

# Određivanje optimalnih uvjeta biorazgradnje polistirena primjenom bakterije *Bacillus subtilis*

---

**Kovačević, Mirela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:149:338310>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mirela Kovačević

**ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA BIORAZGRADNJE  
POLISTIRENA PRIMJENOM BAKTERIJE *Bacillus subtilis*  
DIPLOMSKI RAD**

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

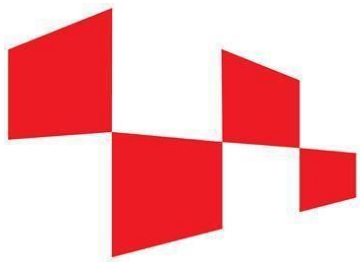
Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović

Dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, lipanj 2023.



**HRZZ**

Hrvatska zaklada  
za znanost

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

## SAŽETAK

Plastika je materijal koji se često koristi u svakodnevnim predmetima, a njezino nepravilno odlaganje i nakupljanje postali su ozbiljna briga za okoliš. Mikroplastika (MP) male su čestice sintetskih organskih polimera manje od 5 mm i predstavljaju veliku prijetnju okolišu zbog svoje postojanosti i inherentne toksičnosti. Biorazgradnja polimera ovisi o različitim čimbenicima, kao što su fizikalna i kemijska svojstva polimera, uvjeti u okolišu i prisutnost mikroorganizama. Iako je biorazgradnja često korišten proces za uklanjanje MP iz okoliša, njezina učinkovitost ovisi o optimizaciji značajnih čimbenika procesa.

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti biorazgradnju čestica polistirena (PS) pomoću bakterije *Bacillus subtilis*, odnosno odrediti značajne čimbenike koji utječu na proces biorazgradnje te optimizirati uvjete biorazgradnje. Eksperiment je osmišljen korištenjem punog faktorskog plana (FFP) za proučavanje učinaka tri čimbenika, odnosno veličine MP, brzine okretaja i optičke gustoće (OG) bakterijske suspenzije, na tri razine. Proces biorazgradnje praćen je 30 dana tijekom kojih se pratio ukupan broj bakterijskih kolonija (eng. *Colony Forming Units*, CFU) i vrijednosti ukupnog (TC), organskog (TOC) i anorganskog (TIC) ugljika. LC/MS analiza je provedena kako bi se otkrilo otpuštanje aditiva iz PS MP i stvaranje potencijalno toksičnih proizvoda razgradnje. Promjene u strukturi PS-a ispitane su ATR-FTIR spektroskopijom. Ekotoksičnost filtrata procijenjena je pomoću bakterije *Vibrio fischeri*. Za procjenu eksperimentalnih rezultata korištena je statistička analiza varijance (ANOVA).

*Ključne riječi:* mikroplastika, polistiren, biorazgradnja, *Bacillus subtilis*, puni faktorski plan

## ABSTRACT

Plastic is a material commonly used in everyday objects, and its improper disposal and accumulation have become a serious environmental concern. Microplastics (MP) are small particles of synthetic organic polymers measuring less than 5 mm and pose a significant threat to the environment due to their persistence and inherent toxicity. The biodegradation of polymers depends on various factors, such as the physical and chemical properties of the polymer, environmental conditions, and the presence of microorganisms. Although biodegradation is often used as a process to remove MP from the environment, its effectiveness relies on optimizing significant process factors.

The aim of this research was to investigate the biodegradation of polystyrene (PS) particles using the bacterium *Bacillus subtilis*. The objective was to identify significant factors influencing the biodegradation process of PS microplastics (MP) using *Bacillus subtilis* and to optimize the biodegradation conditions using this bacterial culture. The experiment was designed using a full factorial design (FFD) to study the effects of three factors, namely MP size, rotational speed, and optical density (OD) of the bacterial suspension, at three levels. The biodegradation process was monitored for 30 days, during which the total colony-forming units (CFU) of bacteria and the values of total carbon (TC), organic carbon (TOC), and inorganic carbon (TIC) were measured. LC/MS analysis was conducted to detect the release of additives from PS MP and the formation of potentially toxic degradation products. Changes in the structure of PS were examined using ATR-FTIR spectroscopy. The ecotoxicity of the filtrate was assessed using the bacterium *Vibrio fischeri*. A statistical analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the experimental results

*Key words:* microplastics, polystyrene, biodegradation, *Bacillus subtilis*, full factorial plan

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	4
2.1. Plastika.....	4
2.2. Polistiren.....	7
2.3. Mikroplastika.....	9
2.3.1. <i>Prisutnost mikroplastike u okolišu</i> .....	10
2.3.2. <i>Sudbina mikroplastike u okolišu</i> .....	14
2.4. Toksičnost mikroplastike.....	15
2.4.1. <i>Test ekotoksičnosti pomoću bakterije Vibrio fischeri</i> .....	20
2.5. Postupci uklanjanja mikroplastike iz vode.....	21
2.5.1. <i>Biorazgradnja mikroplastike</i> .....	22
2.5.1.1. <i>Biorazgradnja polistirena</i> .....	24
2.6. <i>Bacillus subtilis</i> .....	27
2.7. Enzimi kao pokretači biorazgradnje.....	30
2.8. <i>Full factorial plan</i> .....	31
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	33
3.1. Materijali.....	33
3.1.1. <i>Mikroplastika</i> .....	33
3.1.2. <i>Mikroorganizam</i> .....	33
3.2. Mediji i kemikalije.....	34
3.2.1. <i>Hranjivi agar</i> .....	34
3.2.2. <i>Mineralni medij</i> .....	34
3.2.3. <i>Fiziološka otopina</i> .....	35
3.2.4. <i>Hranjiva podloga za uzgoj morske bakterije Vibrio fischeri</i> .....	35
3.2.5. <i>Otopina za resuspenziju</i> .....	35
3.2.6. <i>Otopina NaCl</i> .....	36
3.3. Mjerni instrumenti i oprema.....	36
3.4. Metode rada.....	38
3.4.1. <i>Priprema mikroplastike PS</i> .....	38

3.4.2. Uzgoj bakterije <i>Bacillus subtilis</i> .....	38
3.4.3. Određivanje broja živih stanica bakterija (engl. <i>Colony Forming Unit, CFU</i> ).....	38
3.4.4. Postupak određivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i> .....	39
3.4.5. Određivanje ukupnog, organskog i anorganskog ugljika (engl. <i>Total Organic Carbon, TOC</i> ).....	40
3.4.6. Infracrvena spektroskopija s <i>Fourierovim transformacijama</i> (engl. <i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy-Attenuated Total Reflectance, FTIR-ATR</i> ).....	40
3.4.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i spektrometrije masa (engl. <i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, LC/MS</i> ) .....	40
3.5. Provedba eksperimenta .....	41
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	44
4.1. Određivanje optimalnih uvjeta za biorazgradnju polistirena primjenom <i>Bacillus subtilis</i> prema dizajnu punog faktorskog plana .....	44
4.1.1. Promjena <i>CFU</i> vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje polistirena .....	44
4.1.2. Promjena koncentracije <i>TC-a</i> , <i>TOC-a</i> i <i>TIC-a</i> tijekom pokusa biorazgradnje polistirena.....	48
4.1.3. Praćenje razgradnih i/ili otpuštenih aditiva s površine čestica mikroplastike tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti ( <i>LC/MS</i> ) .....	49
4.1.4. <i>FTIR-ATR</i> spektroskopija mikroplastike polistirena .....	52
4.1.5. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i> 54	
4.1.6. Rezultati statističke analize varijance ( <i>ANOVA</i> ) .....	56
5. ZAKLJUČAK.....	62
6. LITERATURA .....	64

# 1. UVOD

Onečišćenje plastikom jedan je od najbitnijih ekoloških problema s kojima se naš planet danas suočava. Plastika je sintetski materijal koji nije biorazgradiv i može postojati u okolišu stotinama godina. To znači da će plastika koju danas proizvodimo i dalje biti problem generacijama koje dolaze. Plastični otpad nalazi se u gotovo svakom kutku planeta, od dubina oceana do vrhova najviših planina. Plastični otpad šteti divljim životinjama jer ga životinje mogu progutati ili se mogu zapetljati u njega, uzrokujući ozljede, gušenje ili smrt. Plastični otpad također onečišćuje tlo i vodu, utječući na zdravlje ljudi i na zdravlje cijelog ekosustava. Jedan od najvećih problema s plastikom je to što je sveprisutna u našem svakodnevnom životu. Plastikom koristimo za sve, od pakiranja hrane do elektroničkih uređaja, a kao rezultat toga, proizvodnja plastike posljednjih je godina naglo porasla. Međunarodna unija za očuvanje prirode (IUCN) procjenjuje da se trenutno svake godine proizvede više od 300 milijuna tona plastike, od čega se samo 9% reciklira. Napori za rješavanje onečišćenja plastikom uključuju smanjenje upotrebe plastike za jednokratnu upotrebu, povećanje stope recikliranja i razvoj novih tehnologija za učinkovitiju razgradnju plastike. Međutim, još je dug put do rješavanja ovog globalnog problema i bit će potreban zajednički napor pojedinaca, vlada i industrije da se napravi stvarna razlika. Kao jedna od vrsta plastike koja stvara veliki problem je mikroplastika.

Mikroplastika su male plastične čestice manje od 5 milimetara. Mogu doći iz različitih izvora, uključujući razgradnju većih plastičnih predmeta, mikrozrnca u proizvodima za osobnu njegu i sintetička vlakna iz odjeće. Mikroplastika je značajan problem u okolišu jer je može progutati širok raspon divljih životinja, od sićušnog planktona do većih riba i sisavaca. Nakon što se progutaju, te se čestice mogu akumulirati u tkivima životinje i uzrokovati niz zdravstvenih problema, uključujući probavne probleme, hormonsku neravnotežu i reproduktivne probleme. Mikroplastika se također može prenositi na velike udaljenosti kroz zrak i vodu, šireći onečišćenje daleko izvan svog prvotnog izvora. Pronađena je u udaljenim područjima svijeta, poput Arktika i Antarktika, kao i u dubinama oceana. Utjecaj mikroplastike na ljudsko zdravlje još se proučava, no raste zabrinutost da bi te čestice mogle imati negativne učinke i na naše zdravlje. Mikroplastika je pronađena u vodi iz slavine, flaširanoj vodi, pa čak i u zraku koji udišemo, što izaziva zabrinutost u pogledu potencijalnih dugoročnih učinaka izloženosti. Postoji zabrinutost da bi plastika trebala biti klasificirana kao opasni otpad zbog svoje ekotoksičnosti i sposobnosti



da oslobodi štetne tvari u okolišu. Može sadržavati kemijske tvari poput ftalata, bisfenola A, poliklorirane bifenile te polibromirane dioksine koji djeluju kao endokrini disruptori i mogu poremetiti hormonalni sustav organizama. Izaziva neurotoksičnost, oksidativno oštećenje i promjene u energetsom metabolizmu organizama te utječe na imunološke parametre organizama, što može dovesti do smanjene otpornosti na bolesti. Uz sve negativne učinke, mikroplastika također može povećati rizik od bioakumulacije drugih onečišćujućih tvari u organizmima poput žive. [1-2] Napori za smanjenje onečišćenja mikroplastikom uključuju zabranu uporabe mikrozrna u proizvodima za osobnu njegu, poboljšanje praksi gospodarenja otpadom kako bi se spriječio ulazak plastike u okoliš i promicanje upotrebe biorazgradivih alternativa tradicionalnoj plastici. Međutim, potrebno je više istraživanja i djelovanja kako bi se riješio ovaj složeni i sveprisutni ekološki problem.

Uklanjanje mikroplastike iz vodenih okoliša može se postići primjenom naprednih tehnika razdvajanja, kao što su membranske filtracije, flotacija, elektrokoagulacija i adsorpcija. Adsorpcija je učinkovita metoda, gdje se koriste adsorbensi kao što su aktivni ugljen, zeoliti, hidrogelovi i modificirani polimerni materijali. Kombinacija koagulacije i flokulacije također se koristi za uklanjanje mikroplastike iz vode, gdje se dodaju koagulanti kako bi se formirale veće čestice koje se mogu lakše ukloniti. Postoje tehnike koje koriste superhidrofobne materijale koji privlače mikroplastiku s vodenih površina, što olakšava njezino uklanjanje. Uklanjanje mikroplastike iz otpadnih voda može se postići primjenom različitih procesa, uključujući aerobnu i anaerobnu biodegradaciju, kemijsku oksidaciju, membranske filtracije i kombinaciju više procesa. Postoje i procesi koje se fokusiraju na uklanjanje mikroplastike iz tla, poput fizičkog izvlačenja, primjene superhidrofobnih materijala i bioremedijacije uz pomoć mikroorganizama koji razgrađuju plastiku. Važno je razviti i primijeniti učinkovite postupke uklanjanja mikroplastike iz okoliša kako bi se smanjili njezini negativni utjecaji na biljni i životinjski svijet te ljudsko zdravlje. [3-6]

Biorazgradnja plastike, uključujući mikroplastiku, predstavlja proces u kojem mikroorganizmi, poput bakterija, gljiva i algi, razgrađuju plastične čestice na manje molekule koje se mogu razgraditi u prirodi. [7] Međutim, važno je napomenuti da je sposobnost mikroorganizama da razgrade plastiku ograničena, posebno kada se radi o sintetičkim materijalima poput polistirena. Ipak, istraživanja [8-9] pružaju perspektivu o različitim metodama biorazgradnje plastike, uključujući korištenje mikroorganizama odnosnotermofilnih bakterija i pripadajućih enzima.

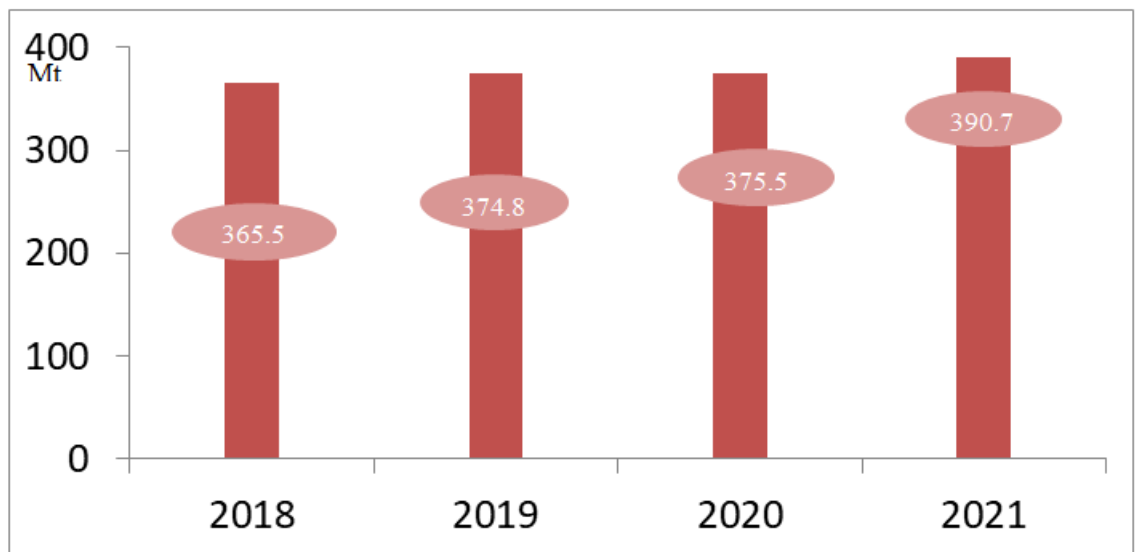
Enzimi imaju ključnu ulogu u procesu biorazgradnje plastike. Lipaza, proteaza i amilaza mogu potaknuti razgradnju različite vrste plastike, uključujući polietilen, polipropilen i poliester. [10] Također istraživanje provedeno sa crvom obrovačem i njegovom sposobnošću da razgradi polistiren je pokazalo da isti mogu probaviti polistirenske čestice i izlučivati produkte razgradnje, to im omogućavaju bakterije *Enterobacter asburiae* i *Bacillus* sp.. [11] Proces biorazgradnje plastike može biti spor i zahtijeva optimizaciju uvjeta kako bi se postigla veća razgradnja.

U ovom radu su određivani optimalni uvjeti biorazgradnje polistirena primjenom bakterijske vrste *Bacillus subtilis*. Ekperiment je dizajniran prema punom faktorskom planu gdje se tijekom 30 dana pratila sama biorazgradnja polistirena uz izuzimanje uzorka svaki sedmi dan i uz različite analize su se odredili najoptimalniji uvjeti. Optimalni uvjeti za biorazgradnju PS-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis*: pH vrijednost = 7,05, 159,84 o/min, i vrijednost OG = 0,5.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Plastika

Polimeri nisu ljudski izum, priroda je puna takvih molekula koje se sastoje od puno jednakih jedinica povezanih zajedno. Primjeri polimera su celuloza, svila, guma, mišićna vlakna, rog, kosa i DNK. Plastika je ljudski izum te je to općeniti pojam koji se obično koristi za umjetne, tj. sintetičke polimere te se smatra kao jednom od najtraženijih sirovina što se može vidjeti i po samim brojkama proizvodnje. Nakon stagnacije u 2020. godini uzrokovane pandemijom COVID-19, globalna proizvodnja plastike povećala se na 390,7 milijuna tona u 2021. godini, što je vidljivo na **slici 2.1.**



**Slika 2.1.** Prikaz proizvodnje plastike tijekom u razdoblju od 4 godine [12]

U **tablici 2.1.** mogu se vidjeti neke od najčešće korištenih plastika.

**Tablica 2.1.** Vrste plastike

<b>Polietilen (PE)</b>	Polietilen je najčešća vrsta plastike koja se koristi u proizvodnji raznih predmeta, uključujući vrećice za jednokratnu upotrebu, plastične boce, omote za hranu i mnogo više.
<b>Polipropilen (PP)</b>	Polipropilen se često koristi za proizvodnju plastičnih kontejnera, bočica za napitke, automobilskih dijelova i mnogih drugih proizvoda.
<b>Polivinilklorid (PVC)</b>	PVC se koristi u građevinskoj industriji za cijevi, prozore, stolariju, ali se također nalazi u mnogim drugim proizvodima poput igračaka, obuće i medicinske opreme.
<b>Polistiren (PS)</b>	Polistiren se često koristi za proizvodnju ambalaže, stiropora, plastičnih čaša, tanjura i drugih laganih predmeta.
<b>Polietilen tereftalat (PET)</b>	PET se koristi za proizvodnju plastičnih boca za piće, pakiranje hrane i tekstilnih vlakana.
<b>Polikarbonat (PC)</b>	Polikarbonat se koristi za izradu prozirnih ili prozirnih predmeta, kao što su naočale, boce, prozori, ali se također koristi u elektronici i medicini.
<b>Poliuretan (PU)</b>	Poliuretan se koristi u proizvodnji pjena, izolacijskih materijala, presvlaka, spužvi i drugih fleksibilnih materijala.

Alexander Parkes je prvi čovjek koji je napravio polimer, nije bio u potpunosti sintetski (1850-ih godina), obrađivanjem celuloze dušičnom kiselinom stvorio je termoplast nitroceluloza. Međutim, Parkes nije imao veliki komercijalni uspjeh te je John Wasley Hyatt eksperimentirao i pronašao način proizvodnje čvrstih, stabilnih nitroceluloza koje je patentirao kao celuloid. [13] Celuloid je tako postao prvi komercijalno uspješan polimer koji je napravio čovjek. Prvi istinski sintetski polimer izumio je belgijsko-američki kemičar Leo Baekeland, koji je spojio fenol i formaldehid u prvu sintetiku duroplast. Duroplasti se razlikuju od termoplasta. Podvrgavaju se kemijskoj promjeni kada se zagrijavaju tvoreći trostruku dimenzionalnu mrežu koja je nepovratna. Za razliku od termoplasta, duroplasti ne mogu biti ponovno topljeni i reformirati se. Za početke plastičnog doba se smatraju bakelit i celuloid dok su danas celuloid i bakelit uglavnom od povijesnog interesa i većina predmeta izrađeni od njih kolekcionarski su predmeti. Prva moderna plastika bio je polivinil klorid (PVC) i još uvijek se proizvodi i koristi u velikim količinama. Čisti PVC je ipak previše krut i krt da bi bio upotrebljiv. 1920-ih, počeli su se dodavati plastifikatori, koji su materijal učinili mekšim i više fleksibilnijim od čistog polimera. Dodavanje aditiva stvorilo je prvu modernu plastiku. Gotovo sva plastika sadrži značajne količine kemijskih dodataka kako bi se modificirala i poboljšala njihova svojstva. [13]

Velika većina plastike temelji se na ugljikovodicima, tj. prvenstveno molekulama izgrađenim od vodika i ugljika. Alternativna plastična taksonomija razlikuje izvore ugljika u polimerima na obnovljive i neobnovljive. Obnovljivi izvori plastike su oni koji dolaze iz obnovljivih izvora, odnosno iz biomase. Primjeri bioplastike uključuju polilaktičnu kiselinu (PLA), polihidroksialkanoate (PHA), polietilentereftalate (PET) i biobazirane polietilene. Neobnovljivi izvori energije su oni koji se temelje na ograničenim resursima koji se ne mogu brzo obnoviti, kao što su fosilna goriva. Primjeri plastike s neobnovljivim izvorima ugljika uključuju: polistiren (PS), polietilen (PE), polipropilen (PP) i polivinilklorid (PVC). [14]

Plastika je u zadnjih 200 godina, od njezinog prvog sintetiziranja, neizmjenjivo uznapredovala te se koristi svakodnevno u raznim aspektima života. Omogućila je tehnološki napredak, razna rješenja i poboljšanja prilikom svakodnevnih izvedbi te financijske uštede. [13] Nažalost s benefitima dolaze i nedostaci. Plastika je globalni izazov koji donosi brojne probleme za okoliš. Jedan od ključnih problema je onečišćenje okoliša koje nastaje kao posljedica rasprostranjenosti plastičnog otpada. Plastični materijali završavaju u vodama, kopnenim područjima, pa čak i udaljenim i osjetljivim ekosustavima. Ovo onečišćenje ima štetne učinke na biljni i životinjski svijet, uzrokujući smrt i ozljede mnogih vrsta. Dodatno, plastični otpad ima izuzetno dug vijek trajanja, zbog čega se akumulira u okolišu i stvara dugoročno onečišćenje. Plastika se razgrađuje vrlo sporo, što dovodi do stvaranja mikroplastike. Mikroplastika se može naći u vodi, tlu i zraku, te se širi kroz ekosustav i utječe na životinje i ljude. Osim toga, plastični otpad ugrožava morske organizme. Mnoge vrste morskih životinja, uključujući ptice, ribe i morske sisavce, mogu se zapetljati u plastične predmete ili ih zamijeniti hranom, što dovodi do ozljeda, gušenja i smrti. Onečišćenje tla i voda također je ozbiljan problem povezan s plastikom. Kada se plastika razgrađuje ili otpušta kemikalije, one mogu prodrijeti u tlo i podzemne vode, negativno utječući na biljni svijet i ugrožavajući ljudsko zdravlje. Nadalje, proizvodnja plastike iz fosilnih goriva pridonosi emisiji stakleničkih plinova, što ima negativne posljedice po klimatske promjene.

