

# Biorazgradnja poli(vinil-klorida) primjenom Gram-pozitivne bakterije

---

Očić, Luka

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:149:902273>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

**Luka Očić**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, srpanj 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

**Luka Očić**

**BIORAZGRADNJA POLI(VINIL-KLORIDA) PRIMJENOM GRAM-  
POZITIVNE BAKTERIJE**

**DIPLOMSKI RAD**

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić
2. Doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović
3. Dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, srpanj 2023.

## Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, za mogućnost izrade i pomoći pri pisanju ovog rada. Zahvaljujem se i asistentici mag. ing. oecoing. Martini Miloloži za pomoć i iskazanom strpljenju pri provođenju eksperimenta u laboratoriju. Hvala i svim djelatnicima Zavoda za industrijsku ekologiju i Zavoda za analitičku kemiju što su omogućili izradu ovog rada. Za kraj zahvaljujem se svim prijateljima, kolegama i obitelji što su mi pružali podršku kroz studiranje.



Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta pod nazivom "Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike" (**AdWaTMiR**) (IP-2019-04-9661).

## SAŽETAK

Danas je život bez plastike i plastičnih proizvoda nezamisliv zbog njihove široke upotrebe i relativno lake proizvodnje, a među najkorištenijim plastikama su polietilen (PE), polipropilen (PP), poli(vinil-klorid) (PVC) i poli(etilen-tereftalat) (PET). Posljedica široke primjene plastika je njihova akumulacija u okolišu što može izazivati negativne utjecaje na okoliš, ali i na ljudsko zdravlje. Zbog toga se traže novi načini uklanjanja plastičnog otpada iz okoliša, a jedan način je i biorazgradnja. Biorazgradnja se odvija primjenom mikroorganizama koji su sposobni enzimima razgraditi polimerni lanac plastičnih materijala. U ovome radu istraživala se biorazgradnja PVC mikroplastike (MP) pomoću gram-pozitivne bakterijske kulture *Bacillus subtilis*. Cilj je bio odrediti optimalne uvjete biorazgradnje PVC MP. Pokus je proveden prema *full factorial* dizajnu ispitujući tri čimbenika na 3 razine: pH (6, 7 i 8), broj okretaja rotacijske tresilice (100, 150 i 200 o/min) i optička gustoća (OG) bakterijske suspenzije (0,1, 0,3 i 0,5). Pokus je trajao mjesec dana tijekom kojih se određivao ukupan broj živih stanica bakterija (CFU) te koncentracija ukupnog ugljika (TC), organskog ugljika (TOC) i anorganskog ugljika (TIC). Nakon provedenog pokusa biorazgradnje, iz vodene faze odvojene su čestice MP-a. Potom su čestice PVC MP okarakterizirane FTIR-ATR spektroskopijom, dok se LC-MS analiza primijenila za ispitivanje mogućih otpuštenih aditiva s PVC MP u vodenu fazu. Na kraju je određena i ekotoksičnost vodene faze primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*, kako bi se utvrdilo nastaju li štetni razgradni produkti biorazgradnjom PVC-a. Dobiveni rezultati pokusa su obrađeni pomoću Design Expert programa uz statističku analizu (ANOVA). Određeni su sljedeći optimalni uvjeti biorazgradnje PVC MP primjenom *Bacillus subtilis*: pH = 7,74, broj okretaja = 200 o/min te OG = 0,5.

**Ključne riječi:** Mikroplastika, PVC, biorazgradnja, *Bacillus subtilis*, optimalni uvjeti biorazgradnje

## SUMMARY

Today life without plastic products is unimaginable because of its broad use and relatively easy manufacturing. The most common types of plastic are polyethylene (PE), polypropylene (PP), polyvinyl chloride (PVC) and polyethylene terephthalate (PET). A result of its widespread use is the accumulation of plastic waste in the environment, which is not only a threat to the environment itself, but also the health of people and animals that live there. Because of that, new ways of removing plastic waste from the environment in an acceptable way are being researched, and one such method is biodegradation. Biodegradation occurs when microorganisms use their digestive enzymes to degrade the polymer chain of the plastic material. In this thesis the biodegradation of PVC microplastic (MP) using a gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* was investigated. The goal was to determine the optimal conditions of the biodegradation of PVC MP. The experiment design was the Full factorial design with 3 factors on 3 levels: pH (6, 7 and 8), speed of the rotary shaker (100, 150 and 200 rpm) and the optical density (OD) of the suspension (0.1, 0.3 and 0.5). The experiment lasted 30 days during which the number of colony forming units (CFU), concentration of total carbon (TC), organic carbon (TOC) and inorganic carbon (TIC) were determined. After 30 days solid MPs were separated from the liquid phase using membrane filtration. After that the PVC MP was analysed using FTIR-ATR spectroscopy, while LC-MS was used to determine if any additives were released from the PVC MP into the liquid phase. Finally, the toxicity of the liquid phase was determined using the marine bacteria *Vibrio fischeri*, to determine if any harmful products of biodegradation of PVC were present. The results were analysed using the program Design Expert with the analysis of variance (ANOVA). The optimal conditions for the biodegradation of PVC MP using *Bacillus subtilis* were: pH = 7,74, speed rotary shaker = 200 rpm and OD = 0,5.

**Key words:** Microplastics, PVC, biodegradation, *Bacillus subtilis*, optimal conditions for biodegradation

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Polimeri.....	3
2.2. Plastika.....	4
2.2.1. Proizvodnja plastičnog materijala.....	6
2.2.2. Poli(vinil-klorid) .....	8
2.3. Mikroplastika .....	9
2.3.1. Vrste mikroplastike.....	10
2.3.2. Podrijetlo i sudbina mikroplastike u okolišu .....	12
2.4. Utjecaj mikroplastike na okoliš .....	13
2.4.1. Toksičnost mikroplastike za vodeni okoliš.....	16
2.5. Razgradnja plastike .....	18
2.5.1. Fizikalno-kemijska razgradnja plastike.....	18
2.5.2. Biorazgradnja plastike.....	19
2.5.3. <i>Bacillus subtilis</i> .....	21
2.5.4. Biorazgradnja poli(vinil-klorida) .....	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	25
3.1. Materijali .....	25
3.1.1. Mikroplastika .....	25
3.1.2. Mikroorganizam.....	25
3.2. Mediji i kemikalije .....	25
3.2.1. Hranjivi agar .....	25
3.2.2. Priprema mineralnog medija .....	26
3.2.3. Fiziološka otopina.....	26
3.2.4. Etanol .....	26
3.2.5. Otopine za određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterijske kulture <i>V. fischeri</i> .....	26
3.3. Mjerni instrumenti i oprema .....	27
3.4. Metode rada.....	29
3.4.1. Priprema mikroplastike.....	29
3.4.2. Sterilizacija mikroplastike.....	29
3.4.3. Uzgoj bakterija <i>Bacillus subtilis</i> .....	29
3.4.4. Određivanje pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika.....	30
3.4.5. Određivanje ukupnoga broja živih stanica bakterija (CFU) .....	30
3.4.6. Karakterizacija čestica PVC-a FTIR-ATR analizom .....	30



3.4.7. Određivanje ukupnog, organskog i anorganskog ugljika .....	31
3.4.8. Procjena aditiva pomoću LC-MS analize .....	31
3.4.9. Određivanje ekotoksičnosti .....	31
3.5. Provođenje pokusa biorazgradnje MP PVC-a .....	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>35</b>
4.1. Promjena CFU prilikom biorazgradnje PVC primjenom <i>Bacillus subtilis</i> .....	35
4.2. Dizajn eksperimenta – Full factorial design .....	41
4.3. Analiza čestica MP PVC-a pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom .....	45
4.4. Praćenje procesa razgradnje mikroplastike određivanjem ukupnog ugljika, ukupnog organskog ugljika i ukupnog anorganskog ugljika .....	47
4.5. Analiza otpuštenih aditiva tokom biorazgradnje pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti .....	48
4.6. Ispitivanje ekotoksičnosti vodene faze uzorka pomoću morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i> .....	51
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>53</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>54</b>
<b>7. POPIS OZNAKA I SIMBOLA .....</b>	<b>62</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>64</b>

## 1. UVOD

Plastični materijali postali su neizostavan dio suvremenog društva i imaju brojne primjene u različitim sektorima kao što su građevina, ambalaža, medicina i slično [1]. Masovna proizvodnja plastike počinje još 1950-ih godina nakon Drugog svjetskog rata i od tada se smatra da je proizvedeno nekoliko milijardi tona plastike [2]. Zbog tako široke primjene i proizvodnje plastičnog materijala neki smatraju da smo u polimernom ili plastičnom dobu. Međutim, velika upotreba plastike dovodi do značajne akumulacije otpada što predstavlja izazov za okoliš. Otpornost plastike na razgradnju je dobro poznata, što za posljedicu ima veliku količinu otpada koji se nagomilava u prirodi [3]. Poznato je da nekoliko tona plastike godišnje završi u moru kao posljedica nepravilno zbrinutog plastičnog otpada gdje se onda akumulira u vodenom okolišu [4]. Jedan od najkorištenijih plastičnih materijala je poli(vinil-klorid) (PVC). PVC je popularan zbog svoje izdržljivosti, fleksibilnosti i raznovrsnih primjena, ali istovremeno predstavlja značajan izazov za održivost i očuvanje okoliša. PVC je poznat po visokom udjelu aditiva koji se dodaju pri proizvodnji gdje određene vrste PVC-a mogu imati udio aditiva od čak 70% svoje mase. Spomenuta veća količina aditiva te njegova otpornost na prirodnu razgradnju čini ga posebno problematičnim jer plastika nakon upotrebe često završava kao otpad u prirodi, onečišćujući ekosustave i ugrožavajući zdravlje okoliša [2,5].

Veća količina nakupljenog plastičnog otpada u okolišu može dovesti do fragmentacije i nastanka plastičnih čestica manjih od 5 mm, tj. nastaju mikroplastike. Osim fragmentacijom, plastika se može i proizvoditi u veličinama manjim od 5 mm za primjenu u različitim proizvodima [6]. Ovaj rastući problem plastičnog otpada zahtijeva nalaženje novih prihvatljivih pristupa rješavanja problematike kako bi se pronašla rješenja za smanjenje negativnog utjecaja na okoliš. Jedan od načina je moguća primjena biorazgradnje plastičnih materijala. Biorazgradnja se odnosi na proces razgradnje organskih materijala primjenom probavnih enzima mikroorganizama. To je potencijalno obećavajući pristup koji bi mogao ponuditi održivo rješenje za smanjenje akumulacije plastičnog otpada i zaštitu okoliša [3, 7].

U ovom radu ispitivala se biorazgradnja MP PVC-a pomoću gram pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* i optimalni uvjeti razgradnje za 3 ispitana čimbenika: brzina okretaja rotacijske miješalice, pH i optička gustoća (OG), na 3 razine. Pokus je dizajniran prema punom faktorskom planu, a dobiveni podaci su analizirani analizom varijance (ANOVA). Pokus je trajao 30 dana pri čemu se određivao broj živih stanica (CFU) u 0., 3., 7., 14., 21., i 30. danu pokusa, a tada se također izuzimao uzorak za TOC i LC-MS analizu. Nakon dobivanja optimalnih uvjeta za tako proveden pokus snimio se FTIR spektar u usporedbi s plastikom koja

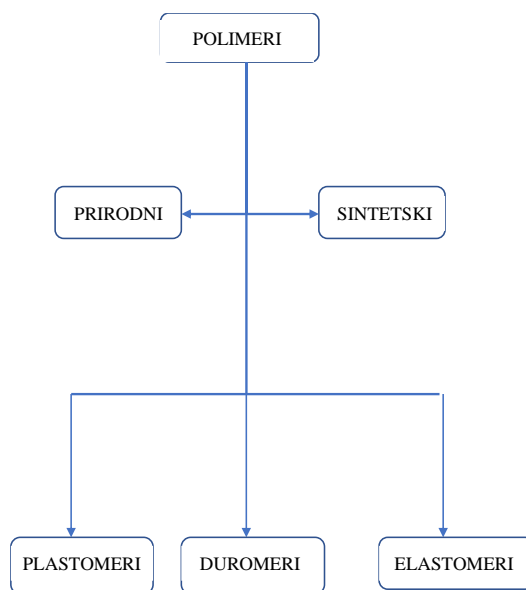
nije podvrgnuta biorazgradnji te LC-MS za analizu otpušenih aditiva pri razgradnji. Osim toga se mjerenjem koncentracije organskog (TOC), anorganskog (TIC) i ukupnog ugljika (TC) pratio tijek biorazgradnje. Konačno odredila se i ekotoksičnost produkta biorazgradnje primjenom morske baterije *Vibrio fischeri*.

Rezultati istraživanja su ukazali da su optimalni uvjeti biorazgradnje PVC-a s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis*: pH = 7,74, broj okretaja = 200 o/min i OG = 0,5. Rezultati FTIR i TOC analize potvrđuju nastanak produkta razgradnje te je prisustvo određenih aditiva utvrđeno LC-MS analizom. Rezultatima testa ekotoksičnosti izraženima kao EC<sub>50</sub> i EC<sub>20</sub> vrijednosti utvrđena je toksičnost vodene faze nakon provođenja procesa biorazgradnje.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Polimeri

U današnje vrijeme osim materijala kao što su željezo i čelik, sve više se koriste i polimerni materijali. Od polimernih materijala najveću primjenu nalazi plastika s globalnom proizvodnjom od skoro 400 milijuna tona godišnje [1], te se procjenjuje da je između 1950. i 2017. godine proizvedeno oko 9,2 milijarde tona plastike [2]. Riječ polimer potječe od grčke riječi *poli* koja znači mnogo i *meros* koja znači dio. Polimeri su makromolekule koje se sastoje od kovalentno povezanih monomernih jedinica i karakterizirane su visokom molekulskom masom. Broj ponavljajućih jedinica, tj. broj monomera nije definiran i polimer se može sastojati od nekoliko stotina do nekoliko tisuća monomernih jedinica, stoga molekulska težina polimera može biti u rasponu od tisuću do nekoliko stotina tisuća grama po molu. Zato se uvodi stupanj polimerizacije (DP) koji označava broj ponavljajućih jedinica u molekuli polimera [8]. Reakcije nastanka polimera spajanjem monomernih jedinica zovemo polimerizacija. Polimerizacija se može po mehanizmu dijeliti na stupnjevite i lančane reakcije, pri čemu se stupnjevite reakcije temelje na karakterističnim reakcijama funkcionalnih skupina, dok se lančane reakcije temelje na radikalima i inicijatorima [9]. Zbog velikog broja različitih polimera postoje razne podjele polimernih materijala. Neke uobičajene podjele su prema podrijetlu (prirodni i sintetski), prema obliku (linearni, razgranati, umreženi...), prema vrsti ponavljajuće jedinice (homopolimeri s jednom vrstom ponavljajuće jedinice i kopolimeri s više vrsta monomera) i prema primjeni. Važna podjela je i prema fizikalno-mehaničkim svojstvima na plastomere, duromere i elastomere. Plastomeri (ili termoplasti) mogu se taliti nekoliko puta jer se njihova kemijska svojstva ne mijenjaju od temperature staklastog prijelaza do tališta. Zbog toga krajnje oblikovanje plastomera provodi se taljenjem i ima mogućnost recikliranja. Za razliku od plastomera, duromeri (ili termoseti) nemaju mogućnost taljenja nakon procesa sinteze kondenzacijskom polimerizacijom. Karakteristično za njih je da se oblikovanje odvija istovremeno kao i reakcija sinteze, pa se oblikuju u kalupu. Osim toga karakterizira ih nemogućnost recikliranja taljenjem. Elastomeri su materijali karakterizirani elastičnim svojstvima. Elastičnost je sposobnost materijala da se vrati u prvobitni oblik nakon uklanjanja određenih vanjskih sila, tako da se materijal trajno ne deformira, kao što je slučaj kod plastomera i duromera [9,10]. Pojednostavljena shema bitnijih podjela dana je na slici 2.1.



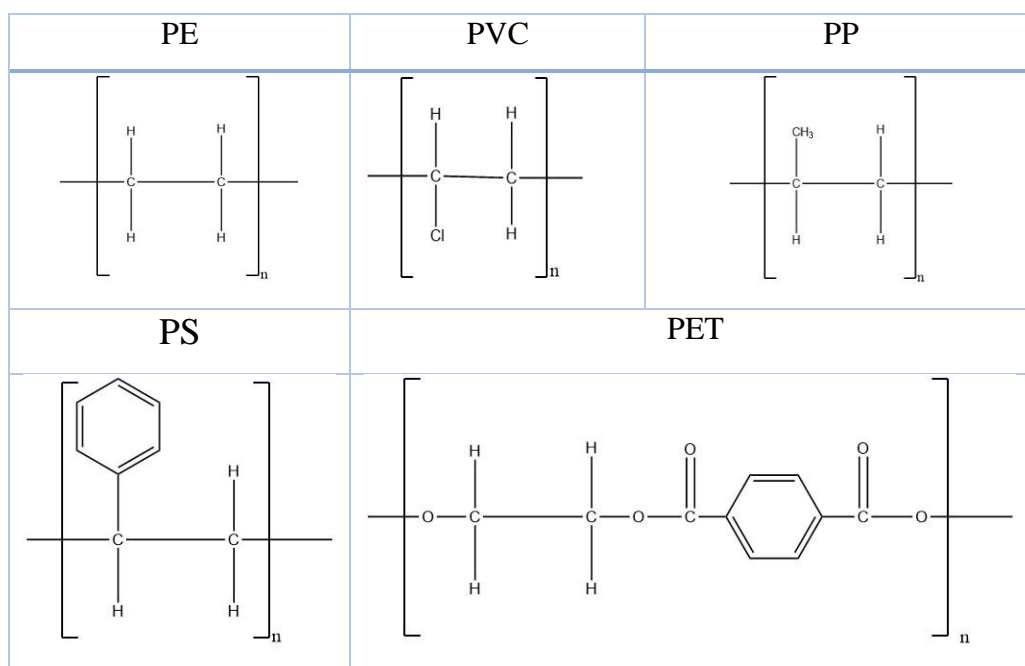
**Slika 2.1.** Prikaz podjele polimera prema podrijetlu i fizikalno-mehaničkim svojstvima

Sintetski polimeri imaju još i bitnu podjelu prema izvoru ugljika za sintezu, i prema tome se dijele na polimere dobivene iz obnovljivih izvora energije (*biobased*) i polimere dobivene iz neobnovljivih izvora energije (*fossil based*). *Biobased* polimeri karakterizirani su time da je izvor ugljika za ove polimere podrijetlom iz biomase, ali nisu svi takvi polimeri biorazgradivi. Razlog tome je što su takvi polimeri kemijski identični onima što se proizvode od fosilnih goriva kao izvora ugljika. Dobar primjer su PET boce napravljene na biološkoj bazi koje je uvela Coca-Cola 2015. godine, no iako su na biološkoj bazi boce nisu biorazgradive [2]. *Fossil based* polimeri svoj izvor ugljika dobivaju iz fosilnih goriva. Takvi polimeri često nisu biorazgradivi, iako postoje i takve plastike koje se mogu biorazgraditi poput polikaprolaktona (PCL) ili poli(butirat-adipat- tereftalat) (PBAT) [2, 11].

## 2.2. Plastika

Zahvaljujući širokom rasponu upotrebe, plastika je danas nezamjenjiva u mnogim područjima i daje značajan doprinos razvoju novih materijala. Plastike su poliplasti, tj. podložni su plastičnoj deformaciji. Zbog svojih praktičnih svojstava i jednostavnosti izrade, plastika se koristi u raznim industrijama kao za ambalažu, u kućanstvima za čitav niz različitih proizvoda, posuda, vrećica i drugo [8]. Plastika je ustvari zbirno ime za sintetske polimere iako nisu svi sintetski polimeri plastični materijali [1]. Svojstva plastike, kao i svih polimernih materijala, ovisi o ponavljajućoj monomernoj jedinici te razgranatosti i veličini polimernog lanca. Prema tomu razlikujemo razne vrste plastičnih materijala. Neki od najkorištenijih vrsta plastike su: poli(vinil-klorid) (PVC), polietilen (PE), polistiren (PS), polipropilen (PP), poliuretan (PUR)

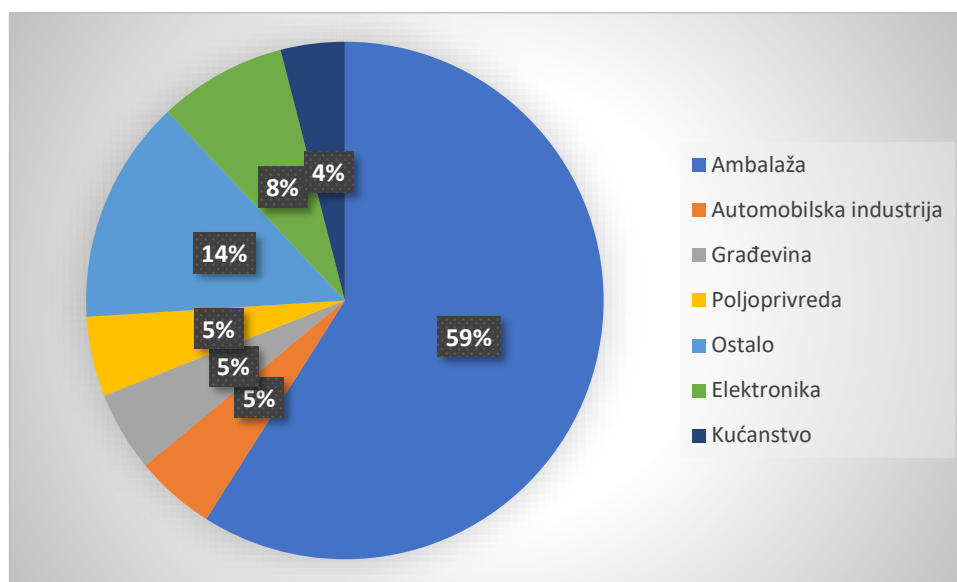
i poli(etilen-tereftalat) (PET), a od tih najtraženiji su PE, PP i PVC prema Europskoj potražnji plastika [10, 12]. Strukture navedenih plastika bazirane su na ugljikovodičnom lancu. Najjednostavnija takva polimerna struktura je od PE, lanac ugljikovih atoma s dva vezana vodika, no može na sebe imati vezan drugi etilenski lanac, takav razgranati lanac naziva se polietilen niske gustoće ili LDPE. Suprotno od toga potpuno linearni lanac polietilena zove se polietilen visoke gustoće ili HDPE. Ponavljajuće jedinice PE, PP, PVC, PS i PET-a dani su u slici 2.2. [10]



**Slika 2.2.** Ponavljajuće jedinice često korištenih plastika

Značajan dio proizvedene plastične mase koristi se za izradu plastične ambalaže, koja čini gotovo 26% ukupne godišnje svjetske proizvodnje plastike [13]. U Europi, specifično u 2015. godini, čak 59% proizvedene plastike utrošeno je za takvu vrstu ambalaže [14]. Prikaz korištene plastike dan je na slici 2.3. Bitno je napomenuti da se većina plastičnih materijala ne smatra biorazgradivim, tj. enzimi mikroorganizama ne mogu prevesti polimerne lance do konačnih produkata razgradnje [8]. Iako je primjena plastičnih materijala postala nezamjenjiva zbog odličnih svojstava takvih proizvoda, ipak postoje nedostaci. Jedan od većih nedostataka plastike je neadekvatno zbrinjavanje plastičnog otpada; procijenjeno je da 5 – 13 tona plastike završi u moru svake godine [9]. Srećom zbog sve veće svijesti negativnih utjecaja takvog otpada na okoliš razvijaju se nove strategije za zbrinjavanje otpada. Trenutno se u Europi od 26 milijuna tona prikupljenog plastičnog otpada reciklira 30 %, 31 % završi u raznim odlagalištima i 39 % se spaljuje [13,14]. No Europska komisija je 18.1.2018. godine prihvatila

strategiju za plastiku u kružnoj ekonomiji (*European Strategy for Plastics in a Circular Economy*), čija je namjena transformirati način na koji se proizvodi, koristi, ali i odlaže plastični otpad. Među većim ciljevima takve politike je da se do 2030. godine svu plastičnu ambalažu može reciklirati ili ponovno koristiti, te da 50 % svog plastičnog otpada bude reciklirano [13,15].



