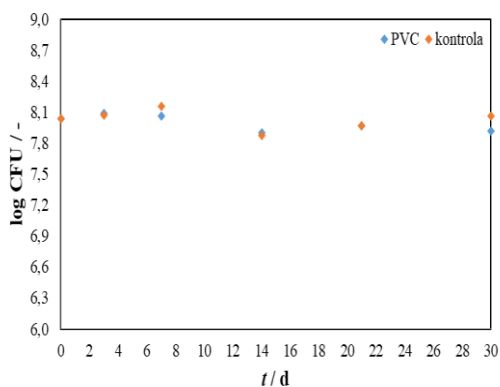
Slika 4.5. Promjena vrijednosti CFU tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* za pokuse: (a) P2-1, (b) P2-9, (c) P2-2, (d) P2-10 ($T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$).



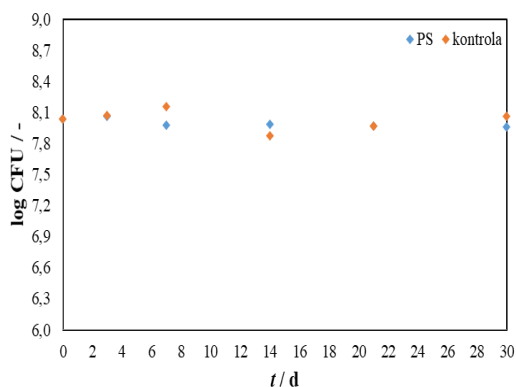
(a)



(b)

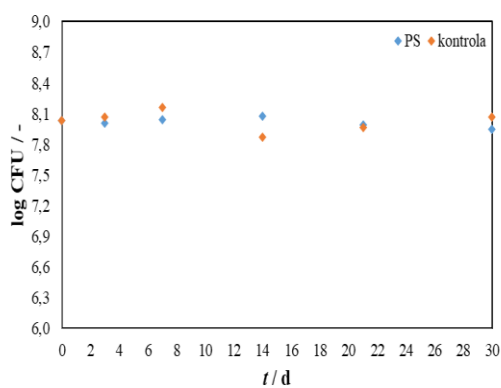


(c)

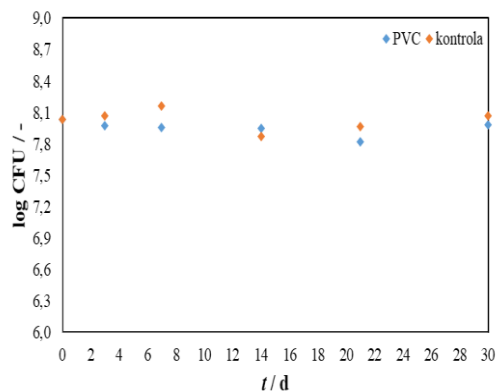


(d)

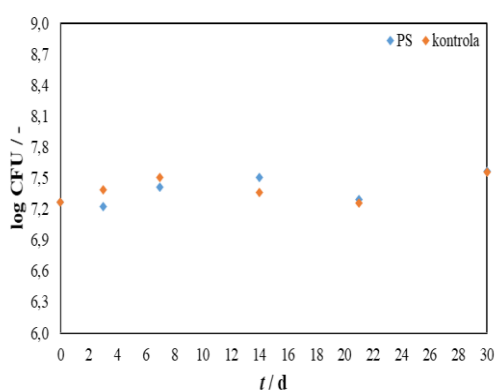
Slika 4.6. Promjena vrijednosti CFU tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* za pokuse: (a) P2-3, (b) P2-11, (c) P2-12, (d) P2-4 ($T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$).



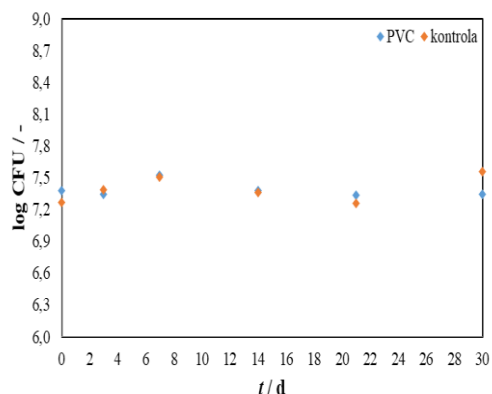
(a)



(b)

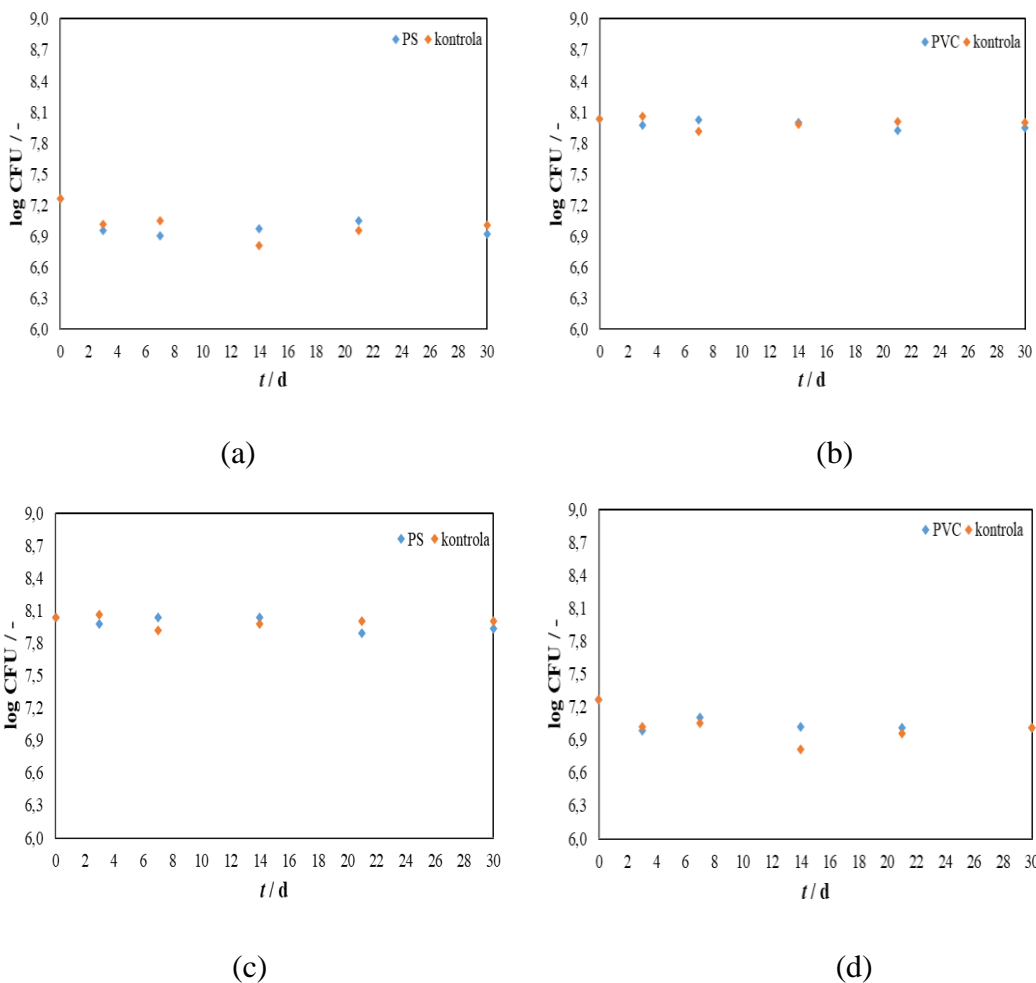


(c)



(d)

Slika 4.7. Promjena vrijednosti CFU tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* za pokuse: (a) P2-5, (b) P2-13, (c) P2-6, (d) P2-14 ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).



Slika 4.8. Promjena vrijednosti CFU tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* za pokuse: (a) P2-7, (b) P2-16, (c) P2-8, (d) P2-15 ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.2. Određivanje koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom biorazgradnje mikroplastike PS i PVC bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*

U tablicama 4.1.-4.3. prikazane su koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom biorazgradnje mikroplastike PS i PVC za bakterijsku kulturu *Pseudomonas alcaligenes*, a u tablicama 4.4.-4.6. prikazane su navedene vrijednosti za bakterijsku kulturu *Bacillus subtilis*. Vrijednosti koncentracija praćene su tokom 30 dana te izražene u mg/L. Postupak provođenja TOC analize detaljno je opisan u poglavlju 3.3.4.3. ovoga rada.

Tablica 4.1. Koncentracije TC-a tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* (pokus P1) za uvjete: (a) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (b) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min, (c) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (d) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min.

(a)	PS		PVC		
t / d	P1-2	P1-7	P1-10	P1-15	SP
0	4,89	4,89	4,89	4,89	4,89
3	3,80	5,25	3,80	5,03	5,16
7	3,55	5,55	3,29	3,10	5,90
14	6,50	5,22	5,15	3,95	3,85
21	5,68	5,16	5,25	5,13	6,24
30	2,07	2,13	5,20	2,11	6,02

(b)	PS		PVC		
t / d	P1-4	P1-5	P1-12	P1-13	SP
0	5,21	5,21	5,21	5,21	5,21
3	4,87	4,33	5,15	4,43	5,43
7	5,54	4,50	5,65	3,90	6,78
14	5,65	5,75	5,25	5,70	6,35
21	6,49	5,85	5,42	5,00	5,05
30	5,99	4,20	4,80	4,68	4,35

(c)	PS		PVC		
t / d	P1-3	P1-6	P1-11	P1-14	SP
0	4,89	4,89	4,89	4,89	4,89
3	4,70	4,37	6,00	4,49	6,51
7	5,85	5,35	5,50	5,72	5,90
14	6,10	4,45	5,05	6,80	3,85
21	5,79	3,68	6,50	5,44	4,24
30	5,45	3,60	4,60	4,20	4,02

(d)	PS		PVC		
t / d	P1-1	P1-8	P1-9	P1-16	SP
0	5,21	5,21	5,21	5,21	5,21
3	5,24	5,34	4,12	5,68	5,18
7	4,60	4,60	5,39	4,15	6,37
14	6,15	5,24	5,55	4,80	6,91
21	5,30	5,05	4,04	5,84	5,01
30	4,52	5,57	4,16	5,05	4,27

Tablica 4.2. Koncentracije TOC-a tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* (pokus P1) za uvjete: (a) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (b) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min, (c) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (d) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min.

(a)	PS		PVC		
t / d	P1-2	P1-7	P1-10	P1-15	SP
0	4,17	4,17	4,17	4,17	4,17
3	2,90	4,99	3,15	4,08	4,89
7	3,40	4,52	3,08	2,99	4,55
14	5,10	4,35	5,10	3,62	3,75
21	5,19	5,12	5,18	4,79	6,21
30	1,94	1,38	5,07	1,97	5,27

(b)	PS		PVC		
t / d	P1-4	P1-5	P1-12	P1-13	SP
0	5,10	5,10	5,10	5,10	5,10
3	4,79	3,89	5,06	4,42	5,36
7	5,25	3,87	5,40	3,90	6,60
14	5,20	4,47	5,21	5,58	6,29
21	6,16	5,70	5,35	4,85	4,51
30	5,87	4,02	4,50	4,40	4,18

(c)	PS		PVC		
t / d	P1-3	P1-6	P1-11	P1-14	SP
0	4,17	4,17	4,17	4,17	4,17
3	4,63	4,26	5,10	4,29	6,16
7	5,50	3,60	5,25	4,92	5,55
14	6,05	4,25	5,71	6,66	3,75
21	5,24	3,19	6,24	5,34	4,21
30	5,20	3,45	4,40	4,18	3,97

(d)	PS		PVC		
t / d	P1-1	P1-8	P1-9	P1-16	SP
0	5,10	5,10	5,10	5,10	5,10
3	5,21	4,95	4,07	5,50	5,12
7	4,23	4,45	4,99	4,02	6,26
14	6,13	5,15	5,26	4,35	6,29
21	4,95	4,87	4,01	5,65	4,51
30	4,51	5,50	3,89	4,83	4,18

Tablica 4.3. Koncentracije ukupnog IC-a tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* (pokus P1) za uvjete: (a) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (b) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min, (c) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (d) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min.

