

# Primjena punog faktorskog plana i metode odzivnih površina pri ispitivanju biorazgradnje polistirena bakterijskom kulturom *Delftia acidovorans*

---

Zovko, Katarina

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:374593>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Katarina Zovko**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2023.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Katarina Zovko

**PRIMJENA PUNOG FAKTORSKOG PLANA I METODE  
ODZIVNIH POVRŠINA PRI ISPITIVANJU BIORAZGRADNJE  
POLISTIRENA BAKTERIJSKOM KULTUROM *Delftia*  
*acidovorans***

DIPLOMSKI RAD

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

**Članovi ispitnog povjerenstva:** izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić  
doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović  
dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

Zagreb, rujan 2023.



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

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na stručnim i korisnim savjetima tijekom izrade i pisanja diplomskog rada, te zanimljivoj predloženoj temi. Zahvalna sam na susretljivosti i strpljenju koje ste uvijek imali sa mnom.*

*Zahvaljujem se asistentici mag. ing. oecoing. Martini Miloloži na trudu, pomoći i strpljenju tijekom provedbe eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Hvala na savjetima pri obradi i interpretaciji dobivenih rezultata.*

*Zahvaljujem se i asistenticama mag. ing. cheming. Viktoriji Martinjak i mag. ing. oecoing. Kristini Bule Možar na pristupačnosti i pomoći u laboratoriju.*

*Hvala mojim prijateljima koji su mi uljepšali ovo studentsko razdoblje i učinili ga lakšim svojom potporom, savjetima i iskustvom. Također zahvalna sam svojim rodicama koje su me uvijek bodrile i vjerovale u mene.*

*Hvala mojoj sestri Veroniki i bratu Luki jer su uvijek bili tu uz mene i imali strpljenja za sve.*

*Posebna zahvala ide mojim roditeljima Mirku i Luciji bez kojih ne bih bila tu gdje jesam. Hvala vam na ogromnoj podršci, ljubavi, požrtvornosti i strpljenju.*

*Na kraju najveću zahvalnost dugujem dragom Bogu na obilnim blagoslovima i daru života.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	4
2.1. Plastika .....	4
2.1.1. Polistiren (PS).....	5
2.2. Mikroplastika (MP).....	8
2.2.1. Karakterizacija mikroplastike.....	12
2.3. Prisutnost mikroplastike u okolišu .....	15
2.3.1. Učinak na okolišne organizme .....	17
2.4. Načini uklanjanja mikroplastike iz okoliša .....	22
2.4.1. Biorazgradnja.....	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	29
3.1. Materijali .....	29
3.1.1. Mikroplastika.....	29
3.1.2 Mikroorganizam .....	29
3.2. Mediji i kemikalije .....	30
3.2.1. Hranjivi agar .....	30
3.2.2. Mineralni medij .....	30
3.2.3. Fiziološka otopina.....	30
3.2.4. Etanol.....	31
3.2.5. Priprema otopina za određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterijske kulture <i>Vibrio fischeri</i> .....	31
3.3. Mjerni instrumenti i oprema.....	32
3.4. Primjena analitičkih i instrumentalnih metoda za praćenje biorazgradnje plastike .....	36
3.4.1. Određivanje broja živih stanica bakterija (eng. <i>Colony Forming Units</i> , CFU).....	36
3.4.2. Određivanje ukupnog, organskog i anorganskog ugljika (eng. <i>Total Organic Carbon</i> , TOC).....	36
3.4.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (eng. <i>Fourier –Transform Infrared Spectroscopy–Attenuated Total Reflectance</i> , FTIR–ATR) .....	36
3.4.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i spektrometrije masa (eng. <i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i> , LC/MS) .....	37
3.4.5. Postupak određivanja ekotoksičnosti MP primjenom morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i> .....	37

3.5. Provođenje pokusa biorazgradnje MP PS-a.....	39
3.5.1. Priprema mikroplastike.....	39
3.5.2. Sterilizacija mikroplastike .....	39
3.5.3. Uzgoj bakterije <i>Delftia acidovorans</i> .....	39
3.5.4. Određivanje optimalnih uvjeta za proces biorazgradnje MP PS-a primjenom bakterijske kulture <i>Delftia acidovorans</i> prema dizajnu punog faktorskog plana .....	39
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	43
4.1. Rezultati pokusa .....	44
4.1.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje PS-a .....	44
4.1.2. Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i TIC-a tijekom procesa biorazgradnje PS-a ..	51
4.1.3. Praćenje potencijalno otpuštenih aditiva i/ili produkata razgradnje s površine MP PS-a tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (LC/MS) .....	53
4.1.4. FTIR–ATR spektroskopija MP PS-a.....	55
4.1.5. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata korištenjem morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i> .....	58
4.1.6. Rezultati statističke analize varijance (ANOVA).....	60
5. ZAKLJUČAK .....	65
6. LITERATURA .....	67
7. POPIS SIMBOLA I OZNAKA .....	79
8. ŽIVOTOPIS .....	82

## SAŽETAK

Širom svijeta na godišnjoj razini odbace se velike količine plastičnog otpada u okoliš. Jedan od velikih problema je jednokratna plastika i nerazvijeni sustavi za gospodarenje otpadom koji su doveli do gomilanja plastike. Jednom odbačena, plastika može dugi niz godina biti prisutna u okolišu. Pod utjecajem raznih vremenskih i vanjskih uvjeta razgrađuje se na manje čestice poznate kao mikroplastika. Osim toga, mikroplastika se proizvodi s namjerom dodavanja u razne kozmetičke proizvode i proizvode za osobnu njegu. Polistiren je jedna od najčešće korištenih vrsta plastike, pa shodno tome i često pronađen u okolišu. Utjecaj MP-a na organizme i ljudsko zdravlje nije još dovoljno istražen, ali činjenica da je sveprisutna i pronađena i u najudaljenijim mjestima na zemlji izazvala je veliku pozornost i zabrinutost. K tome doprinosi velika specifična površina sposobna vezivati razne onečišćujuće tvari iz okoliša kao i razne patogene. Zbog toga se sve više provode razni testovi ekotoksičnosti na širokom broju organizama. Osim upoznavanja sa svim mogućim posljedicama izloženosti MP-u, važno je razviti učinkovite načine njezinog uklanjanja iz okoliša. Posao je izazovan jer zbog svoje male veličine MP uspješno prolazi kroz razne sustave za filtraciju. Procesi biorazgradnje MP-a su obećavajuće zelene metode koje je potrebno razviti i prilagoditi određenim vrstama plastike i mikrobne zajednice. Kod ispitivanja MP-a za dobivanje cjelokupnih informacija važno je koristiti i prikladne metode karakterizacije.

U radu je ispitana biorazgradnja MP čestica PS-a bakterijskom kulturom *Delftia acidovorans* prema punom faktorskom planu. Ispitani su optimalni uvjeti za proces biorazgradnje; pH-vrijednost, broj okretaja rotacijske tresilice i optička gustoća stanice bakterije. Pokus je trajao 30 dana a tijekom tog perioda određivane su vrijednosti ukupnog, organskog i anorganskog ugljika, te broj živih bakterijskih stanica. Potencijalno otpušteni aditivi analizirani su LC/MS metodom, a promjene u strukturi na FTIR\_ATR. Ispitana je i ekotoksičnost filtrata primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*.