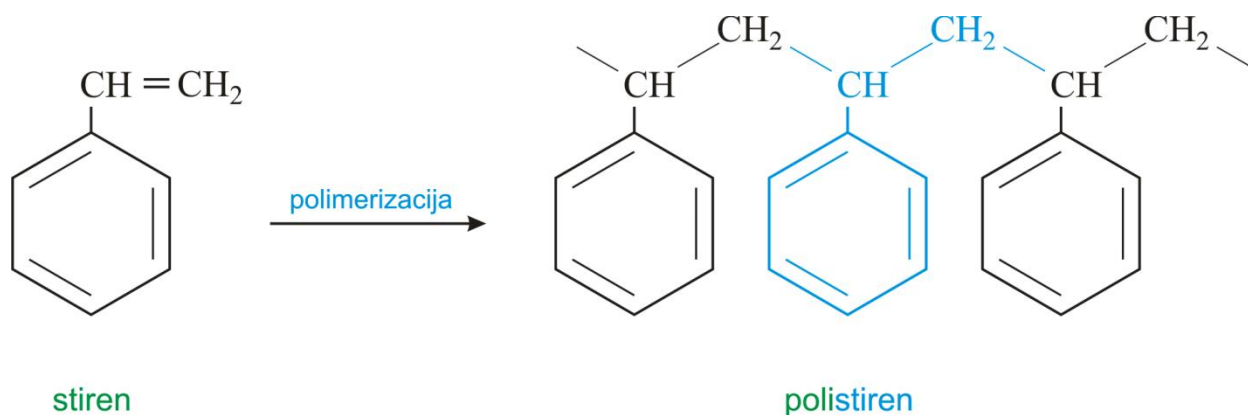
Suočeni s tim problemima, sve veći naglasak stavlja se na korištenje obnovljivih izvora za plastiku iz nekoliko važnih razloga. Prvo, želimo smanjiti ovisnost o fosilnim gorivima, koja je karakteristična za tradicionalnu proizvodnju plastike. Korištenje obnovljivih izvora, poput biljnih materijala ili biomase, pomaže smanjiti emisije stakleničkih plinova i iscrpljivanje ograničenih fosilnih resursa. Osim toga, želimo smanjiti negativne utjecaje plastike na okoliš. Tradicionalna plastika ima dug vijek trajanja i može onečišćivati tlo, vode i ekosustave. Plastika dobivena iz

obnovljivih izvora često ima svojstva biorazgradivosti ili kompostabilnosti, što pomaže u smanjenju negativnih utjecaja na okoliš. Također, okretanje obnovljivim izvorima za plastiku potiče održivi razvoj i kružnu ekonomiju. Kružna ekonomija promiče ponovnu uporabu, recikliranje i obnovu materijala kako bi se smanjila potrošnja resursa. Korištenje obnovljivih izvora za plastiku stvara održive tokove materijala i potiče stvaranje novih tehnologija i inovacija. Na kraju, prelazak na obnovljive izvore za plastiku može otvoriti prostor za istraživanje i razvoj novih materijala i procesa, s ciljem smanjenja utjecaja na okoliš, poboljšanja performansi i otvaranja novih poslovnih mogućnosti. Sve u svemu, okretanje obnovljivim izvorima za plastiku ima ključnu ulogu u stvaranju održivijeg i manje štetnog pristupa plastičnoj industriji.

Plastika se može proizvoditi u različitim veličinama ovisno o njezinoj namjeni. Stoga prema veličini čestica plastika se dijeli na makroplastiku (>25 mm), mezoplastiku (<25 mm – 5 mm), mikroplastiku koju još dijelimo na veću mikroplastiku (1 mm – 5 mm) i manju mikroplastiku (1 μm – 1 mm), te nanoplastiku (<1 μm). [15]

## 2.2. Polistiren

Polistiren je sintetski polimer napravljen od monomera stirena, **slika 2.2.** To je naširoko korištena plastika koja se može naći u raznim proizvodima, uključujući pjenastu ambalažu, jednokratne čaše i tanjure, kutije za CD i izolaciju.



**Slika 2.2.** Kemijska struktura polistirena

Polistiren je lagan i čvrst materijal koji se lako proizvodi, što ga čini popularnim izborom za pakiranje i proizvode za jednokratnu upotrebu. Međutim, nije biorazgradiv i mogu proći stotine godina da se razgradi, što dovodi do zabrinutosti o njegovom utjecaju na okoliš. [16]

Polistiren je termoplast, što znači da se može više puta taliti i ponovno oblikovati bez gubitka svojih kemijskih svojstava. Može se proizvesti u dva oblika: čvrsti i pjenasti. Ima nisko talište i vrlo je zapaljiv, što ga čini opasnim za požare. Kako bi se riješio ovaj problem, proizvodi od polistirena često se tretiraju usporivačima plamena. Također se može razgraditi u male komadiće koji se nazivaju mikroplastika, a koje morski život može progutati i nanijeti štetu ekosustavu. Recikliranje polistirena može biti izazovno zbog njegove male težine i glomaznosti. Međutim, neka postrojenja za recikliranje mogu ga prihvatiti i pretvoriti u nove proizvode kao što su izolacija, okviri za slike i ukrasne letvice. [16-18] Općenito, dok je polistiren koristan materijal u mnogim primjenama zbog svoje niske cijene, male težine i izolacijskih svojstava, on također značajno pridonosi onečišćenju okoliša i nastajanju otpada.

**Tablica 2.2.** Fizikalno kemijska svojstva polistirena

<b>Kemijska otpornost</b>	Polistiren je otporan na većinu kemijskih tvari, uključujući vodu, kiseline, lužine i soli. Međutim, može biti osjetljiv na neke organske otapala i kemikalije visoke koncentracije.
<b>Transparentnost</b>	Polistiren je izrazito proziran materijal, što ga čini popularnim izborom za ambalažu i proizvode koji zahtijevaju transparentnost, poput plastičnih čaša, vrećica ili prozirnih kutija.
<b>Gustoća</b>	Polistiren ima relativno nisku gustoću, što ga čini laganim materijalom. Gustoća polistirena se kreće između 1.04 i 1.09 g/cm <sup>3</sup> .
<b>Krutost i čvrstoća</b>	Polistiren je krut materijal s visokim modulom elastičnosti. Ima dobru čvrstoću na savijanje, ali može biti krhkiji u usporedbi s drugim plastikama, posebno pri niskim temperaturama.
<b>Toplinska svojstva:</b>	Polistiren ima relativno nisku toplinsku provodljivost i dobra izolacijska svojstva. Talište polistirena iznosi otprilike 240-260 °C, dok temperaturu staklenog prijelaza ima na otprilike 100 °C.
<b>Električna svojstva</b>	Polistiren je dobar električni izolator. Ima nisku električnu vodljivost i dobra dielektrična svojstva.
<b>Otpornost na vlagu</b>	Polistiren je relativno otporan na vlagu, ali može apsorbirati vlagu s vremenom, što može utjecati na njegova mehanička svojstva i dimenzionalnu stabilnost.

### 2.3. Mikroplastika

Mikroplastika su sitne čestice plastike koje nastaju razvojem komercijalnih proizvoda i razgradnjom veće plastike. Kao onečišćivač, mikroplastika može biti štetna za okoliš i zdravlje životinja. Kao jedni od najzastupljenijih mikroplastičnih polimera se smatraju polietilen, polistiren i polipropilen. [19] Prisutnost mikroplastike u okolišu izaziva veliku zabrinutost jer je postojana, nosi potencijalno toksične tvari i vodeni organizmi je nažalost ne mogu izbjeći. [20] Mikroplastika zapravo predstavlja male čestice plastičnih materijala u rasponu od 1  $\mu\text{m}$  do 5 mm. [21] Na **slici 2.3.** može se vidjeti veličina mikroplastike na prstu odrasle osobe.



**Slika 2.3.** Mikroplastika

Veličina je važan čimbenik mikroplastike jer određuje raspon organizama na koje može utjecati. Mikroplastika se dijeli na primarni i sekundarni tip. Primarna je zapravo proizvedena u obliku sitnih peleta ili perli dok sekundarna nastaje fizikalno kemijskom transformacijom većih komada plastike. [22] Primarna mikroplastika u okoliš dolazi direktno iz industrijskih tvornica, prilikom proizvodnje plastičnih proizvoda. Takva plastika se može dodatno obrađivati ili ostati u izvornim oblicima. Koriste se u kozmetičkim proizvodima poput tzv. peeling-a, dodaju se u paste za zube, dekorativnu kozmetiku, proizvode za čišćenje domaćinstva i sredstva za abrazivno pjeskarenje površina. [23] Primarna mikroplastika u okoliš ulazi na više načina, ovisno o načinu primjene.



Kroz otpadne vode će najviše dospjeti čestice iz kozmetičkih proizvoda, dok će iz abrazivnog pjeskarenja ući najviše kroz atmosferu. Upravo zbog svoje veličine primarna mikroplastika može vrlo lako dospjeti u vodeni okoliš tako što se ne zadržava na filterima za pročišćavanje otpadnih voda. [24] Sekundarna mikroplastika nastaje degradacijom ili usitnjavanjem otpadne plastike u okolišu, trošenjem brodske opreme i ribolovnog alata, automobilskih guma te ispuštanjem mikrovlakana. [25] Plastični otpad je u prirodi izložen raznim vanjskim utjecajima poput sunčevog zračenja, vjetra i slično koji uzrokuju zapravo stvaranje sekundarne plastike uslijed kemijske promjene polimera. [26] Ulazak sekundarne mikroplastike u okoliš se može odviti putem pranja tekstila u otpadnu vodu ili u zrak, trošenjem raznih predmeta uslijed svakodnevnim korištenjem, ali i djelovanjem prirodnih pojava. [27] Na **slici 2.4.** se može vidjeti razlika između primarne mikroplastike koja je pravilnijeg oblika te sekundarne mikroplastike koja je nepravilnog oblika.



**Slika 2.4.** a) primarna mikroplastika, b) sekundarna mikroplastika

### *2.3.1. Prisutnost mikroplastike u okolišu*

Prisutnost mikroplastike u okolišu je ozbiljan problem koji se sve više prepoznaje širom svijeta. Mikroplastika se odnosi na male čestice plastike koje se mogu formirati iz različitih izvora kao što su plastične boce, vrećice, tekstil, kozmetika itd. Mikroplastika ima širok raspon utjecaja na okoliš. Prvo, može onečistiti vode, uključujući rijeke, jezera i oceane kao i druge vodene ekosustave. To može uključivati mikroplastične čestice koje dolaze iz otpadnih voda, otpada koji se ispušta iz industrije, ribarskih mreža, kao i raspadanje većih plastičnih predmeta na manje

čestice. Kada se mikroplastika ispusti u vodu, može se akumulirati u ribama, školjkama i drugim morskim organizmima koji je konzumiraju. To može imati negativne posljedice za morske ekosustave i zdravlje ljudi koji se hrane tim organizmima. Drugo, mikroplastika može imati štetne učinke na kopnene ekosustave. Može završiti u tlu putem primjene komposta koji sadrži plastiku, nanošenja malča koji sadrži plastiku ili raspadanja plastičnih materijala u tlu. Kada se plastični otpad razgrađuje, može otpuštati kemikalije koje mogu onečistiti tlo i biljke. To može imati negativan utjecaj na poljoprivredu i ekosustave na kopnu. Jedan primjer aditiva koji se često koristi u plastici su ftalati. Ftalati su kemijske tvari koje se koriste za povećanje fleksibilnosti i otpornosti plastike. Međutim, neki ftalati, poput bisfenola A (BPA) i dioktilftalata (DEHP), mogu biti štetni za okoliš i ljudsko zdravlje. Oni se mogu oslobađati iz plastike tijekom razgradnje ili kada je plastika izložena toplini ili oštećenjima. Kada se takvi aditivi otpuštaju u okoliš, mogu se adsorbirati na plastične čestice (mikroplastiku) koje se već nalaze u tlu. Ova adsorpcija može dodatno povećati koncentraciju štetnih tvari u tlu. Na primjer, ukoliko se u tlo unese plastika koja sadrži BPA, BPA se može otpustiti iz plastike i adsorbirati na mikroplastiku prisutnu u tlu. To može predstavljati problem jer se mikroplastika može koristiti kao supstrat za rast mikroorganizama. Nadalje, postoji i mogućnost da se onečišćujuće tvari koje već postoje u tlu adsorbiraju na plastične čestice. Primjerice, teški metali poput žive ili organski onečišćivači prisutni u tlu mogu se vezati za mikroplastiku, čime se povećava njihova koncentracija u okolišu. [28] Treće, istraživanja su pokazala da se mikroplastika može naći u zraku, posebno u urbanim područjima. To može biti rezultat raspadanja plastike ili otpuštanja mikroplastičnih čestica iz proizvoda poput guma na vozilima. Četvrto, mikroplastika se može akumulirati u hrani. Ribe i drugi morski organizmi mogu konzumirati mikroplastiku koja se nalazi u vodi, dok biljke mogu adsorbirati mikroplastiku koja se nalazi u tlu. Također važno za napomenuti je to da plastični materijali koji se razgrađuju na suncu mogu stvarati mikroplastiku koja se zatim raspršuje u okoliš.

Kako bi se smanjila prisutnost mikroplastike u okolišu, potrebno je poduzeti niz mjera. To uključuje smanjenje korištenja jednokratnih plastičnih proizvoda, poboljšanje postupaka recikliranja plastike, edukaciju javnosti o problemu mikroplastike i podršku istraživanjima koja proučavaju njezine utjecaje i moguća rješenja. Važno je da se svaki pojedinac informira o problemu mikroplastike i poduzme korake kako bi smanjio svoju vlastitu potrošnju plastike i promicao održivije alternative. Razvoj tehnologija za uklanjanje mikroplastike iz okoliša je

aktivno područje istraživanja. Postoje inovativne metode poput filtriranja, magnetizacije, uporabe enzima i drugih tehnologija koje se proučavaju kako bi se učinkovito uklonila mikroplastika iz vode i drugih medija.

Količina mikroplastike (MP) koja se nalazi u pojedinom ekosustavu može varirati ovisno o mnogim faktorima, kao što su geografska lokacija, stupanj ljudske aktivnosti, vrsta ekosustava i drugi čimbenici. Također, važno je napomenuti da pronalaženje i kvantifikacija MP-a može biti izazovna zbog različitih metoda uzorkovanja i analize, no jedne od najčešćih mikroplastika u okolišu mogu se vidjeti u **tablici 2.3**.

**Tablica 2.3.** Prisutnost mikroplastike u okolišu [29-33]

---

<b>Voda</b>	<p>Mikročestice: To su fragmenti većih plastičnih predmeta koji su se razbili na manje dijelove. Mogu potjecati od odbačenih plastičnih boca, vrećica, ambalaže ili drugih predmeta koji su se raspali zbog izlaganja suncu, morskoj vodi i mehaničkim silama.</p> <p>Mikrovlakna: Ove čestice mikroplastike su vrlo male i često dolaze iz sintetičkih tekstila kao što su poliester, najlon ili akril. Kada peremo odjeću napravljenu od ovih materijala, mikrovlakna se mogu isprati u odvodne sustave i na kraju dospiju u mora i oceane putem otpadnih voda.</p> <p>Mikrokuglice: Mikrokuglice su sitne kuglice plastike koje se često koriste u kozmetici, osobnoj njezi i kućanstvu. Na primjer, mogu biti prisutne u pilinzima za tijelo, pastama za zube, šamponima i sredstvima za čišćenje. Kada se ispiru, mogu završiti u morskom okolišu putem otpadnih voda.</p>
<b>Tlo</b>	<p>Mikročestice: Mikroplastične čestice u tlu mogu nastati kao rezultat raspadanja većih komada plastike, kao što su ambalaža, vrećice ili predmeti za jednokratnu upotrebu. Ove čestice mogu se raspadati na manje dijelove uslijed izloženosti suncu, vjetru, kiši i drugim atmosferskim uvjetima.</p> <p>Mikrovlakna: Mikroplastika u tlu može potjecati i od otpadnih voda koje sadrže mikrovlakna iz sintetičkog tekstila. Kada peremo odjeću napravljenu od materijala kao što su poliester, akril ili najlon, mikrovlakna se ispiru i mogu završiti u tlu putem kanalizacijskog sustava.</p> <p>Filamenti i vlakna: Ove vrste mikroplastike mogu potjecati iz poljoprivrednih aktivnosti. Primjerice, plastika za mulčiranje koja se koristi u poljoprivrednim kulturama može se raspasti i pridonijeti prisutnosti mikroplastike u tlu. Također, plastični materijali koji se koriste u poljoprivrednom pakiranju i zaštiti usjeva mogu ostaviti tragove mikroplastike u tlu.</p>
<b>Zrak</b>	<p>Mikročestice: Mikroplastične čestice u zraku mogu potjecati od raspadanja većih plastičnih predmeta, kao što su ambalaža, vrećice, boce i drugi otpad. Te čestice mogu biti izložene sunčevoj svjetlosti, vjetru i mehaničkom trošenju te se raspadaju na manje dijelove koji se zatim mogu dispergirati u zrak.</p> <p>Mikrovlakna: Ova vrsta mikroplastike dolazi iz sintetičkih tekstila kao što su poliester, akril ili najlon. Kada peremo odjeću napravljenu od tih materijala, sitna vlakna se otpuštaju u zrak i mogu se transportirati na znatne udaljenosti.</p> <p>Gume: Mikroplastika u zraku može potjecati i od trošenja guma na prometnicama. Gume se s vremenom troše i oslobađaju čestice, uključujući mikroplastiku, koja se onda može raspršiti u zrak.</p>

---

### 2.3.2. Sudbina mikroplastike u okolišu

Sudbina mikroplastike u okolišu obuhvaća različite moguće ishode i procese:

- **Raspadanje:** mikroplastika se može razgraditi, ali taj proces obično traje jako dugo. Plastika je kemijski otporna na prirodne razgradne procese, kao što su sunčeva svjetlost, voda i mikroorganizmi. Raspadanje plastike ovisi također i o vrsti materijala. Na primjer, polietilen (PE), koji je jedan od najčešće korištenih plastičnih materijala, procjenjuje se da može trajati od 10 do 20 godina u prirodi prije nego što se potpuno razgradi. Polistiren (PS), koji se koristi u raznim oblicima poput pjene i tvrde plastike, može trajati od 500 do 1000 godina prije potpunog raspadanja. Polivinilklorid (PVC), često korišten u građevinskoj industriji i proizvodnji cijevi, može trajati više od 100 godina prije potpunog raspadanja. Važno je napomenuti da su ove procjene općenite i mogu varirati ovisno o uvjetima okoline kao što su temperatura i vlažnost. Također, proces raspadanja plastike može rezultirati stvaranjem mikroplastike koja se dalje može zadržavati u okolišu. [34]
- **Akumulacija u organizmima:** mikroplastika može se akumulirati u raznim organizmima prisutnih okolišu. Riblje vrste, rakovi, školjke i drugi organizmi mogu nenamjerno konzumirati mikroplastiku dok se hrane. Te čestice mogu ostati zarobljene u njihovim probavnim traktima, tkivima ili organima, čime se povećava koncentracija mikroplastike unutar njihovih tijela.  
→ Provedeno je istraživanje na ribljim populacijama estuara Mondego, Portugal gdje je cilj bio procijeniti prisutnost gutanja mikroplastike kod triju komercijalnih ribljih vrsta: morske basse (*Dicentrarchus labrax*), morske brasne (*Diplodus vulgaris*) i kamenjara (*Platichthys flesus*). Mikroplastika je izdvojena iz probavnog trakta 120 jedinki vizualnim pregledom i pomoću otopine za probavu. Ukupno je izvađeno 157 čestica iz 38% ukupnih riba (96% vlakana), s prosječno  $1,67 \pm 0,27$  mikroplastike po ribi. Značajno veća količina unesene mikroplastike zabilježena je kod *D. vulgaris* (73%). Dominantni polimeri identificirani  $\mu$ -FTIR metodom bili su poliester, polipropilen i rayon (polusintetička vlakna). [35]
- **Prenošenje kroz prehrambeni lanac:** nedavna istraživanja su pokazala prisutnost mikroplastike u uzorcima ribe, školjki i drugih morskih organizama diljem svijeta. Studije su identificirale mikroplastiku u probavnim traktima riba, njihovim mišićima i drugim tkivima. Ove čestice mogu doći u prehrambeni lanac kroz konzumaciju planktona i drugih organizama

koji su kontaminirani mikroplastikom te iste se mogu prenositi na više razine u prehrambenom lancu, a također ih i čovjek može konzumirati kroz ishranu. [36]

- Potencijalni toksični učinci: mikroplastika može imati toksične učinke na organizme. Istraživanja su pokazala da neki oblici mikroplastike mogu otpuštati kemikalije koje su štetne za živa bića. Među kemikalijama koje su pronađene u vezi s mikroplastikom, neke od najčešće spominjanih su bisfenol A (BPA), ftalati, poliklorirani bifenili (PCB), poliklorirani dioksini (PCDD), poliaromatski ugljikovodici (PAH) i ostali organski spojevi. BPA je kemikalija koja se koristi kao aditiv u plastici, a povezan je s hormonalnim poremećajima. Upotreba BPA-a regulirana je različito u različitim zemljama i regijama diljem svijeta, u Europskoj uniji, Kanadi, SAD-u BPA je zabranjen za uporabu u proizvodnji bočica za hranu i dječje proizvode. Ftalati se koriste kako bi se plastika učinila fleksibilnijom, a određeni ftalati, poput DEHP-a, su zabranjeni ili ograničeni zbog mogućih štetnih učinaka na reproduktivni sustav. PCB-i su kemijski spojevi koji su se nekada široko koristili, a mogu se naći u starijim plastičnim materijalima. Oni su perzistentne organske tvari (POP-ovi) i povezani su s neurotoksičnošću i poremećajima imunološkog sustava. Utjecaj i otpuštanje ovih kemikalija ovise o različitim čimbenicima poput vrste plastike, proizvodnih metoda i uvjeta okoline. Ove kemikalije mogu imati negativne učinke na rast, reprodukciju, imunološki sustav i druge biološke funkcije organizama. [37-38]
- Interakcija s mikroorganizmima: mikroorganizmi, poput bakterija i algi mogu vršiti interakcije s mikroplastikom. Oni mogu kolonizirati površine mikroplastike i promijeniti svoje fizičke i kemijske karakteristike. Ove promjene mogu utjecati na ponašanje i sudbinu mikroplastike u okolišu.