(a)	PS		PVC		
t / d	P1-2	P1-7	P1-10	P1-15	SP
0	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72
3	0,90	0,26	0,65	0,95	0,27
7	0,15	1,03	0,21	0,11	1,35
14	1,40	0,87	0,05	0,33	0,10
21	0,49	0,04	0,07	0,34	0,03
30	0,13	0,75	0,13	0,14	0,75

(b)	PS		PVC		
t / d	P1-4	P1-5	P1-12	P1-13	SP
0	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
3	0,08	0,44	0,09	0,01	0,07
7	0,29	0,63	0,25	0,00	0,18
14	0,45	1,28	0,04	0,12	0,06
21	0,33	0,15	0,07	0,15	0,54
30	0,12	0,18	0,30	0,28	0,17

(c)	PS		PVC		
t / d	P1-3	P1-6	P1-11	P1-14	SP
0	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72
3	0,07	0,11	0,90	0,20	0,35
7	0,35	1,75	0,25	0,80	0,35
14	0,05	0,20	-0,66	0,14	0,10
21	0,55	0,49	0,26	0,10	0,03
30	0,25	0,15	0,20	0,02	0,05

(d)	PS		PVC		
t / d	P1-1	P1-8	P1-9	P1-16	SP
0	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
3	0,03	0,39	0,05	0,18	0,06
7	0,37	0,15	0,40	0,13	0,11
14	0,02	0,09	0,29	0,45	0,62
21	0,35	0,18	0,03	0,19	0,50
30	0,01	0,07	0,27	0,22	0,09

Tablica 4.4. Koncentracije TC tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* (pokus P2) za uvjete: (a) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (b) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min, (c) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (d) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min.

(a)	PS		PVC		
t/d	P2-2	P2-7	P2-10	P2-15	SP
0	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
3	7,82	10,51	9,18	9,32	9,85
7	8,85	6,71	8,16	6,10	9,14
14	6,70	6,85	5,61	7,29	8,15
21	6,61	7,94	6,60	7,41	6,24
30	6,59	6,50	5,38	5,99	6,13

(b)	PS		PVC		
t/d	P2-4	P2-5	P2-12	P2-13	SP
0	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86
3	8,21	8,12	7,36	9,55	8,36
7	8,48	7,45	8,85	7,67	10,03
14	6,80	5,10	6,92	5,87	7,68
21	6,06	6,24	6,05	5,99	5,85
30	6,12	5,82	4,37	6,16	6,38

(c)	PS		PVC		
t/d	P2-3	P2-6	P2-11	P2-14	SP
0	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
3	8,52	7,82	8,19	10,29	7,95
7	7,38	6,38	8,30	10,16	7,21
14	7,46	5,43	6,66	6,10	6,08
21	5,85	6,28	6,79	5,86	6,49
30	6,20	7,59	5,93	6,25	5,70

(d)	PS		PVC		
t/d	P2-1	P2-8	P2-9	P2-16	SP
0	5,86	5,86	5,86	5,86	5,86
3	5,82	6,17	7,75	8,19	8,00
7	10,01	6,23	8,91	6,32	6,15
14	8,35	6,71	5,26	6,03	6,55
21	7,23	8,47	7,12	5,03	9,04
30	6,09	6,51	8,15	5,89	5,97

Tablica 4.5. Koncentracije TOC-a tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* (pokus P2) za uvjete: (a) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (b) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min, (c) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (d) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min.

(a)	PS		PVC		
t / d	P2-2	P2-7	P2-10	P2-15	SP
0	4,19	4,19	4,19	4,19	4,19
3	7,55	9,27	8,22	7,75	9,80
7	8,56	6,70	7,94	5,93	9,08
14	5,71	4,78	4,34	6,43	6,24
21	5,62	6,62	5,48	6,68	6,15
30	5,30	5,03	4,83	4,65	5,36

(b)	PS		PVC		
t / d	P2-4	P2-5	P2-12	P2-13	SP
0	5,53	5,53	5,53	5,53	5,53
3	6,07	7,76	6,21	9,00	7,46
7	8,09	5,41	8,71	7,47	9,68
14	6,37	4,73	5,98	4,96	6,83
21	4,81	4,95	4,77	5,92	5,53
30	4,55	5,60	6,81	4,72	6,20

(c)	PS		PVC		
t / d	P2-3	P2-6	P2-11	P2-14	SP
0	4,19	4,19	4,19	4,19	4,19
3	8,07	7,11	5,46	9,79	4,75
7	6,77	5,62	7,12	5,58	4,75
14	6,27	5,25	5,70	5,46	5,27
21	4,29	5,20	4,21	5,54	5,15
30	5,12	4,32	5,77	4,61	4,45

(d)	PS		PVC		
t / d	P2-1	P2-8	P2-9	P2-16	SP
0	5,53	5,53	5,53	5,53	5,53
3	4,42	5,50	6,34	5,46	7,51
7	7,91	5,09	7,11	5,27	5,89
14	5,65	6,20	5,15	5,90	5,31
21	4,79	6,24	6,35	4,52	7,44
30	5,05	4,60	6,53	4,70	4,73

Tablica 4.6. Koncentracije anorganskog ugljika tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* (pokus P2) za uvjete: (a) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (b) $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min, (c) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 100 o/min, (d) $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 200 o/min.

(a)	PS		PVC		
t/d	P2-2	P2-7	P2-10	P2-15	SP
0	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
3	0,27	1,24	0,96	1,57	0,05
7	0,29	0,01	0,22	0,17	0,06
14	0,99	2,07	1,27	0,86	1,91
21	0,99	1,32	1,12	0,73	0,09
30	1,29	1,47	0,55	1,34	0,77

(b)	PS		PVC		
t/d	P2-4	P2-5	P2-12	P2-13	SP
0	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
3	2,14	0,36	1,15	0,55	0,90
7	0,39	2,04	0,14	0,20	0,35
14	0,43	0,37	0,94	0,91	0,85
21	1,25	1,29	1,28	0,07	0,32
30	1,57	0,22	2,44	1,44	0,18

(c)	PS		PVC		
t/d	P2-3	P2-6	P2-11	P2-14	SP
0	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
3	0,45	0,71	2,73	0,50	3,20
7	0,61	0,76	1,18	4,58	2,46
14	1,19	0,18	0,96	0,64	0,81
21	1,56	1,08	2,58	0,32	1,34
30	1,08	3,27	0,16	1,64	1,25

(d)	PS		PVC		
t/d	P2-1	P2-8	P2-9	P2-16	SP
0	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
3	1,40	0,67	1,41	2,73	0,49
7	2,10	1,14	1,80	1,05	0,26
14	2,70	0,51	0,11	0,13	1,24
21	2,44	2,23	0,77	0,51	1,60
30	1,04	1,91	1,62	1,19	1,24

4.3. Praćenje koncentracije aniona i kationa tijekom procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a metodom ionske kromatografije

Anioni i kationi nastaju kao produkti biorazgradnje MP-a, a također se nalaze unutar mineralnog medija na kojem su se nalazile bakterijske kulture, a čiji je sastav naveden u tablici 3.1. u poglavlju 3.1.2.3. ovoga rada. Postupak provođenja ionske kromatografije detaljnije je opisan u poglavlju 3.3.4.4. U tablicama 4.7. i 4.8. prikazane su koncentracije aniona i kationa nastalih u najvećim količinama tijekom procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a metodom ionske kromatografije bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*.

Tablica 4.7. Koncentracije aniona (Cl⁻) i kationa (K⁺) tijekom procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes*.

t / d	PS				PVC				SP	
	P1-2		P1-7		P1-10		P1-15		Cl ⁻ / mg/L	K ⁺ / mg/L
0	1,619	136,167	1,619	136,167	1,619	136,167	1,619	136,167	1,619	136,167
3	3,794	206,198	11,151	443,178	1,038	451,165	10,276	466,264	0,608	355,370
7	28,759	31,388	0,383	8,106	1,694	227,490	1,134	22,483	n.a.	6,932
14	0,622	399,723	0,608	0,969	14,268	10,067	1,971	23,237	191,800	0,291
21	1,898	13,136	1,878	15,002	0,703	15,594	1,375	317,801	1,444	309,439
30	1,236	5,419	0,116	3,971	0,242	3,562	0,285	2,634	1,208	3,383

t / d	PS				PVC				SP	
	P1-4		P1-5		P1-12		P1-13		Cl ⁻ / mg/L	K ⁺ / mg/L
0	2,094	115,962	2,094	115,962	2,094	115,962	2,094	115,962	2,094	115,962
3	12,876	420,481	2,911	537,615	9,879	279,337	0,781	543,027	18,078	440,914
7	16,559	440,424	2,633	68,727	6,344	275,359	0,125	4,688	18,173	383,161
14	0,672	0,792	0,589	393,994	6,493	81,277	1,242	25,434	0,469	17,628
21	n.a.	243,322	n.a.	275,719	0,328	371,859	0,681	148,386	0,309	11,628
30	4,586	294,908	0,693	393,666	1,044	9,958	22,567	368,646	1,171	10,903

t / d	PS				PVC				SP	
	P1-3		P1-6		P1-11		P1-14		Cl ⁻ / mg/L	K ⁺ / mg/L
0	1,619	136,167	1,619	136,167	1,619	136,167	1,619	136,167	1,619	136,167
3	6,505	319,358	1,465	25,981	0,713	724,796	0,992	17,788	1,417	282,757
7	7,443	642,206	0,098	n.a.	20,952	467,237	n.a.	1,954	n.a.	2,625
14	n.a.	2,161	16,766	678,842	0,287	41,010	13,845	16,345	2,821	19,916
21	1,026	343,474	1,399	377,986	1,143	451,936	1,625	394,595	0,536	16,126
30	0,052	3,582	0,066	5,053	0,318	1,886	1,462	4,176	3,061	242,251

t / d	PS				PVC				SP	
	P1-1		P1-8		P1-9		P1-16		Cl ⁻ / mg/L	K ⁺ / mg/L
0	2,094	115,962	2,094	115,962	2,094	115,962	2,094	115,962	2,094	115,962
3	3,290	104,905	5,151	420,758	n.a.	426,337	21,548	291,411	10,595	456,279
7	22,017	363,336	n.a.	0,915	1,821	566,256	0,705	21,435	1,188	19,167
14	1,087	283,038	4,514	34,639	213,913	288,912	0,055	3,378	1,338	4,282
21	7,169	n.a.	0,530	13,662	0,612	17,546	0,485	62,615	n.a.	320,337
30	1,538	271,306	1,357	12,871	1,497	365,500	n.a.	1,159	136,178	215,183

SP = slijepa proba

Tablica 4.8. Koncentracije aniona (PO_4^{3-}) i kationa (K^+) tijekom procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis*.