**Slika 2.3.** Upotreba plastike u Europi 2015. godine [14]

### 2.2.1. Proizvodnja plastičnog materijala

Proizvodnja polimernih materijala zabilježena je već sredinom 19. stoljeća kada su znanstvenici sintetizirali prirodne polimere poput celuloze, a prvi sintetski polimer (bakelit) dobiven je 1907. Proizvodnja moderne plastike počela je 1920-ih godina kada je prvi put sintetiziran PVC, i nedugo nakon usavršen aditivima u proizvodnji kako bi postao koristan materijal [2]. Iako su već tada proizvedene velike količine plastike i plastične ambalaže, za početnu točku masovne proizvodnje uzimaju se tek 1950-te, kada se ta proizvodnja prebacila s vojnih potreba tijekom Drugog svjetskog rata na civilne potrebe i proizvode [16]. Moderna proizvodnja plastičnih materijala koristi velik broj aditiva i kopolimera tijekom procesa te su sami procesi i parametri sinteze prilagođeni za svaku vrstu plastike radi optimiziranja procesa [17]. Pri proizvodnji plastičnih materijala bitna je njihova podjela na termoplaste i termosete zbog pravilnog ponašanja pri povišenim temperaturama. Neke od značajnih metoda proizvodnje plastike su istiskivanje pomoću ekstrudera (prikazan na slici 2.4.) ili ekstrudiranje, injekcijsko prešanje ili *injection molding*, prešanje uspuhivanjem ili *blow molding* i 3D printanje plastike [16-18]. Ekstrudiranje je proces gdje se rastaljena plastika istiskuje kroz otvor

na ekstruderu, gdje je oblik otvora presjek konačnog oblika. Tipičan proces sastoji se od 4 koraka: plastika se zagrijava te se gura kroz utor u ekstruderu, plastika se istiskuje kroz otvor željenog oblika, zatim se hladi nakon ekstrudiranja i reže po željenoj veličini ili masi. Ovaj proces pogodan je za sintezu raznih pipa, plastičnih filmova i sličnih proizvoda [18, 19].



**Slika 2.4.** Ekstruder [16]

Injekcijsko prešanje je proces koji se bazira na injektiranju vruće smjese plastike u kalup željenog oblika i jedna je od najviše primjenjivanih metoda dobivanja plastičnih dijelova. Prednost ovog procesa naspram ekstrudiranja je što ovaj proces može biti šaržni, a ne kontinuirani. Proces se sastoji od 5 koraka: priprema kalupa, zagrijavanje i ekstrudiranje plastike, oblikovanje istisnute plastike u kalupu, hlađenje plastike u kalupu dok nije dovoljno čvrsta da zadrži oblik za vađenje iz kalupa te uređivanje konačnog proizvoda (ukoliko je potrebno). Zbog korištenog kalupa, geometrija konačnog proizvoda vrlo je precizna što je velika prednost ove metode, no manjak je relativno visoka cijena potrebnih alata [18, 19].

Prešanje uspuhivanjem je proces za proizvodnju šupljih plastičnih proizvoda tako da se u kalupu oblikuje plastića preforma pomoću vrućeg zraka. Najpoznatiji primjer ove proizvodnje je proizvodnja PET boca. Proces se sastoji od 3 koraka: priprema kalupa i šuplje preforme od plastike, korištenje vrućeg zraka dok se preforma ne proširi i poprimi oblik kalupa, te hlađenje proizvoda dok ne očvrstne nakon čega slijedi uklanjanje s kalupa. Ova metoda ima znatno blaže uvjete rada nego injektiranje i stoga je primjetno jeftinija, ali je ograničena na termoplaste radi potrebe da se proizvod termički obradi bez taljenja [18, 19].

3D printanje je metoda gdje posebni printeri izravno izrađuju 3D dijelove od željenog materijala. Iako se mogu dobiti vrlo precizni proizvodi, metoda radi relativno sporog procesa nije isplativa za masovnu proizvodnju s današnjom tehnologijom [18, 19].



Proizvodnjom plastike nastaje značajna količina štetnih plinova zbog korištene sirovine ( najčešće je riječ o fosilnim gorivima). U novije doba proizvodi se plastika dobivena iz obnovljivih izvora energije, no količina potrebne biomase za takvu proizvodnju čini takav proces trenutno neisplativim [17].

Spomenuto je da se u izradi plastičnih materijala koriste razni aditivi. Cilj dodatka aditiva jest poboljšati mehanička, fizička, ali i biološka svojstva plastike. Tako se aditivi dodani u plastiku mogu dodatno podijeliti na pojačavajuća vlakna, punila i sredstva za spajanje (koje se još mogu podijeliti na plastifikatore, stabilizatore i razne retardante) [20]. Najčešći aditivi koji se dodaju su ftalati koji služe kao plastifikatori [20].

### 2.2.2. Poli(vinil-klorid)

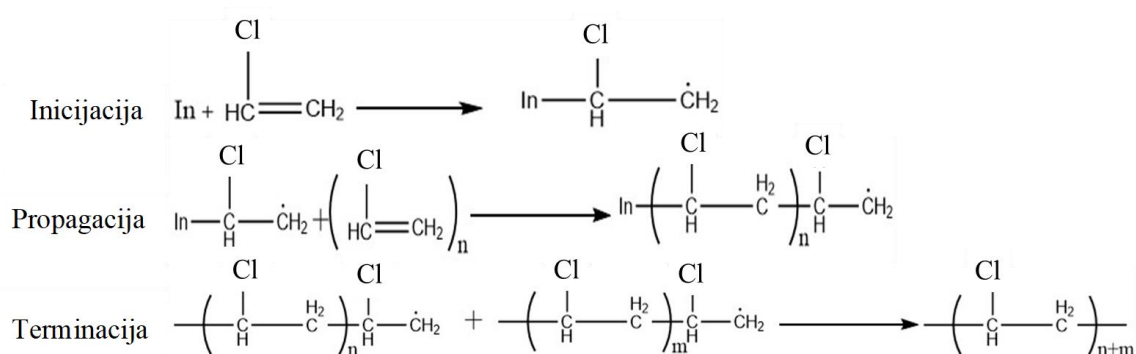
PVC je prva moderna plastika sintetizirana u 20. stoljeću. Strukturu PVC-a čini vinilni lanac na kojem je na svakom drugom ugljikovom atomu jedan vodik zamijenjen atomom klora. Ponavljajuća jedinica prikazana je u slici 2.2. te se taj monomer zove vinil-klorid [2, 10]. Svoju primjenu PVC je najviše našao u građevini, gdje čini 42 % plastičnih proizvoda korištenih u tom sektoru te 69 % ukupnog proizvedenog PVC-a. Česti proizvodi od PVC-a uključuju i pipe, cijevi, izolaciju za kablove, prozore te stolariju [2]. Primjer jedne PVC cijevi dan je na slici 2.5. U 2018. godini proizvedeno je 44,3 milijuna tona PVC-a te je procijenjeno da će se do 2025. godine proizvoditi i do 60 milijuna tona godišnje [21].



**Slika 2.5.** Primjer PVC cijevi [22]

PVC je u izvornom obliku vrlo krhki materijal bijele boje s relativno nepovoljnim svojstvima, zbog čega je potreban dodatak aditiva pri sintezi, a sam PVC je sintetski polimer koji ima najveću količinu aditiva dodanu pri sintezi (čak do 70 % mase) [23]. Zbog klora u svojoj strukturi jedan od produkata razgradnje PVC-a je i klorovodična kiselina (HCl), uz uobičajene produkte poput vode i ugljikovog dioksida [23, 24]. PVC ima relativno visoku čvrstoću, a to

svojstvo proporcionalno je molekularnoj masi polimernog lanca. Bez aditiva ima dobru otpornost na kemijske agense, a nešto slabiju s dodatkom aditiva, no i dalje je otporan na velik broj baza, kiselina i soli. Uz to pokazuje dobru otpornost na lipide i alkohole što znači da ima relativno dobar otpor korozivnom djelovanju kanalizacije i pogodan je materijal za cijevi u takvom sustavu. Nema dobru temperaturnu stabilnost bez dodatka aditiva. Radna temperatura mu je do 60 °C, iznad te temperature nastaje HCl, mijenja se bijela boja u žutu ili smeđe-žutu i razvija se oštri miris. Iako pokazuje dobra izolacijska svojstva, ona su ipak inferiorna naspram nekih drugih plastičnih materijala zbog polarnosti vinil-kloridne skupine. Gustoća PVC-a viša je od vode i on bi u vodi potonuo [24, 25]. Postoje dvije varijacije PVC-a koje se često koriste, rigidni ili kruti i savitljivi. Kruti PVC ima nešto veću gustoću i čvrstoću te znatno veći modul elastičnosti i koristi se za građevinu, prozore, vrata i pipe. Fleksibilni PVC koristi se za izolaciju te za izradu umjetne kože, zavjesa za tuš, vinilne ploče i slično [24]. PVC je zbog njegove strukture moguće sintetizirati i adicijskom tj. radikalskom reakcijom i stupnjevitim reakcijama, a moguća je (iako nepogodna) i ionska polimerizacija. Iako su obje moguće za proizvodnju PVC-a, pogodnija je adicijska polimerizacija s korištenjem inicijatora, najčešće u obliku peroksida. Primjer jedne adicijske reakcijske sheme dan je na slici 2.6. [25].



**Slika 2.6.** Primjer adicijske reakcije dobivanja PVC-a.

Bitno je napomenuti da je na slici 2.6. prikazana sinteza čistog PVC-a, te da su u realnim sintezama prisutni međukoraci dodatka aditiva i moguća je kopolimerizacija s drugim polimerima za poboljšanje svojstava konačnog materijala [25].

### 2.3. Mikroplastika

Kako se plastika zbog svojih dobrih svojstava i niske cijene proizvodnje sve više koristi, tako je i njezino nepravilno odlaganje postao sve veći problem. Jedna od posljedica takvog odlaganja je velika količina plastike koja završi u okolišu i koja pod utjecajem okolišnih uvjeta

može degradirati na mikro i nanoplastiku. Mikroplastika (MP) je naziv za čestice plastike čiji je najveći promjer manji od 5 mm [6].

MP se može naći u mnogo oblika kao što su vlakna, filmovi, pjene i slično, ali osim razlike u obliku razlikujemo ju i po kemijskom sastavu. Najčešće vrste MP-a su analogne plastičnim materijalima: PE, PP, PVC, PET i PS. Za mikrovlakna priča je nešto drukčija. Mikrovlakna su male čestice vlakana koja se otpuštaju iz tekstila i odjeće tijekom pranja. Ovdje najveći udio imaju poliesteri tj. poliesterska vlakna, zatim najviše ima pamuka, no kako je pamuk prirodni i biorazgradivi polimer on nije štetan za okoliš, te nešto manje ima poliakrila i poliamida [6]. MP može nastati pri raznim uvjetima i njihova akumulacija u prirodi može imati mnoge štetne posljedice za okoliš i ljude. MP se smatraju onečišćivalima i predstavljaju rizik po okoliš [27].

### 2.3.1. Vrste mikroplastike

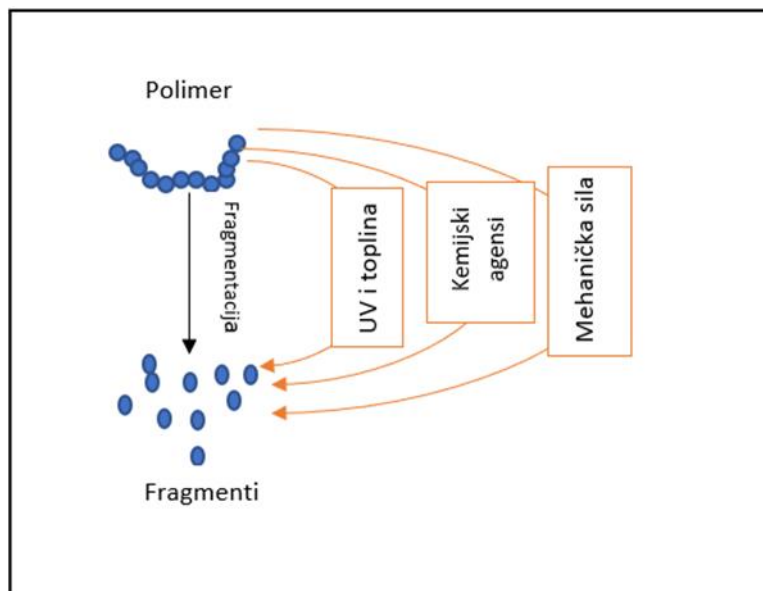
MP možemo podijeliti i prema izvoru nastajanja na primarne i sekundarne MP. Primarne MP su čestice plastike koje su namjerno proizvedene. Primarna MP se najčešće nalazi u kozmetičkim proizvodima poput krema za sunčanje, šampona, pasti za zube, krema za depilaciju i slično. Prikaz izolirane MP iz takvih proizvoda dan je na slici 2.7.. Osim u kozmetičkoj industriji često se primjenjuju i kao abrazivi u raznim sredstvima za čišćenje ili čak u pjeskarenju pri micanju slojeva boje ili lakova s metalnih površina [26, 28]. Najčešće primarne MP su PE, poli(metil-metakrilat) (PMMA), PET, PP i najlon (PA)[6].



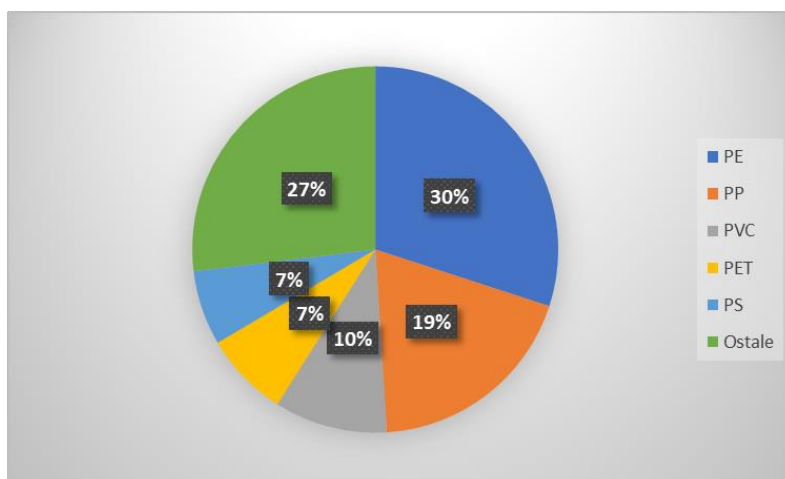
**Slika 2.7.** Mikroplastike izolirane iz kozmetičkih proizvoda. [6]

Sekundarne MP definiraju se kao čestice nastale fragmentacijom makroplastike do veličine manje od 5 mm (slika 2.8.). Bitno je spomenuti da su mikrovlakna ustvari vrsta sekundarne MP koja nastaje tijekom pranja tekstilnih proizvoda. Smatra se da je najviše MP u okolišu ustvari sekundarna, dok je primarna MP bila više prisutna između 1970-ih i 1990-ih godina

[29]. Smatra se da je glavni razlog nastanka sekundarnih MP iz makroplastike starenje polimernih materijala dovoljno dugo dok ne postanu podložni procesu fragmentacije, gdje su glavni faktori starenja visoke temperature i UV zračenje. Dijagram koji prikazuje udio najčešćih sekundarnih MP dan je na slici 2.9. [31].



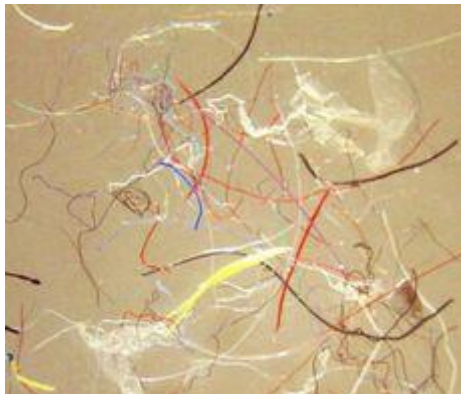
**Slika 2.8.** Shematski prikaz procesa fragmentacije



**Slika 2.9.** Najčešće vrste sekundarne MP [31]

Pranjem odjeće velika količina mikrovlakana se ispušta u kanalizaciju i zato im je najveća koncentracija blizu odljeva kanalizacije. Samo jednim pranjem ispušta se nekoliko stotina tisuća mikrovlakana, a najviše MP-a ispušta odjeća od PA, gdje jedno pranje od 6 kg odjeće ispušta čak 700 000 mikrovlakna. Mikrovlakna se iz vode mogu relativno učinkovito ukloniti

primarnom i sekundarnom obradom vode, no i tada se u otpadnim vodama nalazi visoka koncentracija mikrovlakana [6, 30]. Procijenjeno je da 20 - 35 % MP u vodenom okolišu dolazi od sintetskih materijala u odjeći, a čak do 85% tih MP čine baš mikrovlakna [32].



**Slika 2.10.** Fotografija sintetskih mikrovlakana [6]

### 2.3.2. Podrijetlo i sudbina mikroplastike u okolišu

Spomenuto je da jedan od glavnih izvora MP u vodenom okolišu predstavlja otpadna voda od pranja tekstilnih proizvoda te od kozmetičkih proizvoda. Još jedan velik izvor MP je i čvrsti otpad. Primjerice, na odlagalištima otpada završi do 40 % plastičnog otpada. Taj plastični otpad može se fragmentirati u sekundarnu MP te je utvrđeno da nastaje 20000 – 90000 čestica MP po kg otpada [33]. To predstavlja problem ne samo zbog onečišćenja odlagališta, nego je utvrđena prisutnost MP u vodama u blizini odlagališta, a posljedično i sedimentu te vodenim organizmima u tim vodama, što znači da samo odlagalište služi kao izvor MP za bližnji okoliš [33]. Spomenulo se da u moru godišnje završi nekoliko tona plastike, a velika količina toga su i MP. Glavni izvori MP u vodenom okolišu su razne industrije koje ispuštaju takve čestice u otpadnim vodama ili indirektno nepravilnim odlaganjem plastičnog otpada. Osim industrije velika količina MP u moru završi i zbog turizma, pa krajevi koja su veća turistička središta imaju veći rizik onečišćenja plastikom [28]. U vodenom okolišu MP će, ovisno o vrsti polimera, ili plutati na površini vode ako je riječ o plastikama s gustoćom manjom od vode, ili će potonuti na dno ako im je gustoća veća od gustoće vode. Za MP koja pluta na vodi vjeruje se da se uobičajeni mehanizmi starenja i razgradnje odvijaju uz djelovanje faktora poput UV zraka i temperature, no za MP koja tone je mehanizam razgradnje nešto manje poznat budući da voda ublažava neke od tih faktora. U dubinama su najvjerojatniji mehanizmi mehaničke razgradnje u sedimentu uslijed djelovanja valova i morskih struja. Ponašanje tako nastalih ili degradiranih MP nije lako predvidjeti, ali je njihov učinak i dalje bitno pratiti [31]. Nažalost,

značajna količina MP u vodama završi kao hrana za životinje, ali i u prirodnoj soli koju ljudi dobivaju iz mora. U tablici 2.1. dan je pregled koliko i koje vrste MP su pronađene u tim proizvodima [33].

**Tablica 2.1.** Prehrambeni proizvodi s pronađenim MP-om [33]

Vrsta proizvoda	Količina MP	Vrsta MP
Morske ribe	0-15 čestica po proizvodu	PET, PP, PVC, PA, PS, PE
Dagnje	2,7-3,7 čestica po proizvodu	PET, PUR, polieteri
Kamenice	1,4-7 čestica po proizvodu	PET, PP, PE, PS, PVC, PA
Prirodne soli	7-681 čestica po kg	PET, PES, PE, PP
Prerađene soli	1-10 čestica po kg	PE, PET, PS, poliakrilonitril

U sedimentu prisutnost MP-a usko je povezana s ljudskim djelovanjem, gdje je veća količina MP-a karakteristična za razvijena područja [34]. Osim u vodenom okolišu prisutnost MP-a vidljiva je i u tlu. MP u tlo dopijeva većinom antropogenim utjecajem, tj. preko proizvoda i industrija koje se bave obradom tla ili odlaganjem nepravilno zbrinutog plastičnog otpada. Jednom kada se MP nađe u tlu moguće je da prirodnim procesima migrira kroz tlo, bilo putem već formiranih pora u tlu ili djelovanjem živih bića (prolazak kroz probavu manjih životinja). Utjecaj MP-a na tlo definirano je s više faktora, među kojima je i vrsta MP koja se u tom tlu nalazi, pa zbog toga njihov utjecaj nije uvijek lako predvidjeti [35].

Najviše istraživanja o MP-u u okolišu provedeno je za vodeni i terestijalni okoliš, a nedavno su intenzivna istraživanja započela i u atmosferi. Značajna količina MP-a nađena je u atmosferi, a pretežito je riječ o mikrovlaknima [36]. Većina MP u atmosferi prevelika je da dođe izravno do pluća, no i dalje se mogu nakupiti u gornjim dišnim putevima zbog kontinuiranog udisanja. Bitno je reći da samo 29 % od pronađenih mikrovlakana u atmosferu se smatra da potječu iz plastike, te je veći dio i tih vlakana prirodnog podrijetla poput celuloze. Zbog malog broja istraživanja teško je donijeti zaključak o štetnom utjecaju MP u atmosferi, no bitno je pratiti stanje onečišćenja atmosfere s MP kako bi bilo moguće pravovremeno reagirati [36].

#### 2.4. Utjecaj mikroplastike na okoliš

Kako se sve više MP okuplja u okolišu bitno je znati i kako utječe na njega. Jedan od načina kako MP može negativno djelovati na okoliš je svojom razgradnjom, gdje može otpuštati štetne nusprodukte reakcije razgradnje ili razne aditive dodane pri izradi plastike [37]. Još jedna prijetnja koju pruža MP je mogućnost sorpcije štetnih tvari, poput drugih onečišćivala, zbog njihove velike aktivne površine. Velika aktivna površina posljedica je njihovog malog volumena, budući da je sama aktivna površina omjer površine i volumena materijala.