Rezultati su pokazali da je došlo do određene biorazgradnje MP-a. Dobiveni optimalni uvjeti su pH-vrijednost (8), OG (0,5) i broj okretaja rotacijske tresilice od 172,12 rpm.

**Ključne riječi:** mikroplastika, biorazgradnja, optimalni uvjeti, polistiren, bakterijska kultura *Delftia acidovorans*



## ABSTRACT

All over the world, large amounts of plastic waste are thrown into the environment every year. One of the problems is single-use plastic and underdeveloped waste management systems that have led to the accumulation of plastic. Once discarded, plastic can be present in the environment for many years. Under the influence of various weather and external conditions, it breaks down into smaller particles known as microplastics. In addition, microplastics are produced with the intention of being added to various cosmetic and personal care products. Polystyrene is one of the most commonly used types of plastic, and therefore often found in the environment. The influence of MP on the organism and human health has not yet been sufficiently investigated, but the fact that it is ubiquitous and found even in the most remote places on earth has caused great attention and concern. A large specific surface capable of binding various pollutants from the environment as well as various pathogens contributes to this. For this reason, various ecotoxicity tests are increasingly carried out on a wide number of organisms. In addition to becoming familiar with all the possible consequences of exposure to MP, it is important to develop effective ways of removing it from the environment. The work is challenging because due to its small size, MP successfully passes through various filtration systems. MP biodegradation processes are promising green methods that need to be developed and adapted to specific types of plastics and microbial communities. When testing MP, it is important to use appropriate characterization methods to obtain complete information.

In this paper, the biodegradation of MP particles of PS by the bacterial culture *Delftia acidovorans* was examined according to the full factorial plan. The optimal conditions for the biodegradation process were tested; pH-value, the number of revolutions of the rotary shaker and the optical density of a bacterial cell. The experiment lasted 30 days, and during this period the values of total, organic and inorganic carbon, and the number of living bacterial cells were determined. Potentially released additives were analyzed by LC/MS method, and changes in structure by FTIR\_ATR. The ecotoxicity of the filtrate was also tested using the marine bacterium *Vibrio fischeri*. The results showed that there was a certain biodegradation of MP. The obtained optimal conditions are pH-value (8), OG (0.5) and the number of revolutions of the rotary shaker of 172.12 rpm.

**Keywords:** microplastics, biodegradation, optimal conditions, polystyrene, bacterial culture *Delftia acidovorans*

## 1. UVOD

Plastika predstavlja sintetske dugolančane molekule, jedinstvenih svojstava. Sama riječ plastika dolazi od grčke riječi "plastikos" što znači "može se oblikovati u različite oblike", a upravo to predstavlja jedno od njezinih značajnih svojstava [1]. Pored toga odlikuju je dobra mehanička svojstva, mala masa, otpornost na koroziju i niska cijena zbog čega je zamijenila mnoge tradicionalne materijale. Početak primjene plastike seže u početak 20. stoljeća, točnije 1907. godine proizvodnjom prvog sintetičkog polimernog materijala, *bakelita*, nazvanog po njegovom izumitelju, kemičaru Leu Hendriku Baekelandu [2]. Radilo se o sintetskoj smoli dobivenoj kondenzacijom fenola i formaldehida, koja je bila popularna zbog svoje visoke toplinske otpornosti i izolacijskih svojstava. No, masovna proizvodnja započela je tek 1952. godine [3], pri čemu je godišnja proizvedena količina od 2 milijuna tona do 2021. godine skočila na preko 390 milijuna tona [4]. Najveći proizvođač plastike je Kina, a 2021. godine dosegla je skoro jednu trećinu ukupne svjetske proizvodnje [5]. Epidemija Covid-19 dodatno je povećala potrebu za plastikom u obliku maski i rukavica, čime je drastično porasla njezina proizvodnja. Brzi razvoj novih vrsta polimernih materijala doveo je do njihove široke rasprostranjenosti i primjene u mnogim industrijama poput automobilske, građevinske, tekstilne, elektroničke, kozmetičke i mnogih dr. Time je plastika doprinijela kvaliteti života i postala njegov nezaobilazan dio. Najveći dio proizvedene plastike od 31 % odlazi na proizvodnju svakojake ambalaže [6], pri čemu se najviše koriste vrste poput polietilena (PE), polipropilena (PP), polistirena (PS), poli(vinil–klorida) (PVC) [1]. Iako se velike količine troše na proizvodnju ambalaže, ne može se osporiti njezina uloga u povećanju sigurnosti hrane. Uglavnom se dobiva iz neobnovljivih izvora energije o čemu govori podatak iz 2021. godine koji pokazuje da je 90,2 % od ukupno proizvedene plastike dobiveno upravo iz fosilnih goriva [5]. Masovna i neodrživa proizvodnja, odlaganje u okolišu i problemi s razgradnjom doveli su do velike javne zabrinutosti oko onečišćenja okoliša plastikom [7]. S obzirom da je otporna na razne uvjete, plastika može godinama ostati u okolišu. Raznim procesima može se razgraditi na manje čestice plastike poznate kao mikro (MP) i nanoplastika (NP), koje su sve veći predmet istraživanja zbog široke rasprostranjenosti i potencijalnih negativnih učinaka na okoliš i ljudsko zdravlje [8]. Iako postoje rasprave o njihovoj klasifikaciji prema veličini, pojam mikroplastika odnosi se na čestice plastike manje od 5 mm, a nanoplastika na čestice manje od 1  $\mu\text{m}$ . MP može se podijeliti prema podrijetlu na primarnu i sekundarnu.

Primarna MP odnosi se na čestice plastike koje se s namjerom proizvode i kao takve dodaju u različite kozmetičke proizvode i proizvode za čišćenje, a sekundarna MP nastaje razgradnjom većih plastičnih proizvoda, poput odbačenih plastičnih vrećica, u manje [9]. Prisutnost MP-a dokazana je u vodenom svijetu, poljoprivrednim poljima, voću, povrću i pitkoj vodi čime je čovjek izravno ugrožen. Osim što MP čini mješavinu raznih aditiva koji se dodaju radi postizanja željenih svojstava, stvar čini dodatno složenom velika specifična površina MP-a koja omogućuje lakšu adsorpciju raznih toksina i patogena iz okoliša. Kako bi se odgovorilo na sve veću zabrinutost, određene zemlje u Europskoj uniji (EU) ograničile su upotrebu primarne MP, kao i kozmetička industrija [10]. Porazan je podatak da je od početka masovne proizvodnje plastike do 2015. godine reciklirano tek 9 % od ukupno proizvedene količine [11]. Zbog toga je iznimno važno razviti učinkovite strategije za njezino zbrinjavanje i recikliranje. Od postojećih načina zbrinjavanja plastičnog otpada najčešće se pribjegava jeftinim odlagalištima i spaljivanju [12]. Odlaganjem plastike ne rješava se problem, nego naprotiv zemlja zatrpava smećem, a spaljivanjem se otpuštaju opasne i štetne tvari poput furana, dioksina, teških metala i sulfida [13]. Osim toga postoje kemijski i mehanički procesi recikliranja, te biorazgradnja koja je zbog održivosti i potencijalne učinkovitosti tema brojnih znanstvenih istraživanja. Razni mikroorganizmi, poput bakterija u mogućnosti su razgraditi plastiku u CO<sub>2</sub> i vodu. Ipak potrebno je pronaći optimalne uvjete za najveću učinkovitost njihovih enzima koji djeluju kao intermedijeri depolimerizacije. Proces biorazgradnje sastoji se od stvaranja biofilma na površini plastike, izlučivanja izvanstaničnih enzima koji razgrađuju polimer nakon čega ih mikroorganizmi koriste kao izvor energije [14]. Učinkovitost biorazgradnje ovisi o svojstvima plastike i okolišnim uvjetima poput temperature, pH-vrijednosti i stupnja vlažnosti. Kako bi se dobili željeni podaci i procijenili utjecaji određenih parametara potrebno je pravilno izabrati plan eksperimenta, za koji se danas koriste suvremeni programski paketi [15]. Puni faktorski plan, jedan od dizajna eksperimenta koji se odnosi na proces planiranja, dizajniranja i analiziranja eksperimenta [16], uključuje sve moguće kombinacije razina čimbenika [15]. Metoda koja se može koristiti za dizajniranje skupa eksperimenata je metoda odzivne površine (eng. *Response Surface Methodology, RSM*). Radi se o statističkoj metodi koja može biti korisna kod promatranja više neovisnih varijabli, a cilj je optimizirati odgovor na kojeg one utječu [17].