t / d	PS				PVC				SP	
	P2-2		P2-7		P2-10		P2-15			
	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$
0	29,967	7,813	29,967	7,813	29,967	7,813	29,967	7,813	29,967	7,813
3	22,766	4,985	12,847	3,526	22,384	5,321	18,361	4,653	15,250	4,120
7	n.a.	n.a.	n.a.	4,549	n.a.	3,674	n.a.	3,354	n.a.	2,364
14	19,640	5,699	13,623	7,122	18,985	4,987	n.a.	5,822	272,977	242,251
21	22,821	4,758	11,352	4,913	21,175	4,754	21,153	4,340	16,049	2,922
30	15,328	3,222	8,371	2,694	16,819	6,709	13,633	2,582	11,222	2,840

t / d	PS				PVC				SP	
	P2-4		P2-5		P2-12		P2-13			
	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$
0	19,845	6,585	19,845	6,585	19,845	6,585	19,845	6,585	19,845	6,585
3	13,059	4,958	19,653	6,214	n.a.	n.a.	20,511	5,212	n.a.	2,277
7	n.a.	4,176	20,094	5,163	n.a.	4,282	24,521	4,572	n.a.	4,809
14	n.a.	5,419	23,537	12,631	n.a.	5,053	n.a.	3,821	n.a.	3,743
21	19,291	3,259	4,185	2,247	15,246	3,684	11,642	3,508	20,944	3,259
30	17,220	4,510	n.a.	4,612	18,150	10,242	15,581	3,732	17,718	2,324

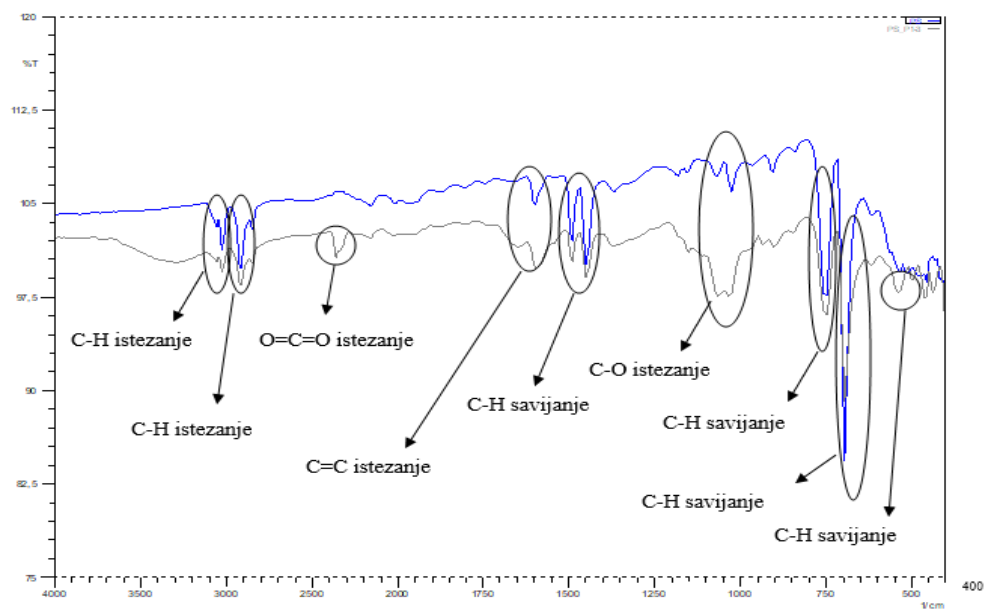
t / d	PS				PVC				SP	
	P2-3		P2-6		P2-11		P2-14			
	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$
0	29,967	7,813	29,967	7,813	29,967	7,813	29,967	7,813	29,967	7,813
3	9,655	4,360	18,208	4,626	15,179	3,307	17,331	5,413	15,250	4,120
7	n.a.	3,479	n.a.	1,620	n.a.	2,655	6,765	2,317	n.a.	2,364
14	n.a.	2,809	n.a.	1,049	n.a.	2,634	n.a.	1,588	272,977	242,251
21	n.a.	1,815	6,606	2,006	12,122	1,852	16,488	3,291	16,049	2,922
30	n.a.	3,242	10,199	2,682	10,070	2,546	n.a.	2,979	11,222	2,840

t / d	PS				PVC				SP	
	P2-1		P2-8		P2-9		P2-16			
	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{K}^+) / \text{mg/L}$
0	20,365	2,598	20,365	2,598	20,365	2,598	20,365	2,598	20,365	2,598
3	14,755	2,450	10,146	4,019	17,161	5,626	4,969	2,856	11,493	5,843
7	n.a.	1,886	n.a.	3,971	n.a.	3,301	n.a.	3,582	n.a.	3,378
14	6,981	2,136	n.a.	3,562	15,697	4,798	n.a.	2,049	n.a.	3,773
21	n.a.	3,105	5,135	2,651	4,438	2,132	10,066	4,584	4,429	2,167
30	8,160	1,817	n.a.	1,634	12,243	2,122	9,677	1,675	n.a.	2,570

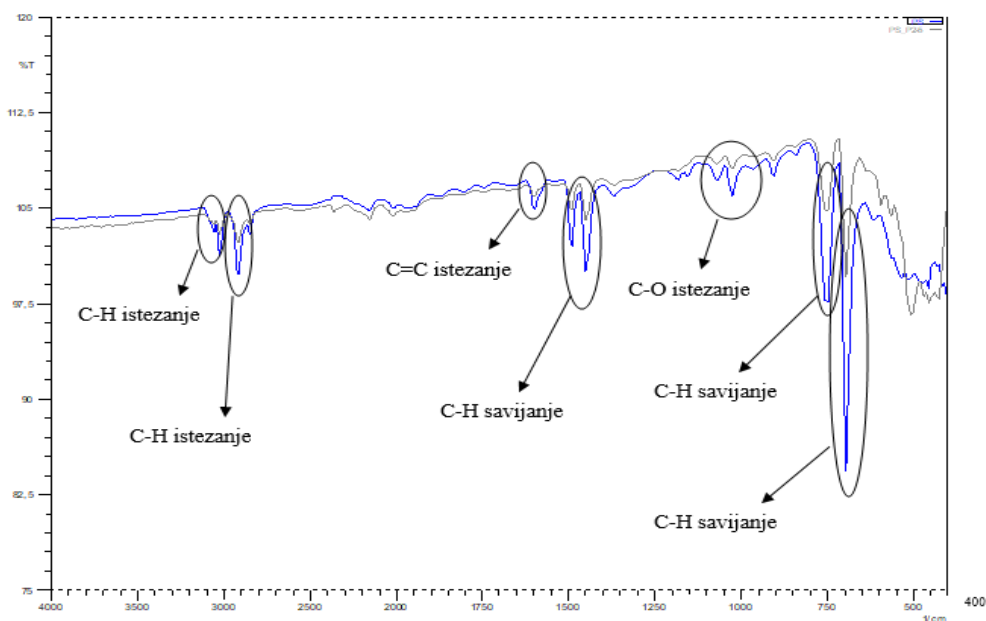
SP = slijepa proba

4.4. FTIR-ATR spektroskopija čestica MP-a prije i nakon procesa biorazgradnje bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*

U ovom su poglavlju, na slikama 4.9. i 4.10., prikazani FTIR spektri PS-a (slika 4.9.) i PVC-a (slika 4.10.) snimljenih prije biorazgradnje te nakon biorazgradnje s bakterijskim kulturama (a) *Pseudomonas alcaligenes* i (b) *Bacillus subtilis*. Postupak provođenja FTIR analize opisan je u poglavlju 3.3.4.6. ovoga rada.

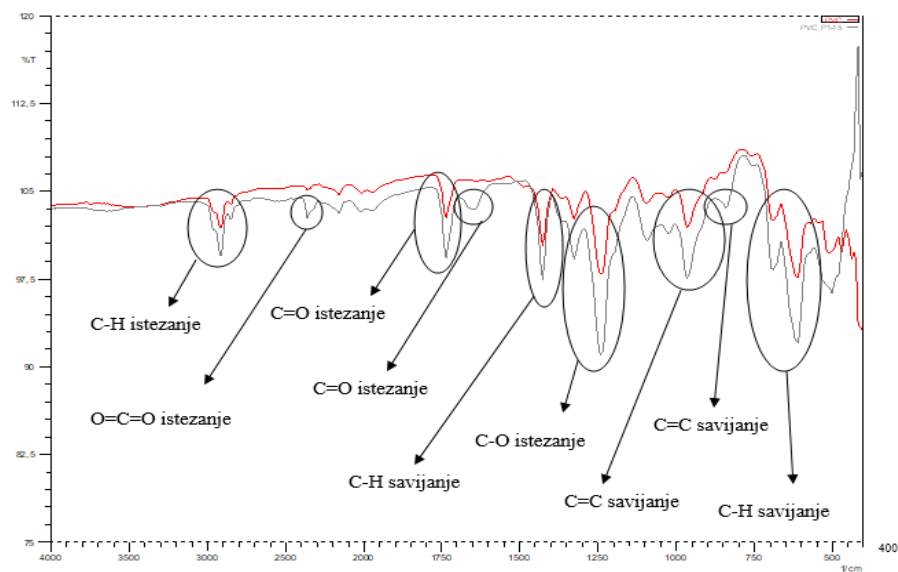


(a)

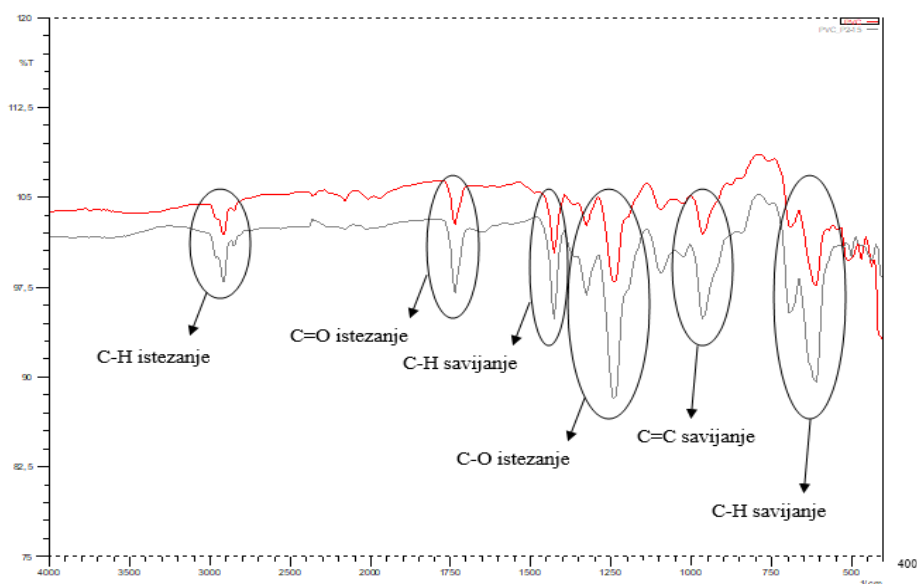


(b)

Slika 4.9. Usporedba FTIR spektra PS-a snimljenog prije biorazgradnje te nakon biorazgradnje s bakterijskom kulturom (a) *Pseudomonas alcaligenes* i (b) *Bacillus subtilis*.