Posljedično MP mogu adsorbirati na površinu veću količinu tvari među kojima su i spojevi koji posjeduju kisik u strukturi. Takvi spojevi mogu promijeniti polarnost i hidrofobnost površine MP. Drukčija svojstva nađena su kod MP koja je prošla proces starenja zbog promjene svoje veličine i boje [27]. Zbog svoje male veličine, starene MP mogu ingestirati i manji organizmi poput raznih nematoda i ličinki [38], a zbog promjene u boji u prehranu ih mogu unijeti i razni predatori koji love na temelju boje plijena [39]. Jednom uneseni u organizam MP može izazvati razne smetnje u organizmu poput upala, što je pogotovo izraženo kod MP koje stvaraju štetne produkte pri razgradnji ili koje ispuštaju veću količinu aditiva (PS, PVC i PE) [27]. No MP može biti štetna i kao inertni materijal u organizmu zbog toga što se nakuplja u živim organizmima, a ta pojava naziva se bioakumulacija. Veće životinje mogu pojesti organizme s akumuliranom plastikom i tako uvesti MP u hranidbeni lanac. Jednom unesena u hranidbeni lanac MP može rasti u količini što je organizam više u tom lancu, ta pojava naziva se biomagnifikacija. Čovjek također može pojesti životinje u kojima se akumulirala plastika i tako unijeti MP i u svoj organizam [40].

Još jedan poznati učinak MP je širenje invazivnih vrsti. Na površini MP moguć je nastanak biofilma na koji se nastanjuju mikroorganizmi iz te okoline. MP s tako formiranim biofilmom se širi, bilo morskim strujama ili antropogenim putevima na brodovima, te tako može doći do okoline gdje to nije uobičajen mikroorganizam nego invazivna vrsta i mogu uzrokovati bolesti ukoliko su patogene [41]. Veći broj istraživanja proveden je na raznim biljnim i životinjskim organizmima. Primjer jednog ispitivanja na biljnim organizmima je istraživanje utjecaja nanoplastika (NP) PS-a na algama roda *Chlorella* i *Scenedesmus* od Bhattacharya i suradnika [42]. Istraživanje se provelo tako da se na celuloznom filmu stanice alga dovode u kontakt s NP PS. PS se adsorbirao na celulozni film te se onda testovima pratilo kako utječe na stanice algi. Jedan način na koji se ispitivao utjecaj NP bio je praćenje količine potrošenog CO<sub>2</sub> kako bi se dobio uvid u fotosintetsku aktivnost alge. Test je pokazao da se smanjila količina potrošenog CO<sub>2</sub> što upućuje na smanjenje fotosinteze kod ispitivanih algi. Pretpostavlja se da je negativan efekt PS-a na fotosintezu djelomično zbog toga što zasjenjuje fotosintetske centre u stanici alge i time smeta pri apsorpciji svjetlosti, ali i stvara prepreke pri putovanju nutrijenta. Osim trošenja CO<sub>2</sub> pratio se nastanak reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) koji u većoj količini nastaju kada se smanjuje fotosinteza u biljkama. Nađena je veća količina takvih spojeva u svim ispitivanim algama nakon adsorpcije NP PS-a. Veća količina ROS-a uz smanjeno trošenje CO<sub>2</sub> dovodi do zaključka da je prisutnost PS-a imalo negativan utjecaj na ispitivane alge, što se najviše moglo uočiti kao smanjenje učinkovitosti fotosinteze [42]. Na životinjski organizam bitno istraživanje proveli su Lu i suradnici koji su ispitivali utjecaj MP PS-a na miševima.

Istraživanje je provedeno na mužjacima oralnim unošenjem MP, a samo istraživanje trajalo je 5 tjedana. Kroz to vrijeme u miševima je uočeno smanjenje ukupne mase te mase jetre i lipida kod svih miševa, neovisno o veličini MP. Uz to uočene su značajne promjene u probavnim sustavima miševa. Kod svih ispitanih organizama primijetilo se smanjeno lučenje zaštitne sluzi u želucu. Utjecaj se uočio i na mikrobnoj ravnoteži u probavnom sustavu, gdje se praćenjem rRNA bakterija primjećuje razlika na 6 - 8 bakterijskih vrsta probavnog sustava ovisno o veličini unesene MP. Osim toga uočio se poremećaj u sintezi masnog tkiva i deficit triglicerida i kolesterola što sve upućuje na negativan utjecaj MP na miševe. Miševi su inače česti modelni organizam pri istraživanjima utjecaja tvari na sisavce i zapaženi rezultati ovog istraživanja pokazuju mogućnost značajnih negativnih utjecaja MP na životinje [43]. Pregled ovih, ali i još nekih značajnih istraživanja na utjecaj MP na živa bića dan je u **tablici 2.2.** [37]

**Tablica 2.2.** Utjecaj MP-a na razne organizme [37]

Organizam	Učinak	Veličina MP / $\mu\text{m}$
<i>Daphnia magna</i> Miševi	Imobilizacija (PE)	1
	Poremećaj mikroba u probavnom sustavu, smanjenje mase	0,5-50
Ptice (Prugasti zovoj)	Nakupljanje u organizmu, mehanička šteta gutanjem	-
Ribe (razne)	Ekspresija imunog gena	0,2-20
	Sporije plivanje	1-5
	Šteta na mozgu i poremećaj ponašanja	0,052-0,33
<i>Alge (Chlorella, Scenedesmus, Obliquus)</i>	Smanjena sposobnost fotosinteze	0,020
<i>Bakterija (Halomonas alkaliphila)</i>	Inhibira rast (NP)	0,05-0,055
	Prekida ekološku funkciju	1

Prisutnost MP-a može drastično utjecati na strukturu, svojstva i sastav tla te bioraznolikost u tlu. Čestice plastika mogu se ugraditi u strukturu preko agregata tla i tako utjecati na neka njegova svojstva. Nađeno je da tako integrirana vlakna poliestera značajno povećavaju sposobnost tla da zadržava vodu, no neke druge MP-a poput PA i PE nisu pridonosili značajnoj promjeni u sposobnosti tla da zadrži vodu. Takve promjene u dinamici vode u tlu može izazvati promjene u učinkovitosti fotosintetskih organizama i posljedično negativan utjecaj na biljke iz tog tla. Osim negativnih utjecaja na tlo, upravljanje vodenom dinamikom u tlu, s dodatkom određenih vrsta i količina mikroplastika, može igrati i ulogu u poboljšanju svojstava i kvalitete tla [35]. Primjer upotrebe MP u tlu je sve više korišten plastični mulč. Koristi se radi smanjenja



evaporacije iz tla i povišenje temperature kako bi se poboljšao urod biljaka. Nažalost, neučinkovito recikliranje takvog proizvoda dovodi do novog izvora MP-a u okolišu [37]. Može utjecati i na migraciju onečišćivala kroz pukotine duboko u tlo [35]. Osim na strukturu MP-a može znatno utjecati i na razne enzimske reakcije u tlu, npr. MP su pokazale znatan utjecaj na djelovanje ureaze, fenol oksidaze, raznih katalaza i FAD-aze. Enzimske reakcije u tlu vrlo su bitne za kruženje elemenata u prirodi, poput ugljika, dušika, fosfora i slično. Bez kruženja tih elementa kroz tlo smanjila bi se količina hranjive tvari u tlu, a s time i njegova plodnost [35]. MP može biti unesena kao hrana slučajnom konzumacijom i tako predstavlja opasnost životinjama i biljkama. Na primjer, istraživanje na crvima je pokazalo inhibiciju rasta i razvoja te smanjenje mase organizama, te čak letalne posljedice pri samo 1%-2% w/w PS MP-a i vremenu izlaganja od 28 dana [44]. Osim biljaka i životinja potrebno je spomenuti utjecaj MP i na mikroorganizme u tlu. MP mogu uzrokovati promjene prolaznosti kisika u tlu, što za posljedicu može poremetiti ravnotežu anaerobnih i aerobnih mikroorganizama. Pokazano je da se dodatkom MP u tlo značajno poremećuje mikrobiološka fauna i tako može dovesti do nestanka pojedinih bakterija, što dovodi do smanjene bioraznolikosti tla [37, 45].

U sedimentu čestice MP dalje mogu biti unesene u vodene organizme, najčešće slučajno putem probave, gdje stvaraju štetu u organizmu. Organizmi koji nastanjuju sediment često su jako osjetljivi i koriste se kao bioindikator onečišćenja sedimenta i vode. Zato su takvi organizmi korišteni kao ispitivana grupa kako bi se ocijenio utjecaj MP dugotrajnim izlaganjem, no u istraživanjima dobiveni rezultati često nisu pratili trendove i većinu nađenih utjecaja teško je interpretirati kao pravilo, nego su poprilično individualni [34]. Većina direktnih utjecaja na organizam su mehanička oštećenja organa i tkiva ili trovanje tvarima koje su adsorbirane na MP. Indirektni utjecaji MP u sedimentu također su ispitani na biomarkerima. Glavni indirektni utjecaj MP je već spomenuto svojstvo bioakumulacije u hranidbenom lancu, no osim toga postoji i kemijski utjecaj. MP su najčešće fragmentirani organski polimeri visokih molarnih masa. Takvi spojevi, iako relativno inertni, i dalje su skloni reakcijama poput hidrolize ili fotolize djelovanjem Sunčevih UV zraka i mogu nastati toksični nusprodukti, pogotovo ako su fragmenti polimera poput PVC ili polikloriranih bifenila (PCB) [34].

#### **2.4.1. Toksičnost mikroplastike za vodeni okoliš**

Kako je rečeno velik dio plastičnog otpada i MP završi u raznim rijekama ili moru neovisno o izvoru tih plastika, a godišnje više tona plastike završi u moru [9]. Stoga je bitno poznavati imaju li MP toksičan učinak u takvom okolišu. Velik broj istraživanja već je napravljen na temu MP u vodenom okolišu i opasnosti koju pruža. Jedno značajno istraživanje u tom

području učinjeno je sa strane Capolupo i suradnika, koji su istraživali nađene MP na aditive i metale koje sadrže te mjerili toksičnost tih MP pomoću morske i slatkovodne alge. Za potrebe istraživanja korištene su MP PP, PVC PS, PET i MP auto guma (CTR). Toksičnost se ispitala na morskoj algi *Skeletonema costatum* i slatkovodnoj algi *Raphidocelis subcapitata*. Istraživanje je pokazalo da je u morskom okolišu otpušteno više aditiva i metala nego u slatkovodnom, a rezultati mjerenja toksičnosti prikazani su u tablici 2.4. [45]

**Tablica 2.3.** Dobiveni rezultati toksičnosti MP izraženi preko EC<sub>50</sub> vrijednosti [45]

Vrsta MP	EC <sub>50</sub> / %	
	za morsku algu	za slatkovodnu algu
CTR	19	0,5
PP	18,1	64
PS	>100	23,5
PVC	1,62	34,6

Rezultati istraživanja pokazuju da je ekotoksičan učinak aditiva veći od očekivanog. Zaključuje se da značajni toksični učinak MP u vodenim okolišima upravo dolazi od aditiva korištenih tijekom proizvodnje plastike. Taj zaključak podržava činjenica da MP u kojima je dokazana veća količina aditiva (PVC, CTR) imaju veći toksičan učinak, tj. manje EC<sub>50</sub> vrijednosti [45]. Kemijsko onečišćenje koje uzrokuju MP ne dolazi samo od otpuštenih aditiva, nego i od raznih spojeva koji se adsorbiraju na hidrofobnu površinu MP. Razna onečišćivala i metali vežu se na površinu MP i tako se mogu širiti kretanjem MP. Teški metali nađeni su na površini nekih MP, primjerice bakar je pronađen na površini MP PP-a i PE-a i to u koncentraciji 80 – 500 ng / g MP [46, 47]. Osim bakra, drugi poznati metali koji se mogu naći na površini MP u vodenom okolišu su arsen, krom, kadmij i olovo [46]. Osim metala na MP se mogu vezati i postojeće organske onečišćujuće tvari (POP) poput poliaromatskih ugljikovodika (PAH) ili diklor-difenil-trikloretran (DDT), ali i drugi razni pesticidi [46]. Neke od tih tvari nalaze se u znatno većoj koncentraciji od drugih, primjerice PAH-ovi koji su nađeni u relativno visokoj koncentraciji 164 900 ng / g MP [48], dok se spojevi poput DDT-a nalaze u primjetno manjoj koncentraciji 276 ng / g MP [49]. Zbog visoke otpornosti POP-ova na biokemijsku i fotolitičku degradaciju i dobrih sorpcijskih svojstava MP ovakvo širenje toksičnih spojeva može činiti veliku štetu u vodenom okolišu, pogotovo jer su takve tvari podložne akumulaciji nakon unosa u organizme [46].

## 2.5. Razgradnja plastike

Razgradnja ili degradacija, plastika označava bilo kakvu promjenu u kemijskim ili fizikalnim svojstvima plastike. Kako je to opširna definicija, procesi razgradnje mogu biti mehanički, fizikalno-kemijski ili čak biološki. Najčešći fizikalno-kemijski procesi razgradnje MP-a su hidroliza, fotoliza i termalna razgradnja. Na termalnu i fotolitičku razgradnju često utječe i kisik iz okoline, stoga su u okolišu najčešće vrste razgradnje termooksidativna i fotoooksidativna razgradnja [50]. Biološka razgradnja ili biorazgradnja označava razgradnju plastike koristeći enzime živih bića, najčešće gljiva ili bakterija [7].

### 2.5.1. Fizikalno-kemijska razgradnja plastike

Fotolitičke reakcije degradacije plastike moguće su zbog njihove niske otpornosti na UV zračenje. Posljedično dolazi do fotolitičkog cijepanja molekula polimera. Sunčevo zračenje sastoji se od vidljivog dijela spektra i sadrži približno 5 % UV zračenja, koje ima dovoljno veliku energiju da uzrokuje kidanje C-C veza u molekuli polimera. Fotolitičke reakcije razgradnje, tj. fotodegradacije se ubrzavaju ukoliko sadrži kromofornu skupinu ili dvostruke C=C veze ili na neveznim orbitalama nekih heteroatoma (poput dušika, kisika, klora...) koji se nalaze u njegovoj strukturi [51]. Inicijacija fotodegradacije ovisi i o valnoj duljini UV zraka koje dosežu plastični materijal, ali i samu vrstu plastike. Neke vrste plastika su otpornije na UV zrake od drugih. Takvi materijali trebaju veću energiju, odnosno UV zrake s nižim valnim duljinama kako bi se reakcija odvila. Primjerice za početak fotodegradacije PVC-a potrebna je valna duljina >250 nm kako bi započela reakcija. U slučaju PVC-a početak takve razgradnje karakteriziran je gubitkom boje materijala, a kasnije slijedi ispuštanje HCl kao produkta razgradnje te umrežavanje i pucanje polimernih lanca za konačnu promjenu svojstva materijala. Ukratko, fotorazgradnja PVC-a može se svesti na 3 koraka: inicijacija, dehidroklorinacija i strukturna promjena polimernog lanca [52]. U okolišu tijekom ove reakcije može doći i do reakcije s kisikom iz atmosfere, koji lako reagira s nestabilnim radikalima (najčešće Cl radikali) koji nastaju tijekom reakcije fotolize. Prisutnost kisika dodatno pridonosi razaranju glavnog polimernog lanca zbog nastalih slabih točaka u strukturi [52].

Termalna razgradnja polimera u okolišu također je djelomično uzrokovana Sunčevim zrakama zbog prijenosa topline na okoliš. Kao i kod fotolize, termolitičke reakcije isto ovise o energiji sustava u obliku topline i termalne stabilnosti plastika. PVC je relativno termalno nestabilan te često koristi stabilizatore kako bi se poboljšala stabilnost pri višim temperaturama. U aerobnim uvjetima termalna stabilnost PVC-a još je niža zbog reakcije s kisikom gdje nastaje  $-\text{CO}(\text{CH}-\text{CH})_n\text{CHCl}-$  grupa. Termalna razgradnja PVC-a se, za razliku od velikog broja drugih plastika,

odvija u dva stupnja. Prvo dolazi do velikog gubitka mase i svojstava PVC polimernog lanca, taj prvi veći gubitak je ustvari izbacivanje HCl-a iz polimernog lanca, tada se gubi 65 % mase polimera. Drugi stupanj je piroliza de-hidrokloriranog PVC-a iz čega nastaju CO<sub>2</sub> i voda. Iako je mehanizam gdje se ta dva stupnja mogu razlikovati poznat, temperature potrebne do njih dođe ipak se ne postižu jednostavno u okolišu u kojem se vjeruje da prevladava prvi stupanj gubitka HCl-a iz sustava [53].

Hidrolitička razgradnja plastike je razgradnja plastike usred djelovanja vode na strukturu polimernog lanca. Ta reakcija inače je značajna za poliestere, ali moguća je na više vrsta polimera, a najčešće se odvija nakon što je zbog oštećenja na polimernom materijalu voda dospjela do glavnog polimernog lanca. Zato se takve reakcije inače odvijaju iznad temperature staklastog prijelaza polimera kad je struktura više amorfna. PVC neće često reagirati s vodom, pogotovo pri neutralnim pH i blagim uvjetima, pa se koristi za izradu cijevi, ali moguće je inicirati hidrolizu PVC-a. Razlog zašto je to poželjno je što se takvim procesom može ukloniti veći dio HCl-a iz strukture, što znači da bi se manje kiseline oslobađalo pri termalnoj razgradnji. Takvo hidrolitičko uklanjanje HCl-a pokazalo se učinkovitim s mogućnošću uklanjanja čak 95 % klora iz strukture [54].

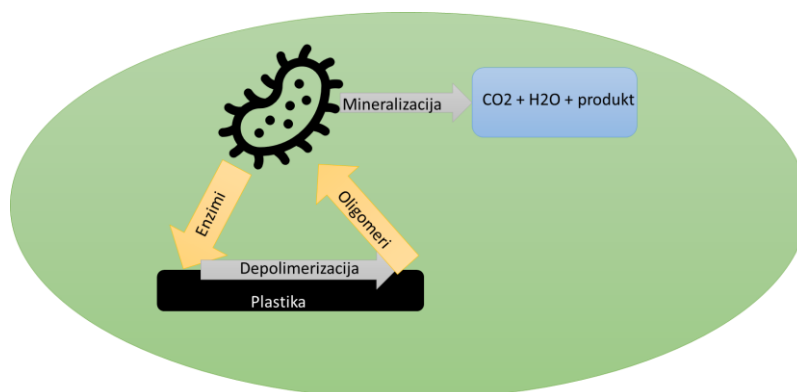
### **2.5.2. Biorazgradnja plastike**

Biorazgradnja je proces u kojem se probavnim enzimima živih bića katalizira razgradnja glavnog polimernog lanca plastike. Taj proces odvija se kada mikroorganizmi koriste plastičnu masu kao izvor ugljika, a često započinje kada mikroorganizmi naprave biofilm na površini plastike. Glavna posljedica nastanka biofilma može se prikazati u 5 koraka: 1) bioobraštanje površine (eng. *Biofouling*), 2) degradacija aditiva, 3) napad glavnog polimernog lanca, 4) hidroliza ili oksidacija i 5) prodor mikroorganizma do polimernog lanca [55]. Jedna od mana većina plastika je što nisu podložne procesima biorazgradnje niti su topive u vodi i stoga su često inertne u okolišu. Ako se biorazgradnja kombinira s nekim drugim mehanizmima razgradnje ipak je moguće da mikroorganizmi degradiraju manje polimerne ili monomerne jedinice u CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O [56]. Postoje dva načina biorazgradnje, uz prisutnost kisika (aerobna razgradnja) i bez prisutnosti kisika (anaerobna razgradnja). Razlika u produktima ovih reakcija je što kod anaerobnih reakcija uz CO<sub>2</sub> i vodu nastaje i metan [57].

Pri biorazgradnji važno je spomenuti da su polimerne molekule prevelike da prođu kroz staničnu membranu te ih je prvo potrebno prevesti u monomerne jedinice. Primijećeno je da polimeri veće molekulske mase imaju manju sposobnost biodegradacije. Razlog tomu je potreba mikroorganizama da se polimer može otopiti kako bi mogao proći kroz staničnu

membranu i dalje se razgraditi enzimima unutar stanice, a poznato je da su polimeri većih molarnih masa manje topivi od onih manje molarne mase [56]. MP koje imaju nižu temperaturu taljenja više su podložni reakcijama biorazgradnje. Struktura polimera također ima bitnu ulogu u biorazgradnji. Amorfni polimeri pogodniji su za biorazgradnju budući da enzimi napadaju amorfne dijelove lanca. Polimeri koji posjeduju esterske i karbonatne veze znatno su pogodniji reakcijama određenih enzima [56]. Okolišni čimbenici utječu na rast mikroorganizama koji razgrađuju MP i stoga je bitno i te čimbenike uzeti u obzir. Neki od tih čimbenika su pH, temperatura, prisutnost kisika, vlaga te dostupnost nutrijenata [56].

Biorazgradnja MP-a započinje s izvanstaničnim enzimima (esteraza, lipaza i i laktaza) kojima se depolimerizira površina plastike na manje oligomere ili monomere. Slijedi asimilacija manjih produkata dobivenih na ovaj način te mineralizacija uz pomoć unutarstaničnih enzima. Mineralizacija je proces u kojem se korišteni spoj prevodi u  $\text{CO}_2$ , vodu i druge metaboličke produkte [56]. Neki polimeri nisu biorazgradivi zbog hidrofobne površine i stoga su otporni na većinu enzimatskih i hidrolitičkih reakcija. Bez takvih reakcija ne odvija se depolimerizacija glavnog lanca i nije moguće mineralizirati polimer do konačnih produkata [56].



**Slika 2.11.** Shematski prikaz generalnog mehanizma biorazgradnje [56]

Neka od najčešćih MP i organizmi koji su istraženi za njihovu biorazgradnju dani su u tablici 2.4..