## 2.4. Toksičnost mikroplastike

Mikroplastika može predstavljati rizik od toksičnosti i za divlje životinje i za ljude. Ove male plastične čestice mogu sadržavati aditive i kemikalije koje su otrovne, poput ftalata, bisfenola A (BPA) i usporivača plamena. Te kemikalije mogu iscuriti iz plastike i ući u okoliš, potencijalno uzrokujući štetu organizmima koji ih progutaju. [39] Studije su pokazale da se mikroplastika može nakupljati u tkivima životinja i uzrokovati niz zdravstvenih problema, uključujući upale,

oksidativni stres i oštećenje DNK. Te čestice također mogu poremetiti rad endokrinog sustava, što može utjecati na rast i reprodukciju. [40] Osim toksičnosti samih plastičnih čestica, također postoji zabrinutost zbog mogućnosti mikroplastike da djeluje kao prijenosnik drugih onečišćivala u okolišu, poput postojanih organskih onečišćivala (POP) i teških metala. Te se kemikalije mogu adsorbirati na površinu mikroplastike i prenositi na velike udaljenosti, potencijalno povećavajući njihovu toksičnost i rizik od izloženosti. [41]

Ispitivanje toksičnosti je postupak koji se koristi za određivanje potencijalne štete tvari za žive organizme, uključujući ljude. Postoje različite metode za ispitivanje toksičnosti tvari, a izbor metode ovisi o čimbenicima kao što su vrsta tvari, namjeravana uporaba tvari i dostupnost resursa. Neke uobičajene metode za ispitivanje toksičnosti uključuju:

- 1) Testovi akutne toksičnosti: ovi testovi se provode kako bi se utvrdili štetni učinci jednokratnog izlaganja tvari tijekom kratkog razdoblja, obično 24 do 96 sati.
- 2) Testovi kronične toksičnosti: ovi testovi se provode kako bi se utvrdili štetni učinci dugotrajne ili opetovane izloženosti tvari tijekom duljeg razdoblja, obično nekoliko tjedana ili mjeseci.
- 3) Testovi mutagenosti i genotoksičnosti: ovi testovi se provode kako bi se utvrdilo može li tvar uzrokovati genetske mutacije ili oštećenje DNK.
- 4) Testovi ekotoksičnosti: ovi testovi se provode kako bi se utvrdili štetni učinci tvari na neljudske organizme i okoliš. Testovi obično uključuju izlaganje organizama, poput algi, rakova ili riba, različitim koncentracijama tvari i praćenje učinaka na rast, reprodukciju i stope smrtnosti.
- 5) *In vitro* testovi: Ovi testovi koriste stanične kulture ili uzorke tkiva za proučavanje učinaka tvari na žive stanice ili tkiva. Odabir metode za ispitivanje toksičnosti ovisi o nekoliko čimbenika, uključujući specifična svojstva tvari koja se ispituje, dostupnost resursa i etička razmatranja korištenja životinja u ispitivanju. [42]

Ispitivanja ekotoksičnosti provode se na širokom rasponu organizama, najčešće se provode na različitim organizmima kako bi se procijenio utjecaj tvari na živa bića i ekosustave. Organizmi koji se često koriste u testovima ekotoksičnosti uključuju:

- 1) bakterije: Bakterije se često koriste za procjenu toksičnosti kemikalija jer se brzo razmnožavaju i imaju osjetljive biokemijske procese. (*Vibrio fischeri*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*)

- 2) alge: Testiranje na algama važno je za procjenu utjecaja kemikalija na morske i slatkovodne ekosustave. (*Selenastrum capricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Chlorella vulgaris*)
- 3) vodene beskralješnjake: Ovo uključuje različite organizme poput vodenih buha, vodenih stršljena, dafnija i drugih organizama koji se često koriste u testovima ekotoksičnosti zbog njihove osjetljivosti i širokog raspona bioloških interakcija.
- 4) ribe: Različite vrste riba, poput zebrića (*Danio rerio*) ili kišnih pastrva (*Oncorhynchus mykiss*), često se koriste za procjenu utjecaja kemikalija na vodene ekosustave, jer su ribe važan dio akvatičnih lanaca prehrane.
- 5) kukci: Različite vrste kukaca, poput pčela, leptira, komaraca ili muha, koriste se za testiranje utjecaja kemikalija na insekte, koji igraju ključnu ulogu u oprašivanju i održavanju ekosustava.
- 6) vodeni organizmi: To uključuje različite organizme koji obitavaju u vodenim okolišima, poput rakova, puževa, kolutića, vodenih buha i drugih organizama. [43]

Važno je napomenuti da se izbor organizama za testiranje ekotoksičnosti temelji na specifičnim zahtjevima istraživanja i ciljevima procjene. Različite vrste organizama mogu se koristiti ovisno o vrsti kemikalija ili tvari koje se ispituju i okolišu koji se simulira u laboratorijskim uvjetima. uključujući vodene i kopnene vrste, kako bi se procijenila potencijalna toksičnost tvari u različitim dijelovima okoliša.

No većina testova ekotoksičnosti se provodi na vodenim organizmima zato što su vodeni ekosustavi često osjetljiviji na onečišćenja od kopnenih ekosustava. Vodeni organizmi su u izravnom kontaktu s vodom, što može biti glavni put izlaganja onečišćivačima, a često su i u osnovi hranidbenog lanca, što može dovesti do nakupljanja onečišćivala u višim razinama. Osim toga, vodeni ekosustavi često su složeniji od kopnenih ekosustava, sa širokim rasponom vrsta i međudjelovanja, što čini većim izazovom predviđanje potencijalnih ekoloških utjecaja onečišćivala. [44-45] Nadalje, mnogi testovi ekotoksičnosti provode se na vodenim vrstama jer ih je relativno lako održavati u laboratorijskim uvjetima i mogu se razmnožavati u velikom broju, što ih čini prikladnima za standardizirane protokole ispitivanja. Osim toga, vodene vrste kao što su ribe, rakovi i alge važni su ekološki i ekonomski. [44]

Rezultati testa ekotoksičnosti pokazuju toksične učinke tvari na žive organizme ili ekosustave. Ovisno o vrsti ispitivanja, rezultati mogu pokazati koncentraciju tvari koja uzrokuje određenu



razinu toksičnosti (npr. letalna koncentracija ili učinkovita koncentracija), učinke tvari na rast, reprodukciju ili ponašanje organizama ili utjecaj na strukturu i funkciju ekosustava. Pokazatelji kojima se iskazuje toksičnost su sljedeći:

**LC<sub>50</sub>** (eng. *Lethal Concentration*) – koncentracija koja uzrokuje smrt 50% populacije

**EC<sub>50</sub>** (eng. *Effective Concentration*) – koncentracija koja uzrokuje štetan učinak kod 50% populacije

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

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

Općenito, rezultati ispitivanja ekotoksičnosti daju informacije o potencijalnim rizicima tvari za okoliš i mogu se koristiti za procjenu sigurnosti kemikalija i proizvoda prije nego što se ispuste u okoliš. Rezultati se također mogu koristiti za razvoj strategija upravljanja rizikom i propisa za zaštitu okoliša i ljudskog zdravlja.

**Tablica 2.4.** Utjecaji nano i mikroplastike na fotosintetske organizme [46]

Vrsta	Vrsta plastike	Veličina	Koncentracija	Vrijeme izlaganja	Učinak
<i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Thalassiosira weissiflogii</i>	PE	350 µm	0 do 1 mg/L	48h	Nema utjecaja na rast stanica <i>T. weissiflogii</i> . Izloženost PEN-u uzrokovala je inhibiciju rasta <i>S. subspicatus</i> za sve testirane koncentracije izloženosti  Oporavak nakon nekog vremena
<i>Raphidocelis subcapitata</i> , <i>Skeletonema costatum</i>	PS, PP, PET, PVC	1000 µm	80 g/L	72h	Inhibiraju rast algi
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	PE, PVC	150 µm 250 µm	50, 1000, 50 000 mg/L	4 do 9 dana	Nema utjecaj na rast algi i nakupljanje lipida nakon 4 dana, ali su minimizirale inhibiciju algi
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	PS	300 – 600 nm	5 – 10 mg/L	10 dana	Gustoća mikroalgi smanjivala se kako je koncentracija plastike rasla: najveći inhibicijski postotak bio je 45,8%. Smanjenje fluorescencije klorofila / fotosintetske aktivnosti. Oštećenja membrane.
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	PS	0.1 - 5 µm	64 mg/L	96h	Antagonističko djelovanje
<i>Euglena gracilis</i>	PS	100 nm, 5 µm	1 mg/L	96h	Toksičnost mikroplastike je veća od nanoplastike (inhibicija rasta, oksidativna oštećenja i smanjenje pigmentacije fotosinteze).  Mikroplastika izazvala je kavitaciju i povećanje broja i volumena vakuola.

#### 2.4.1. Test ekotoksičnosti pomoću bakterije *Vibrio fischeri*

*Vibrio fischeri* je vrsta bioluminiscentne bakterije koja se često koristi u testovima toksičnosti. Bakterije emitiraju svjetlost, što se može vidjeti na **slici 2.5.**, kada su metabolički aktivne, a intenzitet svjetlosti može se mjeriti kao pokazatelj metaboličke aktivnosti bakterije. U ispitivanju toksičnosti, bakterije su izložene tvari, a intenzitet svjetlosti koju emitira bakterija mjeri se tijekom vremena. Ako je tvar toksična, ona će inhibirati metaboličku aktivnost bakterija, a intenzitet svjetlosti koju emitiraju bakterije će se smanjiti. *Vibrio fischeri* posebno je koristan za brzu provjeru toksičnosti uzoraka vode, jer se test može završiti relativno brzo. [47-48]

Metoda inhibicije enzima luciferaze temelji se na sposobnosti određenih tvari da inhibiraju ili smanje aktivnost enzima luciferaze. Luciferaza je enzim koji katalizira kemijsku reakciju koja dovodi do svjetlosnog oslobađanja u bioluminiscenciji. Princip metode inhibicije enzima luciferaze uključuje dodavanje potencijalnog inhibitora u reakcijsku smjesu koja sadrži enzim luciferazu, supstrat i potrebne koenzime. Ako inhibitor ima afinitet prema luciferazi, on se može vezati za enzim ili promijeniti njegovu konformaciju, što dovodi do smanjenja enzimske aktivnosti. Ova metoda je korisna u proučavanju interakcija enzima s potencijalnim inhibitorima, identifikaciji novih tvari s inhibicijskim svojstvima, kao i u farmakološkim istraživanjima za razvoj lijekova. Također se može primijeniti za testiranje toksičnosti tvari koje mogu djelovati kao inhibitori enzima luciferaze.



**Slika 2.5.** *Vibrio Fischeri* u mraku

## **2.5. Postupci uklanjanja mikroplastike iz vode**

Uklanjanje mikroplastike iz vodenih okoliša zahtijeva primjenu naprednih tehnika koje se kontinuirano razvijaju kako bismo postigli što veću učinkovitost. Membranske filtracije su jedan od glavnih načina za uklanjanje mikroplastike iz vode. Ove tehnike uključuju upotrebu poroznih membrana različitih veličina pora koje omogućuju prolaz vode, ali zadržavaju čestice mikroplastike. Membranska filtracija, poput nanofiltracije i obrnute osmoze, može postići visoku učinkovitost u uklanjanju mikroplastike iz vode. Postotak uklanjanja može biti iznad 95% ili čak blizu 100%. [3-6]

Adsorpcija je također vrlo učinkovit proces u uklanjanju mikroplastike iz vodenih okoliša. Adsorbensi, poput aktivnog ugljena, zeolita, hidrogelova i modificiranih polimernih materijala, privlače mikroplastiku i zadržavaju je na svojoj površini. Ovi adsorbensi mogu se koristiti kao filtracijski mediji ili se mogu ugraditi u sustave za pročišćavanje vode. Adsorpcijski materijali kao što su aktivni ugljen, zeoliti i modificirani polimerni materijali mogu postići visoku učinkovitost u uklanjanju mikroplastike iz vode od 80% do 90%. [3-6]

Flotacija je još jedna učinkovita metoda koja koristi proces plutanja kako bi se izdvojila mikroplastika iz vode. Uz pomoć koagulanata i flokulanata, mikroplastika se grupira u veće čestice koje se mogu lako ukloniti iz vode. Kombinacija koagulacije i flokulacije također se često koristi u procesu uklanjanja mikroplastike iz vode. Dodavanjem koagulanata, poput

aluminijevog sulfata ili željezovog klorida, formiraju se flokovi koji aglomeriraju mikroplastiku i olakšavaju njezino uklanjanje iz vode. Postotak učinkovitosti može se kretati u rasponu od 60% do 90%, ovisno o primijenjenim kemikalijama i postupku. [3-6]

Tehnike koje koriste superhidrofobne materijale također su vrlo obećavajuće u uklanjanju mikroplastike s vodenih površina. Ovi materijali imaju posebna svojstva koja omogućuju privlačenje mikroplastike i stvaranje skupina koje se lako mogu ukloniti.

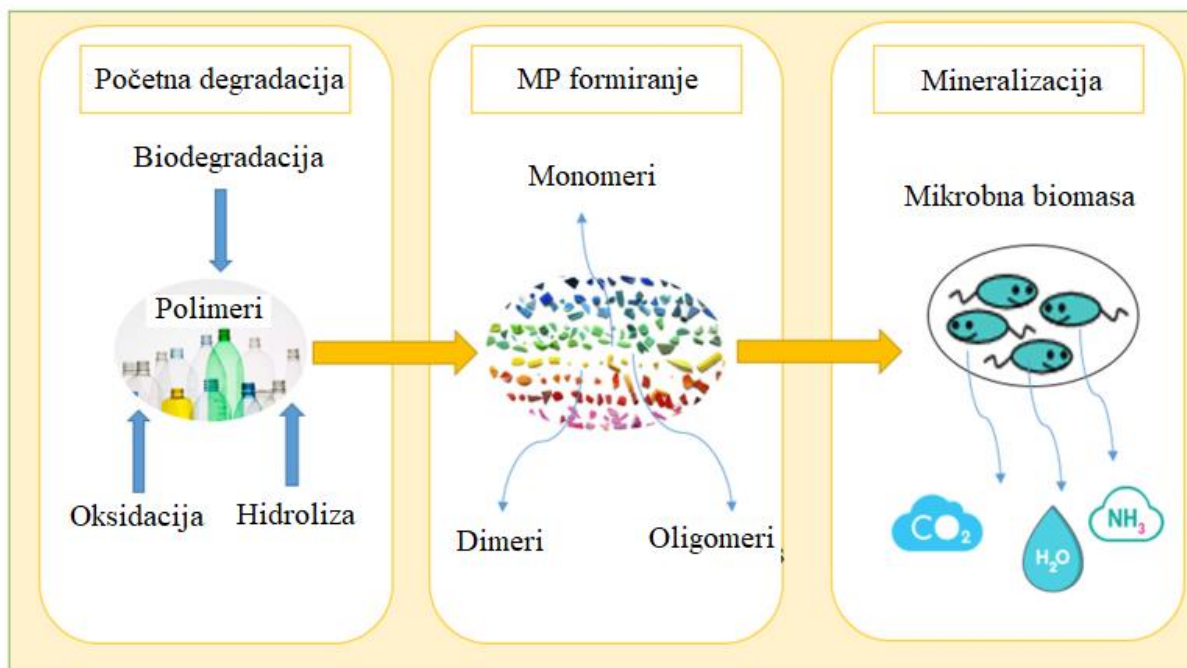
Kada je riječ o uklanjanju mikroplastike iz otpadnih voda, postoji širok spektar procesa koji se mogu primijeniti. To uključuje aerobnu i anaerobnu biodegradaciju, kemijsku oksidaciju, membranske filtracije i kombinaciju više procesa. Aerobna biodegradacija koristi mikroorganizme koji se hrane mikroplastikom i razgrađuju je u manje toksične spojeve. Anaerobna biodegradacija se provodi u odsustvu kisika i također može biti učinkovita u razgradnji mikroplastike.

Kada je riječ o uklanjanju mikroplastike iz tla, postoje različite tehnike koje se mogu primijeniti. Fizičko izvlačenje mikroplastike iz tla može se provesti pomoću različitih metoda kao što su sita, magnetske separatore ili elektrostatske tehnike. Također, primjena superhidrofobnih materijala na tlu može privući mikroplastiku s površine tla i olakšati njezino uklanjanje. Bioremedijacija, uz pomoć mikroorganizama koji su sposobni razgraditi plastiku, također je jedna od metoda koja se istražuje za uklanjanje mikroplastike iz tla. [3-6]

### *2.5.1. Biorazgradnja mikroplastike*

Biorazgradnja mikroplastike odnosi se na proces razgradnje malih čestica plastike pomoću mikroorganizama i enzima koji se prirodno nalaze u okolišu. Ovi mikroorganizmi, poput bakterija i gljiva, proizvode enzime koji mogu razgraditi molekularne veze u mikroplastici, pretvarajući je u manje fragmente.

Razgradnja plastike i mikroplastike, uključujući kemijsku, fizičku i biološku razgradnju, prikazana je na **slici 2.6**.



**Slika 2.6.** Razgradnja i biorazgradnja polimera

Mikrobna biodegradacija mikroplastike uključuje nekoliko koraka, kao što su:

- Prijanjanje mikroorganizama uz površinu mikroplastike i izlučivanjem njihovih ekstracelularnih enzima koji imaju glavnu ulogu u depolimerizaciji plastičnih polimera s površine.
- Razgradnja polimera u manje čestice iz velikih polimernih struktura
- Razgradnja polimera na oligomere, dimere i monomere
- Mineralizacija mikroplastike mikrobnom biomasom prikazuje razgradnju mikroplastike do ugljičnog dioksida (potpuna mineralizacija) pomoću nekoliko enzima, kao i transformaciju nastalih međuprodukata u izvor energije i proizvodnju biomase i daljnje stvaranje biofilma. [49]

Ekstracelularni enzimi poput esteraza, lipaza, lignin peroksidaza, lakaza i mangan peroksidaza ključni su za povećanje hidrofilitnosti plastičnih polimera pretvaranjem u funkcionalne grupe poput karbonilnih ili alkoholnih grupa. Ove promjene potiču prijanjanje mikroorganizama na površini plastike i olakšavaju daljnju biodegradaciju. [50-51] Hidrolaze, kao što su lipaze, esteraze, poli (3-hidroksibutirat) depolimeraze i cutinaze, su ekstracelularni enzimi koji djeluju na površini plastike i razgrađuju je na manje molecule. Tijekom procesa biodegradacije, ovi

enzimi ciljaju specifične osjetljive veze u bočnim lancima polimera ili kemijske grupe na lancu polimera kako bi potaknuli razdvajanje lanaca. Međutim, zbog svoje veličine, vjerojatno ne mogu prodrijeti u strukturu polimera, pa se razgradnja događa uglavnom na površini, što rezultira pukotinama.

Rezultati asimilacije proizlaze iz interakcije monomera koji se prenose u mikrobnju citoplazmu i zatim se metabolički obrađuju. [52] Ranija istraživanja uglavnom su se fokusirala na ekstracelularne enzime koji sudjeluju u primarnim koracima biodegradacije plastike. Međutim, mehanizam intracelularnih enzima i prijenosa monomera kroz bakterijsku staničnu membranu još uvijek je nedovoljno poznat i zahtijeva daljnje istraživanje. Nakon faze bio-fragmentacije, metabolički međuprodukti s karbonilnim ili hidroksilnim funkcionalnim grupama mogu se metabolizirati unutar stanice pomoću intracelularnih enzima kroz procese  $\beta$ -oksidacije i trikarboksilne kiseline (TCA ciklus). [51] Konačni korak je mineralizacija, potpuna razgradnja prenesenih molekula u potpuno oksidirane metabolite poput vode, ugljičnog dioksida, dušika i metana. [52]

Biodegradacija mikroplastike zahtijeva usklađenost nekoliko ključnih faktora kako bi bila učinkovita. Mikroorganizmi koji imaju potencijal za razgradnju moraju posjedovati odgovarajuće enzimske i metaboličke putove. Osim toga, okolišni parametri poput pH vrijednosti, saliniteta, temperature i sadržaja vlage trebaju biti povoljni kako bi se potaknula biodegradacija. [53] Fizičke karakteristike mikroplastike moraju omogućiti prianjanje mikroorganizama na površinu, dok struktura polimera, stupanj polimerizacije i razgranatosti ne bi trebali negativno utjecati na biološku reakciju. Brzina enzimske razgradnje ovisi o amorfnoj i kristalnoj regiji, veličini kristala te debljini lamela polimera. Na primjer, enzimi depolimeraze polihidroksialkanoata (PHA) imaju sposobnost hidrolize uglavnom lanaca u amorfnom stanju na površini fragmentiranih filmova, a potom erozije lanaca u kristalnom stanju [54].

#### *2.5.1.1. Biorazgradnja polistirena*

Polistiren je materijal koji se koristi za proizvodnju širokog spektra predmeta, sintetički polimer koji se proizvodi od stiren monomera. Budući da je sintetički materijal, jedna od glavnih nedostataka ovog materijala je da se teško razgrađuje i može ostati u okolišu stotinama godina.