U ovom radu je pomoću dizajna punog faktorskog plana i metodologije odzivne površine proveden eksperiment procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans*. Cilj

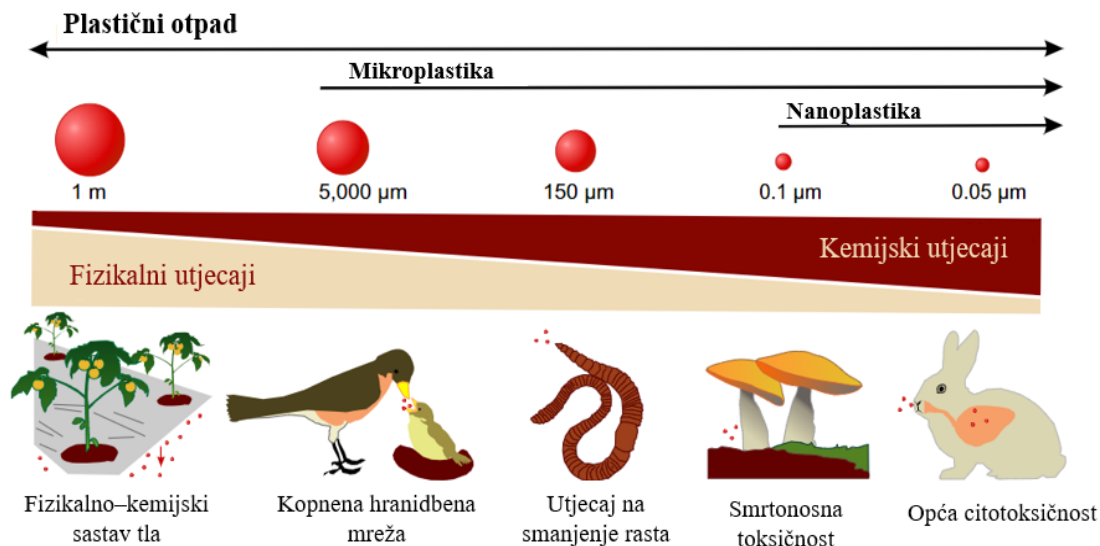
je bio odrediti optimalne uvjete za proces biorazgradnje čestica MP PS-a. Pomoću programa *Design Expert* i analize varijance promatran je utjecaj odabranih parametara (pH–vrijednost, broj okretaja rotacijske tresilice i optička gustoća) na odziv (logaritamska vrijednost CFU).

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Plastika

Pojam plastika se odnosi na sintetske ili polusintetske organske smjese koje sadrže razne vrste aditiva [18]. Uloga aditiva je modificirati različita fizikalna ili kemijska svojstva polimera ili olakšati sami proces proizvodnje kako bi se dobio željeni plastični proizvod [19, 20]. Neki od aditiva su punila, ojačavala, plastifikatori, bojila, pigmenti, biocidi, antioksidansi i usporivači gorenja [20]. Aditivi nisu kovalentno vezani za polimere čime vrlo lako završavaju u okolišu. Određene vrste su iznimno toksične, primjerice polibromirani difenil eteri (eng. *polybrominated diphenyl ethers*, PBDEs) čije je korištenje 2004. godine zabranjeno u EU [21]. Kad se govori o podjeli plastike postoji više kategorija. S obzirom na fizička svojstva plastika se može podijeliti na termoplastiku, koja se može ponovno taliti i preoblikovati, termosete, koji se ne mogu ponovno taliti i preoblikovati, te elastomere, meku i elastičnu plastiku [22]. Prema rasponu veličina čestica plastika se dijeli na makroplastiku ( $\geq 25$  mm), mezoplastiku ( $< 25$  mm–5 mm), mikroplastiku ( $< 5$  mm – 1 mm), te manju mikroplastiku ( $< 1$  mm–1  $\mu$ m) i nanoplastiku ( $< 1$   $\mu$ m) [23].

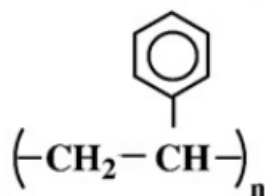
Povoljna i prilagodljiva svojstva plastike poput mogućnosti oblikovanja u razne oblike i veličine, učinila su je prisutnom u gotovo svakom aspektu života zadovoljavajući potrebe rastućeg svjetskog stanovništva. Ipak, svojstva poput trajnosti i izdržljivosti dovela su do njezinog nakupljanja u okolišu. Sve je više provedenih studija kojima se nastoji što bolje shvatiti utjecaj nagomilane plastike na okoliš, a poseban naglasak se stavlja na MP. Na **Slici 2.1.** navedeni su neki od mogućih kombiniranih utjecaja MP-a i NP-a na okoliš i organizme. Neke od najčešće korištenih vrsta plastike su PE, PP, PS, PVC i poli(etilen–tereftalat) (PET).



**Slika 2.1.** MP i NP kao okidač raznih fizikalnih i kemijskih učinaka [24]

### 2.1.1. Polistiren (PS)

PS je jedan od najčešće korištenih vrsta plastike, čiju strukturu čini glavni ugljik–ugljik lanac i bočno vezana aromatska skupina (**Slika 2.2.**). Dobiva se polimerizacijom tekućeg ugljikovodika stirena [25]. Spada u skupinu termoplastike, a prvi ga je proizveo njemački kemijski koncern BASF 1930-ih [25]. PS je na sobnoj temperaturi u čvrstom stanju, ali za potrebe oblikovanja i ekstrudiranja moguće ga je rastaliti i potom ponovno očvrnuti. Može biti u obliku kristalnog PS-a poznat i kao PS opće namjene (eng. *General Purpose Polystyrene*, GPPS), te PS visoke udarne žilavosti (eng. *High Impact Polystyrene*, HIPS) (**Tablica 2.1.**) [26]. Dodatkom elastomera PS-u koji je lomljiv materijal, primjerice polibutadiena dobiva se HIPS. Cilj dodatka elastomera je povećati žilavost, tj. otpornost materijala na udarce i deformacije [27].