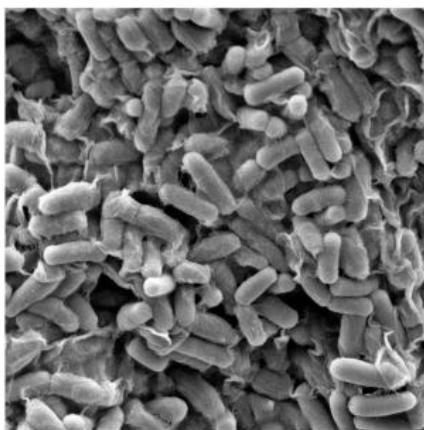
**Tablica 2.4.** Pregled čestih vrsta MP i mikroorganizma što ih mogu razgraditi [57, 58]

Vrsta MP	Organizmi
PE	<i>Brevibacillus borstelensis</i> , <i>Rhodococcus ruber</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Achroia grisella</i>
PUR	<i>Penicillium simplicissimum</i> , <i>Comamonas acidovorans</i> , <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium sp.</i>
PET	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i> , <i>Serratia Plymuthica</i> , <i>Clitocybe sp.</i> , <i>Laccaria laccata</i>
PP	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Engyodontium album</i> , <i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i> , <i>Brevibacillusagri</i> , <i>Brevibacillus sp.</i> , <i>Brevibacillus brevi</i>
PS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Exiguobacterium sibiricum</i> , <i>Exiguobacterium undae</i>

### 2.5.3. *Bacillus subtilis*

Ime ove bakterije u početku bio je *Vibrio subtilis* dok nije 1872. godine preimenovana u *Bacillus subtilis*. Ta bakterija jedna je od najistraživijih bakterija roda *Bacillus*, jedan je od modelnih organizma za proučavanje diobe stanice, površinske mobilnosti, lučenja proteina, proizvodnje biofilma i drugih svojstava. Danas se često primjenjuje u proizvodnji enzima, fermentaciji hrane te biokontroli bilja. Izolirana je iz raznih okruženja od tla do mora. Tvori vrlo otporne spore što joj omogućuje preživljavanje ekstremnih uvjeta. Mikrografija bakterija prikazana je na slici 2.12. [59]. Nedavno se pokazala i kao korisna bakterija za provođenje biorazgradnje. Jedno istraživanje pokazalo je mogućnost razgradnje PE s *Bacillus subtilis* i dodatkom surfaktanta. Vimal i suradnici [60] ispitivali su sposobnost *Bacillus subtilis* da razgradi uzorke MP PE-a. Pokus je trajao 30 dana pod uvjetima od 32 °C i brzinom okretanja od 180 o/min. Uzorak MP prošao je pretretman pod UV svjetlosti, a u sustav je dodan i surfaktant. Nakon 30 dana pokusa mjerila se masa PE MP-a i uspoređivala s masom izmjenom prije istraživanja. Prema rezultatima istraživanja ustanovilo se da je *Bacillus subtilis* pokazao pogodna svojstva za biorazgradnju PE filma debljine 18 μm, te da je dodatak surfaktanta i obrada MP UV svjetlošću pridonijela biorazgradnji. Nakon 30 dana ukupna izgubljena masa PE-a bila je 9,26 %, te je popratno napravljena FTIR analiza PE-a kojom se ustanovilo da su produkti biorazgradnje nastali na filmu [60]. Još jedno istraživanje biorazgradnje MP pomoću *Bacillus subtilis* napravili su Shah i suradnici [61]. U tom istraživanju pratila se razgradnja PUR filmova. Filmovi su bili jednake veličine i debljine i sterilizirani su 70% etanolom i UV zračenjem. Istraživanje je trajalo 30 dana i provodilo se pri 37 °C i brzinom okretanja od 150 o/min. Promjena mase se pratila svaka 3 dana. Konačni

rezultati ukazali su da primjena *Bacillus subtilis* za biorazgradnju nije rezultirala značajnim promjenama mase ispitivanih uzorka MP niti promjenama u strukturi polimera. Istraživanje je također ispitalo istu degradaciju u prisutnosti dvije bakterijske kulture, za koju se osim *Bacillus subtilis* koristila i bakterija *Pseudomonas aeruginosa*. Rezultati istraživanja pokazali su veći gubitak mase te značajne promjene u polimernom lancu MP. Uz to, kod pokusa s obje vrste bakterija izmjerena je veća količina oslobođenog CO<sub>2</sub>. GC-MS analiza produkata biorazgradnje pokazala je da je sustav s dvije vrste bakterija imao više produkata reakcije poput butandiola i adipinske kiseline [61]. Istraživanja su pokazala da je *Bacillus subtilis* pogodna bakterija za provedbu biorazgradnje MP te da se za bolji učinak može kombinirati s kolonijama drugih bakterija [60, 61]. Osim za MP, *Bacillus subtilis* je primijenjen i za razgradnju drugih organskih spojeva. Jednu značajnu primjenu našli su Dars i suradnici [62]. Njihovo istraživanje pokazalo je da *Bacillus subtilis* može podnijeti određene koncentracije benzina i koristiti se za njegovu razgradnju te za čišćenje mjesta onečišćena takvim spojevima [62].



Trends in Microbiology

**Slika 2.12.** Mikrografija *Bacillus subtilis* [59]

#### **2.5.4. Biorazgradnja poli(vinil-klorida)**

PVC je polimer relativno niske molekularne mase u usporedbi s drugim plastikama, no i dalje je manje biorazgradiv. Jedan od faktora koji doprinosi tomu je visoka otpornost na abrazije te mala sposobnost adsorpcije vlage [57]. Istraživanja biorazgradnje PVC-a provela su se na više vrsta organizama. Jedno takvo istraživanje učinjeno je na glisti *Tenebrio molitor*. Uočena je znatna promjena na probavne bakterije ispitivanih životinja što se smatra negativnim utjecajem unošenja PVC-a [23]. Na provedenom istraživanju prema probavnim produktima glista, predložen je mehanizam razgradnje PVC-a koji se sastoji od uklanjanja klor, zatim oksidacije i konačno depolimerizacije [23]. Svako istraživanje biorazgradnje PVC-a pokazalo je da je među produktima biorazgradnje HCl koji nastaje kao posljedica prisustva Cl atoma u

polimernom lancu. Poznato je da kod velikog broja oksidacijskih reakcija nastaju slobodni radikali. Među promatranim mehanizmima razgradnje PVC-a pomoću *Tenebrio molitor* oksidacija je ključni korak u razgradnji, stoga se smatra da prilikom reakcije oksidacije nastaju Cl radikali koji napadom na polimerni lanac kao produkt daju HCl. Odvijanje oksidacijskih reakcija vidljivo je po nastanku spojeva s kisikom koji je potvrđen snimanjem FTIR i NMR spektara [23]. Chinaglia i suradnici predložili su sumarni mehanizam potpune aerobne biorazgradnje organskih molekula i glasi [63]:



Već je poznato da su to konačni produkti mineralizacije takvih spojeva, no kako PVC sadrži Cl atome za njega reakcija izgleda nešto drukčije:



Značajno je napomenuti da se, iako je to sumarna reakcija, prije konačne razgradnje polimernog lanca do CO<sub>2</sub> i vode HCl odvaja od polimernog lanca [23, 63]. Osim na glistama, znatni broj ispitivanja proveden je na mikroorganizmima poput *Pseudomonas citronellolis* i *Bacillus flexus* [66]. Giacomucci i suradnici 2019. godine istražili su sposobnost razgradnje PVC-a više vrsta bakterija. Od 5 vrsta bakterija preliminarna ispitivanja pokazala su da najveću sposobnost degradacije PVC filmova imaju *Pseudomonas citronellolis* i *Bacillus flexus* zbog najvećeg afiniteta tvorbe biofilma na površini PVC-a. Ispitivanje je trajalo 90 dana pri temperaturi od 30 °C i brzini miješanja od 150 o/min i povremenim dodatkom sterilne vode ukoliko se količina tekućine previše smanjila tijekom istraživanja. Nakon provedbe biorazgradnje analizirao se PVC film i zaključilo se da su obje ispitane bakterije više degradirale aditive u PVC-u nego sami polimerni lanac, gdje je smanjenje molekulske mase glavnog lanca bilo nisko. Pod istim uvjetima provelo se istraživanje samo s *Pseudomonas citronellolis*, ali s glavnim razlikom da se koristio otpadni PVC. Trajanje ovog ispitivanja bilo je kraće, samo 30 dana, no rezultati su pokazali da se dogodila značajna razgradnja PVC smanjenjem mase polimernog lanca te je istraživanje ukazalo da *Pseudomonas citronellolis* ima dobru mogućnost razgradnje otpadnog PVC-a u aerobnim uvjetima [66]. Pregled ovog istraživanja i drugih dan je u tablici 2.5. Osim istraživanja navedenih u tablici još jedno značajno istraživanje proveli su Giacomucci i suradnici 2020. godine. Rad je istraživao biorazgradnju PVC filmova s miješanim kulturama morskih bakterija. Miješane kulture su dobivene iz uzorka morske vode u vodenom stupcu dubine 0-1,2 metara. Za istraživanje se pripremilo sveukupno 16 takvih mješovitih kultura od mikroorganizama dobivenih iz vodenog uzorka, ali i čestica koje su se nalazile u vodi. Za istraživanje je korišten PVC film debljine 20 µm. Istraživanje je bilo dugotrajno (7 mjeseci) te je nakon tog vremena ustanovljeno da 3 od



16 mješovitih kultura imaju sposobnost razgradnje PVC filmova. Ovo istraživanje bilo je među prvima koja su pratila mogućnost biorazgradnje PVC s mješovitim morskim bakterijama iz prirodnog staništa u anaerobnim uvjetima. Rezultati poput smanjenja mase PVC-a za 11,7% te smanjenja termalne stabilnosti upućuju na mogućnost razgradnje PVC-a u takvim uvjetima kroz dulje vrijeme izlaganja. Bitno je spomenuti da je u istraživanju PVC bio jedini izvor ugljika za te mikroorganizme [71].

**Tablica 2.5.** Pregled istraživanja o biorazgradnji PVC-a [23, 66-69]

Organizam	Oblik PVC	Uvjeti i trajanje	Rezultati
<i>Tenebrio molitor</i> [23]	MP prah veličine 70 - 300 $\mu\text{m}$	PVC MP unesen je prehranom tijekom 16 dana, za vrijeme hranjenja pratilo se: fekalije, promjena mase glista te promjena molekulske mase plastika	Nakon 16 dana u fecesu je nađeno HCl kao produkt razgradnje PVC-a, stopa preživljavanja iznosila je 87%, a organizmi su izgubili 4% tjelesne mase. Molekulska masa PVC-a je smanjila se za 32 -36 %. FTIR i TGA analiza pokazala su biodegradaciju strukturi PVC-a. Također su uočeni štetni učinci na probavne bakterije organizma.
<i>Pseudomonas citronellolis</i> i <i>Bacillus flexus</i> [66]	PVC film veličine 3 $\text{cm}^2$	Trajanje istraživanja bilo je 90 dana pri temperaturi od 30 $^{\circ}\text{C}$ i brzini miješanja od 150 o/min	Nakon 90 dana primijetila se smanjenje mase PVC-a za 10%. Dodatno se istražilo, pod istim uvjetima, razlaganje otpadnog PVC-a pomoću <i>Pseudomonas citronellolis</i> u trajanju 30 dana gdje se masa PVC-a smanjila za 19%
<i>Micrococcus</i> sp [67]	PVC MP prah	Trajanje istraživanja bilo je 70 dana pri temperaturi od 30 $^{\circ}\text{C}$ i brzini miješanja od 180 o/min	Nastanak kloridnih spojeva upućuje u biorazgradnju ispitnog PVC-a. Degradacija PVC-a, izražena kao količina otpuštenog klora iznosi 0,36% no mineralizacija PVC-a (prema otpuštenom $\text{CO}_2$ ) iznosi 8,87%
<i>Chaetomium globosum</i> [68]	PVC film	Trajanje istraživanja bilo je 28 dana pri temperaturi od 28 $^{\circ}\text{C}$ i relativnom vlagom od 85 %	Smanjenje mase PVC-a za 9%
<i>Vibrio</i> sp., <i>Alteromonas australica</i> , <i>Cobetia</i> sp. [69]	PVC film debljine 0,2 mm	Trajanje istraživanja bilo je 60 dana pri temperaturi od 30 $^{\circ}\text{C}$ i brzini miješanja od 150 o/min	Smanjenje hidrofobnosti PVC-a kod sva 3 ispitana organizma. Smanjenje mase za 1,23 % za <i>Vibrio</i> i <i>Cobetia</i> sp. te 1,73% za <i>Alteromonas australica</i> . Kod sva 3 ispitana organizma struktura PVC-a postaje više amorfnu te topografske snimke površine MP pomoću AFM-a upućuje na uspješno odvijanje biorazgradnje PVC-a kod svih ispitanih organizma
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> [70]	PVC filmovi (6 cm * 2,5 cm)	Trajanje istraživanja bilo je 49 dana pri temperaturi od 30 $^{\circ}\text{C}$ i brzini miješanja od 150 o/min	Rast biomase mikroorganizma za 2,57 mg/mL gdje je jedini izvor ugljika bio PVC. Veća količina oslobođenog $\text{CO}_2$ i NMR analiza ukazuju na produkte biorazgradnje, uz to FTIR analiza ukazala je na biorazgradnju PVC polimernog lanca. Smanjenje molarne mase PVC-a za 178292 $\text{Da}^{-1}$ što je 11% manje od kontrolne grupe.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

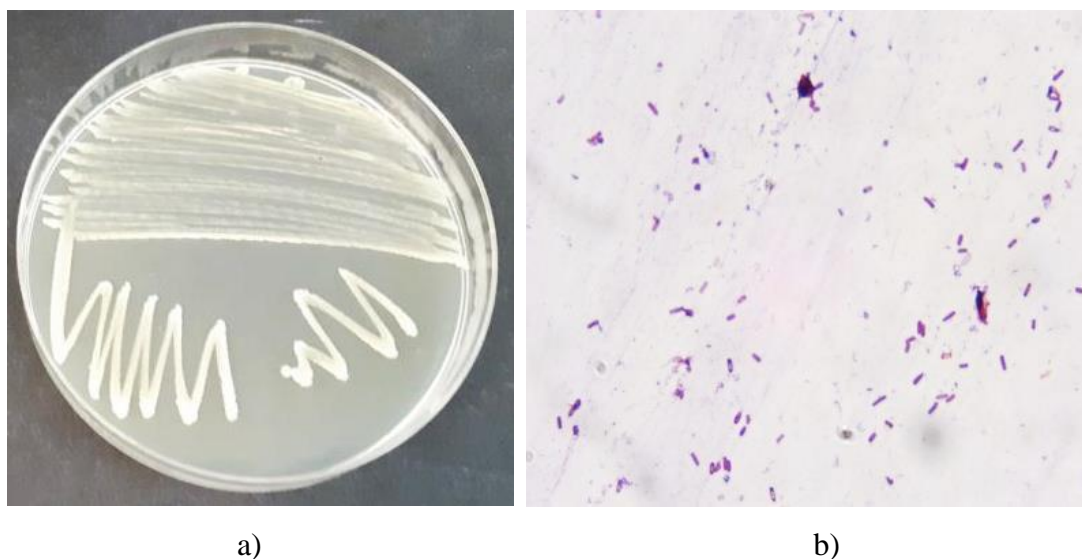
#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroplastika

Prilikom provedbe pokusa korištena je mikroplastika poli(vinil-klorida) (PVC), koja je usitnjena na veličine čestica **300-500  $\mu\text{m}$** . Mikroplastika je dobivena usitnjavanjem jednokratne plastične ambalaže, tj. plastične kutije od PVC-a.

##### 3.1.2 Mikroorganizam

Bakterijska kultura *Bacillus subtilis* (Slika 3.1.) korištena u pokusu pohranjena je u zbirci mikroorganizama na Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 3.1.** Fotografski snimak izrasle bakterijske kulture *Bacillus subtilis* (a) dobivene tehnikom iscrpljivanja na hranjivom agaru te mikrofotografija bakterijske kulture *Bacillus subtilis* (b) obojane po Gramu 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  $^{\circ}\text{C}$  i 1,1 atm.

### 3.2.2. Priprema mineralnog medija

MM je pripremljen prema Kyaw i sur., a njegov točan sastav prikazan je u **Tablici 3.1.**

**Tablica 3.1.** Sastav mineralnog medija.

Tvar	$\gamma$ / g/L
$K_2HPO_4$	12,5
$KH_2PO_4$	3,8
$(NH_4)_2SO_4$	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1
5 mL elementa u tragovima:	
$H_3BO_3$	0,232
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,174
$FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$	0,116
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	0,096
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,022
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,008
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,008

### 3.3.3. Fiziološka otopina

Za pripremu decimalnih razrjeđenja, odnosno za određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija korištena je fiziološka otopina, odnosno 0,9% otopina NaCl. Ona je pripremljena dodatkom 9 g NaCl u 1000 mL deionizirane vode te je prije upotrebe sterilizirana

### 3.2.4. Etanol

Za sterilizaciju MP korišten je etanol,  $w = 70\%$ , koji je pripremljen u odmjerneju tikvici od 1000 mL. Pomoću menzure odmjeren je i u tikvicu stavljeno 730 mL etanola ( $w = 96\%$ ,  $M = 46,07$  g/mol,  $\rho = 0,805$  kg/L ), te je do oznake nadopunjeno deioniziranom vodom.

### 3.2.5. Otopine za određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterijske kulture *V. fischeri*

#### 1) Otopina za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izoosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture *Vibrio fischeri* koja je pripremljena otapanjem 20 g NaCl, 0,2 g  $KH_2PO_4$ , 0,5 g  $CaCl_2$ , 0,2 g  $MgSO_4$ , 0,5 mL glicerola, 10 g glukoze i 10 g rafinoze u 1 litri deionizirane vode. Tako pripremljena otopina za resuspenziju je prokuhana i ohlađena te joj je pH-vrijednost podešena s NaOH ili HCl tako da se nalazi u rasponu od 6,8 do 7,2.

2) Otopina NaCl - 2%-tna otopina NaCl-a je korištena kao radna otopina za pripremu niza razrjeđenja prilikom provedbe testa ekotoksičnosti MP-e primjenom bakterijske kulture *Vibrio*

*fischeri*. Ova je otopina pripravljena otapanjem 2 g NaCl-a u 100 mL deionizirane vode pri čemu pH-vrijednost mora biti u rasponu od 6,8 do 7,2.

### 3.3. Mjerni instrumenti i oprema

U radu je korištena rotacijska tresilica (SIA BIOSAN PSU-10i Orbital Shaker, Latvija.), slika 3.2..



**Slika 3.2.** Mjerni instrumenti i oprema korišteni pri provođenju eksperimenta: a); rotacijska tresilica b); kriomlin c); mehanička sita d); analitička vaga e); vakumski filter lijevak f); autoklav g); prijenosni mjerač WTW h); spektrofotometar i); termostat.

Za usitnjavanje plastičnih materijala korišten je kriomlin nadopunjen tekućim dušikom (Retsch, Njemačka), a za prosijavanje MP-a mehanička sita (W. S. Tyler RX-86-1 Sieve

shaker, USA). Za precizno vaganje korištena je vaga KERN ALJ 220-4NM. Za filtraciju sterilizirane mikroplastike korišten je membranski lijevak uz vakuum pumpu i sterilni celulozno nitrati (C/N) membranski filteri Ahlstrom ReliaDisc™, promjera pora 0,45 µm. Tijekom pripreme decimalnih razrjeđenja korišten je homogenizator Heidolph, REAX top. Za sterilizaciju hranjive podloge, čistog staklenog posuđa, kao i onečišćenog posuđa, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija. Optička gustoća određivana je na spektrofotometru Hach, Model DR/2400, SAD pri valnoj duljini  $\lambda = 600$  nm. Za određivanje pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika korištena je pH elektroda SenTix® 940, kisikova elektroda FDO® 925 uz prijenosni mjerač WTW Multi 340i. Instrument je prije svake upotrebe kalibriran. Za uzgoj bakterija, korišten je termostat Termomedicinski aparati, Hrvatska pri 37 °C. Navedeni mjerni instrumenti i oprema prikazani su na **Slici 3.2**.

Uređaji za TOC/TIC, LC/MS analizu i FTIR-ATR spektroskopiju se nalaze u *spin-off* tvrtci CWT (engl. Comprehensive Water Technology) na Sveučilišta u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. PVC čestice su karakterizirane pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama tj. FTIR-ATR spektrometru, PerkinElmer, Spectrum One.



**Slika 3.3.** FTIR-ATR spektrometar.

Za ispitivanja ekotoksičnosti pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* korišten je Lumistox 300 luminometar i Lumistherm termostadni inkubacijski blok od proizvođača Dr Lange prikazani na **slici 3.4**.



**Slika 3.4.** Korišteni luminometar i termostadni inkubacijski blok.



**Slika 3.5.** LC/MS uređaj.

Za procjenu otpuštenih aditiva s površine PVC čestica u vodenu fazu tijekom biorazgradnje korištena je LC-MS metoda, tj. tekuća kromatografija sa spektrometrom masa kao detektorom. Uređaj je prikazan na **slici 3.5**.

### **3.4. Metode rada**

#### **3.4.1. Priprema mikroplastike**

Za provedbu pokusa biorazgradnje MP-e korišteni su plastični proizvodi koji se upotrebljavaju u svakodnevnom životu, jednokratna plastična ambalaža od PVC-a. Proizvodi su prvo usitnjeni škarama na manje komade te su zatim usitnjeni u kriomlinu nadopunjenim s tekućim dušikom. Nakon toga slijedilo je sušenje na zraku 24-48 h pri sobnoj temperaturi te prosijavanje pomoću mehaničkih sita određenih veličina pora u svrhu dobivanja čestica veličine: **300-500  $\mu\text{m}$** .

#### **3.4.2. Sterilizacija mikroplastike**

Prije same provedbe eksperimenta, čestice PVC-a su se sterilizirale pomoću 70 %-tnog etanola na sobnoj temperaturi na rotacijskoj tresilici. Čestice MP-a su se izdvojile iz etanola metodom membranske filtracije uz ispiranje sterilnom deioniziranom vodom poštujući sterilnu tehniku rada. Čestice MP-a zaostale na sterilnom membranskom filtru (veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ ) su se pomoću sterilne žlice i pincete prebacile u Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL za postavljanje pokusa.

#### **3.4.3. Uzgoj bakterija *Bacillus subtilis***

Za preduzgoj kulture pripremljena je 24-satna kultura *Bacillus subtilis* uzgojena na HA pri 37 °C. U mineralnom mediju priređena je suspenzija koja je postavljena na tresilicu tijekom 24 h,

pri sobnoj temperaturi. Svrha preduzgoja bila je ubrzati fazu prilagodbe mikroorganizma za vrijeme samog izvođenja pokusa.

#### 3.4.4. Određivanje pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika

Na početku pokusa mjerila se pH-vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika. Početna pH-vrijednosti mjerila su se pomoću pH elektrode spojene na multimeter, a koncentracija otopljenog kisika u uzorku mjerila se kisikovom elektrodom, koja je također spojena na multimeter. Mjerne vrijednosti su zabilježene nakon što su se ustalile.

#### 3.4.5. Određivanje ukupnoga broja živih stanica bakterija (CFU)

Tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PVC čestica primjenom *Bacillus subtilis* određivan je ukupan broj živih stanica bakterije *Bacillus subtilis*. Za određivanje ukupnoga broja živih stanica bakterije *Bacillus subtilis* pripremljena su decimalna razrjeđenja. Broj izraslih kolonija bakterije *Bacillus subtilis* određen je ukupno šest puta tijekom trajanja pokusa, a izrazio se preko CFU (eng. *Colony forming units*) vrijednosti. Postupak određivanja CFU započinje pripremom decimalnih razrjeđenja tako da se u 9 mL sterilne fiziološke otopine dodaje 1 mL uzorka iz tikvice gdje se provodi biorazgradnja. Dobiveno razrjeđenje se dobro homogenizira i zatim se iz njega uzima 1 mL i prenosi u drugu epruvetu s 9 mL fiziološke otopine. Taj postupak se ponavlja dok se ne dođe do željenog razrjeđenja. Iduće je potrebno inokulirati 1 mL tako pripremljenog razrjeđenja u praznu sterilnu Petrijevu zdjelicu koji se potom zalije s HA i dobro homogenizira. Petrijeve zdjelice stave se na inkubaciju u termostat 24-48 sati pri 37 °C. Nakon inkubacije, određuje se broj izraslih kolonija brojanjem, dok se CFU vrijednost računa prema formuli (3). Za odabir decimalnog razrjeđenja što se brojio uzelo se razrjeđenje gdje je broj izraslih kolonija bio u rasponu 30-300.

$$\text{CFU} \left( \frac{\text{st}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{broj izraslih kolonija}}{\text{volumen upotrebljenog uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad (3)$$

#### 3.4.6. Karakterizacija čestica PVC-a FTIR-ATR analizom

Nakon provedbe pokusa biorazgradnje PVC-a, čestice su izdvojene metodom membranske filtracije te dodatno isprane sterilnom destiliranom vodom. Te čestice MP uz čestice prije provođenja procesa biorazgradnje korištene su za snimanje FTIR spektra. U svrhu potvrde biorazgradnje, odnosno narušavanja strukture čestica PVC-a, krute čestice su analizirane FTIR-ATR spektroskopijom. Uređaj je prikazan prethodno na Slici 3.3. Analiza je provedena u svrhu dobivanja spektara te praćenja promjena intenziteta, kao i nastanka, nestanka ili pomaka

karakterističnih pikova za PVC. Spektri su snimani u području  $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ . Prije početka analize provedena je inicijalizacija uređaja. Nakon inicijalizacije, kao i prije svakog mjerenja uzorka, snimljena je pozadina (eng. *Background*) kako bi se uklonili pozadinski šumovi. Nakon snimanja spektara, njihovo očitavanje i daljnja obrada provedena je u programu IR Solution, EP, Japan.