Međutim, postoje postupci koji se mogu koristiti za recikliranje polistirena i smanjenje njegovog utjecaja na okoliš. Osim pirolize i kemijskog recikliranja, postoji i mehaničko recikliranje koje uključuje drobljenje polistirena u male komadiće, čime se stvara granulirani materijal koji se može koristiti kao sirovina za proizvodnju novih plastičnih proizvoda. Međutim, ovi procesi mogu biti skupi ili zahtijevati puno energije, što ograničava njihovu primjenu u širokom spektru situacija. [55]

Biorazgradnja polistirena odnosi se na proces u kojem mikroorganizmi u okolišu razgrađuju polistiren u manje dijelove kao što su monomeri i oligomeri. Međutim, biorazgradnja polistirena je relativno spora i može trajati nekoliko godina da se polistiren potpuno razgradi u okolišu. Da bi se ovaj proces ubrzao, mogu se koristiti mikroorganizmi koji su specifično uzgajani da razgrađuju polistiren. U laboratorijskim uvjetima, ovi mikroorganizmi se mogu koristiti za razgradnju polistirena u roku od nekoliko mjeseci, što je znatno brže od prirodnog procesa biorazgradnje. [56] Postoje i drugi načini za ubrzanje procesa biorazgradnje polistirena, poput korištenja fizičkih ili kemijskih metoda. Na primjer, mogu se koristiti ultrazvuk, toplina ili oksidacijski procesi kako bi se polistiren razgradilo u manje dijelove. Međutim, ove metode su često skuplje i manje ekološki prihvatljive od korištenja mikroorganizama za biorazgradnju. [57-58]

Za uzgoj mikroorganizama koji bi razgradili polistiren, potrebno je prvo identificirati i izolirati najučinkovitije vrste koje posjeduju sposobnost razgradnje ovog materijala. Nakon toga, mikroorganizmi se uzgajaju u laboratoriju ili u industrijskom okruženju. [56] Uzgoj mikroorganizama za biorazgradnju polistirena može se provoditi u različitim uvjetima. Na primjer, mikroorganizmi se mogu uzgajati u vodenim otopinama koje sadrže polistiren kao jedini izvor ugljika i energije. Ova metoda se naziva kultura mikroorganizama na krutom polimeru (eng. *solid polymer culture*, SPC). [59] Druga metoda je korištenje mikroorganizama koji su sposobni za razgradnju polistirena u aerobnim uvjetima, tj. uz prisutnost kisika. U ovom slučaju, mikroorganizmi se uzgajaju u agitiranom bioreaktoru, gdje se osigurava dovoljna razina kisika, kao i hranjive tvari potrebne za rast i razmnožavanje. [60] Postoji i mogućnost korištenja genetički modificiranih mikroorganizama koji su učinkovitiji u razgradnji polistirena. Ovi mikroorganizmi su modificirani kako bi proizvodili enzime koji su u stanju razgraditi polistiren u kratkotrajne spojeve, čime se proces biorazgradnje ubrzava. [61] Uzgoj mikroorganizama za biorazgradnju polistirena može se provoditi na maloj ili velikoj skali. Na primjer, uzgoj



mikroorganizama u laboratoriju je često ograničen na manje količine polistirena, dok se u industrijskom okruženju koriste veće količine i bioreaktori za uzgoj mikroorganizama. [62]

Studija je provedena na ekspaniranom polistirenu koji se u velikoj količini nalazi na mangrovima smještenim na ušćima rijeka diljem svijeta te su vjerojatno to i najviše onečišćena područja u kojima se nakupljaju različite vrste plastike koje dolaze s kopna i obližnjih morskih akvakultura. Ekspanirani polistiren je jedan od najčešćih vrsta plastičnog otpada koji se nalazi u tim područjima, čak i u smeću plastike. Nakon obogaćivanja s EPS-om, dobiveni su konzorciji za razgradnju. Oni dijele sličnu strukturu zajednice koju dominiraju bakterije iz porodica *Sphingomonadaceae*, *Rhodanobacteraceae*, *Rhizobiaceae*, *Dermacoccaceae*, *Rhodocyclaceae*, *Hyphomicrobiaceae* i *Methyloligellaceae*. Raznolike bakterije koje predstavljaju članove rodova *Novosphingobium*, *Gordonia*, *Stappia*, *Mesobacillus*, *Alcanivorax*, *Flexivirga*, *Cytobacillus*, *Thioclava* i *Thalassospira* pokazale su sposobnost razgradnje polistirena kao čiste kulture. Nadalje, razgradnja polistirena od strane vrsta *Gordonia* sp. i *Novosphingobium* sp. kvantificirana je putem gubitka mase, uz očite morfološke i strukturne promjene na polistirenskim filmovima koje su promatrane pomoću SEM, ATR-FTIR i analize kontaktnog kuta. Stvaranje novih funkcionalnih skupina koje sadrže kisik ukazuje na put razgradnje putem oksidacije. Iako su stope razgradnje varirale od 2,7% do 7,7% nakon mjesec dana u laboratorijskim uvjetima, a vjerojatno su niže u prirodnim uvjetima, njihova uloga u uklanjanju EPS-a je nezanemariva. [63] Također još jedno istraživanje je provedeno na bakterijskim sojevima te njihovu sposobnost razgradnje PE, PP, PS i PVC u aerobnim uvjetima. U preliminarnom screeningu, nakon 90 dana inkubacije, potencijalna biodegradacija se očito dogodila samo u slučaju PVC filma u prisutnosti *P. citronellolis* i *B. flexus*. [64] Istraživanje provedeno u Njemačkoj na mikroorganizmima koji mogu razgraditi PS je pokazalo da su neki sojevi gljiva i bakterija sposobni razgraditi PS u tlu poput *Phoma* sp. [65] Druga studija identificirala je enzime iz crijeva crva iz roda mealworm (*Tenebrio molitor*) koji mogu razgraditi PS. Ovi enzimi su pokazali sposobnost depolimerizacije PS-a i pretvaranja u manje molekule. [66]

Usporedba dvaju procesa uklanjanja mikroplastike iz okoliša, biorazgradnje i fizikalno-kemijskih procesa dana je u **tablici 2.5**.

**Tablica 2.5.** Usporedba biorazgradnje polistirena i fizikalno-kemijskih procesa

<b>Biorazgradnja</b>	<b>Fizikalno-kemijski procesi</b>
Sam proces biorazgradnje polistirena uključuje djelovanje mikroorganizama ili enzima koji razgrađuju polimerne lance PS-a na manje fragmente. Međutim, sama biorazgradnja PS-a može biti spora i neefikasna, jer PS ima ograničenu osjetljivost na prirodne mikroorganizme i enzime koji se nalaze u okolišu. Stoga, sam proces biorazgradnje može biti relativno spor i nedovoljno učinkovit za potpunu razgradnju PS-a.	Fizikalno-kemijski proces razgradnje PS-a uključuje primjenu različitih fizikalnih i kemijskih tretmana poput toplinskih tretmanana: termalne obrade ili pirolize koji mogu promijeniti strukturu PS-a i smanjiti njegovu molekulsku težinu, čime se olakšava daljnja razgradnja. Također, tretmani s aktivnim reagensima, kao što su oksidativni ili kiseli tretmani, mogu modificirati površinu PS-a.

Kombinacija termalne obrade i enzimske razgradnje postiže najbolje rezultate u razgradnji PS-a. Primjenom termalne obrade pri odgovarajućim uvjetima, struktura PS-a se mijenja, štopovećava njegovu podložnost enzimskoj razgradnji. Također, korištenje odgovarajućih enzima, poput lipaza, pokazalo se ključnim za efikasnu razgradnju PS-a.

## 2.6. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* (slika 2.7.) je Gram-pozitivna bakterija, široko rasprostranjena bakterija koja se može naći u tlu, vodi i drugim prirodnim okruženjima, kao i u crijevima nekih životinja, uključujući i ljude. Ova bakterija je poznata po svojoj sposobnosti da proizvodi velik broj enzima, uključujući proteaze, amilaze, lipaze i druge hidrolaze koje se koriste u različitim industrijskim procesima, kao što su proizvodnja hrane, papira, deterdženata i tekstila. [67] Osim toga, *Bacillus subtilis* ima i druge biološke funkcije koje su važne u različitim prirodnim okolišima. Ona ima sposobnost tvorbe endospora, što joj omogućava preživljavanje u nepovoljnim uvjetima, poput ekstremnih temperatura, nedostatka vode i niskog pH. *Bacillus subtilis* ima i sposobnost stvaranja biofilma, koji predstavlja sloj mikroorganizama koji se formira na površinama u prirodi. Također, ova bakterija proizvodi antibiotike i druge biološki aktivne tvari poput surfaktina i fengicinske kiseline, koje imaju antimikrobna svojstva koja joj pomažu u borbi protiv drugih mikroorganizama u okolišu. [62] *Bacillus subtilis* je također popularan model organizam za istraživanje osnovnih bioloških procesa, poput regulacije gena, formiranja endospora, signalizacije i slično. Ova bakterija se koristi u različitim istraživanjima koja se bave biotehnologijom, biokemijom i mikrobiologijom. [68]



**Slika 2.7.** Mikrofotografija bakterijske kulture *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* ima određene enzime koji se mogu koristiti za razgradnju polimera kao što su celuloza i škrob. Ova bakterija ima sposobnost da proizvodi amilaze, proteaze i lipaze, enzimi koji se koriste u proizvodnji biogoriva, jer se ti enzimi mogu koristiti za razgradnju polisaharida. Međutim, razgradnja plastike poput polistirena je znatno teža zbog specifične kemijske strukture polimera. Unatoč tome, neka istraživanja su pokazala da *Bacillus subtilis* ima sposobnost da razgrađuje neke vrste plastike, uključujući i polistiren, uz pomoć određenih enzima. Na primjer, jedno istraživanje je pokazalo da su bakterije *Bacillus subtilis* uspješno razgradile polistiren u laboratorijskim uvjetima uz dodatak specifičnih enzima koji razgrađuju ovaj polimer. Ovo istraživanje ukazuje na potencijalnu mogućnost upotrebe *Bacillus subtilis* za biorazgradnju plastike u industrijskim procesima. [69-70] U **tablici 2.6.** može se vidjeti pregled za biorazgradnju mikroplastike pomoću bakterije *Bacillus subtilis*.

**Tablica 2.6.** Pregled biorazgradnje mikroplastike pomoću bakterije *Bacillus subtilis* [71-73]

<b>Učinkovitost biorazgradnje</b>	Istraživanja su pokazala da <i>Bacillus subtilis</i> može imati značajan utjecaj na razgradnju mikroplastike. Mehanizam razgradnje uključuje enzimske aktivnosti koje omogućuju bakterijama da razgrađuju polimere plastike na manje molekule.
<b>Utjecaj uvjeta i faktora</b>	Učinkovitost biorazgradnje mikroplastike od strane <i>Bacillus subtilis</i> ovisi o različitim faktorima. To uključuje svojstva površine mikroplastike, kao što su hidrofilnost i veličina čestica, te fizikalno-kemijska svojstva samog polimera. Osim toga, pH vrijednost, temperatura i prisutnost drugih hranjivih tvari također mogu utjecati na brzinu i učinkovitost procesa biorazgradnje bakterija.
<b>Enzimatska aktivnost</b>	<i>Bacillus subtilis</i> je sposoban proizvesti različite enzime koji sudjeluju u razgradnji plastike. Ovi enzimi, poput lipaza, proteaza i amilaza, imaju sposobnost razgraditi specifične komponente plastike, kao što su polietilen, polipropilen i poliester
<b>Potencijalna primjena</b>	Razumijevanje sposobnosti u biorazgradnji mikroplastike ima potencijalnu primjenu u upravljanju otpadom i smanjenju onečišćenja plastikom. Korištenje ovih mikroorganizama može predstavljati ekološki prihvatljivu alternativu tradicionalnim metodama uklanjanja plastike iz okoliša.
<b>Daljnja istraživanja su potrebna</b>	Unatoč obećavajućim rezultatima, daljnja istraživanja su potrebna kako bi se bolje razumjela uloga <i>Bacillus subtilis</i> u biorazgradnji mikroplastike. Potrebno je istražiti optimalne uvjete i strategije za maksimiziranje učinkovitosti biorazgradnje te procijeniti potencijalne ekološke i sigurnosne aspekte ovog pristupa.

Provedeno je istraživanje gdje je izoliran je soj *Bacillus* PELW2042 iz sadržaja crijeva ličinke žutih mealworm crva koji može razgraditi polietilen visoke gustoće (HDPE). Rezultati su pokazali da nakon 42 dana inkubacije s PELW2042 na površini HDPE folije nastaje veliki broj udubljenja i pukotina koje su promatrane pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Fourierova transformacijska infracrvena spektroskopija (FT-IR) detektirala je apsorpcijske vrhove blizu  $1700\text{ cm}^{-1}$  i  $1249\text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje na stvaranje karbonilnih grupa ( $-\text{C}=\text{O}$ ) i eter grupa ( $-\text{C}-\text{O}$ ); spektri rendgenske fotoelektronske spektroskopije (XPS) dodatno su potvrdili nastajanje novih funkcionalnih skupina koje sadrže kisik. Analize rendgenske difrakcije (XRD) i diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) otkrile su smanjenje relativne kristalnosti HDPE folije za  $21,63 \pm 0,18\%$ , što ukazuje na promjenu strukture HDPE-a. Konačno, također je pokazano da je gubitak mase HDPE folije bio visok, čak  $17,36 \pm 0,56\%$ . Nakon 42 dana tretmana sojem PELW2042. Svi ovi rezultati ukazuju na visoku sposobnost *Bacillus* sp. za razgradnju plastike. [74]

## 2.7. Enzimi kao pokretači biorazgradnje

*Bacillus subtilis* je gram-pozitivna bakterija koja je nadaleko poznata po svojoj sposobnosti da proizvodi niz enzima sa sposobnošću biorazgradnje. Ovi enzimi igraju ključnu ulogu u razgradnji organskih spojeva i olakšavanju razgradnje složenih tvari. Najčešći enzimi *Bacillus subtilis* koji koriste u procesima biorazgradnje su:

- proteaze: *Bacillus subtilis* proizvodi različite proteaze, poput subtilizina, koje su uključene u razgradnju proteina. Ovi enzimi naširoko se koriste u formulacijama deterdženata, obradi kože i obradi otpada, gdje pomažu u razgradnji proteinskih tvari.
- lipaze: lipaze koje proizvodi *Bacillus subtilis* uključene su u razgradnju lipida (masti i ulja). Ovi enzimi nalaze primjenu u industrijama poput proizvodnje biodizela, prerade hrane i obrade otpadnih voda, gdje pomažu u razgradnji spojeva na bazi lipida.
- celulaze: *Bacillus subtilis* proizvodi celulaze koje su sposobne razgraditi celulozu, složeni polisaharid koji se nalazi u stjenkama biljnih stanica. Ovi enzimi imaju značajnu primjenu u proizvodnji biogoriva, industriji papira i celuloze te obradi otpada, gdje pomažu u razgradnji materijala na bazi celuloze.
- amilaze: poznato je da *Bacillus subtilis* proizvodi amilaze, koje mogu razgraditi škrob i druge složene ugljikohidrate u jednostavnije šećere. Ovi enzimi nalaze široku primjenu u prehrambenoj industriji, posebno u pekarstvu, pivarstvu i obradi škroba, gdje pomažu u razgradnji materijala na bazi škroba.
- hitinaze: hitinaze koje proizvodi *Bacillus subtilis* sposobne su razgraditi hitin, složeni polisaharid koji se nalazi u egzoskeletima rakova i staničnih stijenki gljivica. Ovi enzimi imaju primjenu u gospodarenju otpadom, poljoprivredi i farmaceutskoj industriji, gdje pomažu u razgradnji materijala koji sadrže hitin. [75-77]

Polistiren je sintetski polimer koji je vrlo otporan na biorazgradnju prirodnim enzimima. Dok sam *Bacillus subtilis* možda ne proizvodi enzime sposobne izravno razgraditi polistiren, bilo je pokušaja da se razviju ili modificiraju enzimi kako bi se poboljšala njihova sposobnost razgradnje ovog polimera. Jedan primjer enzima koji je pokazao određeni potencijal za razgradnju polistirena je klasa enzima poznatih kao kutinaze. Kutinaze su esteraze koje se prirodno nalaze u raznim mikroorganizmima, uključujući određene vrste bakterija i gljiva. Iako

su prvenstveno uključeni u razgradnju kutina, zaštitne tvari koja se nalazi u biljkama, također su pokazali određeno djelovanje za razgradnju polistirena. Posljednjih su godina istraživači koristili tehnike proteinskog inženjeringa za modificiranje kutinaza izvedenih iz mikroorganizama poput vrsta *Thermobifida* i vrsta *Pseudomonas* kako bi poboljšali njihovu sposobnost razgradnje polistirena. Ovi modificirani enzimi, poznati kao poliesteraze, pokazali su obećavajuće rezultate u razgradnji polistirena na manje fragmente. [78-81]

## **2.8. Full factorial plan**

Puni faktorski plan, statistička je eksperimentalna tehnika dizajna koja se koristi za proučavanje učinaka više faktora na varijablu odgovora. Omogućuje ispitivanje svih mogućih kombinacija razina čimbenika kako bi se razumjeli njihovi pojedinačni i interaktivni učinci. U potpunom faktorskom dizajnu, svaki faktor varira na više razina, a sve moguće kombinacije faktorskih razina uključene su u eksperiment. Ovaj pristup osigurava sveobuhvatnu procjenu učinaka svakog čimbenika i njihove interakcije.

Na primjer, imamo dva faktora: A i B, svaki s dvije razine (niska i visoka). U potpunom faktorskom dizajnu, trebali bi provesti eksperimente za sve moguće kombinacije razina faktora: A na niskoj i B na niskoj, A na niskoj i B na visokoj, A na visokoj i B na niskoj, i A na visokoj i B na visokoj. To bi rezultiralo s ukupno četiri eksperimentalna uvjeta.

Prednosti potpunog faktorskog dizajna uključuju:

- Sposobnost proučavanja glavnih učinaka i međudjelovanja: uključivanjem svih mogućih kombinacija razina čimbenika, možete procijeniti pojedinačne učinke svakog čimbenika (glavni učinci), kao i kombinirane učinke čimbenika (interakcije).
- Učinkovito korištenje resursa: Usprkos povećanom broju eksperimentalnih uvjeta kako se broj faktora i razina povećava, puni faktorski dizajni učinkovito koriste resurse pokrivajući sve kombinacije na sustavan način.
- Statistička snaga: Potpuni faktorski dizajni pružaju visoku statističku snagu zahvaljujući sveobuhvatnoj procjeni učinaka faktora.

Međutim, puni faktorski dizajn također ima neka ograničenja:

- Povećana složenost: Kako se broj faktora i razina povećava, broj eksperimentalnih uvjeta eksponencijalno raste. To može rezultirati velikim brojem eksperimenata, čineći dizajn složenim i dugotrajnim.
- Skupo i dugotrajno: Provođenje eksperimenata za sve moguće kombinacije može zahtijevati mnogo resursa u smislu vremena, troškova i truda.
- Ograničena izvedivost: U nekim slučajevima možda neće biti izvedivo ili praktično provoditi pokuse za sve moguće kombinacije, osobito kada je broj faktora i razina velik.

Ukratko, potpuni faktorski dizajn moćna je eksperimentalna tehnika koja omogućuje sveobuhvatno ispitivanje učinaka više čimbenika i njihovih interakcija. Pruža dragocjene uvide u odnose između čimbenika i varijable odgovora, ali može biti zahtjevan za resurse i složen za implementaciju, posebno za dizajne s velikim brojem čimbenika i razina. [82-83]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroplastika

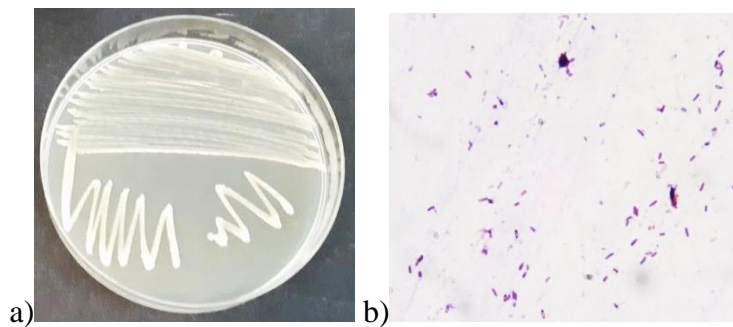
Prilikom provedbe pokusa korištena je mikroplastika polistiren (PS), koja je usitnjena na veličine čestica <math><300\ \mu\text{m}</math>, <math>300\text{-}500\ \mu\text{m}</math> i <math>500\text{-}710\ \mu\text{m}</math> (slika 3.1).



**Slika 3.1.** Plastični pribor PS korišten za dobivanje MP-a.

##### 3.1.2. Mikroorganizam

Bakterijska kultura *Bacillus subtilis* (slika 3.2.) korištena u pokusu pohranjena je u zbirci mikroorganizama na Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 3.2.** Mikrofotografija bakterije *Bacillus subtilis* dobivene tehnikom iscrpljivanja na hranjivom agaru (a) te obojane po Gramu (b) snimljena u prolaznoj svjetlosti,  $P = 1000\times$ .



## 3.2. Mediji i kemikalije

### 3.2.1. Hranjivi agar

Za uzgoj kulture pripremljen je hranjivi agar (HA) prema uputama proizvođača (Biolife Manual, Ingraf, Italija 1991). Podloga je homogenizirana, zagrijana do vrenja i sterilizirana 15 minuta u autoklavu pri 121 °C i 1,1 atm.

### 3.2.2. Mineralni medij

Za biorazgradnju MP-a pripravljeno je 3,0 L mineralnog medija (MM) početne pH – vrijednosti 7,0. pH-vrijednost MM-a se podešavala pomoću 1 M NaOH i 1 M KOH. Mineralni medij se zatim sterilizirao prije upotrebe i koristio za pripremu suspenzije bakterijske kulture. Upotrebom MM-a osigurani su minimalni uvjeti za rast bakterija. Točan sastav medija na 1 L prikazan je u **tablici 3.1.**

**Tablica 3.1.** Sastav mineralnog medija korištenog za provedbu pokusa biorazgradnje.

Tvar	m / g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,80
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,10
5 mL elemenata u tragovima:	0,23
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,17
ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×6H <sub>2</sub> O CoSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,11
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ×4H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	0,09
MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,02
	0,01
	0,01

### 3.2.3. Fiziološka otopina

Za određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija (eng. *Colony Forming Units*, CFU), potrebno je bilo pripremiti epruvete za razrjeđenja koje su sadržavale 0,9% fiziološke otopine. Fiziološka otopina je pripremljena otapanjem 9,0 g NaCl u deioniziranoj vodi koja je zatim sterilizirana vlažnom sterilizacijom.

### 3.2.4. Hranjiva podloga za uzgoj morske bakterije *Vibrio fischeri*

Kruta podloga za održavanje čiste bakterijske kulture *Vibrio fischeri* priprema se otapanjem sastojaka prikazanih u **tablici 3.2.** u 1 L deionizirane vode, uz zagrijavanje do vrenja.