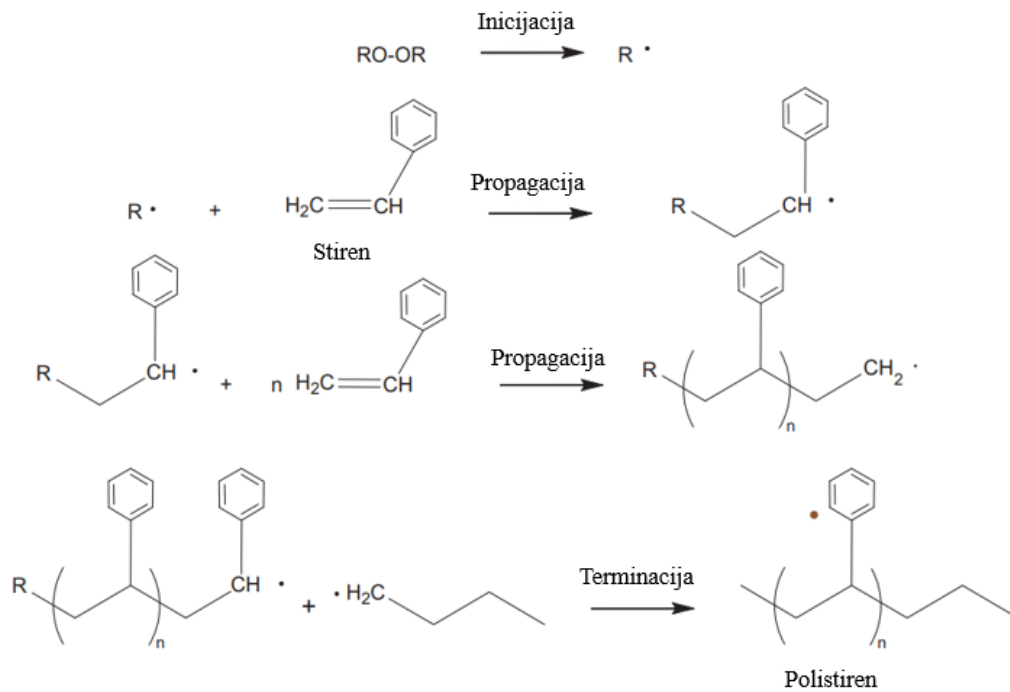


**Slika 2.2.** Ponavljajuća jedinica PS-a [1]

PS se može dobiti polimerizacijom u masi, suspenziji, emulziji i otopini [28]. Jedan od češćih komercijalnih načina dobivanja PS-a je reakcijom slobodno radikalske polimerizacije monomera stirena uz inicijatore poput dibenzoil peroksida uz zagrijavanje [29]. Koraci procesa prikazani na **Slici 2.3.** uključuju faze inicijacije, propagacije i terminacije, a rezultat je polimer otopljen u monomeru ili otopini. Neizreagirani monomer i otapalo mogu se ukloniti pod vakuumom. PS karakteriziraju svojstva krutosti, male težine, prozirnosti, obradivosti i dobre toplinske izolacije, pa se tako koristi za proizvodnju jednokratnih plastičnih čaša, raznih ambalaža i posuda za hranu, te laboratorijskog posuđa (**Slika 2.4.**). Možda je najpoznatija primjena PS-a u obliku stiropora kao toplinskog izolatora. Osim toga kemijski je inertan i dobar električni izolator. Hidrofobni PS je topljiv u raznim organskim otapalima poput benzena, toluena, etilbenzena i kloroforma, a otporan je na djelovanje etilen–oksida, alkohola niske molekulske mase, te raznih oksidirajućih sredstava. Niska cijena i povoljna svojstva dovela su do široke primjene PS-a, a proizvodnja jednokratnih proizvoda, rijetko recikliranje i spori procesi biodegradacije, do njegovog nakupljanja u okolišu.

**Tablica 2.1.** Usporedba svojstava GPPS-a i HIPS-a [26].

<b>GPPS</b>	<b>HIPS</b>
tvrd i krhak	žilav, poboljšane otpornosti na udarce
proziran	svjetlopropusan do neproziran
visoki sjaj	smanjeni sjaj
dobra električna i dielektrična svojstva	smanjena električna svojstva
ograničena kemijska otpornost	smanjena kemijska otpornost
izvrsna obradivost	izvrsna obradivost



**Slika 2.3.** Slobodno radikalna polimerizacija polistirena [26]

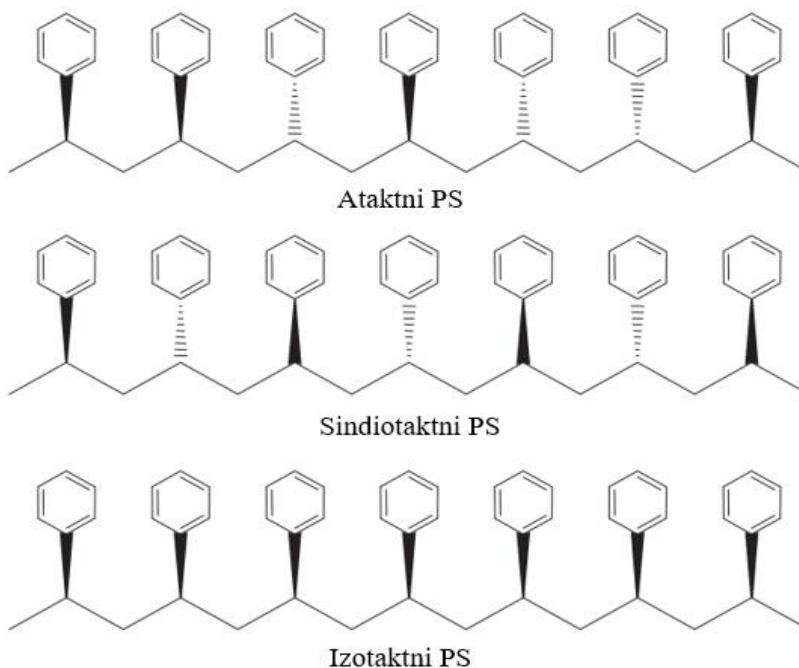
PS se proizvodi u obliku ekspaniranog (EPS) i ekstrudiranog PS-a (XPS) [30]. EPS se dobiva dodatkom pjenila PS-u, najčešće pentana ili ugljikovog dioksida [31]. Nakon toga masa se zagrijava što dovodi do širenja granula PS-a i povećanja volumena. Ekspandirane granule se skladište kako bi se ohladile difuzijom zraka i dodatno učvrstile. XPS se proizvodi u ekstruderu gdje se rastaljeni PS miješa s različitim aditivima i istiskuje kroz mlaznicu željenog oblika. Dodana pjenila se šire uz hlađenje istisnute mase koja se nakon toga reže u željene veličine i oblike [29].