#### **3.4.7. Određivanje ukupnog, organskog i anorganskog ugljika**

Uzorak za određivanje TOC-a se izuzeo 6 puta tijekom provedbe pokusa. Izuzimalo se 0,5 mL uzorka nakon čega se filtrirao kroz okrugli membranski filter veličine pora  $0,45 \mu\text{m}$ . Isto tako izuzimao se uzorak za određivanje TC-a, dok se TIC dobio kao razlika TOC-a i TC-a. Nakon filtracije, uzorak je otpipetiran u staklenu bočicu u koju je dodano 9,5 mL deionizirane vode kako bi ukupni volumen uzorka bio 10 mL. U bočice u kojima se određivao TOC dodale su se i 3 kapi  $\text{H}_2\text{SO}_4$  radi neutralizacije anorganskog ugljika, dok se u bočice za određivanje TC-a nije dodavala kiselina.

#### **3.4.8. Procjena aditiva pomoću LC-MS analize**

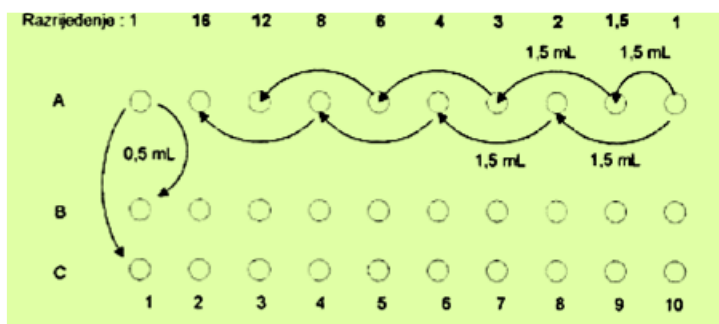
LC-MS analiza ili tekućinska kromatografija uz maseni spektrometar kao detektor provedena je u svrhu procjene otpuštenih aditiva s površine MP čestica u vodenu fazu tijekom pokusa biorazgradnje PVC-a primjenom *Bacillus subtilis*. Uzorak se pipetom dodavao u vijalu namijenjenu za LC uređaj. Prilikom LC/MS analize korištene su dvije pumpe za podešavanje protoka mobilne faze (0,1% mravlje kiseline +MiliQ i acetonitril/metanol) vrijednosti  $0,5 \text{ cm}^3/\text{min}$ . Volumen injektiranog uzorka iznosio je  $5 \mu\text{L}$ . S obzirom da se ne zna točan sastav uzorka, korištena je metoda bez kolone.

#### **3.4.9. Određivanje ekotoksičnosti**

Mjerenje toksičnosti pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* vršilo se prema normi *HRN/EN ISO 11348- 1:2000 en, Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri, Method using freshly prepared bacteria*. Ispitivanje ekotoksičnosti odvijalo se na vodenu fazu uzorka nakon što su filtracijom odvojeni od čestica MP nakon 30 dana biorazgradnje. Za ispitivanje su uz filtrat korištene i otopina za resuspenziju i 2% otopina NaCl-a. Uzorci su se čuvali na temperaturi  $2-5 \text{ }^\circ\text{C}$  u zatamnjenoj posudi do 48 h. U slučaju da se uzorak čuvao duže od dva tjedna bilo ga je potrebno čuvati na temperaturi od  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Podešavanje pH-vrijednosti napravljeno je prije ispitivanja s NaOH ili HCl. pH-vrijednost filtrata trebala je iznositi između 6 i 8,5. Bakterijska suspenzija pripremljena je na



način da se ušicom mikrobiološke eze zahvatilo čiste kulture morske bakterije *Vibrio fischeri* te je suspendirana u epruveti napunjenoj 2/3 otopinom za resuspenziju. Tako pripremljena bakterijska suspenzija termostatirana je 15 minuta u termostatu na 15 °C radi prilagodbe bakterijske kulture uvjetima. Prije provođenja samog testa ekotoksičnosti izmjerena je relativna luminiscencija bakterijske suspenzije *Vibrio fischeri* koja mora iznositi najmanje 1000 da bi se ispitivanje ekotoksičnosti provelo. Korišten je uređaj prikazan na slici 3.4., gdje se su se radila razrjeđenja uzorka prema linearnom nizu, tj. suspenzija *Vibrio fischeri* izlagala se rastućem nizu koncentracija ispitivane tvari. U prvu kivetu niza stavi se 2%-tna otopina NaCl-a do 2/3 volumena kivete, a u zadnju kivetu niza dodaje se 2/3 kivete filtrata. U predzadnju kivetu stavi se 1 mL 2%-tne otopine NaCl, a u sve ostale kivete stavi se po 1,5 mL iste te otopine. Pomoću filtrata iz zadnje kivete se zatim rade željena razrjeđenja načinom prikazanim na slici 3.6..



**Slika 3.6.** Prikaz provedbe testa toksičnosti pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* prema linearnom nizu.

Metoda se zasniva na promjeni bioluminescencije *Vibrio fischeri* nakon izlaganja uzorku. Rezultati ispitivanja razlike luminescencije bakterije *Vibrio fischeri* prije i poslije izlaganja uzorku iskazani su kao  $EC_{50}$  i  $EC_{20}$  vrijednosti što ukazuju na toksični učinak uzorka ili kontrolnog mineralnog medija na bakteriju. Eksperimentalni rezultat je i vrijednost faktora,  $f$ , koji treba iznositi otprilike 1.

### 3.5. Provođenje pokusa biorazgradnje MP PVC-a

Pokus je postavljen prema *Full Factorial* dizajnu (FF) kao dizajnu eksperimenta. Proučavali su se 3 čimbenika na 3 razine ( $3^3$ ) što je ukupno činilo 27 pokusa. Pokus se provodio u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 250 mL, a radni je volumen iznosio 100 mL. Pokus se provodio tijekom 30 dana. Tikvice su sadržavale mineralni medij odgovarajuće pH-vrijednosti, suspenziju mikroorganizma – *Bacillus subtilis*, i mikroplastiku, tj. čestice PVC-a odgovarajuće

veliĉine ĉestica i koncentracije. Veliĉina ĉestica PVC-a je bila konstantna u rasponu 300-500  $\mu\text{m}$ , kao i koncentracija PVC-a koja je bila 500 mg/L.

Ĉimbenici te razine na kojima su se prouĉavali tijekom eksperimenta dani su u **tablici 3.2.**, a za poĉetne uvjete odredili su se parametri dani u **tablici 3.3.** Vrijednosti ĉimbenika s oznakama pokusa dani su u **tablici 3.4.**

**Tablica 3.2.** Ĉimbenici i razine koji su se prouĉavali tijekom eksperimenta

Ĉimbenik	Razina	1	2	3
A	pH-vrijednost / -	6	7	8
B	Broj okretaja / o/min	100	150	200
C	OG / -	0,1	0,3	0,5

**Tablica 3.3.** Uvjeti pokusa s navedenim oznakama.

Oznaka	pH-vrijednost / -	broj okretaja / o/min	OG / -
T1	8	100	0,3
T2	7	100	0,5
T3	6	100	0,5
T4	7	100	0,1
T5	7	150	0,1
T6	8	100	0,1
T7	7	100	0,3
T8	6	100	0,1
T9	8	100	0,5
T10	7	150	0,5
T11	6	150	0,1
T12	8	150	0,5
T13	8	150	0,3
T14	8	200	0,5
T15	6	100	0,3
T16	6	150	0,3
T17	8	200	0,3
T18	6	200	0,3
T19	8	150	0,1
T20	7	200	0,5
T21	7	150	0,3
T22	6	150	0,5
T23	6	200	0,1
T24	7	200	0,3
T25	7	200	0,1
T26	8	200	0,1
T27	6	200	0,5

**Tablica 3.4.** Početni uvjeti za pokus biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis*.

MP	$\gamma(\text{O}_2)_0$ / mg/L	pH- vrijednost <sub>0</sub> / -	$T_0$ / °C	CFU <sub>0</sub> / st/mL	log (CFU) <sub>0</sub> /-	$\gamma(\text{TC}_0)$ / mg/L	$\gamma(\text{TOC}_0)$ / mg/L	$\gamma(\text{TIC}_0)$ / mg/L
<b>PVC OG=0,5</b>	7,63	8,404	24,2	$5,0 \cdot 10^6$	6,70	3,340	3,893	0,553
<b>PVC OG=0,3</b>	7,48	7,695	24,7	$2,1 \cdot 10^7$	7,32	6,205	3,661	2,544
<b>PVC OG=0,1</b>	7,83	6,638	24,2	$7,8 \cdot 10^6$	6,89	3,541	2,506	1,035

Tijekom provođenja pokusa koncentracije MP su bile konstantne i iste u svim uzorcima, dok su se čimbenici pH, OG i broj okretaja rotacijske tresilice mijenjali prema Tablici 3.3. Tijekom 30 dana pokusa pratila se promjena broja živih stanica bakterija (CFU), koncentracije ukupnog, organskog i anorganskog ugljika, te procjena otpuštenih aditiva. Karakterizacija čestica MP provela se pomoću FTIR spektroskopije, a testom ekotoksičnosti pratilo se odvijanje razgradnje MP u uzorcima.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Neadekvatno prikupljanje i odlaganje plastičnog otpada, danas predstavlja veliki problem za okoliš. Naime, poznato je da proces razgradnje svih polimernih materijala pa tako i plastičnih materijala u okolišu je dugotrajan, što ima za posljedicu akumulaciju plastike u okolišu. Također, poznato je iz najnovijih istraživanja da s dugotrajnim stajanjem u okolišu dolazi do usitnjavanja, fragmentiranja plastike na manje sitne komadiće, koji se nazivaju MP [27]. Istraživanja su također pokazala da MP (<5 mm) dodatno onečišćuje okoliš i predstavlja prijetnju zdravlju ljudi, živim organizmima te ekosustavima, dijelom jer adsorbira toksične tvari u vodama, a dijelom jer ulazi kao hrana u žive organizme te na kraju preko hranidbenog lanca dolazi do ljudi. [64, 65] Među najkorištenijim plastikama su PE, PP, PVC i PET [66]. Stoga se danas intenzivno istražuje proces uklanjanja MP iz okoliša te je jedan takav proces biorazgradnja. Biorazgradnja se odvija primjenom mikroorganizama koji su sposobni enzimima razgraditi polimerni lanac plastičnih materijala [66]. Većina plastika bazirana na ugljikovodičnim lancima, pa tako i PVC, pokazala se biološki inertnim, što i je razlog njihovog dugotrajnog zadržavanja i akumulacije u okolišu [72]. Struktura PVC-a, odnosno njegova ponavljajuća jedinica dana je slikom 2.2. Glavna struktura je vinilni lanac poput PE, no ima prisutnu Cl skupinu na svakom drugom C atomu.

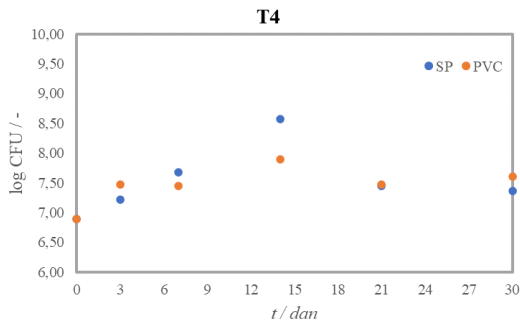
Većina plastičnih materijala kao konačni produkt razgradnje daje CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O kao i većina organskih molekula, no ovdje je PVC iznimka zbog toga što kao posljedica Cl atoma u strukturi nastaje HCl kao jedan od produkta razgradnje [72]. Jedan od obećavajućih pristupa procesu biorazgradnje je korištenje larve *Tenebrio Molitor*. Prema dosadašnjim istraživanjima, larve se mogu prilagoditi na uvjete izloženosti plastike, i to na PS i PVC [72].

U ovome se radu istraživala biorazgradnja PVC MP pomoću gram-pozitivne bakterijske kulture *Bacillus subtilis*. Cilj pokusa je prvo određivanje optimalnih uvjeta biorazgradnje PVC-a pomoću vrijednosti CFU i programa Design Expert zatim karakterizacija i ispitivanje produkta pokusa biorazgradnje te praćenje samog procesa pomoću FTIR-ATR, LC-MS, koncentracije ukupnog, organskog i anorganskog ugljika te ispitivanje ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*. Optimalni uvjeti su dobiveni u programu i zatim su provedena ispitivanja pokusa s najslučajnijim uvjetima.

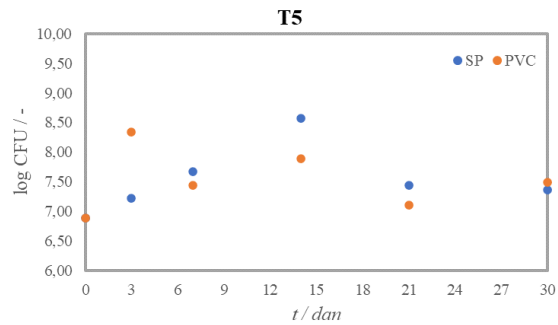
### 4.1. Promjena CFU prilikom biorazgradnje PVC primjenom *Bacillus subtilis*

U svrhu praćenja aktivnosti bakterija tijekom pokusa pratio se broj izraslih kolonija [73]. U ovom pokusu broj izraslih kolonija je određivan na hranjivom agaru nakon 24 h na 37

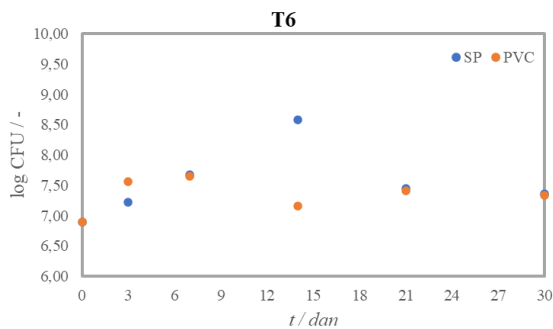
°C. CFU je služio kao parametar za praćenje procesa biorazgradnje MP PVC-a. Na slici 4.1. prikazane su grafičke ovisnosti logaritma CFU o vremenu za pokuse i slijepe probe s OG od 0,1.



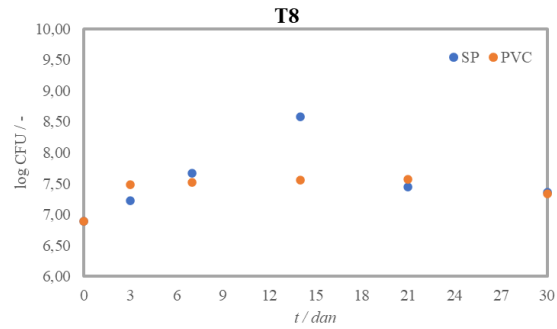
a)



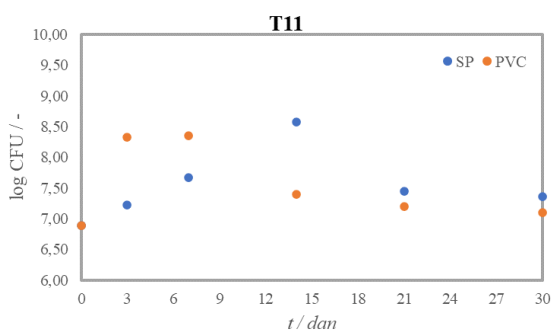
b)



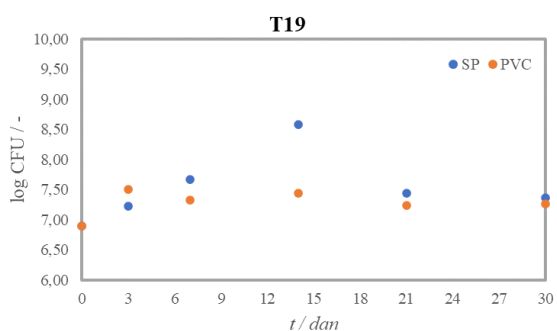
c)



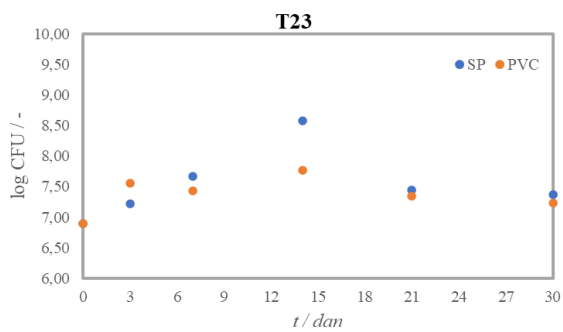
d)



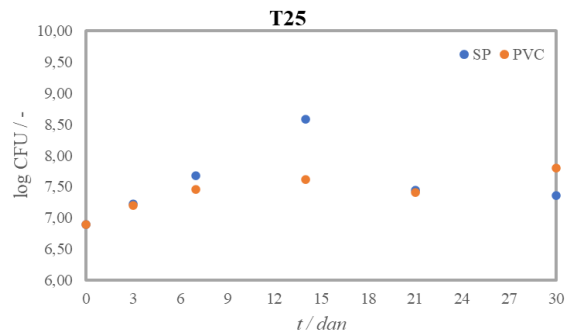
e)



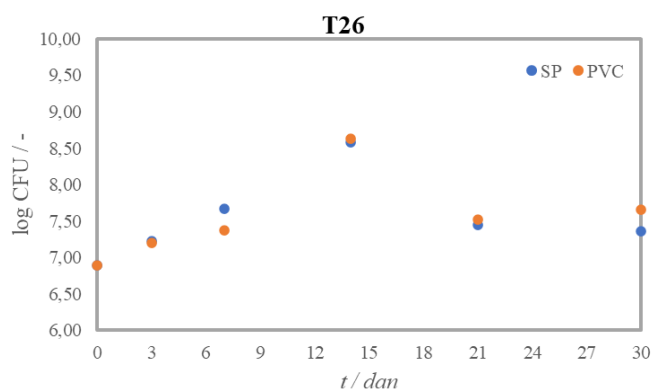
f)



g)



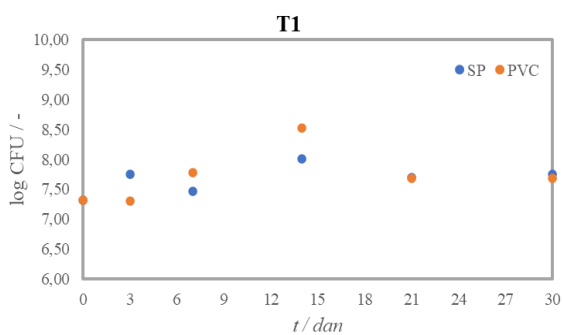
h)



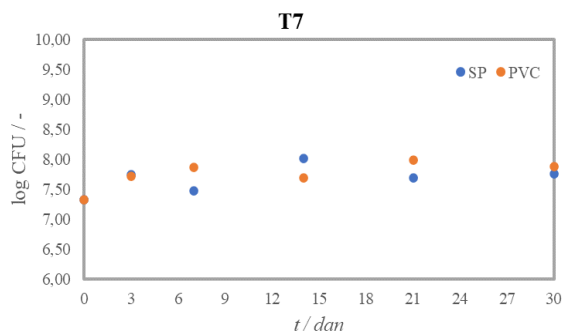
i)

**Slika 4.1.** Promjena logaritamske vrijednosti CFU tijekom 30 dana trajanja biorazgradnje MP PVC-a primjenom *Bacillus subtilis* za pokuse s OG od 0,1: a) T4, b) T5, c) T6, d) T8, e) T11, f) T19, g) T23, h) T25 te i) T26.

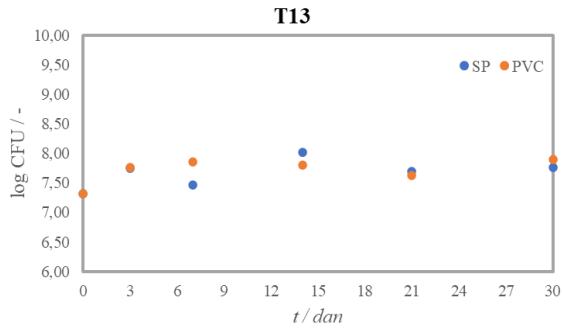
Na slici 4.2. isto takav grafički prikaz ovisnosti logaritma CFU o vremenu dan je i za pokuse provedene s OG od 0,3.