**Tablica 3.2.** Podloga za održavanje morske bakterije *Vibrio fischeri*.

<b>Tvar</b>	<b>m / g</b>
NaCl	<b>30,0</b>
Glicerol	<b>10,0</b>
CaCO <sub>3</sub>	<b>5,0</b>
Pepton	<b>5,0</b>
Kvaščev ekstrakt	<b>3,0</b>
Agar	<b>15,0</b>

### 3.2.5. Otopina za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture *Vibrio fischeri* koja je pripremljena otapanjem sastojaka prikazanih u **tablici 3.3.**, u 1 L deionizirane vode. Nakon otapanja sastojaka otopinu je potrebno prokuhati i ohladiti te pH-vrijednost podesiti s NaOH ili HCl tako da se nalazi u rasponu od 6,8 do 7,2.

**Tablica 3.3** Sastav otopine za resuspenziju.

<b>Tvar</b>	<b><i>m</i> / g</b>
<b>NaCl</b>	20,0
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,2
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,5
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0,2
<b>Glukoza</b>	10,0
<b>Rafinoza</b>	10,0
<b>Glicerol</b>	0,0005

### 3.2.6. Otopina NaCl

Otopina NaCl-a korištena je kao radna otopina za pripremu niza razrjeđenja prilikom provedbe testa ekotoksičnosti MP-a primjenom bakterijske kulture *Vibrio fischeri*. 2%-tna otopina NaCl-a pripremljena je otapanjem 20 g NaCl-a u 1 L deionizirane vode pri čemu pH-vrijednost mora biti u rasponu od 6,8 do 7,2.

## 3.3. Mjerni instrumenti i oprema

Mjerni instrumenti i oprema koja se koristila tijekom provođenja eksperimenta:

- rotacijska tresilica LAUDA-GFL Gesellschaft model 3005, Njemačka za kontinuiranu homogenizaciju uzoraka,
- kriomlin Retsch CryoMill Ball Mill, 100-240 V, 50-60 Hz, Njemačka nadopunjen s tekućim dušikom za usitnjavanje plastičnih materijala,
- mehanička sita W. S. Tyler RX-86-1 Sieve shaker, USA za prosijavanje MP-a,
- vaga na četiri decimale KERN ALJ 220-4NM,
- membranski lijevak uz vakuum pumpu i sterilni celulozno nitratni (C/N) membranski filteri Ahlstrom ReliaDisc<sup>TM</sup>, veličina pora 0,45 μm za filtraciju sterilizirane mikroplastike,

- homogenizator Heidolph, REAX top za pripremu decimalnih razrjeđenja,
- autoklav Sutjeska, Jugoslavija za sterilizaciju MM-a, hranjive podloge, fiziološke otopine, čistog staklenog posuđa, kao i onečišćenog posuđa,
- termostat Termomedicinski aparati, Hrvatska za uzgoj bakterija pri 37 °C,
- pH elektroda SenTix® 940, kisikova elektrodom FDO® 925 i prijenosni mjerača WTW Multi 340i za određivanje pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika.

Za određivanje ukupnog ugljika, organskog ugljika te anorganskog ugljika koristio se instrument TOC-V, Shimadzu. Karakterizacija PS-a provedena je pomoću Infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama tj. FTIR-ATR spektrofotometar, PerkinElmer, Spectrum One. Uređaji se nalaze u *spin-off* tvrtki CWT (engl. *Comprehensive Water Technology*) na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 3.3.** Uređaji korišteni TOC-V, Shimadzu a) i FTIR-ATR spektrometar b)

Na **slici 3.4.** može se vidjeti luminometar LUMISTox 300 koji je korišten za određivanje toksičnosti s bakterijom *Vibrio fischeri* koja ima sposobnost luminiscencije.

LUMISTox 300 ima ugrađen fotometar i ustaljeni rad automatskog mjerenja i razvijanja podataka čime je omogućeno prepoznavanje boje uzorka u testu s luminiscirajućim bakterijama. Radna temperatura instrumenta je 15 °C ( $\pm 1$  °C). Uz luminometru dolazi u kombinaciji termometar LUMIStherm, Hach-Lange GmbH koji se koristi u svrhu termostatiranja.



**Slika 3.4.** Luminometar LUMISTox 300 i termometar LUMIStherm, Hach-Lange Gmb

### **3.4. Metode rada**

#### *3.4.1. Priprema mikroplastike PS*

Prije samog početka eksperimenta bilo je potrebno usitniti mikroplastiku. Korištena je jednokratna PS ambalaža koja je usitnjena na manje komade škarama te su dalje dodatno usitnjeni pomoću kriomlina nadopunjenim tekućim dušikom. Nakon usitnjenja mikroplastika se sušila na zraku 24-48h pri sobnoj temperaturi te služeći se tehnikom prosijavanja, mehaničkim sitom, razvrstale su se čestice različitih veličina: **500-710  $\mu\text{m}$ , 300-500  $\mu\text{m}$  i <300  $\mu\text{m}$ .**

#### *3.4.2. Uzgoj bakterije Bacillus subtilis*

Za preduzgoj kulture pripremljena je 24-satna kultura uzgojena na HA pri 37 °C. U MM-u priređena je suspenzija koja je postavljena na tresilicu tijekom 24 h, 160 o/min pri sobnoj temperaturi. Preduzgoj kulture se provodio u svrhu prilagodbe bakterije na uvjete mineralnog medija, kao i za postizanje logaritamske faze rasta.

#### *3.4.3. Određivanje broja živih stanica bakterija (engl. Colony Forming Unit, CFU)*

Tijekom trajanja pokusa (30 dana) određivao se broj izraslih kolonija bakterija. Za tu svrhu priređena su decimalna razrjeđenja suspenzije. Tijekom eksperimenta 6 puta je izuziman uzorak (0. dan, 3. dan, 7. dan, 14. dan, 21. dan i 30. dan). CFU se određuje tako što se izuzme 1 mL razrjeđenja te prebaci u praznu sterilnu Petrijevu zdjelicu u koju se zatim ulije

preko uzorka HA i homogenizira se pokretima u obliku broja 8 otprilike 10 puta. Nakon što HA otvrdne Petrijeve zdjelice se stavljaju na inkubaciju u termostat 24-48 sati na 37 °C. Nakon inkubacije, odredi se broj izraslih stanica u 1 mL uzorka brojanjem kolonija.

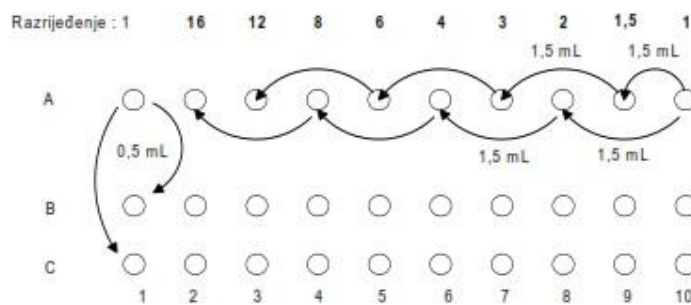
#### 3.4.4. Postupak određivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*

Za ispitivanje ekotoksičnosti filtrata bakterijskih suspenzija PS-a pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* korišten je filtrat bakterijske suspenzije PS-a, resuspenzija bakterije *Vibrio fischeri* i 2%-tna otopina NaCl-a. Kivete koje sadrže pripremljenu suspenziju moraju biti u termostatom bloku na 15 °C, barem 15 minuta prije početka izvođenja testa.

Prije provođenja samog testa ekotoksičnosti potrebno je izmjeriti relativnu luminiscenciju. Potrebno je uzeti 0,5 mL bakterijske suspenzije *Vibrio fischeri* (*screening test*) te staviti u kivetu i izmjeriti luminiscenciju, koja je trebala biti između 2000 i 4000 kako bi se ispitivanje moglo provesti. Nakon što se postigne ta vrijednost može se započeti sa testom ekotoksičnosti prema linearnom nizu.

##### ➤ Linerarni niz

1. U prvu kivetu stavi se 2/3 kivete 2%-tne otopina NaCl, u zadnju kivetu 2/3 razrijeđenog uzorka (utvrđeno *screening testom*). U predzadnju kivetu stavi se 1 mL 2%-tne otopine NaCl, a u sve ostale kivete stavi se po 1,5 mL 2%-tne otopine NaCl.
2. U A nizu napravi se niz željenih razrjeđenja na način na koji je prikazan na **slici 3.5**.
3. U sve ostale kivete B i C niza stavi se po 0,5 mL inokuluma.



**Slika 3.5.** Shematski prikaz pripreme razrjeđenja primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* prema linearnom nizu.

Nakon završetka mjerenja instrument izračunava vrijednosti za EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> s kojima se može odrediti je li veća ili manja toksičnost ispitivanog uzorka, odnosno mineralnog medija koji služi

kao kontrola. Eksperimentalni rezultat je i vrijednost faktora,  $f$ , koji mora biti oko 1 (0,6 do 1,3).

### *3.4.5 Određivanje ukupnog, organskog i anorganskog ugljika (engl. Total Organic Carbon, TOC)*

Kako bi se odredio organski ugljik u uzorcima potrebno je poluautomatskom pipetom sa sterilnim nastavkom izuzeti 0,5 mL uzorka. Ispustiti uzorak u špricu na koju je postavljen filter veličina pora 0,45  $\mu\text{m}$ . Uzorak se profiltrira u staklenu bočicu u koju onda prije samog određivanja TOC-a se dodaje još 9,5 mL deionizirane vode kako bi ukupan volumen iznosio 10 mL. Za svaki uzorak je proveden postupak 2 puta kako bi se mogao odrediti TOC te ukupan ugljik (engl. Total Carbon, TC). U bočicama koje su služile za određivanje TOC-a je dodano i tri kapi  $\text{H}_2\text{SO}_4$  u svrhu neutralizacije anorganskog ugljika. Vrijednost anorganskog ugljika (engl. Total inorganic Carbon, TIC) dobiva se iz razlike TC-a i TOC-a.

### *3.4.6. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (engl. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy-Attenuated Total Reflectance, FTIR-ATR)*

Nakon 30-dnevnog pokusa biorazgradnje, čestice PS-a su izdvojene metodom membranske filtracije te isprane sterilnom deioniziranom vodom. Čestice su zatim podvrgnute FTIR-ATR spektroskopiji koji daje odgovarajući spektar okarakteriziranog polimera s pripadajućim karakterističnim funkcionalnim skupinama. Čvrste čestice PS-a je potrebno staviti na površinu kristala tako da ga u potpunosti prekrije. Ovisno o rezultatima, FTIR-ATR spektroskopijom moguće je i potvrditi da li je uistinu došlo do biorazgradnje MP-a.

### *3.4.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i spektrometrije masa (engl. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, LC/MS)*

Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti i spektrometrije masa je provedena u svrhu detekcije potencijalno nastalih razgradnih produkata i aditiva s površine MP-a u vodenoj fazi tijekom provedbe pokusa biorazgradnje PS-a. Rađeno je gradijentnom metodom pomoću dviju mobilnih faza 0,1% mravlje kiseline + MiliQ i acetonitril/metanol vrijednosti 0,5  $\text{cm}^3/\text{min}$ . S obzirom da je nepoznat sastav uzorka korištena je HPLC metoda bez kolone uz volumen injektiranog uzorka od 10  $\mu\text{L}$ .

### 3.5. Provedba eksperimenta

Određivanje optimalnih uvjeta za biorazgradnju polistirena primjenom bakterije *Bacillus subtilis* prema dizajnu punog faktorskog plana je trajao 30 dana. Dizajn eksperimenta provodio se prema dizajnu punog faktorskog plana koji daje kombinaciju čimbenika na određenim razinama. Tijekom provedbe ovog pokusa radilo se s kombinacijom 3 čimbenika: veličina čestica MP-a, broj okretaja te optička gustoća, na 3 razine: minimalna, srednja i maksimalna (**tablica 3.4**)

**Tablica 3.4.** Popis čimbenika na tri razine

	razina	1	2	3
A	veličina MP	<300 $\mu\text{m}$	300-500 $\mu\text{m}$	500-710 $\mu\text{m}$
B	broj okretaja	100	150	200
C	OG	0,1	0,3	0,5

Kombinacijom čimbenika i razina, prema programu se dobiva matrica (**tablica 3.5.**) koja predstavlja broj tikvica i kombinaciju čimbenika na tri razine za svaku tikvicu. Eksperiment se provodio u 27 tikvica volumena 250 mL, a radni volumen je iznosio 100 mL. Unutar tikvice se nalazio mineralni medij, suspenzija mikroorganizma (*Bacillus subtilis*) te mikroplastika (PS). Kontrolna tikvica sadržavala je sve osim čestica MP-a. Prikaz tikvica na mješalici se može vidjeti na **slici 3.6.**



**Slika 3.6.** Postavljene tikvice za provedbu pokusa biorazgradnje PS-a.



**Tablica 3.5.** Raspis matrice prema dizajnu punog faktorskog plana.

Oznaka pokusa	veličina čestica MP-a / $\mu\text{m}$	broj okretaja /o/min	OG/-
T1	300-500	100	0,5
T2	<300	100	0,1
T3	<300	100	0,3
T4	500-710	100	0,5
T5	<300	100	0,5
T6	300-500	100	0,1
T7	500- 710	100	0,1
T8	300-500	100	0,3
T9	500- 710	100	0,3
T10	<300	150	0,5
T11	500- 710	150	0,1
T12	<300	150	0,3
T13	500- 710	150	0,3
T14	300-500	150	0,3
T15	500-710	150	0,5
T16	300-500	150	0,5
T17	<300	150	0,1
T18	300-500	150	0,1
T19	300-500	200	0,1
T20	<300	200	0,1
T21	<300	200	0,3
T22	300-500	200	0,5
T23	500-710	200	0,1
T24	500-710	200	0,5
T25	<300	200	0,5
T26	300-500	200	0,3
T27	500-710	200	0,3

Izuzimanje uzorka je bilo u određenim vremenskim intervalima (0., 3, 7., 14., 21. i 30. dan) i određenog volumena. Određivan je CFU. Provedena je i TOC analiza, FTIR-ATR spektroskopija te je ispitana ekotoksičnost poslije procesa biorazgradnje pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Određivanje optimalnih uvjeta za biorazgradnju polistirena primjenom *Bacillus subtilis* prema dizajnu punog faktorskog plana

U ovom eksperimentu se provelo ispitivanje određivanja optimalnih uvjeta za biorazgradnju polistirena primjenom bakterije *Bacillus subtilis* koristeći kombinaciju značajnih čimbenika: broj okretaja tikvica, veličina MP-a te optička gustoća bakterijske suspenzije, kako je opisano u eksperimentalnom djelu, **tablica 3.5**.

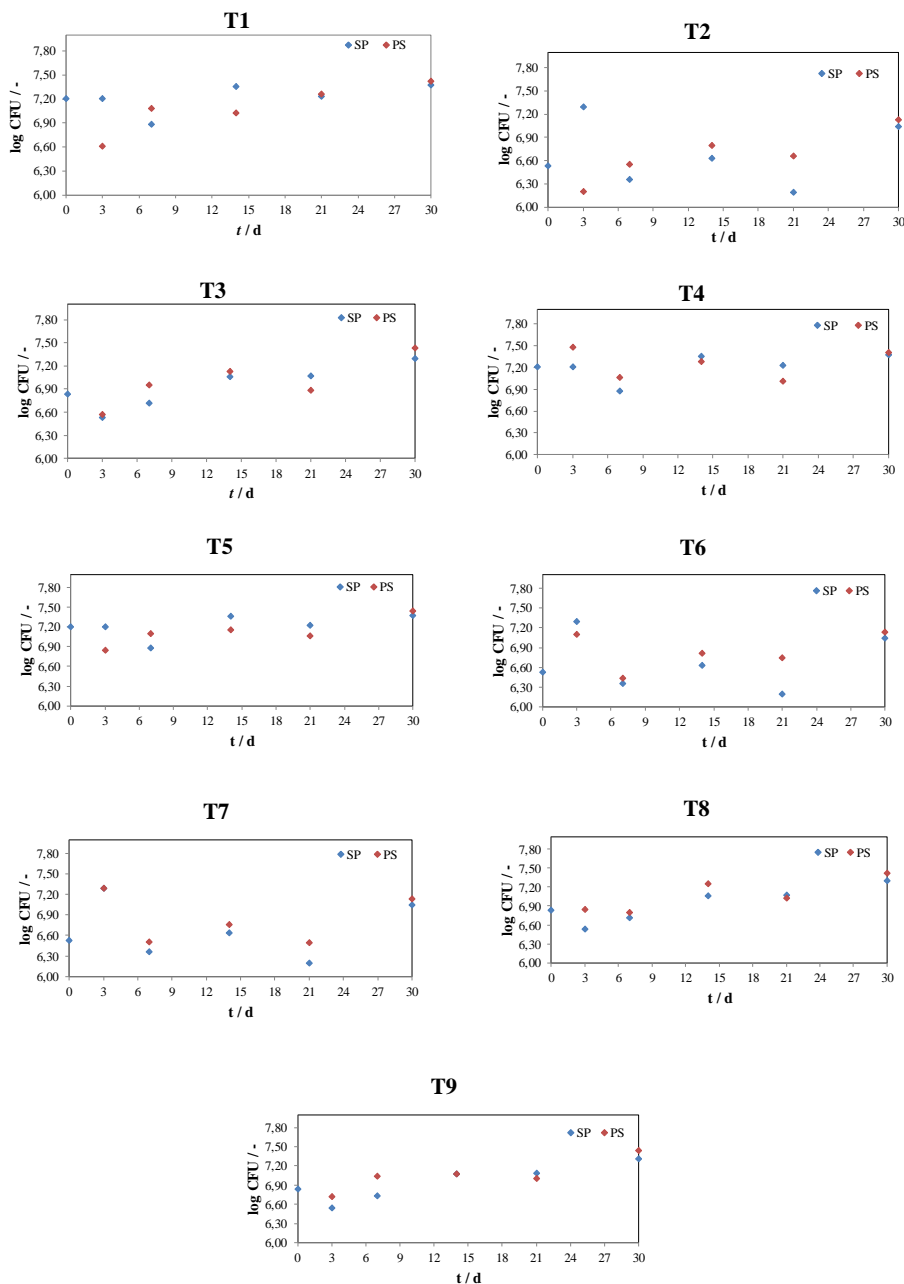
U svrhu određivanja optimalnih uvjeta ekperiment se proveo prema punom faktorskom planu te su dobiveni rezultati prikazani u daljnjem tekstu.

#### 4.1.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje polistirena

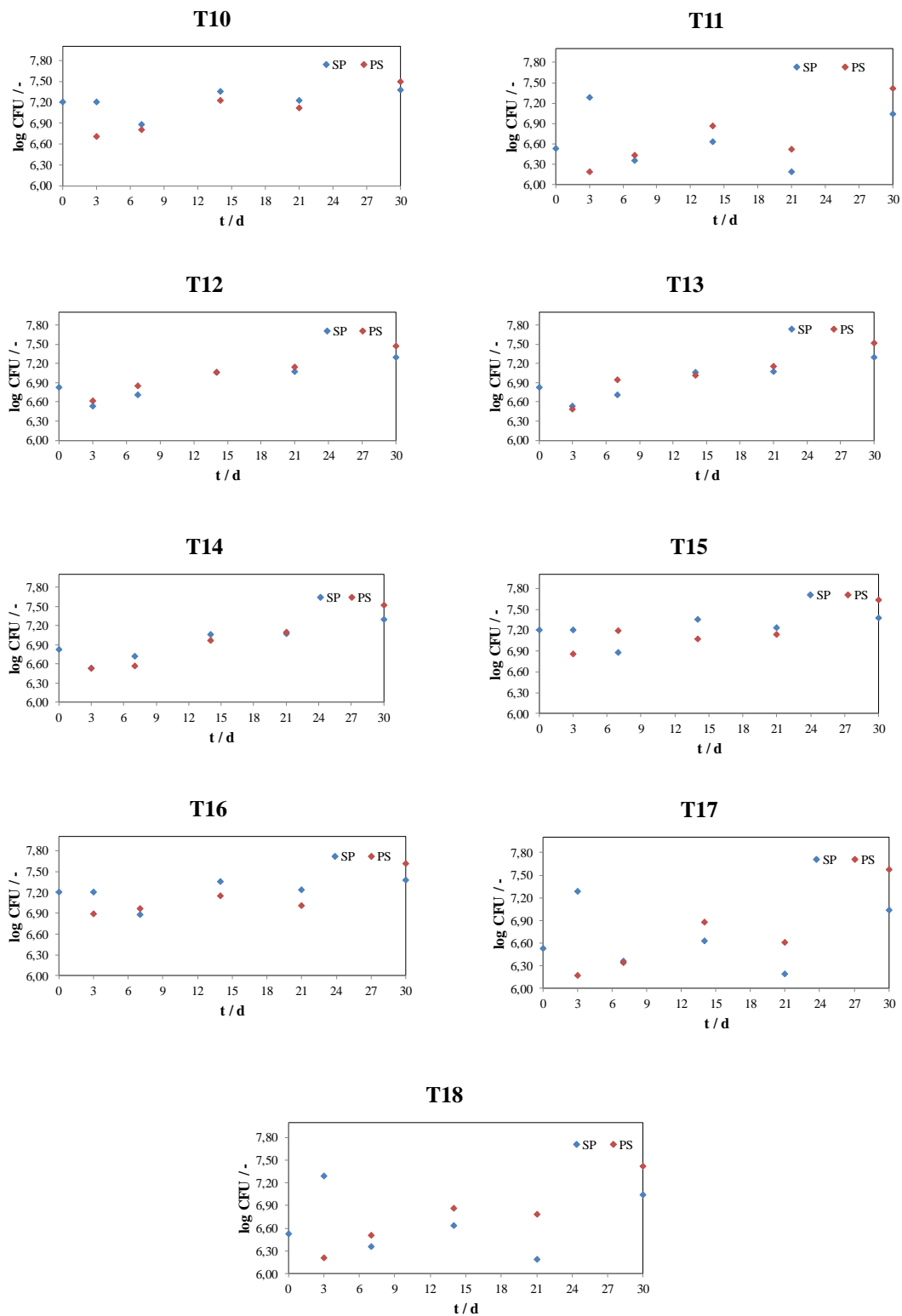
Promjene CFU vrijednosti koja je služila kao parametar za praćenje tijekom biorazgradnje polistirena primjenom bakterijske kulture *Bacillus subtilis* prikazane su na **slikama 4.1-4.3**. Promjene su praćene tijekom 30 dana uz različite čimbenike opisane u **tablici 3.4**.