**Slika 2.4.** Primjer upotrebe PS-a u obliku ambalaže i toplinske izolacije [32]



S obzirom na raspored supstituenata oko temeljnog lanca, razlikujemo izotaktni, sindiotaktni i ataktni PS čije su strukture prikazane na **Slici 2.5**. Većina komercijalnih vrsta je ataktni PS kod kojeg je raspored fenilnih skupina nasumičan. Sindiotaktni PS je semikristalni inženjerski materijal visoke temperature taljenja od 270 °C i visoke kemijske otpornosti. Izotaktni PS se ne koristi mnogo zbog nepovoljnih svojstava poput lomljivosti, visoke temperature taljenja i velike molekulske mase, koji otežavaju obradu.

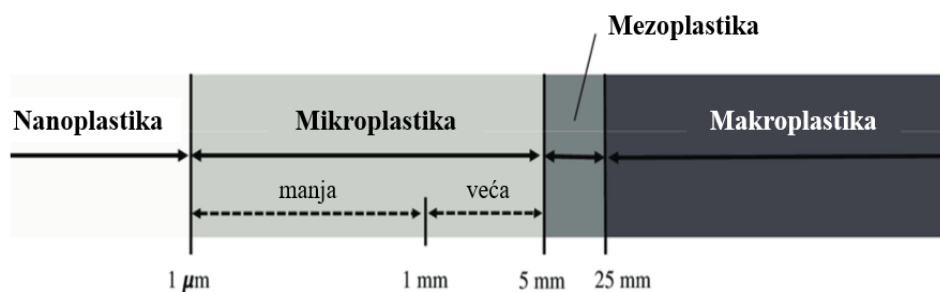


**Slika 2.5.** Strukture pripadajućih konfiguracija PS-a [26]

## 2.2. Mikroplastika (MP)











MP je zbog sve šire rasprostranjenosti u okolišu posljednjih godina postala temom brojnih znanstvenih istraživanja. Posebno se istražuje morski okoliš, a čestice koje završe u njemu mogu se taložiti na dnu, plutati, migrirati, akumulirati, vezati na sebe razne onečišćujuće tvari ili završiti u hranidbenom lancu pogrešnom zamjenom za hranu. Tri najčešće vrste MP-a koje završe u vodenom okolišu su PP, PE i PS, pri čemu je najčešće pronađen PS na površini oceana [23]. Gustoća je glavni čimbenik koji određuje raspodjelu plastike u vodenom okolišu, pa oni manje

gustoće plutaju na površini dok gušći tonu na dno. Na gustoću utječu razni okolišni utjecaji kao i moguće taloženje na površini MP-a, poput biomase. Pojam MP prvi put se pojavio u publikaciji istraživačkog laboratorija Zračnih snaga SAD-a 1968. god., a 1972. god. objavljeni su podaci o prisutnosti čestica plastike mikro veličine na površini Sargaškog mora [23]. No, tek je 2004. god. objavljen pojam MP-a i njegovo moderno shvaćanje opisujući je kao čestice plastike promjera samo nekoliko mikrometara [23, 33]. Upravni odbor programa Nacionalne agencije za istraživanje oceana i atmosfere (eng. *National Oceanic and Atmospheric Administration*, NOAA) „Marine Debris Program“ definirao je MP kao komad plastike manji od 5 mm duž svoje najduže dimenzije [23]. Nije bila definirana donja granica prijelaza u NP, a pojedini autori uzimali su gornju granicu MP-a od 1 mm. Zbog nejasnoća i različitih interpretacija postojala je potreba za usklađenom i točnom definiranom podjelom plastike s obzirom na njezinu veličinu. To je bilo važno i za međusobno uspoređivanje rezultata raznih ispitivanja koja su se provodila. U podjelu je uvedena manja MP, veličinom manja od 1 mm i definirane sve ostale granice (**Slika 2.6.**). Za precizniju specifikaciju i identifikaciju uvedena je i podjela MP-a na temelju izgleda i veličine (**Tablica 2.2.**). Osim oblika pod izgled spada i boja, svojstvo koje znanstvenici uzimaju u obzir kod proučavanja jer može upućivati na stupanj onečišćenosti MP-a. Boja može utjecati da životinje zamijene hranu MP-om, čime ulazi u hranidbeni lanac i izravno prijeti i čovjeku.



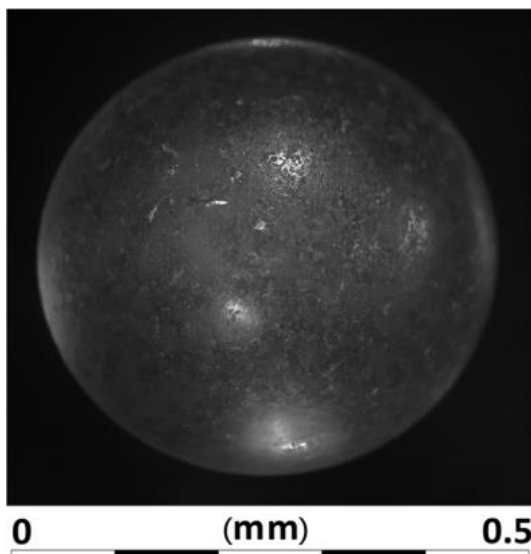
**Slika 2.6.** Podjela plastike s obzirom na veličinu [34]

**Tablica 2.2.** Dodatna podjela MP na osnovu oblika i veličine [23].

Oblik	Veličina
Kuglica 	<5 mm – 1 mm
Mikrozrnca 	<1 mm – 1 μm
Fragment 	<5 mm – 1 mm
Mikrofragment 	<1 mm – 1 μm
Vlakno 	<5 mm – 1 mm
Mikrovlakno 	<1 mm – 1 μm
Film 	<5 mm – 1 mm
Mikrofilm 	<1 mm – 1 μm
Pjena 	<5 mm – 1 mm
Mikropjena 	<1 mm – 1 μm

Procesi biorazgradnje plastike u okolišu pri nekontroliranim uvjetima su jako spori i rijetki, a raznim procesima plastika prelazi u manje fragmente. Stupanj razgradnje ovisi o vrsti plastike i vanjskim uvjetima. Prisutnost MP-a potvrđena je u zraku, vodama, tlu i hrani [35]. Pri proučavanju MP-a važna je njezina podjela s obzirom na podrijetlo, odnosno radi li se o primarnoj ili sekundarnoj MP. Kako bi se donekle ublažio utjecaj sveprisutne MP u okolišu nastoji se ograničiti ili zabraniti upotreba primarne MP u kozmetičkim proizvodima i proizvodima za osobnu higijenu. Njihovim ispiranjem MP putem otpadnih voda i kanalizacije završava u vodenom okolišu. Na **Slici 2.7.** prikazana je mikroskopska slika mikroznca iz sredstva za čišćenje kože čija je uloga pomoć u dubinskom čišćenju. Uloga PS-a u proizvodima za njegu je stvaranje filma [23], a dodaje se kremama za sunčanje, gelovima za tuširanje i losionima za tijelo [36]. Izvori primarne MP su i industrijske sirovine u obliku peleta koje se tale i oblikuju u veće i željene plastične proizvode. Često se kod procesa pjeskarenja koristi MP umjesto pijeska zbog veće izdržljivosti. Djelovanjem vjetra i kroz industrijske otpadne vode MP može završiti u okolišu. Tekstilna industrija je još jedan izvor primarne MP u obliku sintetičkih vlakana od kojih se proizvodi odjeća. Upravo su vlakna

najčešće pronađen oblik plastike u okolišu [23]. Treba napomenuti da samo jednim ciklusom pranja jedan komad sintetičke odjeće ispusti preko 1900 vlakana. Odjeća proizvedena od sintetskih polimera kao rezultat brze mode često završi na odlagalištima otpada, i kao takva predstavlja značajan izvor sekundarne MP. Pronađeno je i da MP pronađe svoj put kroz razne filtre u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda čime se ispušta u okoliš s opasnošću da završi u vodi za piće.