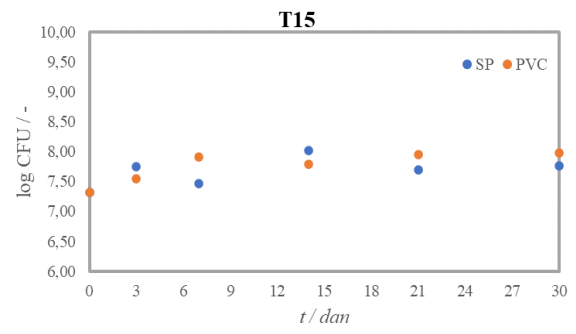
a)



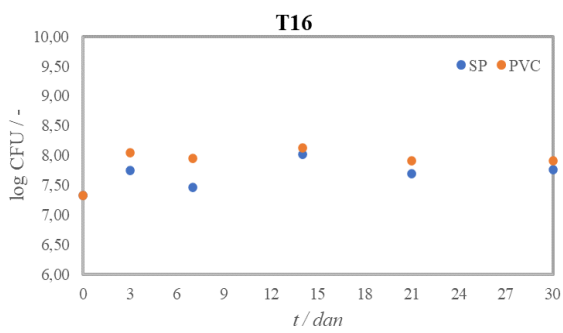
b)



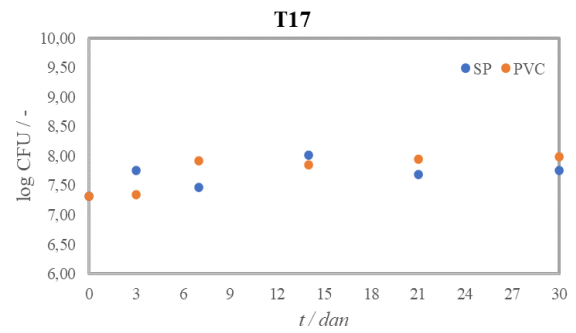
c)



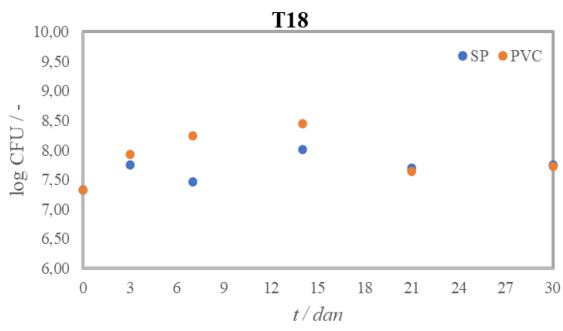
d)



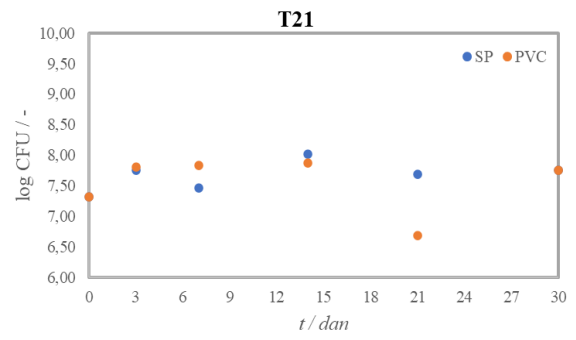
e)



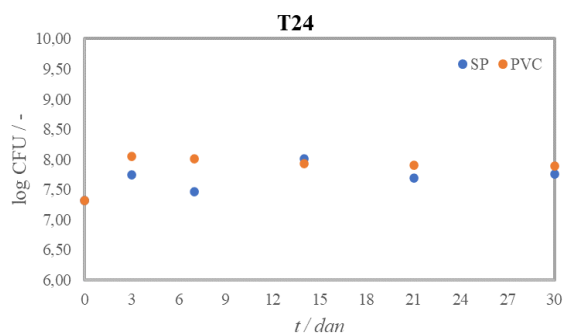
f)



g)



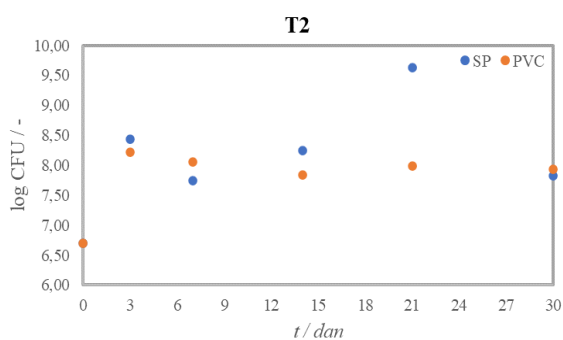
h)



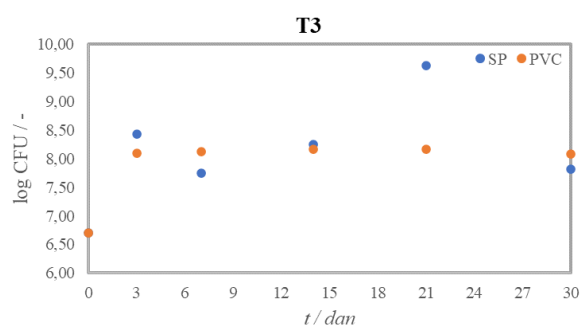
i)

**Slika 4.2.** Promjena logaritamske vrijednosti CFU tijekom 30 dana trajanja biorazgradnje MP PVC-a primjenom *Bacillus subtilis* za pokuse s OG od 0,3: a)T1, b)T7, c)T13, d)T15, e)T16, f)T17, g)T18, h)T21 te i)T24.

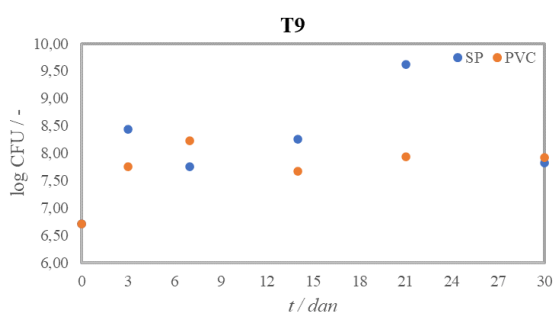
Na slici 4.3. dan je grafički prikaz ovisnosti logaritma CFU o vremenu za pokuse provedene s OG od 0,5.



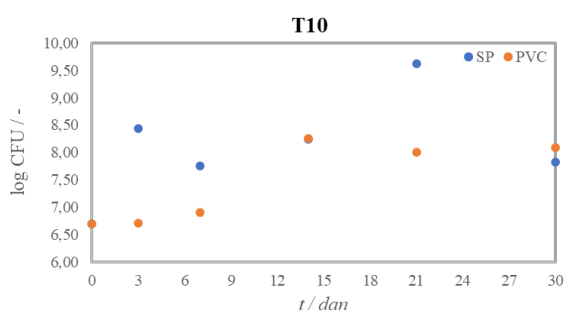
a)



b)

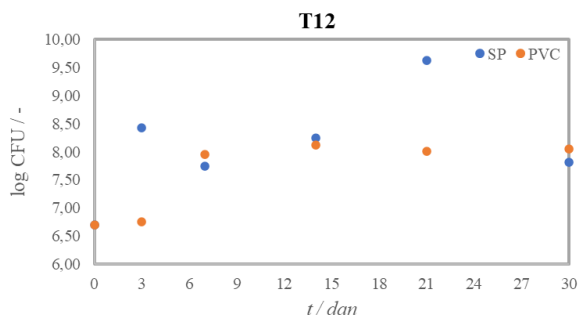


c)

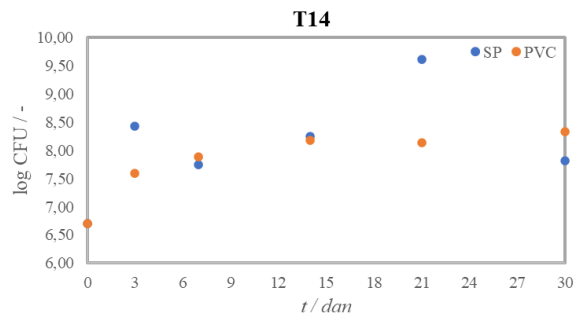


d)

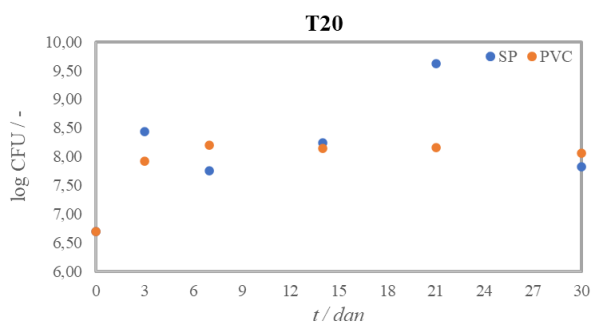




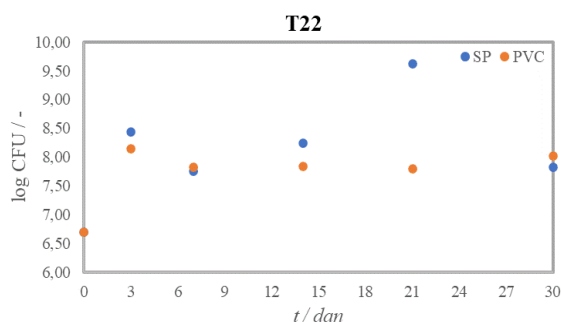
e)



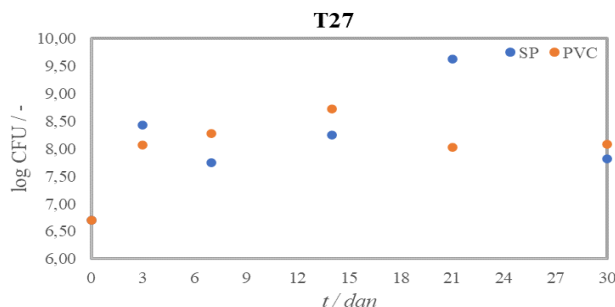
f)



g)



h)



i)

**Slika 4.3.** Promjena logaritamske vrijednosti CFU tijekom 30 dana trajanja biorazgradnje MP PVC-a primjenom *Bacillus subtilis* za pokuse s OG od 0,3: a) T2, b) T3, c) T9, d) T10, e) T12, f) T14, g) T20, h) T22 te i) T27.

Logaritam CFU za nulti dan imao je istu vrijednost za svaku slijepu probu i pokus s istim OG, a vrijednosti su prikazane u tablici 3.4. U većini pokusa uočljivo je da se maksimum doseže u 14. danu i u nekim slučajevima u 7. danu. Maksimum se doseže na kraju faze eksponencijalnog rasta bakterija. Rast bakterija može se podijeliti u 4 faze: lag fazu, fazu eksponencijalnog rasta, stacionarnu fazu i fazu odumiranja. Lag faza se također može nazvati i faza prilagodbe, u

grafičkim prikazima za ove pokuse ustvari ta faza nije vidljiva iz razloga što se bakterijska suspenzija prilagodila mineralnom mediju za izvođenje pokusa i tako se ta faza „preskočila“. Faza eksponencijalnog rasta, ili logaritamska faza, karakterizirana je ubrzanim rastom broja stanica uslijed binarnog cijepanja stanica bakterija, u grafičkim prikazima to je faza od nultog dana do maksimalne vrijednosti CFU. Stacionarna faza karakterizirana je jednakim brojem živih i umrlih stanica, zbog velikog broja umrlih stanica oslobađa se veća količina hranjivih tvari za žive stanice. Na grafičkim prikazima to je obilježeno uzastopnim točkama nakon logaritamske faze. Zadnja faza, faza odumiranja, karakterizirana je naglim padom broja živih stanica zbog stvaranja toksičnih otpadnih produkata uslijed stacionarne faze. Na grafičkim prikazima (slike 4.1.- 4.3.) karakterizirana je naglim padom vrijednosti CFU [74]. Za dobivanje optimalnih uvjeta razgradnje MP PVC-a poželjno je da logaritam CFU bude što viši, a općenito najveće vrijednosti CFU pri trajanju razgradnje su pokazali pokusi s OG od 0,5. Vidljivo je da i slijepa proba za tu vrijednost optičke gustoće ima nagli skok na 21. danu, no budući da nema teorijske osnove za tako nagli skok vjerojatno je u pitanju eksperimentalna pogreška. Od ostalih pokusa može se uočiti da na kraju pokusa u 30. danu najveću vrijednost CFU ima pokus T14 u iznosu od  $2,14 \cdot 10^8$  st / mL, a svoju maksimalnu vrijednost dosegula je u 30. danu, što upućuje da je tada bila najintenzivnija biorazgradnja. Visoka vrijednost od  $1,53 \cdot 10^8$  st / mL dosegula se već u 14. danu, što upućuje da je tada već počeo period intenzivne biorazgradnje. Ova vrijednost CFU značajno je viša od vrijednosti na početku pokusa T14, koja je iznosila  $7,8 \cdot 10^6$  st / mL. Osim u pokusu T14, visoka vrijednost CFU uočena je u pokusu T26 s vrijednosti od  $4,28 \cdot 10^8$  st / mL u 14. danu, što je i više nego maksimalna vrijednost pokusa T14. No vrijednosti za pokus T26 naglo padaju, što upućuje da je period intenzivne biorazgradnje bio kratak, dok je kod pokusa T14 znatno dulji. Uočljivo je da je kod velike većine pokusa, čak i pokusa T14 s visokim CFU vrijednostima, vrijednost CFU-a za slijepu probu u periodu 0. - 7. dana viša od CFU vrijednosti uzorka, što upućuje na negativni utjecaj MP PVC-a na rast bakterijske kulture *Bacillus subtilis* i u skladu je s istraživanjima o toksičnosti MP PVC-a [78]. Nakon 7. dana primjetno raste CFU za uzorke naspram slijepih proba. To upućuje da je bakterija *Bacillus subtilis* uspješno koristila PVC kao izvor ugljika tj. kao supstrat [61].

#### 4.2. Dizajn eksperimenta – Full factorial design

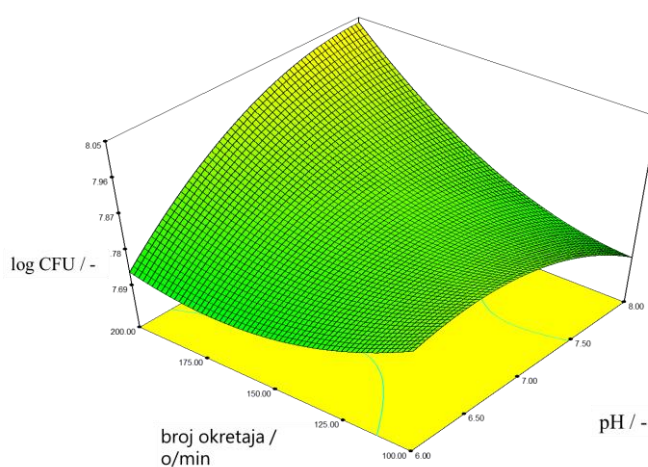
Eksperimentalni dizajn je način na koji će se osmisлити postupak izvođenja pokusa. Značajke dobro dizajniranog eksperimenta su dobro definiran cilj, mogućnost procjene pogreške, dovoljna preciznost i mogućnost da raspozna je različite efekte korištenjem slučajnog odabira i

faktorskog dizajna. Bitni pojmovi kod dizajna eksperimenta su faktori i nivoi, gdje je faktor ili čimbenik bilo kakva promjena stanja u pokusu, a nivoi su razlike faktora koji mogu biti kvantitativni ili kvalitativni. Kod pokusa gdje je potrebno pratiti utjecaj više efekta bitno je izabrati ispravni eksperimentalni dizajn. Jedan od mogućih takvih dizajna je faktorski dizajn eksperimenta ili faktorska analiza, koja se koristi kako bi se utvrdili učinci individualnih faktora te relacije između faktora. Prednost faktorske analize je što može znatno smanjiti broj uzoraka koje je potrebno analizirati, a među boljim faktorskim analizama jest potpuna faktorska analiza (eng. *Full factorial design*). Ovaj dizajn eksperimenta karakteriziran je brojem pokusa proporcionalno brojem faktora, tako je za ovaj rad gdje se proučava 3 faktora na 3 nivoa bilo potrebno  $3^3$  odnosno 27 pokusa, te su provedeni pokusi za sve kombinacije faktora i nivoa. Prednost ovog dizajna je mogućnost prikazivanja utjecaja svih faktora na konačni rezultat te utjecaj interakcija faktora. Mana ovakvog dizajna je da je eksperiment s velikim brojem faktora gotovo neizvediv s dizajnom potpune faktorske analize zbog prevelikog broja pokusa, a nije moguće samo izbaciti nivo jer se može izgubiti značajan učinak izbačenih podatka [75].

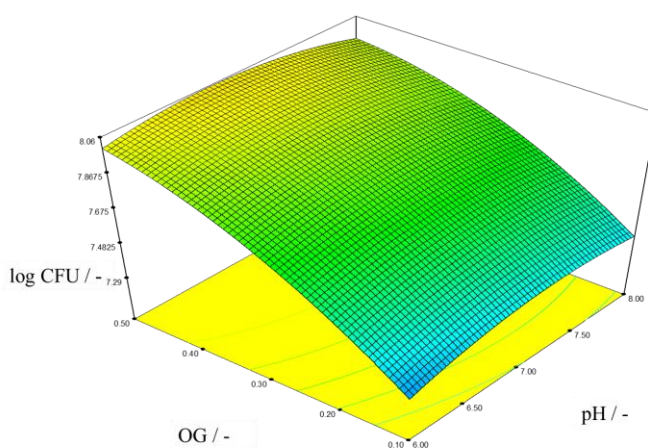
Za provedbu dizajna eksperimenta i potvrđivanje signifikantnosti rezultata korišten je program Design Expert. U programu su uneseni parametri: pH-vrijednost, broj okretaja rotacijske tresilice te optička gustoća bakterijske suspenzije za svih 27 provedenih pokusa uz logaritam CFU vrijednosti kao odziv. Podatci su obrađeni tako da je u programu traženo da vrijednost logaritma CFU bude maksimalna i stoga se dobiva ovisnost CFU vrijednosti o 3 parametra (dobivene su 3 grafičke ovisnosti prikazane na slici 4.4.). Iz grafičke ovisnosti mogu se vizualno potvrditi rezultati, što je program dao kao optimalne uvjete, prikazano na tablici 4.1. Grafički prikazi na slici 4.4. pokazuju ovisnosti logaritma CFU u odnosu na kombinacije svih 3 čimbenika pri kojima su provedeni pokusi. Prva grafička ovisnost ukazuje na ovisnost log CFU o brzini okretaja i pH. Uočljivo je da se najveći odaziv CFU postigao pri kombinaciji viših vrijednosti pH i brzina okretaja. Iako inače veća brzina okretaja može otežati rast *Bacillus subtilis* zbog toga što se biofilm teže stvara pri dinamičkim nego stacionarnim uvjetima [76], u ovim ispitivanim uvjetima su veće brzine okretaja rotacijske tresilice pogodovale bakteriji. Iduća grafička ovisnost prikazuje ovisnost log CFU o pH i OG (slika 4.4. b). Iz ovisnosti se uočava da se najveće vrijednosti CFU dobivaju pri visokim vrijednostima OG i neutralnim pH. Uočava se, također, pad vrijednosti CFU pri manjim OG te kiselim ili lužnatim pH. Konačni prikaz daje ovisnost log CFU o brzini okretaja i OG (slika 4.4. c). Dobiveni prikaz ukazuje da je CFU najveći pri visokim vrijednostima OG te pri najvišim vrijednostima brzine okretaja prema crvenom području na odzivnoj površini. Kombinacijom svih prikaza može se zaključiti

da za postizanje viših vrijednosti CFU optimalni uvjeti su: više vrijednosti brzine okretaja i optičke gustoće, te pH-vrijednosti između neutralnih i lužnatih vrijednosti.

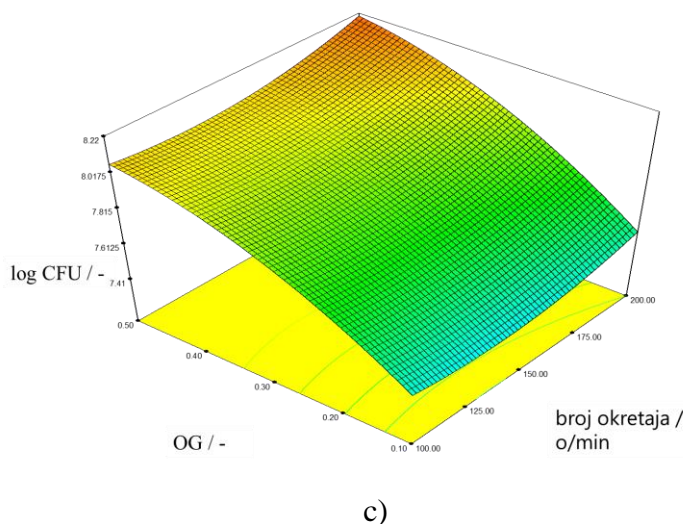
Dobiveni rezultati optimalnog pH u skladu su s uvjetima za rast bakterije *Bacillus subtilis* koja najbolje raste pri pH rasponu 6 – 9 [59]. Pogodno djelovanje visoke OG može se objasniti činjenicom da kod većih OG je veći broj živih stanica bakterija. Vjeruje se da je zato dobivena optimalna razgradnja kod viših vrijednosti OG. Visoka brzina okretaja također je u skladu s očekivanjima pošto se rotacijom osigurava koncentracija otopljenoga kisika u sustavu, a bakterija *Bacillus subtilis* je aerobna bakterija i potreban joj je kisik za rast [59].



a)



b)



**Slika 4.4.** Prikazi odzivnih površina za promjenu logaritma CFU o čimbenicima pokusa: a) brzini okretaja i pH, b) optičkoj gustoći i pH, c) brzini okretaja i optičkoj gustoći.

Pri obradi podataka u programu je provedena i ANOVA analiza podataka. ANOVA, ili analiza varijanci, jest statistička metoda za usporedbu varijanci srednjih vrijednosti više faktora [77]. Pri analizi dobivene su vrijednosti standardne devijacije, srednje vrijednosti, predviđena suma kvadrata ostataka (PRESS), koeficijent varijacije (C.V.), odgovarajuća preciznost,  $R^2$ , prilagođeni  $R^2_{adj}$  i predviđeni  $R^2$ , prikazano na tablici 4.2.  $R^2$  vrijednost predstavlja mjeru linearnosti u sustavu, tj. mjera koliko dobiveni eksperimentalni podatci slijede model, no kada sustav ima više faktora (nezavisnih varijabli) koji pridonose promjeni konačnog rezultata (zavisne varijable) pri iskazivanju  $R^2$  vrijednosti potrebno je uzeti u obzir koliko svaka varijabla pridonosi u procesu, stoga se uvodi prilagođeni  $R^2_{adj}$  (eng. *Adjusted R<sup>2</sup>*). Prilagođeni  $R^2_{adj}$  je korigiran s brojem varijabli što se koriste [79]. Za  $R^2$  vrijednost je poželjno da bude što bliže 1, odnosno da bude što bolje poklapanje modela i podatka. Vrijednost za predviđeni  $R^2$  od 0,7260 je u slaganju s prilagođenim  $R^2_{adj}$  vrijednosti od 0,8222. Dobivena vrijednost za odgovarajuću preciznost od 12,122 predstavlja omjer šuma i signala, željeni omjer iznosi 4 ili više i stoga dobiveni omjer od 12,122 upućuje na adekvatni signal.

**Tablica 4.1.** Optimalni uvjeti biorazgradnje PVC-a primjenom *Bacillus subtilis* dobiveni programom Design Expert.

pH-vrijednost / -	broj okretaja / o/min	OG / -	log CFU / -	Poželjnost	Odabrano
7,74	200	0,50	8,24731	0,933	

**Tablica 4.2.** Pregled statističkih podataka modela dobiveni analizom varijance.

Std. Dev.	0,13
Mean	7,78
C.V. %	1,69
PRESS	0,69
$R^2$	0,88
Prilagođeni $R^2$	0,82
Predviđeni $R^2$	0,73
Odgovarajuća preciznost	12,122

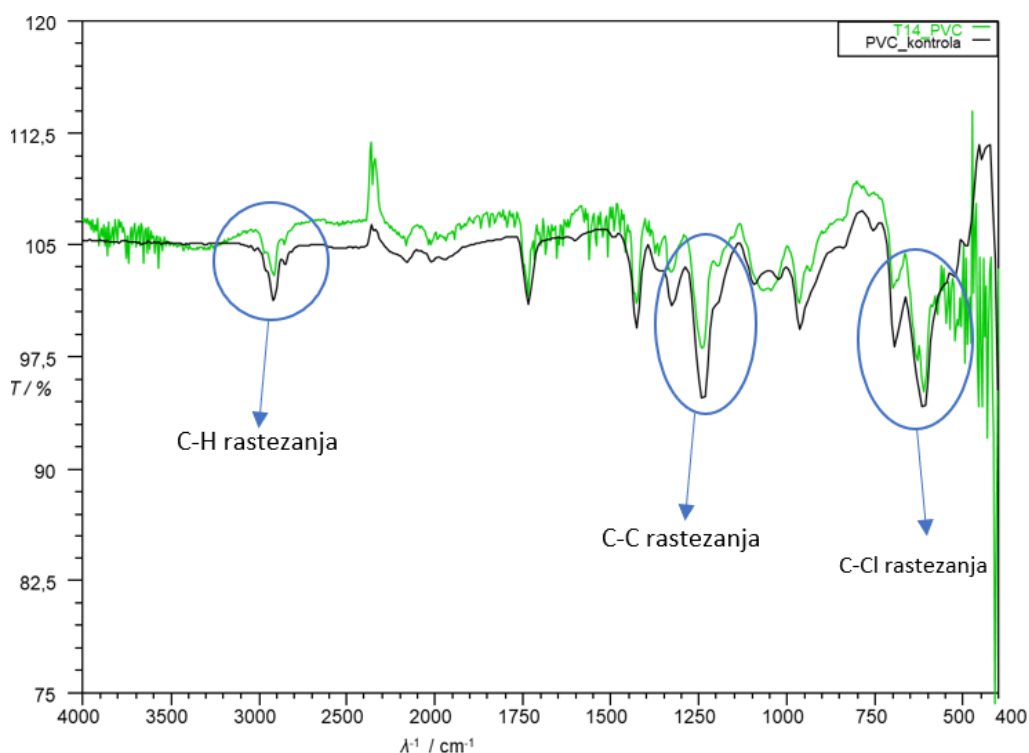
Podatci iz tablice 4.1. slažu se s grafičkim ovisnostima prikazani na slici 4.5. i predstavljaju optimalne uvijete za biorazgradnju MP PVC-a pomoću *Bacillus subtilis*. Od provedenih pokusa ti uvjeti se najviše podudaraju s pokusom T14. To se podudara s vrijednostima CFU na grafovima na slici 4.4, i stoga će se daljnji podatci i rezultati pokusa fokusirati na „optimalnom“ pokusu T14.