Na **slikama 4.1-4.3** su prikazane grafičke ovisnosti broja živih stanica bakterije (CFU) za sve uzorke MP-a veličine čestica <300, 300 – 500  $\mu\text{m}$  i 500 – 710  $\mu\text{m}$ ; optičke gustoće (OG) 0,1; 0,3 i 0,5 te brojem okretaja tresilice 100; 150 i 200 o/min u usporedbi s kontrolom (SP). Broj živih stanica bakterija u 0. danu za pokuse s OG = 0,1 iznosio je  $3,4 \times 10^6$  st/mL, za pokuse s OG = 0,3 je iznosio  $6,8 \times 10^6$  st/mL, dok je za pokuse s OG = 0,5 iznosio  $1,6 \times 10^7$  st/mL. Promjena broja stanica u eksperimentu se sastojala od eksponencijalne faze te stacionarne faze. Vidljivo je da je u većini slučajeva, odnosno kombinaciji ključnih čimbenika, eksponencijalna faza trajala od 0. do 14. dana nakon čega je nastupila stacionarna faza do završetka eksperimenta tj. do 30. dana. U stacionarnoj fazi je broj živih i mrtvih bakterijskih stanica jednak. Tijekom biorazgradnje polistirena najveći broj izraslih kolonija bakterije *Bacillus subtilis* u 3. danu je postignut kod pokusa: T4, T7 i T25 u vrijednosti  $3,0 \times 10^7$  st/mL,  $1,9 \times 10^7$  st/mL te  $8,6 \times 10^7$  st/mL. Najveći broj izraslih kolonija u 7. danu je postignuto kod pokusa: T1, T5 i T15 u vrijednostima redom  $1,2 \times 10^7$  st/mL,  $1,2 \times 10^7$  st/mL i  $1,6 \times 10^7$  st/mL. U 14. danu najveći broj izraslih kolonija se postigao u pokusima: T4, T8 i T22 u vrijednosti  $1,9 \times 10^7$  st/mL,  $1,8 \times 10^7$  st/mL i  $1,7 \times 10^7$  st/mL. U 21. danu najveći broj izraslih kolonija se postigao u pokusima: T1, T13 i T22 u

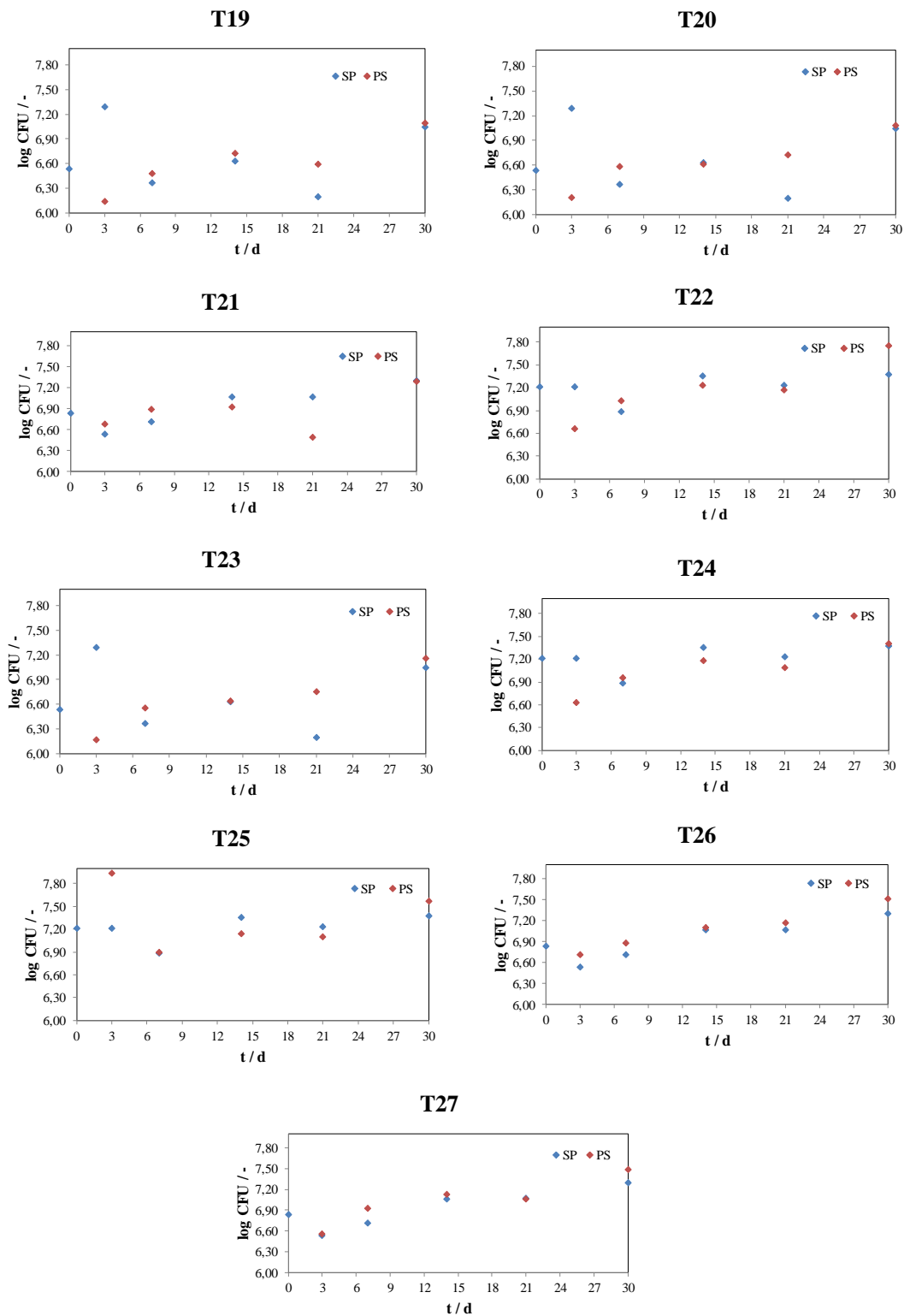
vrijednosti  $1,8 \times 10^7$  st/mL,  $1,5 \times 10^7$  st/mL i  $1,5 \times 10^7$  st/mL. U zadnjem danu, 30. danu, eksperimenta najveći broj izraslih stanica se postigao u pokusima: T15, T16 i T22 u vrijednosti  $4,3 \times 10^7$  st/mL,  $4,2 \times 10^7$  st/mL i  $5,6 \times 10^7$  st/mL.



**Slika 4.1.** Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus subtilis* tijekom 30 dana biorazgradnje polistirena za pokuse T1 do T9 s brojem okretajem 100 o/min.



**Slika 4.2.** Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus subtilis* tijekom 30 dana biorazgradnje polistirena za pokuse T10 do T18 s brojem okretajem 150 o/min.



**Slika 4.3.** Promjena CFU vrijednosti bakterije *Bacillus subtilis* tijekom 30 dana biorazgradnje polistirena za pokuse T19 do T27 s brojem okretajem 200 o/min.

Gotovo svi pokusi pokazuju pravilne faze rasta bakterijskih stanica uz nekolicinu odstupanja. Vidljivo je kako je u svih 27 tikvica u kojima se odvijala biorazgradnja polistirena pri različitim uvjetima, uz bakteriju *Bacillus subtilis*, do 14. dana broj izraslih kolonija rastao eksponencijalno te je nastupila stacionarna faza sve do zadnjeg dana, 30. dana, gdje se pojavio nagli porast izraslih kolonija bakterije. Na **slikama 4.1.-4.3.** je također vidljiv i broj izraslih kolonija za slijepu probu (SP) tijekom 30 dana. SP je rađena za sve tri vrijednosti OG. Uspoređujući vrijednosti CFU za SP s odgovarajućim pokusima uočena je neznatna razlika u broju izraslih kolonija. Kako bakterije koriste MP kao izvor energije jasno je da je porast CFU vrijednosti ovisan o raspoloživosti izvora ugljika. Zato se može primjetiti kako je CFU za pokus T22 jedan od najviših, uzastopno vrijeme, od svih pokusa pošto su korištene čestice PS-a veličine između 300 – 500  $\mu\text{m}$ , zbog veće specifične aktivne površine na koju se biomasa može vezati. Također u pokusu T22 je postignuta najviša vrijednost broja izraslih kolonija jer je *Bacillus subtilis* aerobna bakterija, [84] što znači da za svoj rast i metabolizam koristi kisik iz okoliša, a pokus T22 je stavljen na 200 o/min, što bi moglo značiti bolja opskrba kisikom tijekom eksperimenta.

Nažalost, razne studije navode da polistiren nije biorazgradiv materijal i otporan je na prirodni proces raspadanja koji provode mikroorganizmi u okolišu. [84] Ne pokazuje značajnu razgradnju u okolišu zbog svoje kemijske stabilnosti, visoke molekulske mase te nedostatka hranjivih tvari koje bi omogućile rast mikroorganizama koji ga mogu razgraditi. [85]

#### 4.1.2. Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i TIC-a tijekom pokusa biorazgradnje polistirena

Rezultati dobiveni TOC analizom prikazani su u **tablici 4.2.** Rezultati pokazuju promjenu vrijednosti ukupnog ugljika (TC), organskog ugljika (TOC) i anorganskog ugljika (TIC) za pokus **T15** tijekom procesa biorazgradnje polistirena primjenom bakterije *Bacillus subtilis*.

Trend promjene TOC vrijednosti za pokus T15 donekle prati promjene log CFU u istome pokusu. Naime, TOC vrijednost bi se tijekom procesa biorazgradnje trebala smanjivati, no to se u ovome slučaju ne događa s obzirom na pretpostavku da dolazi do nastajanja razgradnih produkata i/ili otpuštanja aditiva s površine čestica mikroplastike. Kako je vrijednost log CFU se smanjila u 3. danu, tako se uočava i pad TOC vrijednosti. Nadalje, uočen je porast istih u 7. danu, kao i u 30. danu. TIC vrijednosti, koje upućuju na anorganski ugljik odnosno nastanak CO<sub>2</sub>, najviše su u 3. i 7. danu. Prema ovome se može potvrditi da je došlo do biorazgradnje, odnosno da je *Bacillus subtilis* koristio PS kao izvor ugljika i energije. S obzirom na preostale

TC i TOC vrijednosti, TIC vrijednosti se nisu mogle izračunati. Očekivano je bilo dobivanje relevantnih podataka iz provedene analize, odnosno da vrijednost TC-a bude veća od vrijednosti TOC-a. Kako nisu dobiveni odgovarajući rezultati upravo zbog toga je odlučeno ne oslanjati se na ove podatke kako bi se fokusiralo na ostale analize koje su bile relevantnije za eksperiment..

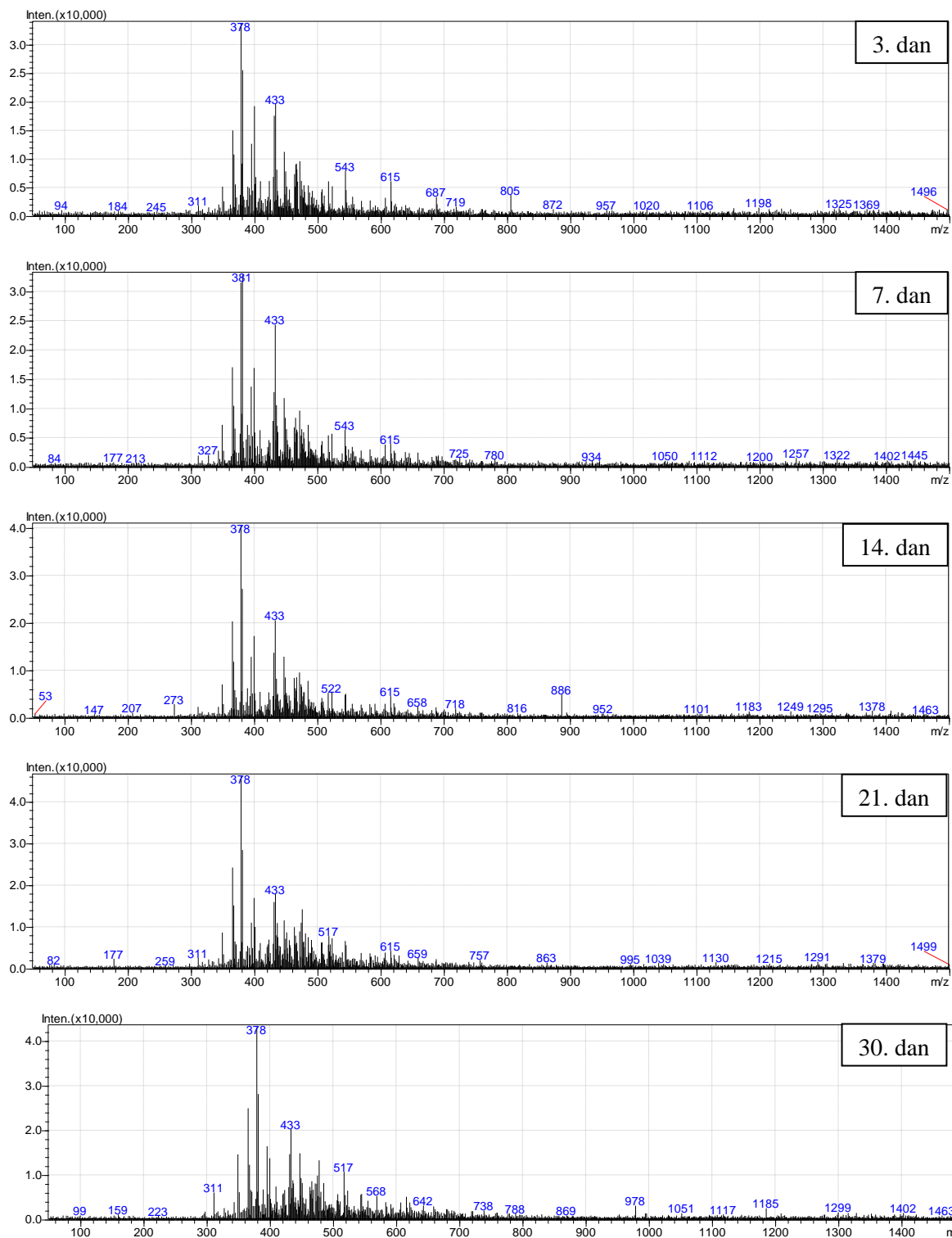
**Tablica 4.2.** Rezultati dobiveni TOC analizom.

<i>t</i> / dan	$\gamma(\text{TOC-T15})$ / mg/L	$\gamma(\text{TOC-SP})$ / mg/L	$\gamma(\text{TC-T15})$ / mg/L	$\gamma(\text{TC-SP})$ / mg/L	$\gamma(\text{TIC-T15})$ / mg/L	$\gamma(\text{TIC-SP})$ / mg/L
0.	7,071	7,071	3,382	3,382	/	/
3.	2,151	9,760	4,719	10,865	2,568	1,105
7.	4,157	5,697	5,189	6,374	1,032	/
14.	5,163	3,550	2,867	2,603	/	/
21.	3,113	9,717	2,708	7,357	/	/
30.	8,024	9,412	4,701	7,128	/	/

#### 4.1.3. Praćenje razgradnih i/ili otpuštenih aditiva s površine čestica mikroplastike tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (LC/MS)

Na **slici 4.4.** prikazan je maseni spektar biorazgradnje polistirena pri OG 0,5 i okretajem 150 o/min dobiveni analizom pomoću LC/MS uređaja. U nastavku u **tablici 4.3.** prikazani su ionski oblici i imena identificiranih spojeva biorazgradnje polistirena bakterijom *Bacillus subtilis* za pokus T15.





Slika 4.4. Rezultati LC/MS analize biorazgradnje polistirena za 3.,7.,14.,21. i 30. dan za pokus T15.

**Tablica 4.3.** Ionski oblik i ime najznačajnijih spoja identificiranih tijekom 30 dana biorazgradnje polistirena bakterijom *Bacillus subtilis* za pokus T15 [86].

<i>m/z</i> omjer	Spoj
378	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub> DOA, Dioktil adipat
433	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub> Diizooktil ftalat
517	C <sub>22</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>2</sub> Dimetil(oktadecil)amonijev acetat

LC/MS analiza filtrata iz eksperimenta iz pokusa tijekom 30 dana pokazuje slične rezultate. Najznačajniji spojevi koji su se detektirali provedenom analizom su dioktil adipat, diizooktil ftalat te dimetil(oktadecil)amonijev acetat.

Dioktil adipat (DOA) vrsta je organskog spoja koji pripada obitelji estera. [87] DOA je bistra, bezbojna tekućina slabog mirisa i obično se koristi kao plastifikator, tvar koja se dodaje polimerima kako bi se povećala njihova fleksibilnost i obradivost. Neke uobičajene upotrebe dioktil adipata uključuju: DOA se naširoko koristi kao plastifikator u polimernim formulacijama jer pomaže u poboljšanju njihove fleksibilnosti, trajnosti i otpornosti na toplinu i kemikalije. DOA se također može koristiti u drugim proizvodima na bazi polimera kao što su ljepila, premazi i brtvila. Upotrebu u materijalima koji dolaze u dodir s hranom kao što su folije za pakiranje, može pomoći u poboljšanju fleksibilnosti i trajnosti materijala za pakiranje hrane. Koristi se kao sastojak u nekim proizvodima za osobnu njegu, kao što su losioni i kreme, za poboljšanje njihove teksture i razmazivosti. Može se koristiti kao mazivo, otapalo ili rashladno sredstvo u raznim industrijskim procesima. [88] Važno je napomenuti da, iako se DOA naširoko koristi i općenito smatra sigurnim za namjeravanu upotrebu, može imati potencijalne zdravstvene i ekološke rizike ako se ne rukuje ispravno. Na primjer, DOA može biti otrovan ako se proguta ili udiše, a također može biti štetan za vodeni život ako se ispusti u vodene tokove.

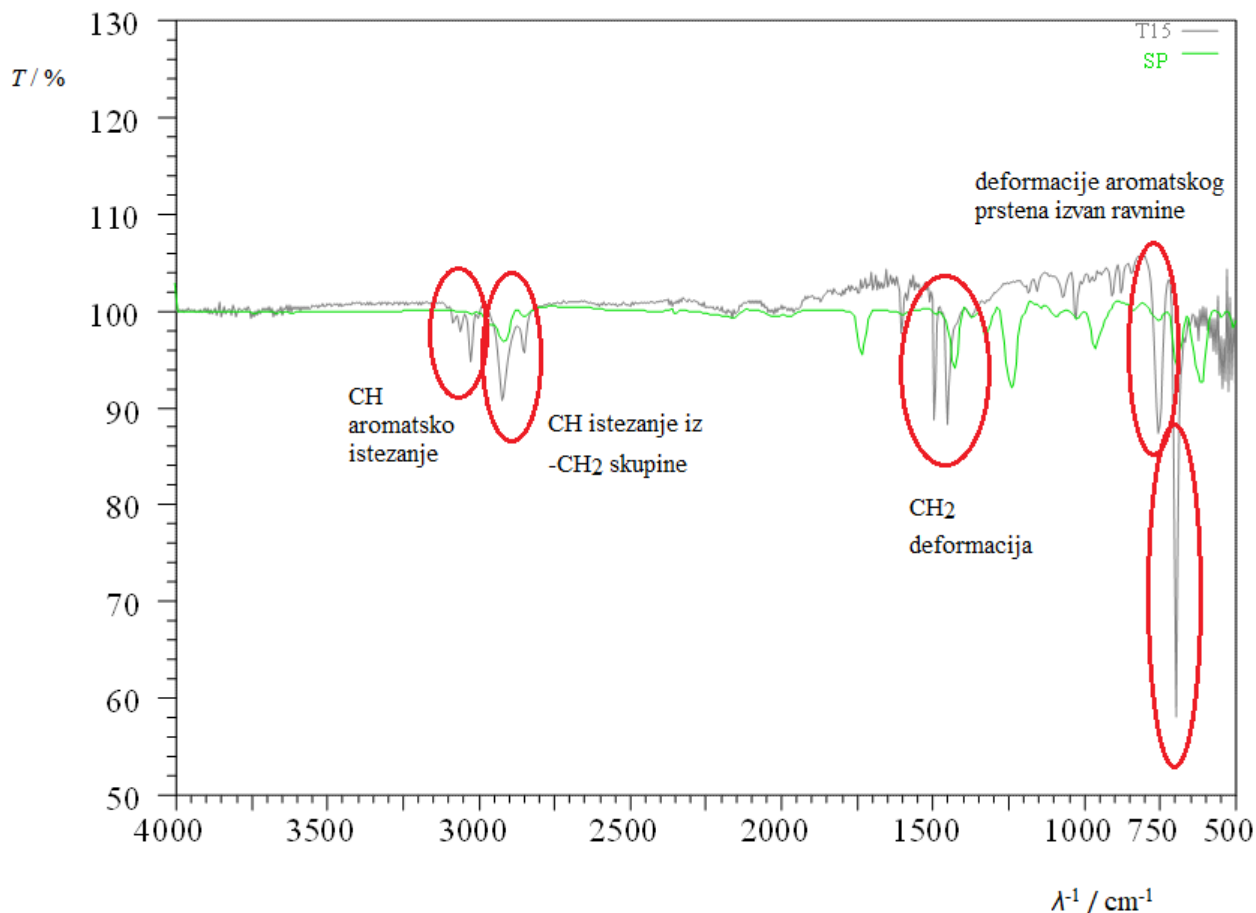
Diizooktil ftalat (DIOP) vrsta je organskog spoja koji spada u ftalatne estere, obično se koristi kao plastifikator. [89] DIOP je bistra, bezbojna tekućina blagog mirisa. DIOP se također može za razna poboljšanja polimerima poput i DOA-e. Kao i drugi ftalatni esteri, DIOP je povezan s

potencijalnim zdravstvenim i ekološkim rizicima. Dokazano je da ima svojstva remećenja endokrinog sustava, što znači da može ometati rad tjelesnog hormonskog sustava. Također je utvrđeno da je DIOP toksičan za vodene organizme. Kao rezultat toga, postoje propisi i ograničenja za korištenje DIOP-a u određenim proizvodima, posebno onima koji dolaze u dodir s hranom ili pićem. [90]

Dimetil(oktadecil)amonijev acetat vrsta je amonijevog spoja koji ima svojstva surfaktanta. Obično se koristi kao kationski surfaktant, emulgator i antimikrobno sredstvo. Nije plastifikator, ali može se dodati određenim formulacijama polimera kao pomoćno sredstvo u procesu ili kao komponenta formulacije koja uključuje plastifikatore. Koristi se za razne svrhe poput emulgatora i regeneratora u proizvodima za njegu kose i kože, sastojak u nekim farmaceutskim pripravcima, poljoprivrednim proizvodima kao što su herbicidi, insekticidi i fungicidi, za proizvodnju boja, premaza i ljepila. Važno je napomenuti da ima antimikrobna svojstva i može biti učinkovit protiv nekih bakterija i gljivica. Osim toga, može biti toksičan u visokim koncentracijama i može izazvati iritaciju kože ili respiratorne probleme ako se udiše. [91-93]

#### *4.1.4. FTIR-ATR spektroskopija mikroplastike polistirena*

FTIR spektar polistirena može se koristiti za identifikaciju i karakterizaciju materijala, kao i za analizu njegove molekularne strukture i sastava. To je vrijedan alat u mnogim područjima istraživanja i industrije, uključujući kemiju polimera, znanost o materijalima i kontrolu kvalitete.