**Slika 2.7.** Primarna MP iz proizvoda za osobnu njegu [23]

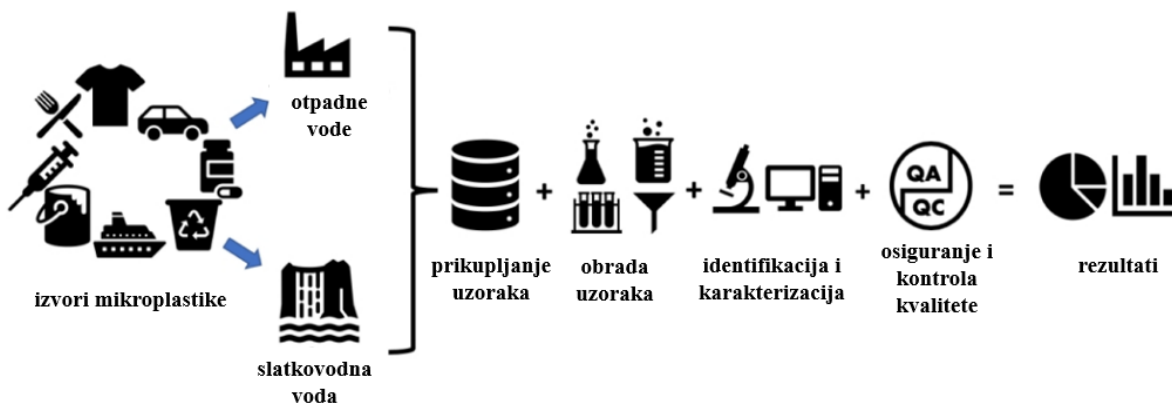
Sekundarna MP je, za razliku od primarne, nepravilnih oblika (**Slika 2.8.**) jer nastaje razgradnjom odbačenih komada plastike pod utjecajem vanjskih čimbenika poput morskih valova ili Sunčeve svjetlosti. Kemijskim, fizikalnim i biološkim procesima poput hidrolize, abrazije, oksidacije ili biorazgradnje nastaje MP. Izvor sekundarne MP je i trošenje guma, a jedan od najčešćih izvora je raspad plastične užadi. Tu su još odbačeni tepisi, razne mreže za lov i jednokratna plastika poput plastičnih vrećica, čaša, slamki, pribora za jelo. Iako je Vijeće EU-a 2019. god. donijelo odluku o zabrani jednokratne plastike za koju postoji alternativa [37], epidemija Covid-19 pogoršala je stanje zbog porasta potrebe za jednokratnom plastikom u obliku proizvoda za osobnu zaštitu (rukavice i maske) i ambalaže.



**Slika 2.8.** Komadići sekundarne MP pronađeni u vodenom okolišu [23]

### 2.2.1. Karakterizacija mikroplastike

Karakterizaciji MP-a prethodi prikupljanje i priprema uzoraka za analizu ovisno o tome koja tehnika se koristi (**Slika 2.9.**) [38]. Karakterizacija obuhvaća određivanje fizikalnih i kemijskih svojstava MP-a uključujući boju, oblik, veličinu i kemijski sastav tvari. Za to se koriste razne tehnike mikroskopije, spektroskopije, masene spektrometrije, metode toplinske analize i nuklearne magnetske rezonancije (NMR) [39]. Za složenije uzorke potrebno je kombinirati više tehnika.



**Slika 2.9.** Koraci analize uzoraka MP-a iz vodenog okoliša [38]

Fizikalna svojstva veće MP-e moguće je odrediti golim okom, no za manje uzorke potrebno je koristiti mikroskope. Zbog jednostavne izvedbe, u tu svrhu se koriste optički mikroskopi. Jedan od njih je stereomikroskop koji se često koristi za određivanje morfologije, boje, veličine i oblika MP-a [40]. Za manje čestice može se koristiti pretražni elektronski mikroskop (eng. *Scanning Electron Microscopy*, SEM), kojim se dobivaju slike visoke rezolucije. Ipak, negativna strana SEM-a je ograničen broj uzoraka, visoka cijena i vrijeme koje je potrebno uložiti za pripremu uzoraka. Mikroskop atomskih sila (eng. *Atomic Force Microscopy*, AFM) značajan je zbog visoke prostorne rezolucije i osjetljivosti, no u usporedbi sa SEM-om sporija je brzina snimanja.

Za identifikaciju, odnosno određivanje kemijskih svojstava MP-a značajne su metode infracrvene spektroskopije. Najčešće korištene tehnike su bliska infracrvena spektroskopija (NIR) i FTIR spektroskopija. Mikro-FTIR ( $\mu$ -FTIR) metoda kombinira mikroskop i spektrometar, a pogodna je za analizu uzoraka MP-a većih od 10  $\mu\text{m}$ . LDIR (eng. *Laser direct infrared*) spektrometrija je relativno nova tehnika za analizu MP-a, čija je prednost brzina i visoka kvaliteta dobivenih slika. Ovaj uređaj kao izvor infracrvenog zračenja koristi kvantni kaskadni laser [41]. Ne postoji mnogo objavljenih istraživanja koristeći ovu tehniku, pa postoji i nedostatak baze podataka. Ramanova spektroskopija je tehnika u kojoj se kemijska struktura ispitivanog uzorka dobiva na temelju informacija o vibracijama i rotacijama veza u molekuli uzorka. Kombinacija Ramanove spektroskopije s mikroskopom naziva se mikro-Ramanova spektroskopija i može identificirati širok raspon veličina [42], pa i čestice manje od 20  $\mu\text{m}$  [40]. Još jedna tehnika je površinski pojačana Ramanova spektroskopija (eng. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*, SERS) koja je značajna zbog mogućnosti detekcije pojedinačne molekule, kraćeg vremena potrebnog za karakterizaciju i visoke osjetljivosti. Za precizniju karakterizaciju MP-a mogu se kombinirati tehnike infracrvene i Ramanove spektroskopije. FTIR i Ramanova spektroskopija su važne metode u kemijskoj karakterizaciji MP-a jer su precizne i ne oštećuju ispitivane uzorke. Komplementarna tehnika mikro-FTIR tehnike je energijski razlučujuća rendgenska spektrometrija (EDS) koja za analizu koristi energije emitiranih X-zraka karakteristične za elemente koji se nalaze u uzorku. Daje jasnije karakteristične pikove od FTIR-a. Kombinacijom EDS tehnike sa SEM-om dobivaju se podaci o kemijskom sastavu i površinskoj morfologiji uzorka, te postojećim aditivima [43]. Jedna od tehnika masene spektroskopije sekundarnih iona (SIMS) prikladna za analizu MP je vrijeme proleta SIMS (eng. *Time-Of-Flight SIMS*, TOF-SIMS) koja se koristi za ispitivanje kemijskog sastava tvari na način da se površina uzorka bombardira kratkim ionskim pulsima [44].