(a)

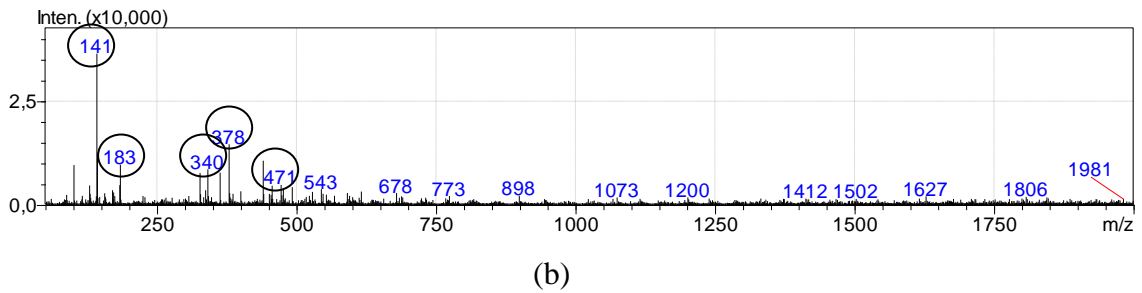
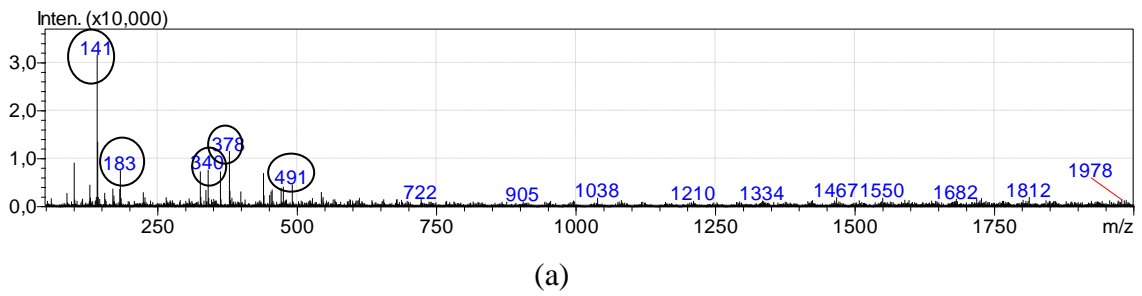


(b)

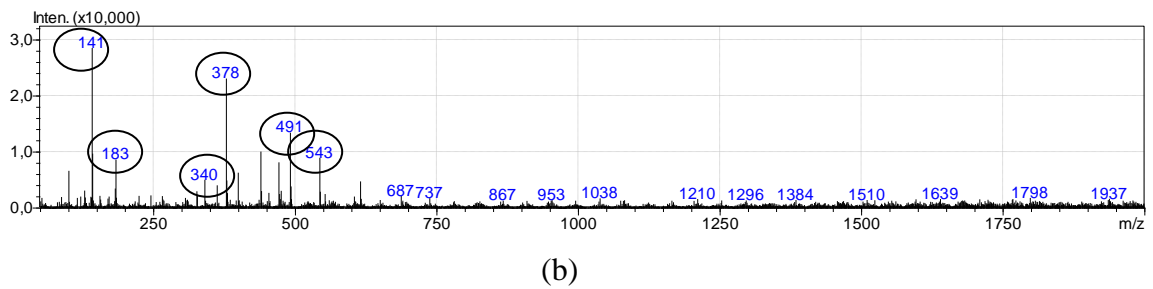
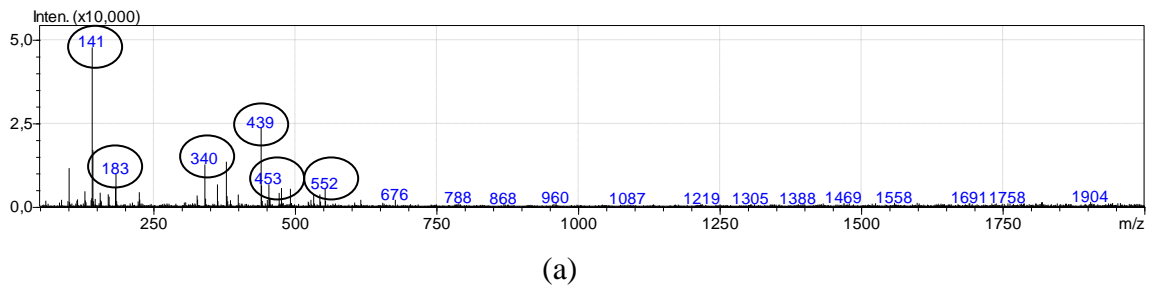
Slika 4.10. Usporedba FTIR spektra PVC snimljenog prije biorazgradnje te nakon biorazgradnje s bakterijskom kulturom (a) *Pseudomonas alcaligenes* i (b) *Bacillus subtilis*.

4.5. Praćenje produkata biorazgradnje mikroplastike PS i PVC tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC analiza)

Postupak provođenja HPLC analize detaljno je opisan u poglavlju 3.3.4.5. Na slikama 4.11. i 4.12. prikazani su dobiveni maseni spektri uzoraka: P1-2 za 21. dan pokusa (slika 4.11. (a)) i P1-10 za 21. dan pokusa (slika 4.11. (b)) za pokus s bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* te P2-6 za 30. dan pokusa (slika 4.12. (a)) i P2-15 za 30. dan (slika 4.12. (b)) pokusa s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis*.



Slika 4.11. Maseni spektrometri biorazgradnje PS (a) i PVC (b) s bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* za: (a) P1-2 i (b) P1-10.



Slika 4.12. Maseni spektrometri biorazgradnje PS (a) i PVC (b) s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* za: (a) P2-6 i (b) P2-15.

4.6. Praćenje toksičnosti filtrata prilikom biorazgradnje mikroplastike PS i PVC pomoću bakterijske kulture *Vibrio fischeri*

Dobiveni rezultati EC₂₀ i EC₅₀, kao i vrijednost TU pomoću kojih se pratila toksičnost filtrata prilikom biorazgradnje mikroplastike PS-a i PVC-a pomoću bakterijske kulture *Vibrio fischeri* prikazani su u tablicama 4.9. i 4.10. Postupak određivanja toksičnosti filtrata opisan je u poglavlju 3.1.7. ovoga rada za obje korištene bakterijske kulture.

Tablica 4.9. Podaci o toksičnosti nakon provedbe pokusa biorazgradnje mikroplastike PS-a i PVC-a bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes*.

	EC ₂₀ [%]	EC ₅₀ [%]	TU
P1-1	76,92	/	/
P1-2	55,49	73,43	1,36
P1-9	48,76	/	/
P1-10	30,92	40,01	2,50
P1-4	13,79	63,13	1,58
P1-3	90,91	/	/
P1-12	14,85	35,06	2,85
P1-11	/	20,68	4,84
P1-5	7,48	26,32	3,80
P1-6	7,53	68,75	1,45
P1-13	26,29	52,11	1,92
P1-14	80,13	/	/
P1-7	30,01	43,62	2,29
P1-8	6,28	90,00	1,11
P1-15	35,60	20,19	4,95
P1-16	/	80,00	1,25

Tablica 4.10. Podaci o toksičnosti nakon provedbe pokusa biorazgradnje mikroplastike PS i PVC bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis*.

	EC ₂₀ [%]	EC ₅₀ [%]	TU
P2-1	7,28	10,74	9,31
P2-9	19,85	/	/
P2-2	16,46	42,16	2,37
P2-10	/	35,90	2,78
P2-3	/	/	/
P2-11	56,87	/	/
P2-12	12,40	41,61	2,40
P2-4	10,13	32,72	3,06
P2-5	36,35	/	/
P2-13	83,33	/	0,40
P2-6	83,33	/	/
P2-14	47,95	100,00	1,00
P2-7	9,84	27,14	3,68
P2-16	33,62	/	/
P2-8	27,91	/	/
P2-15	/	39,99	2,50

4.7. Rezultati ANOVA analize u računalnom programu Design Expert prema Taguchi dizajnu

U tablici 4.11. navedeni su značajni čimbenici dobiveni ANOVA analizom varijance s pripadajućim vrijednostima doprinosa za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*. U tablici 4.12. navedene su eksperimentalne vrijednosti parametara ANOVA analize za navedene pokuse. Postupak određivanja značajnih čimbenika za proces biorazgradnje MP-a primjenom bakterija *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis* opisan je u poglavlju 3.3.4.8. ovoga rada.

Tablica 4.11. Značajni čimbenici dobiveni ANOVA analizom s pripadajućim vrijednostima doprinosa za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*.

Pokus	Značajni čimbenici	Doprinos [%]
P1 - PS	Broj okretaja / o/min	51,18
P1 - PVC	Veličina čestica mikroplastike / μm	68,61
P2 - PS	pH-vrijednost / -	3,80
	Veličina čestica mikroplastike / μm	5,20
	Broj okretaja / o/min	4,06
	OG / -	81,41
	γ_{GLU} / mg/L	5,51
P2 - PVC	pH-vrijednost / -	3,13
	OG / -	94,21
	γ_{GLU} / mg/L	1,80

Tablica 4.12. Eksperimentalne vrijednosti parametara ANOVA analize za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*.

Pokus	Standardna devijacija	C.V. / %	R^2	Prilagođeni R^2	Predviđeni R^2
P1 - PS	0,50	6,71	0,5118	0,4304	0,1321
P1 - PVC	0,28	3,73	0,6861	0,6338	0,4419
P2 - PS	0,011	0,14	0,9998	0,9993	0,9969
P2 - PVC	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00

5. RASPRAVA

5.1. Praćenje broja živih stanica po mililitru (CFU vrijednosti) tijekom biorazgradnje mikroplastike PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*

Tijekom provedbe pokusa biorazgradnje primjenom dviju bakterijskih kultura – *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis* praćena je promjena broja živih bakterijskih stanica po mililitru (CFU vrijednost). Biorazgradnja PS-a i PVC-a mikroplastike bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* prikazana je na slikama 4.1.-4.4. CFU vrijednosti za pokus biorazgradnje bakterijom *Pseudomonas alcaligenes* (P1) praćene su za 0., 3., 7., 14., 21. i 30. dan pokusa te se njihova vrijednost uspoređivala s kontrolnim uzorkom u kojem su jednaki početni uvjeti. Kao što je vidljivo na slici 4.1., 3. i 7. dan pokusa dolazi do pada logaritamskih CFU vrijednosti s obzirom na početni dan pokusa u sva 4 prikazana uzorka. Relativno najveće povećanje CFU vrijednosti zabilježeno je na 14. dan pokusa, što znači da je biorazgradnja mikroplastike tada bila najintenzivnija, odnosno dolazi do ekspanzionalne faze rasta bakterijske kulture. Nakon 14. dana uočljiv je pad CFU vrijednosti za sva 4 uzorka prikazana na slici 4.1. Zadnji dan pokusa CFU vrijednost ponovno raste za uzorke P1-2 i P1-10, što se može pripisati manjoj veličini čestica mikroplastike prisutnih u navedenim uzorcima čime je omogućena lakša biorazgradnja. [66]

Na slici 4.2. koja se odnosi na drugi niz uzoraka za koje se pratila CFU vrijednost, vidljivo je da su najveće CFU vrijednosti nakon 0. dana pokusa obilježene 3. i 7. dana pokusa, nakon čega dolazi do blagog pada CFU vrijednosti u 14. danu pokusa za obje vrste ispitivane mikroplastike. Nakon toga, 21. dana pokusa dolazi do ponovnog rasta CFU vrijednosti što se može pripisati ekspanzionalnoj fazi te slijedi blagi pad CFU vrijednosti na zadnji dan pokusa za sva 4 ispitivana uzorka (P1-4, P1-3, P1-12, P1-11). Primjećene su više CFU vrijednosti u pokusu P1-3 usporedno sa P1-4, odnosno P1-11 usporedno s pokusom P1-12, što začinuje s obzirom na veću veličinu i manju koncentraciju čestica mikroplastike u uzorcima P1-3 i P1-11.

Pokusi u kojima se pratila biorazgradnja pri temperaturi od 25°C i pri 100 okretaja prikazani su na slici 4.3. Najveće CFU vrijednosti za navedene uzorke primijećene su u 3. danu pokusa nakon čega u gotovo sva 4 uzorka slijedi pad CFU vrijednosti od 7. do 30. dana pokusa. Broj bakterijskih stanica po mililitru znatno je manji u uzorcima P1-5 i P1-13 s obzirom na kontrolni uzorak, dok su kod uzoraka P1-6 i P1-14 primijećene povećane vrijednosti CFU s obzirom na kontrolni uzorak, što se može pripisati manjoj veličini čestica mikroplastike te

njihovoj većoj koncentraciji, zbog čega je i specifična površina čestica MP-e veća te biorazgradnja intenzivnija. [66]

Na slici 4.4. prikazana je promjena CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PS i PVC za uzorke P1-7, P1-8, P1-15 i P1-16. Najveći porast bakterijskih stanica vidljiv je u 21. danu pokusa za uzorak P1-7 i u 14. danu za uzorak P1-8, nakon čega dolazi do blagog pada CFU vrijednosti 30. dan pokusa za spomenute uzorke. U uzorku P1-15 nakon 0. dana dolazi do blagog porasta CFU u 3. danu pokusa, a najviše CFU vrijednosti za spomenuti uzorak detektirane su u 14. dan pokusa. U uzorku P1-16 dolazi do pada CFU vrijednosti od 0. do 3. dana, te porasta od 3. do 7. dana pokusa. Od 7. do 14. dana CFU vrijednost naglo opada, s blagim porastom od 14. do 21. dana pokusa. CFU vrijednosti za ovaj uzorak većinski su manje u usporedbi s kontrolnim uzorkom.