#### 4.3. Analiza čestica MP PVC-a pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom

Za uzorke MP PVC-a snimljen je FTIR-ATR spektar prije i poslije provođenja pokusa razgradnje. Snimljena je transmisija na području valnog broja 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  s ATR nastavkom. Na slici 4.5. prikazan je dobiveni spektar s kontrolom (crna linija na spektru) i uzorkom T14 (zeleno linija na spektru) s označenim pikovima te su u tablici 4.4. prikazani karakteristični pikovi za PVC.

Uočljivo je da oba uzorka PVC MP imaju sva 3 karakteristična pika danih u tablici 4.4., to upućuje da se u 30 dana izvođenja pokusa nije dogodila znatna promjena polimernog lanca PVC-a. No ipak je uočljiva promjena u spektru uslijed biorazgradnje. Naime uz uobičajene pikove pri 690  $\text{cm}^{-1}$ , 1099  $\text{cm}^{-1}$  i 2900–2950  $\text{cm}^{-1}$  uočava se nastanak dva nova pika na spektru za pokus T14. Riječ je o piku za O-H rastezanja (hidroksilna skupina) pri ~3500  $\text{cm}^{-1}$  te piku pri ~1750  $\text{cm}^{-1}$ , što označava C=O rastezanja (karbonilna skupina), prisutnost te dvije skupine često upućuje na prisutnost karbonilne kiseline s funkcionalnom grupom COOH. Ove dvije skupine su u literaturi spomenute kao neizbježan produkt pri oksidaciji i biorazgradnji plastika [23, 80]. Razlog nastanku ovih pikova je oksidacijska reakcija za koju je utvrđeno da se odvija pri procesu biorazgradnje, koja uvodi kisik u lanac polimera te se stvaraju slabe točke u

polimernom lancu gdje će se lakše odviti reakcije, tj. nastaju nusprodukti razgradnje s kisikom [7]. Uz nastanak tih grupa primjećuje se i blagi pad intenziteta pika pri  $690\text{ cm}^{-1}$ , tj. slabi pik što označava C-Cl interakciju. Na dobivenom spektru uočljiva je promjena zbog biorazgradnje, ali radi kratkog vremena trajanja pokusa promjene su relativno slabo vidljive. Za pokuse biorazgradnje u literaturi se uzima vrijeme od 90 dana jer se tada znatno bolje vide promjene na FTIR spektru između PVC-a prije i nakon biorazgradnje u odnosu na dobiveni spektar s pokusom u trajanju od 30 dana [23].



**Slika 4.5.** FTIR-ATR spektar uzorka PVC-a prije provođenja pokusa (PVC\_kontrola) te uzorka T14 nakon pokusa (T14\_PVC).

**Tablica 4.3.** Karakteristični pikovi na FTIR spektru PVC-a.

Interakcija	C-C rastezanje	C-H rastezanje	C-Cl rastezanje
Pik na FTIR spektru / $\text{cm}^{-1}$	1099	2900–2950	690
Struktura			

#### 4.4. Praćenje procesa razgradnje mikroplastike određivanjem ukupnog ugljika, ukupnog organskog ugljika i ukupnog anorganskog ugljika

Za praćenje procesa biorazgradnje plastike određivalo se TC, TOC i TIC za 0. dan, 3. dan, 7. dan, 14. dan, 21. dan i 30. dan iz vodenog medija uzorka. Rezultati dani tablično u tablici 4.3. prikazuju promjenu koncentracije ugljika u pokusu T14 kroz vrijeme trajanja pokusa.

**Tablica 4.4.** Promjena vrijednosti ukupnog ugljika, organskog ugljika i anorganskog ugljika tijekom procesa biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis* za pokus T14 i slijepu probu.

$t / d$	T14			Slijepa proba		
	$\gamma(\text{TOC}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{TC}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{TIC}) \text{mg/L}$	$\gamma(\text{TOC}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{TC}) / \text{mg/L}$	$\gamma(\text{TIC}) / \text{mg/L}$
0.dan	3,340	3,893	0,553	3,340	3,893	0,553
3.dan	3,691	8,759	5,068	5,169	5,498	0,329
7.dan	2,240	17,475	15,235	1,586	7,959	6,373
14.dan	3,451	6,949	3,498	10,878	7,469	/
21.dan	5,279	1,600	/	5,641	3,966	/
30.dan	1,654	6,790	5,136	2,779	1,639	/

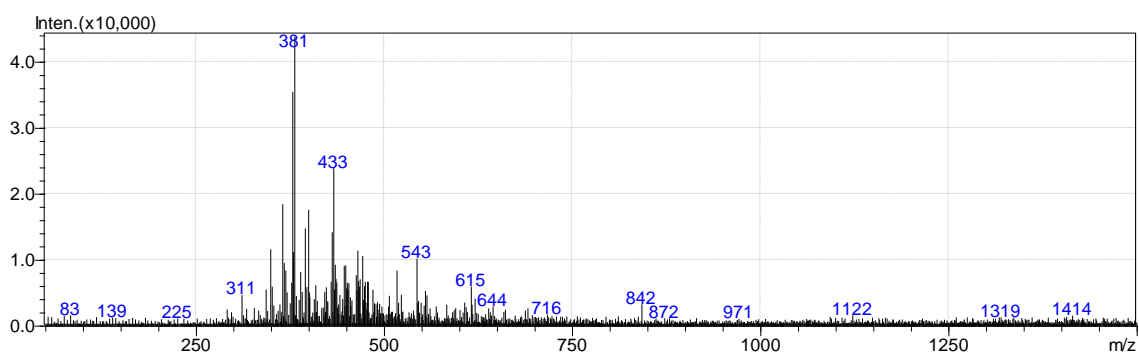
Kod razgradnje plastika generalno se očekuje pad TOC vrijednosti kroz vrijeme i rast TIC vrijednosti [81]. Razlog tomu je da se kod procesa biorazgradnje troše organske molekule (u ovom slučaju to su molekule MP), dok nastaju anorganske molekule  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . No kod većina komercijalnih plastika uočava se da prilikom razgradnje TOC vrijednost naglo naraste. Ovo se događa zbog ispuštanja aditiva koji se dodaju u plastiku radi poboljšanja svojstava ili pomažu pri proizvodnji plastike. Aditivi su često veće organske molekule poput ftalata [81]. U dobivenim podacima u tablici 4.3. podatci za 0. dan su isti za uzorak i probu. U podacima za



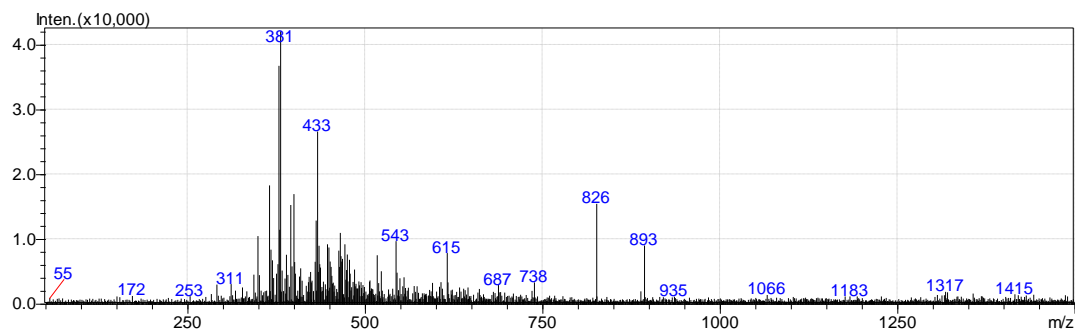
7. dan uočljiv je nagli porast količine TC i TIC vrijednosti s naglim padom TOC-a. Teorijski se ne može objasniti tako nagla promjena koja u podacima za 14. dan više nije prisutna te je vrlo vjerojatno riječ o onečišćenju u uzorku pri pripremi za mjerenje u uređaju. Smanjenje koncentracije TOC-a s 3. dana na 14. dan ukazuje na odvijanje razgradnje MP. Vrijednost TC-a niža je u 14. danu i stoga je niža i koncentracija TIC-a, usprkos tome TIC je i dalje viši od TOC-a, što je u skladu s očekivanjima. U 21. danu uočen je visoki skok TOC-a naspram 14. dana, što iako nije u trendu za razgradnju MP, se i dalje može objasniti otpuštanjem različitih aditiva. Naravno na ovaj način se ne može potvrditi ako je riječ o otpuštanju aditiva, to se ispitivalo dodatno tekućinskom kromatografijom s MS detektorom. Rezultati LC/MS analize potvrđuju da je riječ o otpuštanju organskih aditiva, što će biti objašnjeno dalje u radu. Pri određivanju vrijednosti za 21. dan došlo je do eksperimentalne pogreške te se nije mogla izračunati TIC vrijednost. TOC u 30. danu, odnosno na kraju pokusa, ponovno je pala. Na kraju pokusa TOC vrijednost je primjetno manja nego na početku pokusa, što bi uputilo na odvijanje procesa biorazgradnje. TIC vrijednost je zato primjetno veća na kraju pokusa, što također upućuje na odvijanje biorazgradnje i nastanka CO<sub>2</sub>, kao anorganskog oblika ugljika. Značajno smanjenje organskog ugljika u 30. danu u slaganju je s visokom CFU vrijednosti pokusa T14 u periodu između 14. – 30. dana trajanja pokusa, tj. razgradnja je bila najintenzivnija u tom periodu zbog čega je došlo do oslobađanja aditiva u 21. danu, ali i relativno niske koncentracije TOC-a na kraju pokusa.

#### 4.5. Analiza otpuštenih aditiva tokom biorazgradnje pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

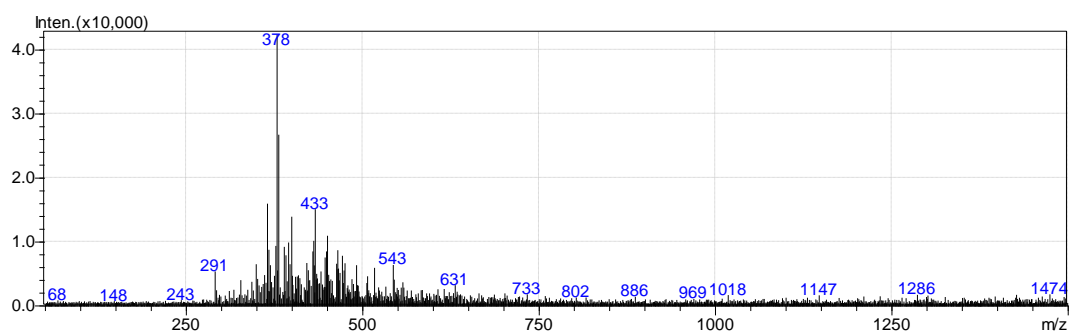
Za vrijeme trajanja pokusa u vodenom mediju se pratilo otpuštaju li se aditivi iz čestica PVC-a pomoću HPLC uređaja s MS detektorom. Dobiveni su spektri za 3., 7., 14., 21. i 30. dan na slikama 4.6. – 4.10. te je u tablici 4.5. ispisano pronađeni aditivi i njihova  $m/z$  omjer.



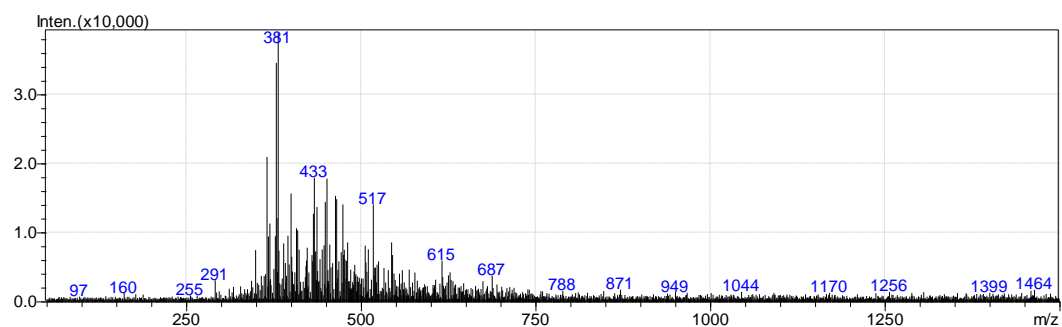
**Slika 4.6.** Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis* u 3. danu za pokus T14.



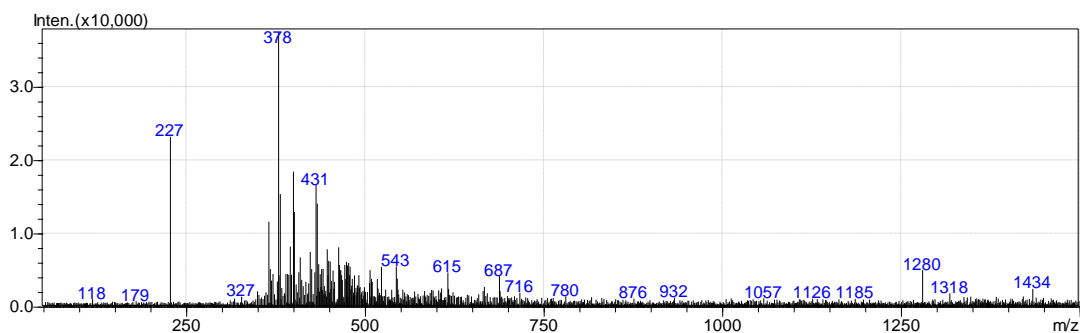
**Slika 4.7.** Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis* u 7. danu za pokus T14.



**Slika 4.8.** Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis* u 14. danu za pokus T14.



**Slika 4.9.** Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis* u 21. danu za pokus T14.



**Slika 4.10.** Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis* u 30. danu za pokus T14.

**Tablica 4.5.** Spojevi identificirani prema HPLC/MS spektrima za pokus T14 tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje.

<i>m/z</i> omjer	ime spoja	Struktura
160	triacetin	$C_3H_5(OCOCH_3)_3$
148	diizobutil ftalat	$C_{16}H_{22}O_4$
179	metil ftalat	$2-(HO_2C)C_6H_4CO_2CH_3$
255	benzil ftalat	$C_6H_5CH_2OOC C_6H_4COOH$
291	diizonil ftalat	$C_{26}H_{42}O_4$
381	ACETEM	(više vrsta)
433	polietilen glikol	$H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$

Tabelirane *m/z* vrijednosti dobivene su iz literatura [82 – 85]. U 21. danu pojavljuje se pik za triacetin (*m/z* = 160), trostruki ester glicerina i acetatne kiseline i spoj sa širokom primjenom, od kojih je jedna i kao aditiv u izradi plastike. Iako sam pik na 160 nije prisutan u 30. danu postojan je pik na 118, što je često prisutno kao produkt reakcije samog triacetina. Triacetin je po FDA-u označen kao siguran spoj, korišten i kao aditiv u hrani [82, 84]. U većini dobivenih spektara uočavaju se ftalati, spojevi koji se često dodaju u više vrsta plastike kao aditivi (plastifikatori). Oni se dodaju za poboljšanje izdržljivosti plastike, a dodaju se često i u PVC plastiku, pogotovo kada je bitno plastični proizvod bude nepropustan [82, 83]. Procijenjeni pikovi ftalata često su slabi i različiti kroz dane, a uz to većina tih ftalata su mono- ili diesteri, vjerojatno nastali kao produkt razgradnje većeg spoja, poput često korištenog DEHP ftalata [82, 84]. Aditiv s pikom od 381, acetilirani mono i digliceridni spojevi ili ACETEM, prisutan je u većini masenih spektara, s iznimkom u 14. dana i 30. dana. Taj aditiv je spoj na bazi acetatnog estera i nedavno je postao česti aditiv pri izradi plastika. Osim u izradi plastika često se koristi kao emulgator za hranu. Prednost ovog spoja kao aditiva je što je izrađen u potpunosti od jestivih ulja (često kokosovih) i što ima dobru termalnu stabilnost [86]. Konačni identificirani spoj bio je polietilen glikol, PEG, s pikom na 433. PEG je česti aditiv u polimernim spojevima zbog svojih dobrih svojstava, širokog područja primjene, netoksičnosti i biorazgradivosti [85]. PEG je prisutan na svakom spektru osim onom na 30. danu, no tada je prisutan pik na 431, što je mogući produkt razgradnje spoja. U 14. i 21. danu primjećuje se najveći broj pikova što se slaže s prijašnjim rezultatima. U 14. danu CFU doseže maksimalnu vrijednost i biorazgradnja se najviše odvija zbog čega je očekivano da se otpušta veća količina aditiva iz plastike. U 21. danu je bio značajan skok u TOC, što bi moglo biti objašnjeno daljnjim otpuštanjem veće količine aditiva.

#### 4.6. Ispitivanje ekotoksičnosti vodene faze uzorka pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*

Nakon provedbe pokusa, s filtratima od uzorka proveo se test ekotoksičnosti u svrhu utvrđivanja štetnih učinka na bakteriju *Vibrio fischeri* zbog mogućeg nastanka ekotoksičnih nusprodukta uslijed razgradnje ili zbog otpuštenih aditiva. Test se izravno zasniva na svojstvu bioluminiscencije morske baterije *Vibrio fischeri*, tj. na promjeni bioluminiscencije populacije pri izlaganju uzorku, gdje je ekotoksičnost uzorka proporcionalna smanjenjem bioluminiscencije. Test ekotoksičnosti s *Vibrio fischeri* pokazao se vjerodostojnim ispitom za ispitivanja ekotoksičnosti u vodenom mediju [87]. Rezultati ovih mjerenja su postotak inhibicije bioluminiscencije *Vibrio fischeri* uz  $EC_{50}$  i  $EC_{20}$  vrijednosti. EC vrijednosti, tj. efektivne koncentracije označavaju koncentraciju tvari pri kojoj se uočava štetni učinak na 20 % ( $EC_{20}$ ), odnosno 50 % ( $EC_{50}$ ) izložene populacije. Dakle, što su niže EC vrijednosti to je manje tvari potrebno za štetni učinak na testni organizam, odnosno tvar je više ekotoksična [88]. Capolupo i suradnici [45] testirali su ekotoksičnost nekoliko vrsta MP, među kojima je i PVC, na vodene organizme. Istraživanje je pokazalo da je PVC vrlo toksičan za vodene organizme, i to više za morske organizme, sa zapaženom  $EC_{50}$  vrijednosti od 1,62 %, dok je nešto manje toksičan za slatkovodne organizme s  $EC_{50}$  vrijednosti od 34,06 %. Jedina MP koja je u istraživanju pokazala veću ekotoksičnost su mikročestice auto gume. Razlog tome je što su i PVC i guma imali veći udio aditiva i metala u sebi nego ostale ispitane plastike, a gume su imale i nečistoće stečene u procesu vulkanizacije [45]. U rezultatima se očekuju relativno niske  $EC_{50}$  vrijednosti za pokuse koji su imali intenzivne razgradnje, no očekuje se ipak veća  $EC_{50}$  vrijednost od one iz literature. To je zbog manjeg broja prisutnih aditiva koji su u istraživanju doprinosili toksičnosti plastike [45, 89].

U dobivenim rezultatima može se uočiti da velik broj uzoraka ima relativno nisku  $EC_{50}$  vrijednost gdje najniže vrijednosti imaju T4, T6, T9, T3, T8, T24 i T14. Za T4 treba napomenuti da je inhibicija je bila visoka i za kontrolu ne samo uzorak što upućuje da je vrlo niska  $EC_{50}$  vrijednost podrijetlom od vanjskog utjecaja, a ne samog uzorka. Niske  $EC_{50}$  vrijednosti su bile očekivane zbog dokazanih aditiva što se procijenilo pomoću LC-MS-a te je pokus T14 među nižim EC vrijednostima. Ovo je očekivano budući da se kod ovoga pokusa (T14) odvila biorazgradnja prema optimalnim uvjetima. Same vrijednosti u slaganju su s literaturnim zbog očekivano jačeg utjecaja na morske organizme [45].

**Tablica 4.6.** Vrijednosti EC<sub>50</sub> i EC<sub>20</sub> te inhibicije kao rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*.

Uzorak	EC <sub>20</sub> / %	EC <sub>50</sub> / %	INH / %
T1	9,02	/	43,63
T2	16,67	/	/
T3	/	12,58	67,53
T4	/	6,20	75,99
T5	1,16	15,69	48,70
T6	/	10,06	39,74
T7	/	/	35,97
T8	3,55	12,63	66,12
T9	/	10,17	99,42
T10	/	/	60,25
T11	10,12	40,51	59,77
T12	6,41	42,83	62,61
T13	23,12	/	22,77
T14	/	16,28	53,54
T15	6,73	31,37	50,18
T16	16,77	/	49,49
T17	/	38,18	57,19
T18	26,28	46,67	53,48
T19	/	/	16,68
T20	12,48	/	24,74
T21	12,98	29,94	68,92
T22	12,98	15,50	84,46
T23	5,18	20,54	97,20
T24	/	13,29	73,10
T25	30,24	/	42,28
T26	/	/	42,32
T27	27,19	48,35	48,29

Uočava se da manji broj pokusa; T27, T18, T12 i T11 imaju relativno visoke EC<sub>50</sub> vrijednosti, dok neki pokusi čak nisu imali inhibiciju od 50 % za originalni uzorak (uzorak vodene faze). To upućuje da se razgradnja u tim pokusima slabije odvijala te da se manje aditiva otpustilo u vodenu fazu. Za neke od pokusa, poput T11 to se podudara s relativno niskom CFU vrijednosti, dok se za neke pokuse to kosi s CFU vrijednostima poput T12 i T27.