Rezultat toga su pobuđeni sekundarni ioni karakteristični za ispitivanu MP, a njihove mase se određuju na temelju vremena koje im je potrebno da stignu do detektora. Još jedna tehnika spektrometrije masa, matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom, (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) MALDI-MS omogućuje identifikaciju polimernih komponenti, određivanje raspodjele molekulske mase i analizu površine [45]. Plinska kromatografija–masena spektrometrija (GC-MS) je tehnika kojom se komponente uzorka razdvajaju, zatim pojedinačno analiziraju. Uglavnom se koristi za analizu otopljenih ili ekstrahiranih polimernih komponenti, adsorbiranih onečišćivala ili otpuštenih aditiva iz MP-a [46]. Korisna je za određivanje produkata razgradnje polimera. Masena spektrometrija pirolizne plinske kromatografije (Py-GC/MS) je kombinacija procesa pirolize kojim se uzorak polimera prevodi u plinovito stanje, metoda plinske kromatografije kojim se produkti razdvajaju i masene spektrometrije za konačnu analizu i pružanje informacije o kemijskom sastavu ispitivanog uzorka. Ovom metodom se mogu analizirati i polimeri većih molekulskih masa. Postoje određena ograničenja primjene metode za heterogene ili složene uzorke gdje određene vrste MP-a mogu proizvesti slične produkte pirolize. Od metoda toplinske analize mogu se također koristiti termogravimetrijska analiza (TGA) i diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC). No, DSC se više koristi za karakterizaciju novosintetiziranih polimera primjerice za dobivanje informacije o kristalnosti, i nije toliko pouzdan kod kompleksnih uzoraka gdje sastojci imaju slične točke taljenja. TGA se uglavnom koristi za praćenje promjene mase s promjenom temperature i u kombinaciji s metodama masene spektrometrije ili FTIR-a za brzu kvalitativnu i kvantitativnu analizu MP-a. Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS) je metoda koja koristi X-zrake za pobuđivanje elektrona i pomoću njihove izmjerene energije određuje kemijski sastav na površini uzorka. XPS se može koristiti za praćenje promjena kod starenja MP-a utjecajem svjetlosti. Ima visoku rezoluciju, ali za razliku od IR i Ramanove spektroskopije zahtijeva veće uzorke potrebne za analizu. <sup>1</sup>H NMR spektroskopija je prikladna za kvalitativnu i kvantitativnu analizu MP-a iako se još u toliko mjeri ne koristi. Na temelju rezonancijskih spektara dobivaju se informacije o strukturi, a za provođenje analize ispitivani uzorak MP-a potrebno je otopiti u prikladnom deuteriranom otapalu. Prednost ove metode je što nije važna veličina uzorka i relativno je brza [43].

U **Tablici 2.3.** dani su primjeri korištenih metoda u karakterizaciji MP-a iz vodenih izvora.

**Tablica 2.3.** Primjeri metoda primijenjenih u karakterizaciji MP-a [46].

Mjesto/podrijetlo	Vrsta MP-a	Veličina MP-a	Količina	Primijenjene metode
SAD/morska voda	PP, PE, PS, PA	<5 mm	0,025 g/mL	Izgled MP-a određen je stereomikroskopom, a kemijska i morfološka karakterizacija pomoću SEM-a.
Italija/plitke vode	PP, PE, PS	<1 mm	672-2175 komada/kg	Površinska morfologija je određena metodom SEM/EDS, a identifikacija $\mu$ -FTIR analizom.

Karakterizacija i proučavanje MP-a je važna zbog sveobuhvatnog razumijevanja utjecaja MP-a na okoliš i živa bića. Postoji potreba za standardiziranim metodama karakterizacije MP-a koje bi prevladale ograničenja postojećih metoda i dale pouzdane rezultate. Trenutne metode nisu prilagođene MP-u, ali njihovo korištenje svakako pruža korisne informacije i smjernice u daljnjem pristupu.

### 2.3. Prisutnost mikroplastike u okolišu

Većina studija o MP-u provedena je za vodeni, odnosno morski okoliš jer najveće količine upravo završe tamo. No, zbog opće prisutnosti u okolišu uključujući i zrak i tlo, sve više se proširuju ispitivanja. Pronađena je u gotovo svakom poznatom ekosustavu [47], uključujući najudaljenija nenaseljena područja i velike nadmorske visine [48], čime se povećava mogućnost konzumacije i bioakumulacije u hranidbenom lancu. Prisutnost MP-a u udaljenim polarnim područjima Arktika i Antarktika posljedica je globalnog razvoja trgovine, turizma, pomorskog prometa, a negativno utječe na polarne ekosustave i njegove organizme [49]. Rizici i posljedice MP-a u hranidbenom lancu nisu u potpunosti shvaćeni zbog nedovoljno istraženih ekotoksikoloških učinaka. Gustoća naseljenosti, kao važan parametar, izravno je povezana s količinom plastičnog otpada. Tako su urbana područja velik izvor onečišćenja, te područja eksploatacije zbog povećane ljudske aktivnosti. Ulična prašina može poslužiti kao pokazatelj onečišćenosti određene sredine [50]. Znanstvenici procjenjuju da se 4–23 puta više plastike ispusti na kopno nego u oceane [51]. Zbog male mase MP se lako prenosi iz urbanih područja, kao i odlagališta otpada. MP koja se nalazi u



atmosferi može putovati velikim udaljenostima i tako završiti u oceanima, pri čemu je zabilježen njezin prijenos atmosferom na udaljenosti do 95 km [52]. Kopneni otpad raznim putevima u konačnici završi u morima, a većina MP-a koja završi u moru zadržava se uz obalu. Procjenjuje se da 80–90 % otpada u moru potječe s kopna [53]. Trošenje guma i cesta smatra se najvećim izvorom čestica MP-a koje završe u moru [54]. Plastika koja tone na dno postaje dio morskog sedimenta i kao takva teško dostupna, te opasna zbog potencijalnog toksičnog djelovanja. Podaci pokazuju da oko 70 % MP-a završi u sedimentima, a 30 % pluta na površini [47]. Zbog svega toga postoji potreba za uspostavljanjem učinkovitog sustava odvodnje otpadnih voda s kopna. Na distribuciju MP-a u prirodi utječu različiti okolišni čimbenici, najviše antropogeni i hidrodinamički, kao i fizikalno–kemijska svojstva MP-a, zbog čega ju je jako teško predvidjeti. Važni antropogeni čimbenici su gustoća naseljenosti i kvaliteta gospodarenja otpadom [55]. Treba spomenuti i vremenske uvjete, kiše i vjetrove te oborinske vode koje nastaju i mogu prenijeti MP na velike udaljenosti. Rezultati istraživanja, gdje je praćen utjecaj oluje na koncentraciju MP-a u estuariju Cooks River (Australija), pokazali su da je ona skočila za 40 puta nakon oluje [56]. Nakon dva dana obilne kiše količina od 400 čestica po  $m^3$  narasla je na čak 17 383 čestica po  $m^3$ . Uzorkovanje je provedeno prije, tijekom i nakon oluje. Kanalizacijski ispusti su još jedan ozbiljan izvor širenja MP-a u vodeni okoliš. Korištenjem spomenutih sredstava za osobnu higijenu čestice MP-a ispiranjem izravno završavaju u kanalizacijskim odvodima. Velika zabrinutost je izazvana kad je MP pronađena u podzemnim vodama, važnom izvoru pitke vode. U istraživanju koje su proveli Panno i suradnici, cilj je bio istražiti prisutnost MP-a u podzemnoj vodi iz krških vodonosnika u Illinoisu, SAD [57]. Rezultati su pokazali da je 16 od ukupno 17 uzoraka podzemne vode, koja je uzorkovana iz izvora ili bunara, sadržavalo određenu količinu MP-a. Najveća koncentracija iznosila je 15,2 čestice/L, a srednja 6,4 čestice/L. Takvi rezultati izazvali su zabrinutost jer vode iz krških vodonosnika čine 25 % izvora pitke vode na globalnoj razini. Mogući izvori MP-a koja završi u vodenom okolišu, prikazani su na **Slici 2.10**. Kanalizacijski mulj iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda koji se koristi u poljoprivredi za oplemenjivanje tla, može značajno doprinijeti širenju MP-a. Pronađeno je da mogu sadržavati između 1000 i 170 900 čestica MP-a po kg [58]. Tla tretirana kanalizacijskim muljem u prosjeku imaju 256 % više čestica MP-a od netretiranog tla [59]. Praćenje i detektiranje MP-a u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda važni su koraci u kontroliranju ispuštanja MP-a u okoliš.