S obzirom na sve navedeno, može se zaključiti kako procesu biorazgradnje čestica MP-e PS i PVC više pogoduje temperatura od 25°C u usporedbi sa prva dva seta uzoraka u pokusu s bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* koji su bili izloženi temperaturi od 15°C. Intenzivnija biorazgradnja MP-a bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* pri 25 °C proizlazi iz činjenice da je optimalna temperatura rasta navedene bakterijske kulture približno 28-37 °C. [67] Nadalje, intenzivnija biorazgradnja s obzirom na veću specifičnu površinu čestica MP-e, detektirana je u prisutnosti čestica MP-e manje veličine i više koncentracije, što rezultira većom CFU vrijednošću.

Drugi pokus proveden je s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* koja predstavlja gram pozitivnu bakteriju, a ona je u usporedbi s gram-negativnom bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* pokazala veću otpornost odumiranju bakterijskih stanica zbog deblje stanične stijenke i mogućnosti stvaranja spora. [61] Dokaz veće otpornosti bakterijske kulture *Bacillus subtilis* su primjetno veće CFU vrijednosti u odnosu na pokus P1 prikazane na slikama 4.5.-4.8. Brojnost navedenih bakterijskih stanica u pokusu P2 praćene su 0., 3., 7., 14., 21. i 30. dan pokusa. Na slici 4.5. na kojoj su prikazani uzorci P2-1, P2-9, P2-2 i P2-10 vidljive su slične CFU vrijednosti za ispitane uzorke u usporedbi sa kontrolnim uzorkom. Relativno najviše CFU vrijednosti detektirane su 14. i 30. dan pokusa.

Nadalje, na slici 4.6. prikazan je drugi dio pokusa koji uključuje P2-3, P2-11, P2-12 i P2-4 kod kojih su dobivene CFU vrijednosti također slične vrijednostima odgovarajućih kontrolnih uzoraka. U uzorcima P2-3 i P2-11 vidljiv je blagi pad CFU vrijednosti u odnosu na kontrolni uzorak, što potvrđuje manji intenzitet biorazgradnje u usporedbi s uzorcima P2-12 i P2-4, što se može pripisati većoj veličini i nižoj koncentraciji čestica MP-e u uzorcima P2-3 i P2-11. [66]

Na slici 4.7. prikazane su logaritamske vrijednosti CFU za uzorke P2-5, P2-13, P2-6 i P2-14 koje su, kao i u prethodnim pokusima, slične CFU vrijednostima kontrolnog uzorka, a najintenzivnija biorazgradnja detektirana je 14. i 30. dana pokusa. Posljednji dio pokusa odnosi se na uzorke P2-7, P2-16, P2-8 i P2-15 koji su prikazani na slici 4.8. Manja odstupanja od vrijednosti kontrolnih uzoraka vidljiva su kod uzoraka P2-7 i P2-15 te kod njih biorazgradnja nije toliko intenzivna u usporedbi s druga dva uzorka, s obzirom na veću veličinu čestica MP-e koja usporava njenu biorazgradnju.

Usporedbom intenziteta biorazgradnje s obzirom na vrstu MP-a, pri istim uvjetima za iste bakterijske kulture, primjećena je intenzivnija biorazgradnja čestica PS-e što je povezano za strukturom samog polimera. S obzirom na prisutnost klora u strukturi PVC-a, on je toksičniji za mikroorganizme u usporedbi s PS-om zbog čega je intenzivnija biorazgradnja primjećena kod PS-a za obje bakterijske kulture. [68]

5.2. Određivanje koncentracije TC-a, TOC-a i IC-a tijekom biorazgradnje mikroplastike PS i PVC bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*

U tablicama 4.1.-4.6. prikazane su vrijednosti TC-a, TOC-a i IC-a izražene u mg/L, koje su praćene tijekom 30 dana za pokuse biorazgradnje mikroplastike bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*. U tablici 4.2. prikazane su koncentracije TOC-a tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* (pokus P1). Iz tablice 4.2. može se zaključiti da su najveće TOC koncentracije detektirane tijekom 14. i 21. dana pokusa što upućuje na najintenzivniju biorazgradnju.

U tablici 4.3. prikazane su vrijednosti koncentracija IC-a koje se ne mjere direktno, već su dobivene oduzimanjem koncentracije TC-a od koncentracije TOC-a. IC-e upućuje na prisutstvo CO₂ koji je produkt biorazgradnje što potvrđuje proces razgradnje mikroplastike. Najviše vrijednosti koncentracija IC-a detektirane su 7. i 14. dan pokusa te je tada biorazgradnja mikroplastike bila najintenzivnija. IC-e potvrđuje biorazgradnju što se slaže sa porastom CFU vrijednosti u istim pokusima.

Nadalje, vrijednosti koncentracija TC-a za pokus P1 prikazane su u tablici 4.1. Dobivene vrijednosti koncentracija TC-a potvrđuju, kao što je prethodno prikazano u tablicama 4.2. i 4.3., da je najveća biorazgradnja detektirana 14. dana pokusa. Najniže vrijednosti TC-a nakon 0. dana detektirane su 3. dana pokusa kod bakterijske kulture *Pseudomonas alcaligenes*.

U tablicama 4.4.-4.6. prikazane su vrijednosti koncentracija TOC-a, IC-a i TC-a tijekom biorazgradnje PS i PVC bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* (pokus P2). U tablici 4.5.

prikazane su vrijednosti koncentracija TOC-a za svih 16 ispitivanih uzoraka koje su uspoređene s vrijednostima kontrolnog uzorka. Najviše vrijednosti koncentracija TOC-a za bakterijsku kulturu *Bacillus subtilis* primijećene su 3. i 7. dana pokusa te tada dolazi do najintenzivnije biorazgradnje mikroplastike. Slijedi tablica 4.6. u kojoj su prikazane vrijednosti koncentracija IC-a za pokus P2, koje su također najviše tijekom 3. i 7. dana pokusa. Koncentracije IC-a ukazuju na nastajanje nusprodukta CO₂ koji nastaje prilikom biorazgradnje mikroplastike. Vrijednosti koncentracija TC-a odgovaraju vrijednostima koncentracija TOC-a i IC-a te upućuju na jednaki zaključak. Navedene teze dodatno su potkrijepljene odgovarajućim CFU vrijednostima.

5.3. Praćenje biorazgradnje mikroplastike PS i PVC ionskom kromatografijom

Prilikom provedbe pokusa biorazgradnje mikroplastike PS-a i PVC-a s bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis* detektirana je promjena koncentracija aniona i kationa prisutnih u ispitivanim uzorcima. U tablicama 4.7. i 4.8. prikazane su promjene koncentracija aniona i kationa prilikom biorazgradnje s navedenim bakterijskim kulturama. Promjene koncentracija iona praćene su u kontrolnim uzorcima te u uzorcima koji sadržavaju PS i PVC-e.

U tablici 4.7. prikazane su koncentracije kloridnih aniona (Cl⁻) i kalijevih kationa (K⁺), s obzirom da su to dvije ionske vrste koje su prisutne u najvećim koncentracijama prilikom biorazgradnje mikroplastike bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes*. Osim navedenih ionskih oblika, detektirani su i fosfatni, nitritni, nitratni i sulfatni anioni, te kationi natrija, amonijaka, magnezija i kalcija, ali u znatno nižim koncentracijama. Iz tablice je vidljivo da su najviše koncentracije kloridnih aniona u pokusu P1 detektirane tokom 14. dana pokusa. U usporedbi s kontrolnim uzorkom, vrijednosti u pravilu rastu od 0. do 14. dana pokusa, nakon čega dolazi do postupnog pada koncentracija kloridnih aniona, a najniže su koncentracije detektirane 30. dana pokusa, što je u skladu s rezultatima TOC analize. Većini bakterijskih kultura pri optimalnim uvjetima rasta nisu potrebni kloridni ioni za rast. Međutim, prema istraživanju provedenom 2003. godine [69], nekolicini bakterijskih kultura, potrebna je određena koncentracija kloridnih iona za rast u slanoj okolini. Nadalje, kloridi imaju ulogu osmolita pri osmoadaptaciji, odnosno uspostavljanja uravnotežene koncentracije soli unutar i izvan bakterijske stanice. [69] Važna značajka bakterija, koje posjeduju staničnu stijenku, je održavanje razlike osmotskog tlaka u staničnoj membrani, stvarajući hidrostatički tlak koji se naziva turgor. Smatra se da turgor ima veliku ulogu u rastu bakterija te određivanju oblika njihove stanične stijenke. Turgor unutar stanice može biti signal te krajnji produkt transporta

kalijevih kationa, zbog čega ovisi upravo o njihovoj koncentraciji unutar bakterijske stanice. [70]

Najveće povećanje u koncentraciji kalijevih kationa u usporedbi s kontrolnim uzorkom detektirano je u uzorcima izuzetima u 14. danu pokusa, dok su smanjene koncentracije K^+ iona, sukladno s rezultatima TOC analize i dobivenim CFU vrijednostima, detektirane 30. dana pokusa.

Koncentracije glavnih anionskih i kationskih oblika nastalih procesom biorazgradnje u pokusu P2 prikazane su u tablici 4.8., a riječ je o fosfatnim (PO_4^{3-}) anionima i kalijevim (K^+) kationima. Najviše fosfatnih aniona detektirano je 3. i 14. dana provedbe pokusa. Fosfatni anioni bakterijama služe kao izvor energije za proces biorazgradnje mikroplastike, a smanjena koncentracija fosfatnih aniona koja je detektirana u uzorcima izuzetima 7. dana pokusa povezana je s odgovarajućim nižim CFU vrijednostima. Iz navedenog se može zaključiti da niže koncentracije fosfatnih aniona u odnosu na kontrolni uzorak znače intenzivniju biorazgradnju. Kationski oblik koji je u najvišoj koncentraciji nastao u pokusu P2 su kalijevi kationi, što je potkrijepljeno rezultatima u tablici 4.8. Najveće povećanje koncentracije kalijevih kationa s obzirom na kontrolni uzorak detektirano je 3. i 14. dana pokusa, dok je znatno smanjene koncentracije kalijevih kationa detektirano u uzorcima izuzetima 7. i 30. dana pokusa. Fosfatni ioni također se nalaze unutar stanične stijenke bakterija, te imaju ulogu u osmoregulaciji. [71]

5.4. Praćenje biorazgradnje FTIR-ATR analizom mikroplastike

Postupak FTIR analize opisan je u poglavlju 3.3.4.6., a početni spektri dviju promatranih vrsta mikroplastike – PS-a i PVC-a snimljeni su prije provedbe pokusa biorazgradnje. Na spektrima su naznačeni karakteristični pikovi, čiji intenzitet uz pojavu novih pikova potvrđuje proces biorazgradnje MP-e. Spektri su analizirani pripadajućom literaturom. [72]

PS spektar karakterizira pik na $3150-3050\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C-H istezanje karakteristično za alkene, te pik jednakog intenziteta na $2950-2800\text{ cm}^{-1}$, koji također predstavlja C-H istezanje karakteristično za alkane. Slijedi pik manjeg intenziteta na $1650-1600\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C=O istezanje karakteristično za primarne amide. Nadalje, dvostruki pik jačeg intenziteta nalazi se na $1500-1425\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C-H savijanje karakteristično za alkane. Pikovi koji se nalaze na $800-650\text{ cm}^{-1}$ predstavljaju C-H savijanje karakteristično za arome.