## 5. ZAKLJUČAK

Zbog sve veće prisutnosti nepravilno zbrinute plastike u okolišu traži se učinkovit i ekološki prihvativ način uklanjanja takvog otpada, jedan takav način je i biorazgradnja. Biorazgradnja se temelji na probavnim enzimima mikroorganizama za razlaganje polimernih lanca plastičnog materijala, a konačni produkti razgradnje ugljikovodičnih plastika su ugljikov dioksid i voda. Zbog toga je u ovom radu provedeno istraživanje biorazgradnje mikroplastike PVC-a pomoću gram pozitivne bakterijske kulture *Bacillus subtilis*. Pokus je trajao 30 dana, a plan pokusa proveden je prema potpunom faktorskom planu s 3 čimbenika na 3 nivoa, što su pH (6,7,8), brzina okretanja (100, 150, 200) te optička gustoća (0,1, 0,3, 0,5) s ukupno 27 pokusa i 3 slijepe probe. Tijekom trajanja pokusa određivao se CFU, odnosno broj živih stanica, prema kojem su određeni optimalni uvjeti razgradnje. Nakon određivanja optimalnih uvjeta karakteriziran je pokus proveden po tim uvjetima i određena je toksičnost filtrata nakon pokusa. Iz dobivenih podatka mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- određeni su optimalni uvjeti biorazgradnje PVC-a s bakterijskom kulturom *Bacillus subtilis*: pH = 7,74, broj okretaja = 200 o/min i OG = 0,5
- CFU vrijednost za pokus T14 upućuju da se najintenzivnija razgradnja odvijala u 14. danu.
- promjenom koncentracija ukupnog, organskog i anorganskog ugljika, utvrđuje se odvijanje biorazgradnje zbog rasta anorganskog ugljika vremenom trajanja pokusa i padom organskog, osim na 21. dan gdje se naglo povećala količina organskog ugljika zbog otpuštanja aditiva.
- promjene u FTIR-ATR spektru poput nastanka novih pikova i slabljenje nekih postojećih govori da je došlo do biorazgradnje, no većih promjena na glavnom polimernom lancu PVC-a nije bilo u 30 dana provedbe pokusa.
- pomoću HPLC-a s MS detektorom može se pretpostaviti (prema dobivenim *m/z* omjerima) prisutnost idućih aditiva u uzorku PVC-a: triacetin, diizobutil ftalat, metil ftalat, benzil ftalat, diizonil ftalat, ACETEM i Polietilen glikol ,
- rezultati ovog rada upućuju da je moguće optimizirati biorazgradnju mikroplastike PVC-a primjenom gram pozitivne bakterijske kulture upravljanjem čimbenicima poput pH, brzine okretanja te optičkom gustoćom.

## 6. LITERATURA

- [1] Maraveas, C. (2020). Production of Sustainable and Biodegradable Polymers from Agricultural Waste. *Polymers*, 12(5), 1127. doi:10.3390/polym12051127
- [2] Geyer, R. (2020). Production, use, and fate of synthetic polymers. *Plastic Waste and Recycling*, 13–32. doi:10.1016/b978-0-12-817880-5.00002-5
- [3] Sanga, T.; Wallis, C. J.; Hill, G.; Britovsek, G. J. P. (2020) , Polyethylene terephthalate degradation under natural and accelerated weathering conditions, *Eur. Polym. J.* 136109873
- [4] Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. doi:10.1126/sciadv.1700782
- [5] Zhang, Z., (2022) . “Polyvinyl Chloride Degradation by a Bacterium Isolated from the Gut of Insect Larvae.” *Nature Communications*, vol. 13, no. 1, ,
- [6] Hrnjak – Murgić, Z., *Mikroplastika; izvori i nastajanje* , predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2020
- [7] Gautam, R., Bassi, A. S., & Yanful, E. K. (2007). A review of biodegradation of synthetic plastic and foams. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141(1), 85–108. doi:10.1007/s12010-007-9212-6 10.1007/s12010-007-9212-6
- [8] Jukić, A. , *Kemija prirodnih i sintetskih polimera*, predavanja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2012
- [9] Hrnjak – Murgić, Z. , *Prirodni i sintetski polimeri*, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2004
- [10] Young, R. J., Lovell, P. A. (2011), Introduction to polymers. *CRC press*.
- [11] <https://www.impact-solutions.co.uk/bio-based-and-fossil-based-plastics/> (datum pristupa 5.6.2023.)  
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32903-y>.
- [12] PlasticsEurope, E.P.R.O., (2019). Plastics—the facts 2019. An analysis of European plastics production, demand and waste data. *Plastic Europe* <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>.
- [13] Drzyzga, O., & Prieto, A. (2018). Plastic waste management, a matter for the “community.” *Microbial Biotechnology*. doi:10.1111/1751-7915.13328
- [14] [https://environment.ec.europa.eu/strategy/plastics-strategy\\_en](https://environment.ec.europa.eu/strategy/plastics-strategy_en) (Datum pristupa 17.5.2023.)
- [15] <https://ec.europa.eu/environment/pdf/circular-economy/plastics-strategy-brochure.pdf> (Datum pristupa 17.5.2023.)

- [16] Freinkel S.(2011) A brief history of plastic's conquest of the world. *Scientific American*; <https://www.scientificamerican.com/article/a-brief-history-of-plasticworld-conquest/>.
- [17] Nicholson, S. R., Rorrer, N. A., Carpenter, A. C., & Beckham, G. T. (2021). Manufacturing energy and greenhouse gas emissions associated with plastics consumption. *Joule*, 5(3), 673–686. doi:10.1016/j.joule.2020.12.027
- [18] <https://formlabs.com/eu/blog/guide-to-manufacturing-processes-for-plastics/#blow-molding> (Datum pristupa 18.05.2023.)
- [19] Katančić, Z., *Polymer science and technology - University of Zagreb*, 5. predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2022./2023
- [20] Deanin, R. D. (1975). Additives in plastics. *Environmental Health Perspectives*, 11, 35–39. doi:10.1289/ehp.751135
- [21] <https://shorturl.at/rHKLY> (Datum pristupa 20.05.2023)
- [22] <https://shorturl.at/tuIVX> (Datum pristupa 20.05.2023)
- [23] Peng, B.-Y., Chen, Z., Chen, J., Yu, H., Zhou, X., Criddle, C. S., Zhang, Y. (2020). Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Environment International*, 145,106106. doi:10.1016/j.envint.2020.106106
- [24] Katančić, Z., *Polymer science and technology - University of Zagreb*, 2. predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2022./2023
- [25] Endo, K. (2002). Synthesis and structure of poly(vinyl chloride). *Progress in Polymer Science*, 27(10), 2021–2054. doi:10.1016/s0079-6700(02)00066-7
- [26] Hale, R. C., Seeley, M. E., La Guardia, M. J., Mai, L., & Zeng, E. Y. (2020). A Global Perspective on Microplastics. *Journal of Geophysical Research: Oceans*. doi:10.1029/2018jc014719
- [27] Liu, P., Zhan, X., Wu, X., Li, J., Wang, H., & Gao, S. (2019), Effect of weathering on environmental behavior of microplastics: Properties, sorption and potential risks. *Chemosphere*, 125193. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.12
- [28] Boucher, J., Friot, D.,(2017). Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of sources. *Iucn* Vol. 10.:, .
- [29] Ryan, P. G., Moore, C. J., van Franeker, J. A., and Moloney, C. L. (2009) . Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.*, , 364, 1999–2012. doi: 10.1098/rstb.2008.0207



- [30] Efimova, I., Bagaeva, M., Bagaev, A., Kileso, A., & Chubarenko, I. P. (2018). Secondary Microplastics Generation in the Sea Swash Zone With Coarse Bottom Sediments: Laboratory Experiments. *Frontiers in Marine Science*, 5. doi:10.3389/fmars.2018.00313
- [31] Lehtiniemi, M., Hartikainen, S., Näkki, P., Engström-Öst, J., Koistinen, A., & Setälä, O. (2018). Size matters more than shape: Ingestion of primary and secondary microplastics by small predators. *Food Webs*, e00097. doi:10.1016/j.fooweb.2018.e00097
- [32] Liu, J., Yang, Y., Ding, J., Zhu, B., & Gao, W. (2019). Microfibers: a preliminary discussion on their definition and sources. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-019-06265-w
- [33] Golwala, H., Zhang, X., Iskander, S. M., & Smith, A. L. (2021). Solid waste: An overlooked source of microplastics to the environment. *Science of The Total Environment*, 769, 144581. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.1445
- [34] Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbins, J., & Janssen, C. R. (2015). Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research*, doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.007
- [35] Guo, J.-J., Huang, X.-P., Xiang, L., Wang, Y.-Z., Li, Y.-W., Li, H., Wong, M.-H. (2020). Source, migration and toxicology of microplastics in soil. *Environment International*, 137(0), 105263-doi:10.1016/j.envint.2019.105263
- [36] Gasperi, J., Wright, S. L., Dris, R., Collard, F., Mandin, C., Guerrouache, M., Tassin, B. (2018). Microplastics in air: Are we breathing it in? *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 1–5. doi:10.1016/j.coesh.2017.10.002
- [37] Zhang, S., Wang, J., Liu, X., Qu, F., Wang, X., Wang, X., Sun, Y. (2018). Microplastics in the environment: A review of analytical methods, distribution, and biological effects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. doi:10.1016/j.trac.2018.12.002
- [38] Fueser, H., Mueller, M.-T., Weiss, L., Höss, S., Traunspurger, W., (2019). Ingestion of microplastics by nematodes depends on feeding strategy and buccal cavity size. *Environ. Pollut.* 255, 113227.
- [39] De Sá, L. C., Luís, L. G., & Guilhermino, L. (2015). Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environmental Pollution*, 196, 359–362. doi:10.1016/j.envpol.2014.10.026
- [40] Devriese, L. I., De Witte, B., Vethaak, A. D., Hostens, K., & Leslie, H. A. (2017). Bioaccumulation of PCBs from microplastics in Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): An experimental study. *Chemosphere*, 186, 10–16. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.07

- [41] Kaiser, D., Kowalski, N., Waniek, J.J., (2017). Effects of biofouling on the sinking behavior of microplastics. *Environ. Res. Lett.* 12 (12), 124003.
- [42] Bhattacharya, P., Lin, S., Turner, J. P., & Ke, P. C. (2010). Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(39), 16556–16561. doi:10.1021/jp1054759
- [43] Lu, L., Wan, Z., Luo, T., Fu, Z., & Jin, Y. (2018). Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Science of The Total Environment*, 631-632, 449–458. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.051
- [44] Cao, D., Xiao, W., Luo, X., Liu, G., Zheng, H., 2017. Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 61, 12148. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/61/1/012148/meta>.
- [45] Capolupo, M., Sørensen, L., Jayasena, K. D. R., Booth, A. M., & Fabbri, E. (2020). Chemical composition and ecotoxicity of plastic and car tire rubber leachates to aquatic organisms. *Water Research*, 169, 115270. doi:10.1016/j.watres.2019.115270
- [46] ammo, F. K., Amoah, I. D., Gani, K. M., Pillay, L., Ratha, S. K., Bux, F., & Kumari, S. (2020). Microplastics in the environment: Interactions with microbes and chemical contaminants. *Science of The Total Environment*, 140518. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140518
- [47] Wang, F., Wong, C.S., Chen, D., Lu, X., Wang, F., Zeng, E.Y., 2018. Interaction of toxic chemicals with microplastics: a critical review. *Water Research* 139, 208-219
- [48] Yeo, B. G., Takada, H., Hosoda, J., Kondo, A., Yamashita, R., Saha, M., Maes, T., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and hopanes in plastic resin pellets as markers of oil pollution via International Pellet Watch monitoring. *Archives of environmental contamination and toxicology* 73(2), 196 -206.
- [49] Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Mato, Y., Saha, M., Okuda, K., Nakashima, A., Murakami, M., 2009. International pellet watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Marine pollution bulletin* 58(10), 1437 -1446.
- [50] Al-Azzawi, F., Degradation Studies On Recycled Polyethylene Terephthalate, Doctoral dissertation, *London Metropolitan University*, London, 2015. str. 63-71.
- [51] Loaeza, D.; Cailloux, J.; Santana Pérez, O.; Sánchez-Soto, M.; MasPOCH, M. L. (2021). Impact of Titanium Dioxide in the Mechanical Recycling of Post-Consumer Polyethylene Terephthalate Bottle Waste: Tensile and Fracture Behavior. *Polymers* 13 310. [doi.org/10.3390/polym13020310](https://doi.org/10.3390/polym13020310)

- [52] Decker, C. (1984). Photodegradation of PVC. *Degradation and Stabilisation of PVC*, 81–136. doi:10.1007/978-94-009-5618-6\_3
- [53] Yu, J., Sun, L., Ma, C., Qiao, Y., & Yao, H. (2016). Thermal degradation of PVC: A review. *Waste Management*, 48, 300–314. doi:10.1016/j.wasman.2015.11.041
- [54] Lu, J., Ma, S., & Gao, J. (2002). Study on the Pressurized Hydrolysis Dechlorination of PVC. *Energy & Fuels*, 16(5), 1251–1255. doi:10.1021/ef020048t
- [55] Miri, S., Saini, R., Davoodi, S. M., Pulicharla, R., Brar, S. K., & Magdoui, S. (2022). Biodegradation of microplastics: Better late than never. *Chemosphere*, 286, 131670. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131670
- [56] Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246–265. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.
- [57] Bahl, S., Dolma, J., Jyot Singh, J., & Sehgal, S. (2020). Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*. doi:10.1016/j.matpr.2020.06.096
- [58] Jadaun, J. S., Bansal, S., Sonthalia, A., Rai, A. K., & Singh, S. P. (2022). Biodegradation of plastics for sustainable environment. *Bioresource Technology*, 126697.
- [59] Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*. doi:10.1016/j.tim.2019.03.008
- [60] Vimala, P. P., & Mathew, L. (2016). Biodegradation of Polyethylene Using *Bacillus Subtilis*. *Procedia Technology*, 24, 232–239. doi:10.1016/j.protcy.2016.05.031
- [61] Shah, Z., Gulzar, M., Hasan, F., & Shah, A. A. (2016). Degradation of polyester polyurethane by an indigenously developed consortium of *Pseudomonas* and *Bacillus* species isolated from soil. *Polymer Degradation and Stability*, 134, 349–356. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.003
- [62] Darsa, K.V., Thatheyus, A. J., Ramya, D. (2014). Biodegradation of Petroleum Compound Using the Bacterium *Bacillus subtilis*. *Science International*, 2: 20-25.
- [63] Chinaglia, S., Tosin, M., & Degli-Innocenti, F. (2018). Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level. *Polymer Degradation and Stability*, 147, 237–244. doi:10.1016/j.polymdegradstab.201
- [64] Piccardo, M.; Provenza, F.; Grazioli, E.; Cavallo, A.; Terlizzi, A.; Renzi, M. (2020), PET microplastics toxicity on marine key species is influenced by pH, particle size and food variations, *Sci. Total Environ.* **715** 136947.

- [65] Liu, P.; Qian, L.; Wang, H.; Zhan, X.; Lu, K.; Gu, C.; Gao, S. (2019), New Insights into the Aging Behavior of Microplastics Accelerated by Advanced Oxidation Processes, *Environ. Sci. Technol.*, **53** 3579–3588.
- [66] Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., & Fava, F. (2019). Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. *New Biotechnology*. doi:10.1016/j.nbt.2019.04.005
- [67] Patil, R., Bagde, U.s. (2016). Development of novel bacterial strains for enhanced biodegradation of plastic polymers by protoplast fusion. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 18. 513-523.
- [68] Vivi, V. K., Martins-Franchetti, S. M., & Attili-Angelis, D. (2018). Biodegradation of PCL and PVC: *Chaetomium globosum* (ATCC 16021) activity. *Folia Microbiologica*. doi:10.1007/s12223-018-0621-4
- [69] Khandare, S. D., Chaudhary, D. R., & Jha, B. (2021). Bioremediation of polyvinyl chloride (PVC) films by marine bacteria. *Marine Pollution Bulletin*, 169, 112566. doi:10.1016/j.marpolbul.2021.112566
- [70] Ali, M. I., Ahmed, S., Robson, G., Javed, I., Ali, N., Atiq, N., & Hameed, A. (2013). Isolation and molecular characterization of polyvinyl chloride (PVC) plastic degrading fungal isolates. *Journal of Basic Microbiology*, 54(1), 18–27. doi:10.1002/jobm.201200496
- [71] Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., & Fava, F. (2020). Biodegradation of polyvinyl chloride plastic films by enriched anaerobic marine consortia. *Marine Environmental Research*, 104949. doi:10.1016/j.marenvres.2020.104949
- [72] Pivato, A. F., Miranda, G. M., Prichula, J., Lima J. E. A., Ligabue R. A., Seixas, A., Trentin, D. S. , (2022), Hydrocarbon-based plastics: Progress and perspectives on consumption and biodegradation by insect larvae, *Chemosphere*, 293, , 133600, 0045-6535, doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133600.
- [73] Orhan, Y., Hrenovic, J. and Buyukgungor, H., (2004). Biodegradation of plastic compost bags under controlled soil conditions. *Acta Chimica Slovenica*, 51(3), pp.579-588.
- [74] Kučić-Grgić, D., *Kemijski i biokemijski procesi u tlu i sediment*, 2. predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2021./2022.
- [75] Bolanča T., *Kemometrija*, 8. Predavanje, predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2021./2022.
- [76] Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd\_Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*. doi:10.1016/j.sjbs.2019.05.004 10.1016/j.sjbs.2019.05.004

- [77] Bolanča T., *Kemometrija*, 6. Predavanje, predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2021./2022.
- [78] Wang, Q., Wangjin, X., Zhang, Y., Wang, N., Wang, Y., Meng, G., & Chen, Y. (2020). The toxicity of virgin and UV-aged PVC microplastics on the growth of freshwater algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of The Total Environment*, 141603. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141603 10.1016/j.scitotenv.2020.141603
- [79] Bolanča T., *Kemometrija*, 10. Predavanje, predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2021./2022.
- [80] Peng, B.-Y., Li, Y., Fan, R., Chen, Z., Chen, J., Brandon, A. M., ... Wu, W.-M. (2020). Biodegradation of low-density polyethylene and polystyrene in superworms, larvae of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae): Broad and limited extent depolymerization. *Environmental Pollution*, 115206. doi:10.1016/j.envpol.2020.115206
- [81] Latorre, I., Hwang, S., Sevillano, M., & Montalvo-Rodríguez, R. (2012). PVC biodeterioration and DEHP leaching by DEHP-degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 69, 73–81. doi:10.1016/j.ibiod.2011.12.011
- [82] Lambertini, F., Catellani, D., Vindigni, M., & Suman, M. (2016). Multiresidual LC-MS analysis of plasticizers used in PVC gaskets of lids and assessment of their migration into food sauces. *Journal of Mass Spectrometry*, 51(9), 805–813. doi:10.1002/jms.3815
- [83] Mortensen, G. K., Main, K. M., Andersson, A.-M., Leffers, H., & Skakkebæk, N. E. (2005). Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC–MS–MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(4), 1084–1092. doi:10.1007/s00216-005-3218-0
- [84] Quinn, M. J., & Ziolkowski, D. (2015). Wildlife Toxicity Assessment for Triacetin. *Wildlife Toxicity Assessments for Chemicals of Military Concern*, 291–301. doi:10.1016/b978-0-12-800020-5.00017-x
- [85] Li, D., Jiang, Y., Lv, S., Liu, X., Gu, J., Chen, Q., & Zhang, Y. (2018). Preparation of plasticized poly (lactic acid) and its influence on the properties of composite materials. *PLOS ONE*, 13(3), e0193520. doi:10.1371/journal.pone.0193520
- [86] <https://polymer-additives.specialchem.com/product/a-iffs-nutrition-biosciences-grindsted-acetem-95-co-liq> (Datum pristupa 10.04.2023.)
- [87] Wang, N., Chelme-Ayala, P., Perez-Estrada, L., Garcia-Garcia, E., Pun, J., Martin, J. W., Gamal El-Din, M. (2013). Impact of Ozonation on Naphthenic Acids Speciation and Toxicity of Oil Sands Process-Affected Water to *Vibrio fischeri* and Mammalian Immune System. *Environmental Science & Technology*, 47(12), 6518–6526. doi:10.1021/es4008195

[88] Kučić-Grgić, D., *Primjena ekotoksikologije*, 1. predavanje, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, akademska godina 2021./2022.

[89] Vikhareva, I.N.; Aminova, G.K.; Mazitova, A.K. (2021), Ecotoxicity of the Adipate Plasticizers: Influence of the Structure of the Alcohol Substituent. *Molecules* , 26, 4833. <https://doi.org/10.3390/molecules26164833>

## 7. POPIS OZNAKA I SIMBOLA

$\omega$  - maseni udio, %

$M$  – molarna masa, g/mol

$\rho$  – gustoća, kg/L

$\gamma$  – masena koncentracija, g/L

$T$  – temperatura, °C

CFU – broj živih stanica bakterija stanica/ mL

CTR – auto guma (eng. Car tire rubber)

MP - mikroplastika

NP - nanoplastka

PBAT - polibutirat adipat terephthalate

PCB – poliklorirani bifenil

PCL – polikaprolaktona

PVC – poli(vinil-klorid)

PS – polistiren

PE – polietilen

PP – polipropilen

PET – poli(etilen tereftalat)

PUR – poliuretan

PA – poliamid

FTIR-ATR – Fourierova infracrvena spektroskopija (eng. Fourier-transform infrared spectroscopy)

TGA – termogravimetrijska analiza (eng. Thermogravimetric Analysis)

PBC – poliklorirani bifenili

PAH – policiklički aromatski ugljikovodici

POP - postojane organske onečišćujuće tvari

LDPE – polietilen niske gustoće

HDPE – polietilen visoke gustoće

DEHP – bis(2-etilheksil ftalat)

ROS - reaktivne kisikove vrste

DDT – diklordifeniltrikloreten

ISO – Međunarodna organizacija za normizaciju (eng. International Organization for Standardization)

EC<sub>50</sub> - efektivna koncentracija koja izaziva štetni učinak kod 50% ispitanih testnih organizama

EC<sub>20</sub> – efektivna koncentracija koja izaziva štetni učinak kod 20% ispitanih testnih organizama

UV zračenje – ultraljubičasto zračenje

OG – optička gustoća

MM – mineralni medij

HA – hranjivi agar

TOC - ukupni organski ugljik

TC – ukupni ugljik

TIC - anorganski ugljik

SP – slijepa proba

HPLC/ MS – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti/masena spektrometrija

GC/ MS – plinska kromatografija/ masena spektrometrija

AFM – mikroskopija atomskih sila

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

PEG - polietilen glikol

C.V. – koeficijent varijacije, (eng. Coefficient of variation)

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije, (eng. Coefficient of determination)

ANOVA – statistička analiza varijance



## 8. ŽIVOTOPIS

Luka Očić ██████████ Osnovnu školu Antuna Augustinčića završio je 2014. godine, a iste godine upisao je Zdravstveno učilište Zagreb, smjer Zdravstveno laboratorijski tehničar. Učeničku praksu u sklopu srednjoškolskog obrazovanja odradio je u domu zdravlja Zaprešić i KB Sveti Duh. Nakon završetka srednje škole upisuje preddiplomski studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije 2018. godine. Za vrijeme preddiplomskog studija odradio je studentsku praksu na Institutu Ruđer Bošković u Zavodu za kemiju materijala. Stekao je titulu prvostupnika primijenjene kemije 2021. godine nakon obrane završnog rada pod mentorstvom prof. dr. sc. Zlate Hrnjak-Murgić na Zavodu za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju. Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjene kemije na istom Fakultetu. Za vrijeme diplomskog studija odradio je CESAR stručnu praksu u sklopu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije.. Sudjelovao je na Studentskom kongresu o održivoj kemiji i inženjerstvu (SKOKI).