**Slika 4.5.** Prikaz FTIR spektara za PS prije i nakon biorazgradnje za pokus T15.

Na **slici 4.5.** naznačene su strukturne promjene koje su se odvale tijekom biorazgradnje polistirena pomoću bakterije *Bacillus subtilis*. Vidljivi su karakteristični pikovi tj. apsorpcijski vrh na oko  $3025\text{ cm}^{-1}$  koji predstavlja C-H aromatsko istezanje odnosno rasteznu vibraciju aromatskog prstena u monomerima stirena, na otprilike  $2875\text{ cm}^{-1}$  vidljiv je vrh apsorpcije koji označava C-H istezanje iz  $-\text{CH}_2$  skupine, pik na  $1450\text{ cm}^{-1}$  predstavlja  $\text{CH}_2$  deformacija te pik na otprilike  $690\text{ cm}^{-1}$  predstavlja deformaciju aromatskog C-H prstena izvan ravnine. [94]

Usporedbom FTIR spektara prije i nakon biorazgradnje uočeno je da je došlo do izraženih promjena u intenzitetu na spomenutim pikovima. Na  $1600\text{ cm}^{-1}$  identificiran je novi pik koji pripada rastezanju C=C veze koja potječe od alkena. [95]

#### 4.1.5. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*

Negativan utjecaj onečišćenja mora plastikom na život u moru je značajan, a sve veća važnost ekoloških pitanja rezultirala je potražnjom za tehnologijom koja je sigurna za morski okoliš i morske oblike života. Kako bi se odgovorilo na izazove onečišćenja mikro i nanoplastikom, istražuju se biotehnoška rješenja, poput upotrebe mikrobnih zajednica koje mogu stvarati biofilme na plastičnim površinama i proizvoditi katalitičke enzime koji mogu razgraditi sintetičke polimere poput polistirena. Međutim, prije nego što se ti postupci biorazgradnje mogu primijeniti na poluindustrijskoj ili industrijskoj razini, bitno je steći uvid u nusprodukte biorazgradnje. Iako može biti teško odrediti točan sastav konačne suspenzije, neizravne metode poput testova ekotoksičnosti mogu se koristiti za procjenu je li sastav štetan ako se pusti u okoliš. Osim štetnih učinaka gutanja plastike i nakupljanja u tkivima, otpuštanje oligomera, monomera i aditiva tijekom biorazgradnje može predstavljati novu razinu opasnosti i pridonijeti toksičnom učinku. Test inhibicije bioluminiscencije, koji koristi *Vibrio fischeri* (ISO 11348:2007) [96], je povezanost promjena kinetičkih svojstava bioluminescentne reakcije s toksičnošću ispitivanih tvari, odnosno, pad luminiscencije proporcionalan je s toksičnošću ispitivane tvari. Ključno je procijeniti toksičnost nusproizvoda nastalih mikrobnom razgradnjom sintetičkih polimera poput polistirena kako bi se spriječilo nanošenje štete morskom životu i morskom okolišu. Studije su pokazale da plastične čestice mogu imati toksični učinak na morske vrste, kao što je oplodnja jajašca morskog ježa te rast i razvoj ličinki, zbog otpuštanja monomera, oligomera i aditiva. Stoga je važno razlikovati i uzeti u obzir toksičnost ovih otpuštenih komponenti uz izravnu štetu uzrokovanu gutanjem plastike. [97-98]

Test inhibicije bioluminiscencije pomoću *Vibrio fischeri*, kako je navedeno u ISO 11348:2007, ima nekoliko prednosti kao tehnika ekotoksikološkog ispitivanja. Jedna od njegovih najznačajnijih prednosti je kratko trajanje, što omogućuje brzu i učinkovitu procjenu potencijalno štetnih tvari. Ova je metoda također relativno jednostavna i isplativa, što je čini dostupnom i korisnom za širok raspon primjena. Osim toga, pokazalo se da je ovaj biološki test vrlo osjetljiv na različite onečišćujuće tvari, uključujući teške metale, pesticide i industrijske kemikalije. Ova osjetljivost ga čini učinkovitim alatom za praćenje onečišćujućih tvari u okolišu i procjenu njihovog potencijalnog utjecaja na morske i vodene organizme. Test je također prilagodljiv različitim tipovima uzoraka, uključujući vodu, sediment i tlo, a može se izvesti i sa čistim spojevima i sa složenim smjesama. Općenito, test inhibicije bioluminiscencije pomoću *Vibrio*

*fischeri* nudi vrijedan i svestran alat za procjenu potencijalne ekotoksičnosti različitih tvari u nizu vrsta uzoraka. Njegova jednostavnost, osjetljivost i ekonomičnost čine ga atraktivnom opcijom za istraživače i upravitelje okoliša koji žele pratiti i ublažiti utjecaj potencijalno štetnih zagađivača na prirodni okoliš. [99-101]

U **tablici 4.5.** mogu se vidjeti rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata bakterijske suspenzije *Bacillus subtilis* za biorazgradnju polistirena i vrijednosti EC<sub>20</sub>, kao i vrijednosti EC<sub>50</sub>.

**Tablica 4.5.** Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*.

<b>Pokus</b>	<b>Inhibicija / %</b>	<b>EC<sub>20</sub> / %</b>	<b>EC<sub>50</sub> / %</b>
<b>T1</b>	49,27	16,23	*
<b>T2</b>	60,44	4,94	25,04
<b>T3</b>	37,00	18,08	38,95
<b>T4</b>	48,06	14,41	*
<b>T5</b>	54,46	8,70	47,07
<b>T6</b>	50,71	11,26	*
<b>T7</b>	51,47	12,90	*
<b>T8</b>	49,21	11,28	*
<b>T9</b>	18,27	*	*
<b>T10</b>	59,12	7,85	36,77
<b>T11</b>	29,15	30,03	*
<b>T12</b>	27,01	20,66	*
<b>T13</b>	62,54	17,22	39,39
<b>T14</b>	47,74	0,41	*
<b>T15</b>	58,33	9,38	34,87
<b>T16</b>	38,67	*	*
<b>T17</b>	41,90	10,84	5,00
<b>T18</b>	60,10	0,02	14,97
<b>T19</b>	52,87	*	*
<b>T20</b>	42,20	13,18	*
<b>T21</b>	54,05	13,52	45,09
<b>T22</b>	47,15	12,30	*
<b>T23</b>	54,71	*	45,53
<b>T24</b>	51,03	10,36	*
<b>T25</b>	64,43	11,42	33,24
<b>T26</b>	41,86	4,93	27,93
<b>T27</b>	46,69	*	*

\* vrijednost nije bilo moguće procijeniti.

U eksperimentu se pratio intenzitet bioluminiscencije *Vibrio fischeri* na početku i na kraju eksperimenta kako bi se odredila efektivna koncentracija koja je uzrokovala štetan učinak na 20

% izložene populacije tj. *Vibrio fischeri*, također poznatu kao vrijednost EC<sub>20</sub>. Ova je vrijednost važna u ekotoksikološkim ispitivanjima, jer pruža način za mjerenje potencijalne štete koju tvar može prouzročiti populaciji. Još jedna često korištena vrijednost je EC<sub>50</sub>, koja predstavlja koncentraciju tvari koja uzrokuje štetu kod 50 % izložene populacije. Vrijednosti EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> koriste se za određivanje toksičnosti tvari i mogu pružiti važne informacije za procjenu rizika za okoliš. U tablici se može vidjeti kako najnižu vrijednost EC<sub>50</sub> imaju pokusi: T5, T13, T15, T21 i T23. Najveći toksični učinak na morsku bakteriju *Vibrio fischeri* uočen je kod pokusa T18 u iznosu od 0,02 %. Budući da proces može otpustiti aditive ili nove proizvode organske razgradnje s površine mikroplastičnih čestica, očekivano su dobivene niske vrijednosti EC<sub>20</sub>. Nastali nusproizvodi mogu biti štetni za organizme. Niske vrijednosti EC<sub>20</sub> pokazuju da čak i male količine ovih štetnih tvari mogu negativno utjecati na 20 % populacije *Vibrio fischeri*, što naglašava potencijalne rizike povezane s onečišćenjem morskog okoliša mikroplastikom.

#### **4.1.6. Rezultati statističke analize varijance (ANOVA)**

Zbog značajnog utjecaja onečišćenja plastikom na okoliš, znanstvenici su istraživali različite pristupe kako bi razumjeli problem. Jedan od izazova u tom smislu je stvoriti matematičke modele za biorazgradnju krutih materijala, budući da ovaj proces uključuje brojne varijable i pod utjecajem je međuovisnosti mikroorganizama te unutarnjih i vanjskih čimbenika. Dodatno, brzina razgradnje određena je ograničenjima prijenosa mase, jer su čvrsti supstrati visoko hidrofobni. Iako postoje neki matematički modeli za razumijevanje biorazgradnje plastike u prirodnim okruženjima poput vodenih sustava, ključno je proučavati proces biorazgradnje u kontroliranim uvjetima, kao što je korištenje bioreaktora i sustava za kompostiranje, kako bi se razvila djelotvorna rješenja. [102] Pomoću analizom varijance (ANOVA) provjeren je utjecaj na odziv sustava pri promjeni čimbenika. Proveden je eksperiment kako bi se odredili optimalni uvjeti za biorazgradnju PS-a korištenjem potpunog faktorskog dizajna (eng. *Full Factorial design*), koji se obično koristi kada je fokus na identificiranju čimbenika koji utječu na proces ili procjeni njihovog utjecaja. Potpuni faktorski dizajni omogućuju procjenu učinaka svih čimbenika i njihovih međudjelovanja. Za analizu utjecaja pojedinih procesnih parametara na logaritamsku vrijednost jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) tijekom biorazgradnje PS-a, provedena je analiza varijance (ANOVA) pomoću programa Design Expert na razini značajnosti  $p < 0,05$ . ANOVA je metoda koja omogućuje procjenu varijabilnosti na koju utječu različiti

čimbenici. [103] Statistička metoda koja pomaže utvrditi postoje li značajne razlike. Ispitivanjem odstupanja rezultata od srednjih vrijednosti, ANOVA omogućuje testiranje nulte hipoteze ( $H_0$ ), koja kaže da su srednje vrijednosti unutar danog tretmana (tj., na istoj razini faktora) jednake i pripadaju istoj populacije, pri čemu je svaka varijacija posljedica slučajne pogreške. Razina praga statističke značajnosti ( $\alpha$ ) mjera je osjetljivosti statističkog testa i označava najveću dopuštenu stopu pogreške za odbacivanje nulte hipoteze. U ovoj studiji razina značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ , što znači da tvrdimo da je nulta hipoteza točna s vjerojatnošću od 95 %, a da je vjerojatnost da je nulta hipoteza netočna 5 %. Preporuča se navesti točnu vrijednost  $p$ -vrijednosti, a ne samo je li manja ili veća od  $\alpha$ , jer to daje precizniju mjeru značajnosti rezultata. [104] U **tablici 4.6.** mogu se vidjeti rezultati provedene analize varijance.

**Tablica 4.6.** Eksperimentalne vrijednosti parametara modela prilikom biorazgradnje PS-a bakterijom *Bacillus subtilis*.

	Zbroj kvadrata	$df$	Srednji kvadrat	$F$ -vrijednost	$p$ -vrijednost Vjv. $> F$
<b>Model</b>	<b>0,630</b>	<b>9</b>	<b>0,070</b>	<b>6,04</b>	<b>0,0008</b>
<b>A - pH /-</b>	$3,461 \cdot 10^{-3}$	1	$3,461 \cdot 10^{-3}$	0,30	0,5926
<b>B - broj okretaja / o/min</b>	$6,326 \cdot 10^{-3}$	1	$6,326 \cdot 10^{-3}$	0,54	0,4710
<b>C - OG /-</b>	0,310	1	0,310	26,90	<0,0001
<b>AB</b>	$2,305 \cdot 10^{-4}$	1	$2,305 \cdot 10^{-4}$	0,020	0,8897
<b>AC</b>	$1,563 \cdot 10^{-3}$	1	$1,563 \cdot 10^{-3}$	0,13	0,7186
<b>BC</b>	0,018	1	0,018	1,56	0,2291
<b>A<sup>2</sup></b>	0,018	1	0,018	1,57	0,2265
<b>B<sup>2</sup></b>	0,120	1	0,120	10,11	0,0055
<b>C<sup>2</sup></b>	0,016	1	0,016	1,37	0,2583
<b>Ostatak</b>	0,200	17	0,012	/	/
<b>Ukupno</b>	0,830	26	/	/	/



U ovom slučaju  $C$ ,  $C^2$  su značajni čimbenici modela i predstavljaju OG i  $OG^2$  jer su im  $F$ -vrijednosti manje od 0,0500. Vrijednosti veće od 0,1000 označavaju da pojmovi modela nisu značajni.

Važno je napomenuti da sama  $p$ -vrijednost ne govori o veličini ili praktičnom značaju učinka. Statistički značajan rezultat možda neće biti praktično značajan ako je veličina učinka mala ili ako su troškovi ili napor provedbe intervencije previsoki. Stoga se preporuča također prijaviti veličine učinka, intervale pouzdanosti i praktične implikacije rezultata, uz  $p$ -vrijednost.

U daljnim natuknicama opisat će se veličine korištene za analizu i procjenu kvalitete matematičkih modela stvorenih u studiji, uključujući koeficijent determinacije ( $R$ -kvadrat), prilagođeni  $R$ -kvadrat, korijen srednje kvadratne pogreške i srednja apsolutna postotna pogreška. Ove veličine omogućuju kvantificiranje točnosti i prediktivne snage modela te usporedbu različitih modela ili postavki parametara. [105]

- **Standardna devijacija** ( $\sigma$ ), mjera varijabilnosti vrijednosti u skupu podataka. Ona procjenjuje koliko su pojedinačne vrijednosti udaljene od srednje vrijednosti skupa. Visoka vrijednost standardne devijacije ukazuje na veliku varijabilnost, dok mala vrijednost ukazuje na manju varijabilnost u skupu podataka.
- **R-Squared** ( $R^2$ ) je koeficijent determinacije je mjera koliko dobro regresijski model odgovara stvarnim podacima. On predstavlja kvadrat korelacije između predviđene vrijednosti (od strane regresijskog modela) i stvarne vrijednosti podataka. Koeficijent determinacije uvijek je između 0 i 1, gdje vrijednost 1 označava savršenu predikciju, a vrijednost 0 označava da model nije bolji od slučajnog predviđanja.
- **Adjusted R-Squared** - predstavlja modifikaciju standardnog koeficijenta determinacije ( $R^2_{adj}$ ) koja uzima u obzir broj nezavisnih varijabli i veličinu uzorka kako bi se izbjegli nerealno visoki vrijednosti  $R^2$  u slučajevima s velikim brojem nezavisnih varijabli ili malim uzorcima.
- **Predicted R-Squared** - predviđeni koeficijent determinacije tj. mjera kvalitete prediktivne moći regresijskog modela. Koristi se za procjenu koliko dobro model može predviđati buduće vrijednosti promatranog odziva. Obično je manji od standardnog koeficijenta determinacije.
- **PRESS** - predviđena suma kvadrata ostataka

➤ **C. V.** - koeficijent varijacije relativna mjera rasipanja izražena u %

**Tablicom 4.7.** su prikazani čimbenici koji imaju najznačajniji utjecaj na proces te odgovarajuće razine pri kojima bi proces biorazgradnje bio optimalan.

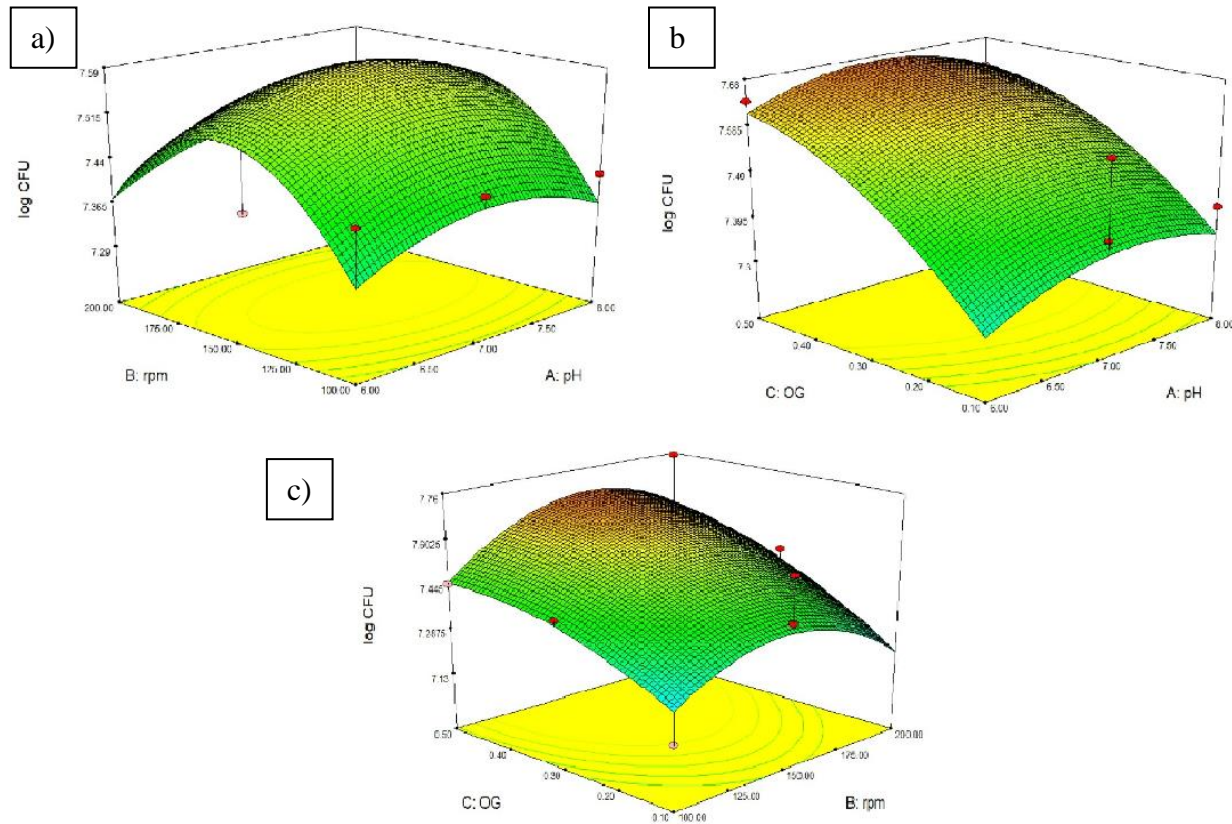
**Tablica 4.7.** Pregled statističkih podataka modela.

$R^2$	0,7617
<b>Prilagođeni <math>R^2</math></b>	0,6355
<b>Predviđeni <math>R^2</math></b>	0,3939
<b>Odgovarajuća preciznost</b>	8,409
<b>Standardna devijacija</b>	0,11
<b>Srednja vrijednost</b>	7,41
<b>Koeficijent varijacije (C.V.%)</b>	1,46
<b>PRESS</b>	0,50

Standardna devijacija u eksperimentu iznosi 0,11. Koeficijent determinacije  $R^2$  iznosi 0,7617, što označava da se model relativno dobro slaže s eksperimentalnim rezultatima. Prilagođeni  $R^2$  iznosi 0,6355, dok predviđeni  $R^2$  iznosi 0,3939. Navedene vrijednosti ne upućuju na kvalitetu predviđanja modela, već koliko je dobro zavisna varijabla opisana nezavisnim varijablama. Pošto se prilagođeni  $R^2$  ne razlikuje previše od  $R^2$  može se zaključiti da model ne sadrži previše nezavisnih varijabli. Predviđeni  $R^2$  indicira koliko će model biti odgovarajuć za buduće podatke i dosta je niži od prilagođenog  $R^2$ . Odgovarajuća preciznost iznosi 8,409, što znači da model ima odgovarajući signal i može se koristiti u dizajnu procesa. C.V. iznosi 1,46 %, što ukazuje da rasipanje podataka oko srednjih vrijednosti nije visoko.

Primjenom punog faktorskog plana uz korištenje programskog alata Design Expert na temelju podataka o promjeni vrijednosti log CFU tijekom 30 dana, utvrđeni su optimalni uvjeti za provedbu procesa. **Slika 4.6.** prikazuje odzivne površine za ispitivane čimbenike (broj okretaja, pH-vrijednost, OG) te utjecaj njihovih međusobnih interakcija na broj razvijenih kolonija.

Intenzitet utjecaja varijabli na log CFU prikazan je crvenom bojom za najjači, zelenom bojom za srednji i plavom bojom za najslabiji utjecaj.



**Slika 4.6.** 3D prikazi modela odzivnih površina koji prikazuju utjecaj međuovisnosti ispitivanih čimbenika na rast broja stanica bakterija: a) broj okretaja i pH vrijednost, b) OG i pH-vrijednost, c) OG i broj okretaja.

Na 3D prikazu modela može se vidjeti paralelnom utjecaju dvaju ispitivanih čimbenika na odziv log CFU. Najveći utjecaj je vidljiv pri većim vrijednostima OG (0,5), pH vrijednost koja iznosi 7 te broj okretaja je najoptimalniji pri 150 o/min. Najniži utjecaj se može vidjeti kod manje vrijednosti OG (prema 0,1) te odmicanjem pH od 7 i odmicanjem broja okretaja od 150 o/min. Čimbenici koji imaju najznačajniji utjecaj na proces mogu se vidjeti u **tablici 4.8.** ujedno prikazuje odgovarajuće razine pri kojima bi proces biorazgradnje bio optimalan. Uvjeti odgovaraju pokusu T15.