Na slici 4.9. (a) i (b) prikazani su FTIR spektri PS mikroplastike koji su dobiveni nakon pokusa biorazgradnje s bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* (b) i *Bacillus subtilis*

(c). U svrhu potvrde biorazgradnje PS mikroplastike potrebno je analizirati navedene spektre u usporedbi sa početnim PS spektrom. U novim su spektrima uočeni neki novi pikovi, kao i promjena položaja i intenziteta već postojećih pikova. Prilikom usporedbe spektra dobivenog nakon biorazgradnje PS bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* s početnim spektrom detektirano je prisustvo novog pika na $550\text{-}450\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C-H savijanje karakteristično za aromate te pik slabijeg intenziteta na $2400\text{-}2350\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja O=C=O istežanje karakteristično za CO₂ čime je potvrđena biorazgradnja. Nastajanje novih pikova (skupina) navodi na zaključak da je u provedenom pokusu došlo do biorazgradnje, odnosno cijepanja polimernog lanca PS na manje jedinice. Također je uočljiv blagi pomak pikova koji se na početnom spektru PS nalaze na $3150\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$ i $2950\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, a sada su pomaknuti za otprilike 50 cm^{-1} udesno te malo većeg intenziteta kao što je prikazano na slici 4.9. (a). Nadalje, pik koji se na početnom spektru nalazio na $1500\text{-}1425\text{ cm}^{-1}$ sada je pomaknut za otprilike 25 cm^{-1} udesno te nešto jačeg intenziteta. Pikovi koji se u početnom PS spektru nalaze na $800\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ neznatno su pomaknuti prema kraćim valnim duljinama, te primjetno većeg intenziteta od odgovarajućih pikova u početnom PS spektru. Nadalje, prilikom usporedbe spektra dobivenog nakon biorazgradnje PS bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* s početnim PS spektrom što je prikazano na slici 4.9. (b), primijećen je znatno slabiji intenzitet pikova koji se nalaze na $3150\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$ i $2950\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ te njihov blagi pomak prema kraćim valnim duljinama. Uočljiv je i novonastali pik slabog intenziteta na $2400\text{-}2350\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja O=C=O istežanje karakteristično za CO₂ čime je potvrđena biorazgradnja. Svi pikovi karakteristični za početni PS spektar, na ovome su spektru (slika 4.9. (b)) znatno slabijeg intenziteta, a prisutan je još jedan novi pik na $550\text{-}475\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C-H savijanje i karakterističan je za aromate. S obzirom na sve navedeno, može se uočiti uspješnija biorazgradnja PS kod bakterijske kulture *Bacillus subtilis* u usporedbi sa *Pseudomonas alcaligenes*, zbog promjene intenziteta pikova i dviju novonastalih pikova koji upućuju na biorazgradnju.

Na slici 4.10. (a) i (b) prikazani su FTIR spektri PVC mikroplastike koji su dobiveni nakon pokusa biorazgradnje s bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* (b) i *Bacillus subtilis* (c). Na početnom PVC spektru, neki od karakterističnih pikova nalaze se na $3050\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ – pik koji predstavlja C-H istežanje karakteristično za alkene, pik na $1775\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C=O istežanje karakteristično za estere, pik na $1450\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C-H savijanje karakteristično za aldehide, dvostruki pik na $1350\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C-O istežanje karakteristično za aromatske estere, pik na $1000\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C=C savijanje karakteristično za alkene te dvostruki pik na $700\text{-}550\text{ cm}^{-1}$ koji predstavlja C-H

savijanje karakteristično za aromate. Prilikom usporedbe spektra dobivenog nakon biorazgradnje PVC-a bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* s početnim spektrom detektirano je prisutstvo triju novih pikova te promjene u intenzitetu i položaju već prisutnih pikova. Prvi se novonastali pik javlja na 2400-2300 cm^{-1} te predstavlja O=C=O istežanje karakteristično za CO_2 što je potvrda biorazgradnje. Drugi novonastali pik javlja se na rasponu valnih duljina od 1700-1600 cm^{-1} i predstavlja C=O istežanje karakteristično za aldehide. Posljednji novonastali pik slabog je intenziteta te se javlja na 850-800 cm^{-1} i predstavlja C=C savijanje karakteristično za alkene. Intenzitet svih već prisutnih pikova povećan je u odnosu na pikove početnog PVC spektra. Prilikom usporedbe početnog PVC spektra i spektra dobivenog nakon biorazgradnje PVC-a bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* nema novonastalih pikova, no došlo je do povećanog intenziteta već prisutnih pikova. Iz navedenog se može zaključiti da je biorazgradnja PVC-a bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* u usporedbi s kulturom *Bacillus subtilis* intenzivnija čemu svjedoči nastanak triju novih pikova sa funkcionalnim skupinama koje potvrđuju biorazgradnju.

5.5. Praćenje produkata biorazgradnje mikroplastike PS-a i PVC-a tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC analiza)

Za uzorak P1-2 u 21. danu pokusa biorazgradnje PS s bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* dobiven je maseni spektar prikazan na slici 4.11. (a). Pik najvećeg intenziteta za navedeni uzorak primijećen je pri omjeru mase i naboja (m/z) od 141 te on prema literaturi [73] približno odgovara ionima $[\text{M}+\text{CH}_3\text{CN}+\text{Na}]^+$ po čemu se može zaključiti da je vjerojatno riječ o otapalu. Drugi po redu pik najvećeg intenziteta nalazi se na vrijednosti m/z od 378 i vjerojatno predstavlja ion strukture $[\text{M}_2+\text{H}]^+$. Sljedeći po intenzitetu je pik na m/z vrijednosti 340 koji odgovara ionskoj strukturi $[\text{AB}_3+\text{H}]^+$, koja je karakteristična za deterdžente. Slijedi pik vrijednosti m/z omjera 183 koji odgovara strukturi iona $[\text{M}+\text{H}]^+$ koji je prema literaturi karakterističan za difenil ketone. Zadnji po redu pik značajnijeg intenziteta odgovara vrijednosti m/z omjera 491 čija je ionska struktura $[\text{AB}_6+\text{Na}]^+$, a također je karakterističan za deterdžente. Nadalje, za uzorak P1-10 u 21. danu pokusa biorazgradnje PVC s bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* dobiven je maseni spektar prikazan na slici 4.11. (b). Usporedbom slike 4.11. (a) i 4.11. (b) vidljivo je da su u spektru uzorka P1-10 prisutne već navedene vrijednosti m/z 141, 378, 340 i 183 koje su prethodno okarakterizirane. Novi pik čija je m/z vrijednost 471 odnosi se na ion strukture $[\text{AB}_6+\text{H}]^+$ koji je okarakteriziran kao deterdžent.

Za uzorak P2-6 u 30. danu pokusa biorazgradnje PS s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* dobiven je maseni spektar prikazan na slici 4.12. (a). Osim već okarakteriziranih pikova

m/z vrijednosti 141, 183 i 340 koji su u ovom slučaju većeg intenziteta od prethodnih uzoraka, detektirana su još 3 značajnija pika. Pik najvećeg intenziteta koji nije prethodno okarakteriziran nalazi se pri m/z vrijednosti 439 te se odnosi na ion strukture $[A_9B+Na]^+$ koji je okarakteriziran kao polietilen-glikol. Sljedeći po redu pik značajnijeg intenziteta nalazi se pri m/z vrijednosti 453 ionske strukture $[M+H]^+$ te je vjerojatno riječ o najlonu. Posljednji pik značajnijeg intenziteta nalazi se pri m/z vrijednosti 552 čija je ionska struktura $[M+Na]^+$. Nadalje, na slici 4.12. (b) prikazan je maseni spektrometar biorazgradnje PVC s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* za uzorak P2-15 (30. dan pokusa). Osim već okarakteriziranih pikova značajnijeg intenziteta pri m/z vrijednostima 141, 183, 340, 378 i 491, prisutan je još jedan pik značajnijeg intenziteta koji se nalazi pri m/z vrijednosti 543. Taj se pik vjerojatno odnosi na ion strukture $[AB_7+Na]^+$ koji je okarakteriziran kao deterdžent.

5.6. Određivanje toksičnosti filtrata nakon provedbe pokusa biorazgradnje mikroplastike PS-a i PVC-a primjenom bakterijske kulture *Vibrio fischeri*

Nakon provedbe dvaju pokusa biorazgradnje mikroplastike PS-a i PVC-a bakterijskim kulturama *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis*, ispitivana je ekotoksičnost navedenih vodenih faza (filtrata) nakon provedbe pokusa biorazgradnje pomoću bakterijske kulture *Vibrio fischeri*, a postupak ove metode je detaljnije opisan u poglavlju 3.1.7. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.9. za pokus P1, te u tablici 4.10. za pokus P2. Rezultati EC_{20} i EC_{50} predstavljaju volumni udio uzorka pri kojem dolazi do 20%-tnog i 50%-tnog pada luminiscencije bakterijske kulture *Vibrio fischeri*. Iz izmjerene vrijednosti EC_{50} izračunata je vrijednost TU (eng. toxicity units) koje predstavljaju relativnu toksičnost ispitivanih uzoraka, a računaju se prema sljedećoj formuli (4):

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

Najniže vrijednosti EC_{20} dobivene u pokusu P1 primijećene su kod uzorka P1-8 za koji ona iznosi 6,28% iz čega se može zaključiti da je taj uzorak od svih uzoraka u pokusu P1 najtoksičniji za bakterijsku kulturu *Vibrio fischeri*. Niske vrijednosti EC_{20} primijećene su i kod uzoraka P1-5 i P1-6, što također ukazuje na njihovu visoku toksičnost, a svim je spomenutim uzorcima zajednička vrsta mikroplastike koju sadržavaju – PS. Uzorak s najvišom vrijednošću EC_{20} u pokusu P1 je P1-3 što ukazuje na njegovu nisku toksičnost. U pokusu P2 uzorci koji pokazuju daleko najniže vrijednosti EC_{20} su P2-1 i P2-7 što ukazuje na njihov visok toksični utjecaj.

Dobivene vrijednosti relativne toksičnosti (TU) prema literaturi se mogu podijeliti u 4 kategorije: <1 % = netoksično; 1-40 % = toksično; 40-100 % = vrlo toksično; >100 % = izuzetno toksično. [74] Prema navedenoj kategorizaciji, u pokusu s bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* relativna toksičnost svih ispitivanih uzoraka, osim 4 uzoraka nepoznatih vrijednosti relativne toksičnosti: P1-1, P1-9, P1-3 i P1-14, nalazi se u rasponu vrijednosti 1-40 % što ukazuje na zaključak da su svi navedeni uzorci toksični. Nadalje, u pokusu s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis* 8 uzoraka pokazali su se toksičnima s obzirom na dobivenu vrijednost relativne toksičnosti, dok se jedino uzorak P2-13 čija je TU vrijednost 0,40 može kategorizirati kao netoksičan.

5.7. Rezultati ANOVA analize u računalnom programu Design Expert prema Taguchi metodi

Plan pokusa biorazgradnje mikroplastike PS i PVC napravljen je za oba pokusa (P1 i P2) u računalnom programu Design Expert prema Taguchi metodi. Taguchi metoda služi za optimizaciju provedbe pokusa, a zatim slijedi ANOVA statistička analiza čime se ispituje na koji način promjena određenih čimbenika u pokusima P1 i P2 utječe na odziv sustava. Na taj način moguće je računalno odrediti koji su najznačajniji čimbenici koji u pokusima biorazgradnje mikroplastike PS i PVC imaju upravo najveći učinak na biorazgradnju. Kada se odrede najznačajniji čimbenici, moguće je zaključiti koji uzorci pokazuju najintenzivniju biorazgradnju u svakom pokusu.

Najznačajniji čimbenik u pokusu P1 prilikom praćenja biorazgradnje PS-a bio je broj okretaja po minuti, a doprinos navedenog čimbenika iznosi 51,18 %. Miješanje, odnosno broj okretaja ovdje igra vitalnu ulogu u pružanju najboljeg okruženja za bakterije jer regulira brzinu topljivosti kisika te ubrzava prijenos hranjivih tvari i kisika u stanice mikroorganizama. [75] Nadalje, u pokusu P1 u kojem se pratila biorazgradnja PVC-a najznačajniji je čimbenik veličina čestica mikroplastike, čiji doprinos iznosi 68,61 %. ANOVA analizom varijance u pokusu P2 prilikom praćenja biorazgradnje PS-a uočeno je nekoliko značajnih čimbenika, a to su pH-vrijednost, veličina čestica mikroplastike, broj okretaja, optička gustoća i koncentracija glukoze. Najznačajniji od navedenih čimbenika bila je optička gustoća, čiji doprinos iznosi 81,41 %. Slijedi koncentracija glukoze s doprinosom od 5,51 %, veličina čestica mikroplastike s doprinosom od 5,20 %, broj okretaja s doprinosom od 4,06 %, a najmanji doprinos od 3,80 % imala je pH-vrijednost. Za pokus P2 biorazgradnje PVC-a značajni čimbenici su pH-vrijednost, temperatura, koncentracija čestica mikroplastike, broj okretaja, optička gustoća i koncentracija glukoze. Najznačajniji od navedenih čimbenika, s obzirom na doprinos od 94,21 %, bila je

optička gustoća. Doprinos od 3,13 % imala je pH-vrijednost, dok je doprinos za koncentraciju dodane glukoze iznosio 1,80 %, kao što je vidljivo u tablici 4.11.

U tablici 4.12. navedene su vrijednosti standardnih devijacija, značenja, koeficijenti varijacije - C.V. [%], vrijednosti R^2 , prilagođeni R^2 i predviđeni R^2 . Standardna devijacija se mjeri u jedinicama varijable odziva i predstavlja razliku između vrijednosti podataka i prilagođenih vrijednosti. Niža vrijednost standardne devijacije znači da model bolje opisuje odziv. Vrijednost R^2 predstavlja postotak varijacije u odgovoru koji se objašnjava modelom. Pomoću R^2 moguće je odrediti u kojoj mjeri model odgovara podacima, a veća vrijednost R^2 znači da model više odgovara podacima. Prilagođeni R^2 je postotak varijacije u odgovoru koji se objašnjava modelom, prilagođen za broj prediktora u modelu u odnosu na broj opažanja. Nadalje, pomoću predviđenog R^2 moguće je odrediti koliko dobro model predviđa odgovor na nova opažanja pa tako modeli koji imaju veće vrijednosti predviđenog R^2 imaju bolju sposobnost predviđanja. [76] Najniža vrijednost standardne devijacije primijećena je u pokusu P2-PVC te ona iznosi 0,00 što znači da model u potpunosti opisuje odziv. S druge strane, najveća je vrijednost standardne devijacije detektirana u pokusu P1-PS te ona iznosi 0,50. Vrijednost koeficijenta determinacije (R^2) kreće se između 0 i 1, a najveća vrijednost R^2 detektirana je u pokusu P2-PVC te iznosi 1,00, što znači da za taj pokus model u potpunosti odgovara podacima. Vrijednosti R^2 za pokuse s bakterijskom kulturom *Pseudomonas alcaligenes* znatno su manje te iznose 0,5118 za pokus P1-PS i 0,6861 za pokus P1-PVC. Nadalje, najveće vrijednosti prilagođenog R^2 i predviđenog R^2 primijećene su za pokus P2-PVC, što znači da je za taj pokus veći postotak varijacije objašnjen modelom te da navedeni model ima bolju sposobnost predviđanja. [76]

6. ZAKLJUČAK

Biorazgradnja dviju vrsta MP-a– PS-a i PVC-a pomoću bakterijskih kultura *Pseudomonas alcaligenes* i *Bacillus subtilis* pratila se tijekom 30 dana različitim analitičkim metodama. CFU vrijednost odnosi se na broj živih bakterijskih stanica po mililitru, a veće CFU vrijednosti u odnosu na kontrolni uzorak (koji ima istu pH vrijednost i OG vrijednost) upućuju na intenzivniju biorazgradnju u pojedinim uzorcima. Detektirane su veće CFU vrijednosti u prisutnosti čestica MP-a manjih veličina i većih koncentracija, što je povezano sa većom specifičnom površinom promatranih čestica MP-a. Kod obje bakterijske kulture primjećena je intenzivnija biorazgradnja PS-a što je povezano s njegovom manjom toksičnošću u odnosu na PVC-e koji sadrži kloridnu skupinu. Nadalje, primjećena je bolja biorazgradnja kod pokusa provedenih na temperaturi od 25 °C s obzirom da ona više odgovara optimalnoj temperaturi rasta proučavanih bakterijskih kultura.

Sljedeća metoda praćenja intenziteta biorazgradnje PS-a i PVC-a uključuje praćenje koncentracija TC-a, TOC-a i IC-a. S obzirom da IC-e upućuje na nastajanje CO₂ kao metaboličkog produkta biorazgradnje, ovom su metodom dodatno potvrđene teze o biorazgradnji.

Slijedi praćenje biorazgradnje metodom ionske kromatografije, u kojima se prate koncentracije najčešće prisutnih ionskih vrsta te uspoređuju s kontrolnim uzorcima. U pokusu P1 pratila se koncentracija kloridnih i kalijevih iona, koji imaju ulogu u osmoregulaciji bakterijskih stanica. Nadalje, u pokusu P2 pratila se koncentracija fosfatnih i kalijevih iona s obzirom na kontrolni uzorak, a relativno najveće koncentracije navedenih iona u oba pokusa detektirane su 14.dana provedbe pokusa.

Analitička metoda koja dodatno potvrđuje proces biorazgradnje MP-a je FTIR-ATR analiza, prije koje je bilo potrebno snimiti početne spektre promatranih vrsta MP-a u cilju njihove usporedbe sa spektrima dobivenim nakon procesa biorazgradnje dvjema bakterijskim kulturama. Novonastali pikovi na PS spektrima potvrđuju proces biorazgradnje, s naglaskom na pikove koji predstavljaju O=C=O istežanje karakteristično za CO₂ što dodatno potkrepljuje rezultate dobivene praćenjem koncentracije IC-a TOC analizom. Na PVC-e spektrima također su vidljivi novi pikovi te promjene u intenzitetu i položaju već prisutnih pikova.

Visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom dobiveni su maseni spektri na kojima se pratio intenzitet značajnijih pikova pri određenom omjeru mase i naboja (m/z). Pikovi su okarakterizirani prema pripadajućoj literaturi, te se može zaključiti kako se većina novonastalih

pikova odnosi na aditive prisutne unutar MP-a koji su većim dijelom okarakterizirani kao deterdženti.

Slijedi određivanje toksičnosti nakon provedbe pokusa biorazgradnje MP-a PS i PVC primjenom bakterijske kulture *Vibrio fischeri* pri čemu su ispitivane vodene faze, tj. filtrati dobiveni iz odgovarajućih uzoraka. Toksičnost se pratila rezultatima EC₂₀ i EC₅₀ koji predstavljaju volumni udio uzorka pri kojem dolazi do 20 %-tnog i 50 %-tnog pada luminiscenije bakterijske kulture *Vibrio fischeri*, a naknadno je pomoću vrijednosti EC₅₀ izračunata i relativna toksičnost ispitivanih uzoraka koja se označava kao TU. Niže vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ primjećene su kod pokusa koji se odnose na biorazgradnju PVC-a što se podudara sa rezultatima ionske kromatografije, odnosno veće koncentracije kloridnih iona u pokusu P1.

Naposljetku je provedena ANOVA analiza varijance prema planu pokusa dizajniranom po Taguchi metodi, u svrhu detekcije najznačajnijih čimbenika koji utječu na odziv sustava. Za dobivene najznačajnije čimbenike pratio se i njihov doprinos procesu biorazgradnje MP-e dvjema bakterijskim kulturama. Nadalje, tablično su prikazane i dobivene eksperimentalne vrijednosti parametara ANOVA analize – standardne devijacije, koeficijenti varijacije, vrijednosti R^2 , prilagođeni R^2 i predviđeni R^2 . Kako je najveća vrijednost R^2 koja iznosi 1,00 detektirana u pokusu P2-PVC, može se zaključiti kako za taj pokus model u potpunosti odgovara podacima.

7. POPIS SIMBOLA

MP - mikroplastika

PET – poli(etilen-tereftalat)

PE – polietilen

LDPE – polietilen niske gustoće

HDPE – polietilen visoke gustoće

PP – polipropilen

PS – polistiren

PVC – poli(vinil-klorid)

CFU – broj živih stanica bakterija

SP – slijepa proba

OG – optička gustoća

FTIR-ATR – Fourierova infracrvena spektroskopija

HPLC/MS – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. *High Pressure Liquid Chromatography* / masena spektroskopija

EC₅₀ – volumni udio uzorka pri kojem dolazi do 50%-tnog pada luminiscencije bakterijske kulture *Vibrio fischeri*

TU - relativna toksičnost, engl. *Toxicity unit*

UV zračenje – ultraljubičasto zračenje

CO₂ – ugljikov dioksid

HA – hranjivi agar

KOH – kalijev hidroksid

H₂SO₄ – sumporna kiselina

NaCl – natrijev klorid

KH₂PO₄ – kalijev dihidrogenfosfat

CaCl₂ – kalcijev klorid

MgSO₄ – magnezijev sulfat

TOC - ukupni organski ugljik

TC – ukupni ugljik

IC - anorganski ugljik

K⁺ - kalijev ion

Cl⁻ - klordini ion

PO₄³⁻ - fosfatni ion

8. LITERATURA

- [1] Kedzierski, M., Frère, D., Le Maguer, G., Bruzard, S., Why is there plastic packaging in the natural environment? Understanding the roots of our individual plastic waste management behaviours, *Science of The Total Environment*, 139985 (2020) 2-4.
- [2] Wang, J., Yue, D., Wang, H., In Situ Fe₃O₄ Nanoparticles Coating of Polymers for Separating Hazardous PVC from Microplastic Mixtures. *Chemical Engineering Journal*, 127170 (2020)1-2.
- [3] Wang, C., Zhao, J., Xing, B., Environmental Source, Fate, and Toxicity of Microplastics. *Journal of Hazardous Materials*, 124357 (2020) 3-4.
- [4] Frias, J. P. G. L., Nash, R., Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin* 138 (2019) 145–147.
- [5] Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., Thiel, M., Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology* 46(6) (2012) 3060–3075.
- [6] Chandra, P., Enespa, Singh, D. P., Microplastic degradation by bacteria in aquatic ecosystem. *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*, (2020) 447–454.
- [7] Gao, M., Xu, Y., Liu, Y., Wang, S., Wang, C., Dong, Y., Song, Z., Effect of polystyrene on di-butyl phthalate (DBP) bioavailability and DBP-induced phytotoxicity in lettuce. *Environmental Pollution*, 268, 115870 (2021) 1-2.
- [8] Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S., Swan, S. H., Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526) (2009) 2153–2166.
- [9] Zhang, J., Zhao, M., Li, C., Miao, H., Huang, Z., Dai, X., Ruan, W., Evaluation the impact of polystyrene micro and nanoplastics on the methane generation by anaerobic digestion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 205, 111095 (2020) 1-2.
- [10] Andrady, A. L., Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8) (2011) 1596–1605.
- [11] Zhang, F., Yao, C., Xu, J., Zhu, L., Peng, G., Li, D., Composition, spatial distribution and sources of plastic litter on the East China Sea floor. *Science of The Total Environment*, 140525 (2020) 1-2.
- [12] Hohn, S., Acevedos-Trejos, E., Abrams, J. F., de Moura, J. F., Spranz, R., Merico, A., The

long-term legacy of plastic mass production. *Science of The Total Environment*, 141115 (2020) 1-2.