**Tablica 4.8.** Optimalni uvjeti za biorazgradnju PS-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis*.

<b>pH vrijednost / -</b>	<b>broj okretaja / o/min</b>	<b>OG / -</b>
7,05	159,84	0,50

Prema dobivenim statističkim podacima i odzivnim površinama određeni su optimalni uvjeti za provođenje biorazgradnje PS-om s bakterijom *Bacillus subtilis* te iznose: broj okretaja 159,84 o/min, OG 0,50 te pH vrijednost 7,05, što se može vidjeti u tablici 4.8. biorazgradnja ima bolju homogenizaciju ako se primjeni viši broj okretaja te veća koncentracija samih mikroorganizama koji provode biorazgradnju.

## 5. ZAKLJUČAK

Mikroplastika, odnosno male čestice plastike veličine manje od 5 mm, postaje sve veći problem za okoliš i ljudsko zdravlje jer se nakon što se odbaci u prirodu, može nakupljati u tlu, vodi i zraku, te se u konačnici može naći u lancu prehrane. Budući da plastika nije biorazgradiva, već se samo raspadne na još manje čestice koje mogu biti još opasnije, traže se načini kako smanjiti njezinu količinu u okolišu. Jedan od načina je korištenje bakterija koje mogu razgraditi plastiku. *Bacillus subtilis* je jedna od bakterija koja ima potencijal za razgradnju plastike, uključujući polistiren. U nekim istraživanjima se pokazalo da *Bacillus subtilis* može proizvoditi enzime poput polistirenaze, koji su sposobni razgraditi polistiren na manje molekule koje se mogu dalje razgraditi od drugih mikroorganizama. Ovo su vrlo obećavajući rezultati koji ukazuju na to da bi uporaba mikroorganizama poput *Bacillus subtilis* mogla biti korisna u rješavanju problema mikroplastike u okolišu.

Tijekom eksperimentalnog razdoblja od 30 dana su praćene promjene u fizikalno-kemijskim parametrima, a kao rezultat toga se zaključilo:

- Najveća CFU vrijednost u odabranom pokusu T15 postignuta je u 30. danu i iznosila je  $4,3 \times 10^7$  st/mL.
- Provedena je LC/MS analiza pomoću koje su otkriveni novonastalih iona. Ti novonastali ioni su dokaz biorazgradnje polistirena uz pomoć bakterijske kulture *Bacillus subtilis*.
- Na temelju analize FTIR spektra polistirena, uočene su promjene u intenzitetu pikova apsorpcijskih vrpca, te je otkriveno stvaranje novih i nestajanje postojećih vrpca. To ukazuje na učinkovitu biorazgradnju PS-a uz pomoć bakterije *Bacillus subtilis*.
- EC<sub>20</sub> vrijednost dobivena nakon biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus subtilis* u pokusu T15 iznosila je 9,38% dok je EC<sub>50</sub> vrijednost iznosila 34,87. Inhibicija u tom pokusu iznosi 58,33%.
- Rezultati statističke analize varijance (ANOVA) pokazali su kako su optimalni uvjeti za biorazgradnju PS-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis*: pH vrijednost = 7,05, 159,84 o/min, i vrijednost OG = 0,5. Što bi odgovaralo pokusu T15 koji je imao čestice polistirena veličine 500 – 710 μm.

Međutim, važno je napomenuti da biotehnoške strategije za razgradnju plastike, uključujući i uporabu mikroorganizama, još uvijek nisu u potpunosti razvijene i testirane u prirodnom okolišu. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo koliko su ove strategije učinkovite i sigurne za okoliš.

## 6. LITERATURA

- [1] Barboza, L.G.A., et al. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European sea bass. *Environmental Research*, 166, (2018) 570-577.
- [2] Mattsson, K., et al. Effects of microplastics on innate immune parameters in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environmental Science and Technology*, 52(20), (2018) 11761-11769.
- [3] Su, L., et al. Removal of microplastics from water environment: A review. *Water Research*, 176, (2020) 115724.
- [4] Wang, J., et al. Removal of microplastics from water by adsorption: A review. *Water Research*, 175, (2020) 115641.
- [5] Ding, J., et al. A review of microplastics removal in wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 770, (2020) 145292.
- [6] Zhang, K., et al. Removal of microplastics by coagulation: Role of coagulant type, solution chemistry and natural organic matter. *Water Research*, 111, (2017) 11-19.
- [7] Wei, R., et al. Biodegradation of plastics: current status and future perspectives. *Biotechnology Journal*, 14(1), (2019) 1700059.
- [8] Khan, S., et al. Microbial degradation of polyethylene: A review of current developments and future perspectives. *Journal of Environmental Management*, 270, (2020) 110809
- [9] Al-Salem, S.M., et al. Progress in the recycling of polystyrene. *Chemical Engineering Journal*, 347, (2018) 527-548.
- [10] Shah, A.A., et al. Plastic biodegradation: Challenges and opportunities. *Journal of Environmental Management*, 217, (2018) 565-576.
- [11] Yang, J., et al. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests. *Environmental Science and Technology*, 48(20), (2014) 12080-12086.
- [12] <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/> (Pristup 11. lipnja 2023.)
- [13] Streit-Bianchi, M., Cimadevila, M., Trettnak, W., *The Plastic Sea Combatting Plastic Pollution Through Science and Art, Mare Plasticum Springer, Švicarska* (2020).
- [14] Napper, I. E., Thompson, R. C., & Jambeck, J. R. Plastic waste trade has led to a new era of pollution. *Science Advances*, 6(44), (2020)

- [15] MSFD GES Technical Subgroup on Marine Litter, Monitoring Guidance for Marine Litter in European Seas, Draft Report. European Commission, Brussels, (2013).
- [16] <https://www.americanchemistry.com/Polystyrene/> (Pristup 1. travnja 2023.)
- [17] <https://www.epa.gov/international-cooperation/polystyrene> (Pristup 1. travnja 2023.)
- [18] <https://www.plasticseurope.org/en/about-plastics/types-plastics/polystyrene> (Pristup 1. travnja 2023.)
- [19] Samiha Kabir, M., Wang, H., Luster-Teasley, S., Zhang, L., Zhao, R., Microplastics in landfill leachate: Sources, detection, occurrence, and removal, *ESE*, 16 (2023)
- [20] Auta, H.S., Emenike, C.U., Fauziah, S.H., Distribution and importance of microplastic in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions, *Environment International*, 102 (2017) 165-176
- [21] Qiu, Q., Tan, Z., Wang, J., Peng, J., Li, M., & Zhan, Z., Extraction, enumeration and identification methods for monitoring microplastics in the environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 176, (2016) 102–109.
- [22] Rochman, C.M., The story of plastic pollution: From the distant ocean gyres to the global policy stage. *Oceanography*, 33(3) (2020), 60-70.
- [23] Pico Y, Alfarhan A, Barcelo D. Nano- and microplastic analysis: Focus on their occurrence in freshwater ecosystems and remediation technologies. *TrAC*
- [24] Andrady, A.L. & Neal, M.A.. Applications and societal benefits of plastics. *Philos. Trans. R. Soc., B.*, 364, (2009) 1977–1984
- [25] Jahnke A. WEATHER-MIC-How microplastic weathering changes its transport, fate and toxicity in the marine environment
- [26] Andrady A.L. Microplastics in the marine environment. *Mar Pollut Bull*, 62, 8, (2011), 1596-1605
- [27] Andrady, A.L. Persistence of plastic litter in the oceans. In M. Bergmann, L. Gutow, L., M. Klages, eds. *Marine Anthropogenic Litter*, (2015) 57-72. Cham, Switzerland, Springer International Publishing
- [28] Horton, A. A., Svendsen, C., Williams, R. J., Spurgeon, D. J., & Lahive, E. Large microplastic particles in sediments of tributaries of the River Thames, UK-Abundance, sources and methods for effective quantification. *Marine Pollution Bulletin*, 114(1), (2017) 218-226.



- [29] Andrady, A. L. The plastic in microplastics: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), (2017) 12-22.
- [30] Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., ... & Law, K. L. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), (2015) 768-771.
- [31] Rochman, C. M., Browne, M. A., Halpern, B. S., Hentschel, B. T., Hoh, E., Karapanagioti, H. K., ... & Thompson, R. C. Policy: Classify plastic waste as hazardous. *Nature*, 494(7436), (2013) 169-171.
- [32] Law, K. L. Plastics in the marine environment. *Annual Review of Marine Science*, 9, (2017) 205-229.
- [33] Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), (2017)
- [34] Narayan, R. Biodegradability: A Way for the Future of Plastics. *Materials Today Chemistry*, 17, 100306 (2020).
- [35] Bessa F, Barría P., Neto J.M., Frias J.P.G.L., Otero V., Sobral P., Marques J.C., Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment, *Marine Pollution Bulletin*, 128, (2018), 575-584
- [36] Bouwmeester H., Hollman P. C. H., Peters R.J. B., Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology, *Environmental Science & Technology*, 49, 15, (2015) 8932–8947
- [37] Koelmans, A. A., Mohamed Nor, N. H., & Hermsen, E. Sorting out the risks of microplastics. *Environmental Science & Technology*, 53(19), (2019) 9964-9971.
- [38] Lohmann, R. Microplastics are not important for the cycling and bioaccumulation of organic pollutants in the oceans—but should microplastics be considered POPs themselves?. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), (2017) 460-465.
- [39] Campanale C, Massarelli C, Savino I, Locaputo V, Uricchio VF. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *Int J Environ Res Public Health.*, 1212 (2020): 13–17
- [40] United Nations Environment Programme, *Marine Plastic Debris and Microplastics: Global Lessons and Research to Inspire Action and Guide Policy Change*. 2016

- [41] Bhuyan Md. S, Effects of Microplastics on Fish and in Human Health, *Frontiers in Environmental Science*, 10 (2022)
- [42] Kim, H.-W., Jo, J. H., Kim, Y.-B., Le, T.-K., Cho, C.-W., Yun, C.-H., Chi, W. S., Yeom, S.-J., Biodegradation of polystyrene by bacteria from the soil in common environments, *Journal of Hazardous Materials* 416 (2021), 126239
- [43] Smith, J., Jones, A., *Organisms Used in Ecotoxicity Testing: Overview of Major Species and Their Applications*, Environmental Toxicology and Chemistry, 2018
- [44] European Chemicals Agency (ECHA). Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment. 2017.
- [45] Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. 2011.
- [46] Larue C., Sarret G., Castillo-Michel H., Pradas Del Real A., A Critical Review on the Impacts of Nanoplastics and Microplastics on Aquatic and Terrestrial Photosynthetic Organisms, *Small*, 20, (2021)
- [47] Meier, J., Täubner, I., The *Vibrio fischeri* Luminescence Assay: A Simple and Rapid Screening Method for Toxicity Assessment. In *Marine Pollution and Microbial Remediation* Springer, Cham. 2016, 175-184
- [48] ISO 11348-3:2007 Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria
- [49] Blair Espinoza, Reina Maricela Microplastics in wastewater treatment systems and receiving waters. PhD thesis, University of Glasgow (2019)
- [50] Shahnawaz, M., Sangale, M.K., Ade, A.B., *Bioremediation Technology for Plastic Waste*. (2019.)
- [51] Taniguchi, I., Yoshida, S., Hiraga, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., Oda, K., Biodegradation of PET: current status and application aspects. *ACS Catal.* 9, (2019) 4089–4105.

- [52] Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, (2013) 7137–7146.
- [53] Gong, J., Duan, N., Zhao, X., Evolutionary engineering of *Phaffia rhodozyma* for astaxanthin-overproducing strain. *Front. Chem. Sci. Eng.* 6, (2012) 174–178.
- [54] Shabbir, S., Faheem, M., Ali, N., Kerr, P.G., Wang, L.-F., Kuppusamy, S., Li, Y., Periphytic biofilm: an innovative approach for biodegradation of microplastics. *Sci. Total Environ.* 717, (2020) 137064.
- [55] Andrady, A. L., *Plastics and environmental sustainability*, John Wiley & Sons, 2003.
- [56] Yang, S.S., Brandon, A.M., Crowley, D.E., Wang, Q. Biodegradation of polystyrene and plastic wastes by mealworms: A review on current knowledge and future perspectives. *Waste Management*, 89, (2019) 98-108.
- [57] Oliveira, L.A., da Cruz, G.F., Seckler, M.M., Agnelli, J.A.M., Carvalho, A.K.F., Gonçalves, M.C., et al. Biodegradation of expanded polystyrene by filamentous fungi isolated from landfill soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 147 (2020).
- [58] Lee, J., Lee, H., Lee, H., Lee, J., Lee, S., Lee, C., et al. Accelerated biodegradation of polystyrene by *Pseudomonas putida* B1 via cell surface display of bacterial carboxylesterase (CesA). *Environmental Science & Technology*, 51(1), (2017) 527-534.
- [59] Wei, R., Wong, Y. S., Sudesh, K., & Ma, F. Biodegradation of polystyrene by *Pseudomonas* sp. isolated from the guts of sea turtles. *Marine Pollution Bulletin*, 146, (2019) 763-767
- [60] Narancic, T., O'Connor, K. E., & Prieto, A. A review of the enzymatic degradation of biodegradable polymers. *Chemical Society Reviews*, 49(22), (2020) 8119-8149
- [61] Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. Recent advances in microbial polyethylene and polypropylene plastics degradation. *Frontiers in Microbiology*, 10, (2019) 2804.
- [62] *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial Cell Factories*, 13, 1, (2014) 87
- [63] Liu R., Zhao S., Zhang B., Li G., Fu X., Yan P., Shao Z., Biodegradation of polystyrene (PS) by marine bacteria in mangrove ecosystem, *Journal of Hazardous Materials*, 442, (2023), 130056

- [64] Giacomucci L., Raddadi N., Soccio M., Lotti N., Fava F., Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*, *New Biotechnology*, 52, (2019), 35-41
- [65] Hofmann U., Schlosser D. Biochemical and physicochemical processes contributing to the removal of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, (2016), 2381–2399
- [66] Yang Y., Yang J., Wu W.-M., Zhao J., Song Y., Gao L., Yang R., Jiang L., Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests, *Environmental Science & Technology*, 49, 20, (2015),12080–12086
- [67] Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., & Higton, G., *Industrial microbiology: an introduction*, John Wiley & Sons, 2001.
- [68] Miroslava Kisilak, Michał Obuchowski, Agnieszka Tarnawa, Agata Gonet-Surówka, Bartosz Bartoszewicz, Janina Baranowska, "Bacillus subtilis as a tool for synthetic biology: construction of a novel system for inducible gene expression", *Microbial Cell Factories*, 2012, 11:9
- [69] Junhua Zhang, Yuling Zhu, Xiaoning Wang, Shaoqing Yang, *Bacillus subtilis* as a platform for cellulase production and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, , vol. 103, no. 4 (2019), 1385-1398,
- [70] Abdel-Hamid, A. M., Soliman, N. A., Al-Askar, A. A., & Alharbi, R. F. Biodegradation of expanded polystyrene by filamentous fungi isolated from landfill soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 151 (2020), 104905
- [71] Naz et al. (2019): "Bacillus subtilis biofilm decreases microplastic degradation capacity"
- [72] Syafiuddin et al. (2018): "Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by *Bacillus subtilis*"
- [73] Zainudin et al. (2021): "Polyethylene Degradation by *Bacillus subtilis* Isolated from Marine Sediment"
- [74] Zhang H., Liu Q., Wu H., Sun W., Yang F., Ma Y., Qi Y., Biodegradation of polyethylene film by the *Bacillus* sp. PELW2042 from the guts of *Tenebrio molitor* (Mealworm Larvae), *Process Biochemistry*, 130, (2023), 236-244
- [75] Bérdy, J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 65(8), (2012) 385-394.

- [76] Singh, R., Tiwari, M. K. A study on cellulase enzyme production by *Bacillus subtilis* using lignocellulosic waste. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 4(3), (2012) 940-947.
- [77] Rajaei, S., Mashreghi, M. Amylase production by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains isolated from spoiled canned food. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(4), (2013) 376
- [78] Wei, R., Zimmermann, W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?. *Microbial Biotechnology*, 10(6), (2017) 1308-1322.
- [79] Ribitsch, D., Acero, E. H., Greimel, K., Eiteljoerg, I., Trotscha, E., Freddi, G., Guebitz, G. M. Enhanced cutinase-catalyzed hydrolysis of polyethylene terephthalate by covalent fusion to hydrophobins. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), (2011) 7546-7550.
- [80] Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Oda, K. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), (2016). 1196-1199.
- [81] Han, J., Guo, J., Zhang, Z., Chen, X., Li, M., Yang, Y. Screening and characterization of a new thermophilic bacterium capable of degrading polyethylene. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(15), (2017) 44836
- [82] Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons. (2017).
- [83] Box, G. E. P., Hunter, W. G., Hunter, J. S. *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery* (2nd ed.). John Wiley & Sons. (2005).
- [84] Makarewicz, O., Dubrac, S., Msadek, T., Borriss, R. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Annals of microbiology*, 59(4), (2009) 583-597.
- [85] Yang, Y., Yang, J., Wu, W. M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L. Microbial degradation of polystyrene: A review. *Environmental pollution*, 223, (2017) 469-480.
- [86] Keller, Jie Sui, Alex B. Young and Randy M., The contaminant information below is taken from "Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry" *Whittal Analytica Chimica Acta* 627, Issue 1, 3 (2008), 71-81
- [87] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dioctyl-adipate> (Pristup 11. travnja 2023.)
- [88] <https://chemceed.com/products/dioctyl-adipate-doa/> (Pristup 11. travnja 2023.)
- [89] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diisooctyl-phthalate> (Pristup 11. travnja 2023.)

- [90] Toxicity review of Diisooctyl phthalate (DIOP), United States consumer product safety commission, Bethesda 2010, MD 20814
- [91] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/61756> (Pristup 11. travnja 2023.)
- [92] <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.039.419> (Pristup 11. travnja 2023.)
- [93] <https://cymitquimica.com/products/AN-AG002BM8/19855-61-9/1-octadecanamine-nn-dimethyl-acetate-11/> (Pristup 11. travnja 2023.)
- [94] Das, G., Bordoloi, N. K., Rai, S- K., Mukherjee, A. K., Karak, N., Biodegradable and biocompatible epoxidized vegetable oil modified thermostable poly(vinyl chloride): thermal and performance characteristics post biodegradation with *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp., *Journal of Hazardous Materials* 209–210 (2012), 434-442.
- [95] Bucci, K., Tulio, M., Rochman, C. M., What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review, *Ecological Applications* 30(2) 2020.
- [96] International-Standard (ISO 11348-1), Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test)— Part 3: Method using freeze-dried bacteria, (2007).
- [97] Martínez-Gómez, C., Leon, V. M., Calles, S., Gomáriz-Olcina, M., Vethaak, A.D., The adverse effects of virgin microplastics on the fertilization and larval development of sea urchins, *Marine Environmental Research* (2017).
- [98] Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Iqbal, M., *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of The Total Environment*, 626 (2018) 1295–1309.
- [99] Castro-González, M. I., Méndez-Armenta, M., Gómez-Pinedo, U. A review of the methodologies used in the evaluation of water quality and the ecotoxicology of microcystins. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18) (2015)13677-13695
- [100] Makkar, R. S., Cameotra, S. S., Banat, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1(1), (2011) 1-19.
- [101] Tavares, T., Pereira, C., Henriques, I. Bioluminescence-based assays for ecotoxicity testing of nanomaterials: A review. *Science of the Total Environment*, 668, (2019) 1079-1091
- [102] Baldera-Moreno, Yvan et al. “Biotechnological Aspects and Mathematical Modeling of the Biodegradation of Plastics under Controlled Conditions.” *Polymers*. 14,3 375. 18 (2022)

- [103] Pfaff, S., Salopek, B. Primjena planiranja eksperimenata u oplemenjivanju mineralnih sirovina. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik*. 16 (1), (2004) 97-106
- [104] Ukrainczyk, M. Planiranje pokusa u industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*. 5 (3-4), (2010) 96-105
- [105] Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Neter, J., & Li, W. *Applied linear statistical models* 4. (2004). McGraw-Hill/Irwin.

## 7. POPIS SIMBOLA

MP – mikroplastika

PS – polistiren

FFP - *Full factorial plan*

OG – optička gustoća

CFU - eng. *Colony Forming Units*

TC – ukupni ugljik, mg/L

TOC – ukupni organski ugljik, mg/L

TIC – ukupni anorganski ugljik, mg/L

LC/MS – (eng. *liquid chromatography-mass spectrometry*) - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i spektrometrije

ATR-FTIR - (eng. *Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy*) - infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama

ANOVA – eng. *Analysis of Variance*

IUCN – međunarodna unija za očuvanje prirode

COVID-19 - virusna je bolest uzrokovana koronavirusom SARS-CoV-2

PP – polipropilen

PE – polietilen

PVC – polivinilklorid

PET – polietilen tereftalat

PC – polikarbonat

PU – poliuretan

PLA – polilaktična kiselina

PHA – polihidroksialkanoat

BPA – bisfenol A

DEHP – dioktilftalat

PCB – poliklorirani bifenil

PCDD – poliklorirani dioksin



PAH – poliaromatski ugljikovodici

POP – perzistentne organske tvari

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

LC<sub>50</sub> - (eng. *Lethal Concentration*) – koncentracija koja uzrokuje smrt 50% populacije

EC<sub>50</sub> - (eng. *Effective Concentration*) – koncentracija koja uzrokuje štetan učinak kod 50% populacije

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

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

SPC - eng. *solid polymer culture*

EPS – ekspandirani polistiren

SEM – eng. *scanning electron microscope*

HDPE – polietilen visoke gustoće

FT-IR – Fourierova transformacijska infracrvena spektroskopija

XPS – rendgenska fotoelektronska spektroskopija

XRD – rendgenska difrakcija

DSC – diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

HA – hranjivi agar

MM – mineralni medij

HPLC – (eng. *high performance liquid chromatography*) – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

DOA – dioktil adipat

DIOP – diizooktil ftalat

## ŽIVOTOPIS

Mirela Kovačević [REDACTED] U Zagrebu je pohađala osnovnu školu „OŠ Trnsko“ i srednju školu „Prirodoslovna gimnazija Vladimira Preloga“ te ih završila s odličnim uspjehom. 2021. godine završila je preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu sa završnim radom na temu „Komina masline kao održiva sirovina za proizvodnju biodizela“, izradila pod mentorstvom prof. dr. sc. Aleksandra Sander na Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo. Godine 2021. upisuje diplomski studij Ekoinženjerstvo na FKIT-u i paralelno se zapošljava u Plivi (Tevi) i započinje svoje prve korake kao inženjer odnosno istraživački analitičar gdje savladava osnove HPLC instrumenta kao i LC/MS instrumenta.

Tečno govori engleski jezik te se dobro snalazi u njemačkom i slovenskom jeziku. Vješto barata MS Office paketom, programima Scientist i SuperPro Designer.