[13] Baena-González, J., Santamaria-Echart, A., Aguirre, J. L., González, S., Chemical recycling of plastic waste: Bitumen, solvents, and polystyrene from pyrolysis oil. *Waste Management*, 118 (2020) 139–144.

[14] Lerici, L. C., Renzini, M. S., Pierella, L. B., Chemical Catalyzed Recycling of Polymers: Catalytic Conversion of PE, PP and PS into Fuels and Chemicals over H-Y. *Procedia Materials Science*, 8 (2015) 298.

[15] Nisticò, R., Polyethylene terephthalate (PET) in the packaging industry. *Polymer Testing*, 106707 (2020) 1-3.

[16] Meza de Luna, A., Shaikh, F. U. A., Anisotropy and bond behaviour of recycled Polyethylene terephthalate (PET) fibre as concrete reinforcement. *Construction and Building Materials*, 265, 120331 (2020) 1-2.

[17]<https://polymerdatabase.com/polymer%20classes/Polyester%20type.html> (pristup 3.8.2021.).

[18] Chandra, P., Enespa, Singh, D. P., Microplastic degradation by bacteria in aquatic ecosystem. *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (2020) 435–438.

[19] Bonilla, J., Paiano, R. B., Lourenço, R. V., Bittante, A. M. Q. B., Sobral, P. J. A., Biodegradability in aquatic system of thin materials based on chitosan, PBAT and HDPE polymers: Respirometric and physical-chemical analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164 (2020) 1399–1401.

[20]<https://www.differencebetween.com/difference-between-pvc-and-vs-hdpe/> (pristup 3.8.2021.).

[21] <https://omicoplastics.com/blog/l-dpe-hdpe-similarities-and-differences/> (pristup 3.8.2021.).

[22] Lin, T. A., Lin, J.-H., Bao, L., Polypropylene/thermoplastic polyurethane blends: mechanical characterizations, recyclability and sustainable development of thermoplastic materials. *Journal of Materials Research and Technology* (2020) 5305-5306.

[23]https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-PS-Mitchell-2004_fig2_256442141 (pristup 25.5.2021.).

[24] Suman, T. Y., Jia, P.-P., Li, W.-G., Junaid, M., Xin, G.-Y., Yan, W., Pei, D.-S., Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on brine shrimp: First evidence highlighting the molecular mechanism through transcriptome analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 123220 (2020) 4-5.

- [25] Urbanek, A. K., Rybak, J., Wróbel, M., Leluk, K., Mirończuk, A. M., A comprehensive assessment of microbiome diversity in *Tenebrio molitor* fed with polystyrene waste. *Environmental Pollution*, 114281 (2020) 1.
- [26] Gao, S. Z., Wang, J. S., Gao, X. W., Modeling and advanced control method of PVC polymerization process. *Journal of Process Control*, 23(5) (2013) 664.
- [27] Abdelghany, A. M., Meikhail, M. S., Asker, N., Synthesis and structural-biological correlation of PVC/PVAc polymer blends. *Journal of Materials Research and Technology* (2019) 3909.
- [28]https://www.researchgate.net/figure/Structural-formula-of-PVC-8_fig2_319302277 (pristup 25.5.2021.).
- [29] Villanueva, M. E., González, J. A., Rodríguez-Castellón, E., Teves, S., Copello, G. J., Antimicrobial surface functionalization of PVC by a guanidine based antimicrobial polymer. *Materials Science and Engineering: C*, 67 (2016) 214.
- [30] Park, M., Choi, I., Lee, S., Hong, S., Kim, A., Shin, J., Kim, Y.-W., Renewable Malic Acid-based Plasticizers for Both PVC and PLA Polymers. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* (2020) 148.
- [31] Altenhofen da Silva, M., Adeodato Vieira, M. G., Gomes Maçumoto, A. C., Beppu, M. M., Polyvinylchloride (PVC) and natural rubber films plasticized with a natural polymeric plasticizer obtained through polyesterification of rice fatty acid. *Polymer Testing*, 30(5) (2011) 478.
- [32] Gao, M., Xu, Y., Liu, Y., Wang, S., Wang, C., Dong, Y., Song, Z., Effect of polystyrene on di-butyl phthalate (DBP) bioavailability and DBP-induced phytotoxicity in lettuce. *Environmental Pollution*, 268, 115870 (2021) 1-2.
- [33] Lebreton, L., Slat, B., Ferrari, F., Sainte-Rose, B., Aitken, J., Marthouse, R., ... Reisser, J., Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific Reports*, 8(1) (2018) 4-7.
- [34] Auta, H. S., Emenike, C. ., Fauziah, S., Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, 102 (2017) 166.
- [35] Huang, D., Tao, J., Cheng, M., Deng, R., Chen, S., Yin, L., Li, R., Microplastics and Nanoplastics in the Environment: Macroscopic Transport and Effects on Creatures. *Journal of Hazardous Materials* 124399 (2020).
- [36] Auta, H. S., Emenike, C. ., Fauziah, S., Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment*

International, 102 (2017) 165–176.

[37] Jiang, X., Chen, H., Liao, Y., Ye, Z., Li, M., Klobučar, G., Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. *Environmental Pollution* (2019) 831-832.

[38] Belden, J., Introduction to ecotoxicology. *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology*, (2020) 381–393.

[39]http://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Understanding_In_Vitro_and_In_Vivo_Toxicology_Testing_for_Chemicals.html (pristup 20.8.).

[40] Rai, P. K., Lee, J., Brown, R. J. C., Kim, K.-H., Environmental fate, ecotoxicity biomarkers, and potential health effects of micro- and nano-scale plastic contamination. *Journal of Hazardous Materials*, 123910 (2020) 8-19.

[41] Jiang, X., Chen, H., Liao, Y., Ye, Z., Li, M., Klobučar, G., Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. *Environmental Pollution* (2019) 831-836.

[42] Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., ... He, D., Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of The Total Environment* 619-620 (2018) 1–8.

[43] Ribeiro, F., Garcia, A. R., Pereira, B. P., Fonseca, M., Mestre, N. C., Fonseca, T. G., ... Bebianno, M. J., Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2) (2017) 379–391.

[44] Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Iqbal, M., *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of The Total Environment*, 626 (2018) 1296–1297.

[45] Montalbán, M. G., Hidalgo, J. M., Collado-González, M., Díaz Baños, F. G., Villora, G., Assessing chemical toxicity of ionic liquids on *Vibrio fischeri* : Correlation with structure and composition. *Chemosphere*, 155 (2016) 405–406.

[46] <https://serc.carleton.edu/details/images/6565.html> (pristup 26.5.2021.).

[47] Eubeler, J. P., Zok, S., Bernhard, M., Knepper, T. P., Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(9) (2009) 1057–1072.

[48] Klein, S., Dimzon, I.K., Eubeler, J., Knepper, T.P., Analysis, Occurrence, and Degradation of Microplastics in the Aqueous Environment, *Freshwater Microplastics*, Hdb. *Env. Chem.* 58 (2017).

[49] Hodzic, A., Re-use, recycling and degradation of composites. *Green Composites*, (2004)

252–271.

[50] Klein, S., Dimzon, I. K., Eubeler, J., Knepper, T. P., Analysis, Occurrence, and Degradation of Microplastics in the Aqueous Environment. *Freshwater Microplastics* (2017) 61–62.

[51] Lee, H. M., Kim, H. R., Jeon, E., Yu, H. C., Lee, S., Li, J., Kim, D.-H., Evaluation of the Biodegradation Efficiency of Four Various Types of Plastics by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from the Gut Extract of Superworms. *Microorganisms*, 8(9) (2020) 1341.

[52] <https://ysjournal.com/biodegradation-of-polyethylene-fragments-and-microbeads-using-bacillus-subtilis-and-pseudomonas-putida/> (pristup 20.8.2021.).

[53] Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., Fava, F., Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*, *New Biotechnology* (2019).

[54] Li, J., Kim, H. R., Lee, H. M., Yu, H. C., Jeon, E., Lee, S., & Kim, D.-H., Rapid biodegradation of polyphenylene sulfide plastic beads by *Pseudomonas* sp. *Science of The Total Environment*, 137616 (2020).

[55] Auta, H. S., Emenike, C. U., Jayanthi, B., & Fauziah, S. H., Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 127 (2018) 15–21.

[56] Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Li, L., Lin, H., ... Zhao, Y., Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of The Total Environment*, 135931 (2019).

[57] 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) 1.

[58] Valenstein, P., Bardy, G. H., Cox, C. C., Zwadyk, P., *Pseudomonas Alcaligenes* Endocarditis. *American Journal of Clinical Pathology*, 79(2) (1983) 245–246.

[59] Kwong, S., Sequence analysis of plasmid pRA2 from *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867 (P25X) reveals a novel replication region. *FEMS Microbiology Letters*, 158(2) (1998) 159.

[60] Xu, J., Zeng, X., Jiang, N., Zhou, Y., Zeng, L., *Pseudomonas alcaligenes* infection and mortality in cultured Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Aquaculture*, 446 (2015) 13.

[61] Duan, M., Zhang, Y., Zhou, B., Qin, Z., Wu, J., Wang, Q., Yin, Y., Effects of *Bacillus subtilis* on carbon components and microbial functional metabolism during cow manure–straw composting. *Bioresource Technology*, 122868 (2020) 2.

[62] <https://www.asmscience.org/content/education/imagegallery/image.2676> (pristup

24.5.2021.).

[63] Xiang, M., Kang, Q., Zhang, D., Advances on systems metabolic engineering of *Bacillus subtilis* as a chassis cell. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 5(4) (2020) 245.

[64] Li, J., Liu, H., Paul Chen, J., Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research* (2018) 137, 367–370.

[65] 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) 412.

[66] Zhang, K., Hamidian, A. H., Tubić, A., Zhang, Y., Fang, J. K. H., Wu, C., Lam, P. K. S., Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. *Environmental Pollution*, 274, 116554 (2021).

[67] 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*, (1982) 26(1), 15–24.

[68] <https://www.ecowatch.com/why-you-should-avoid-pvc-products-1881927242.html> (pristup 11.9.2021.).

[69] Roeßler, M., Sewald, X., Müller, V., Chloride dependence of growth in bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 225(1) (2003) 161–165.

[70] Epstein, W., The Roles and Regulation of Potassium in Bacteria. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, (2003) 293–320.

[71] Hirota, R., Kuroda, A., Kato, J., Ohtake, H., Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(5) (2010) 423–432.

[72] https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table (pristup 16.8.2021.).

[73] <https://www.bc.edu/bc-web/schools/mcas/departments/chemistry/research/facil-inst/mass-spec-background-ions.html> (pristup 17.8.2021.).

[74] Ledda, C., Rapisarda, V., Bracci, M., Proietti, L., (2013) Professional exposure to basalt rock dust: assessment by the *Vibrio fischeri* ecotoxicological test, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 8 (23) (2013) 1-5.

[75] Wriahusna, A., F., Dzakiyya, N., U., Puspita, I., D., Pudjiraharti, S., Optimization of Agitation Rate in Bioreactor Increases Chitinase Activity of *Serratia marcescens* PT6 (2020) 147.

[76]<https://support.minitab.com/en-us/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/how-to/one-way-anova/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/model-summary/> (pristup 1.9.2021.)