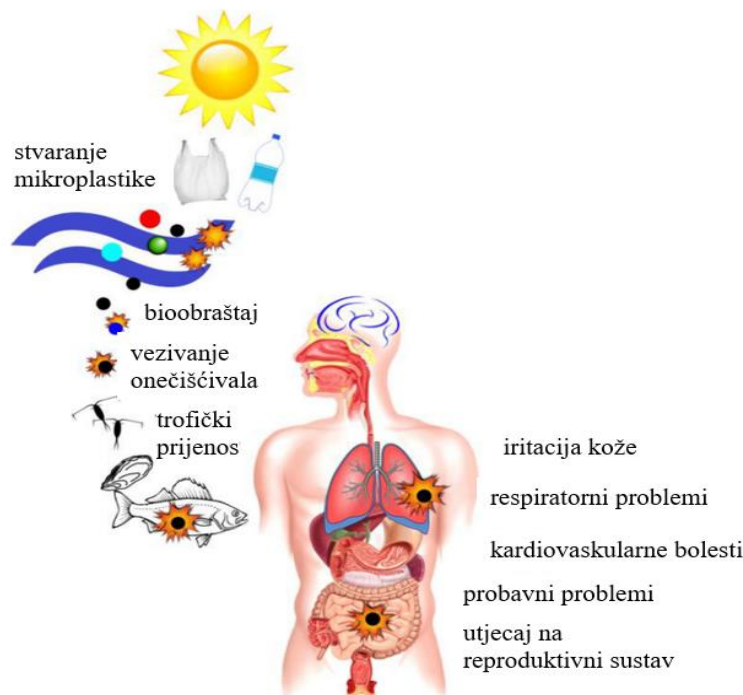
**Slika 2.10.** Izvori mikroplastike koja završi u vodenom okolišu [53]

Budući da je brzina proizvodnje i odlaganje plastike veće od razgradnje, opterećenje okoliša samo raste. Osim pronalaženja pravih načina gospodarenja otpadom iznimno je važno pronaći učinkovite metode za uklanjanje MP-a iz okoliša, kojoj se pripisuje utjecaj na promjene u svojstvima ekosustava, te njegove procese i zajednice.

### 2.3.1. Učinak na okolišne organizme

Izvori i toksičnost MP-a posljednjih godina su intenzivno istraživani. Negativni učinci MP-a ovise o njezinim fizikalnim i kemijskim svojstvima, te uvjetima okolnog medija. Prilikom ekotoksikoloških ispitivanja ne smiju se zanemariti ni onečišćivala koji se vezuju na površinu MP-a poput teških metala ili postojanih organskih onečišćivala. Iako su istraživanja uglavnom bila okrenuta različitim vodenim i kopnenim organizmima nižeg hranidbenog lanca, posljednjih desetljeća mnogi nastoje ispitati utjecaj na ljudsko zdravlje. Načini unosa MP-a u ljudski organizam su udisanjem i gutanjem, a važan put je upravo kroz hranu. Za mnoge morske proizvode

koji se koriste u ljudskoj prehrani pronađeno je da sadrže određene količine MP-a. Osim morske hrane koja se smatra glavnim izvorom MP-a u ljudskoj prehrani (**Slika 2.11.**), potvrđena je njezina prisutnost u proizvodima poput kuhinjske soli, meda, šećera i piva, te u vodi za piće [60]. Konzumiranje školjkaša koji su sadržavali MP i antibiotike dovelo je do povećanog rizika rezistencije na antibiotike kod ljudi i prijenosa patogenih bakterija i parazita.



**Slika 2.11.** Potencijalni utjecaji MP-a na ljudsko zdravlje [61]

Iako su još uvijek nepoznati i nedovoljno istraženi zdravstveni rizici izloženosti MP-u, u budućnosti se očekuju posljedice kroničnog opterećenja. Već je dokazana prisutnost MP-a u ljudskoj posteljici [62].

Neki od ispitivanih organizama iz vodenog okoliša su fitoplanktoni, morske trave, mangrove, vodene biljke, vodeni beskralježnjaci (člankonošci, mekušci, crvi) i različite vrste ptica [60]. MP može poremetiti razne biološke aktivnosti organizama pa tako njezinim vezivanjem na površinu fitoplanktona dolazi do razaranja stanične stijenke i inhibicije fotosinteze koja je važan izvor hrane i kisika za vodene predatore. Sličan je rezultat vezivanja MP-a na razne vrste slatkovodnih mikroalgi čime dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih oblika kisika i poremećaja u procesu fotosinteze. Važno je ispitati i procijeniti toksični učinak na vodene biljke, jer njihovom

konzumacijom od strane biljojeda MP direktno ulazi u hranidbeni lanac. U jednom ispitivanju, gdje je među ostalim praćen utjecaj MP PS-a raspona veličina 20–500  $\mu\text{m}$  na rast dviju vrsta makrofita ukorijenjenih u sedimentu, uočen je utjecaj na masu suhe tvari izdanka [63]. MP je utjecala i na relativnu stopu rasta jedne od vrsta, *Elodea* sp., no nije bilo odnosa između doze i odgovora. MP čestice PS-a veličine 4–45  $\mu\text{m}$  utjecale su na značajan pad stope rasta korijena vodene leće *Lemna minor*, ali nisu imale utjecaj na rast lišća niti na količinu fotosintetskog pigmenta [64]. Analiza dosadašnjih provedenih ispitivanja na ribama, koju su proveli Jacob i sur., pokazala je da su MP čestice najveći utjecaj imale na ponašanje, te osjetilne i neuromuskularne funkcije [65]. To je uključivalo utjecaj na hranjenje, živčani sustav, vid, kretanje i aktivnost. Laboratorijskim ispitivanjima na ribama uočen je veći utjecaj plastičnih čestica veličine  $\leq 20$   $\mu\text{m}$  na neurološke funkcije, crijevnu propusnost, metabolizam i ponašanje. Jedna od najčešće korištenih vrsta riba je zebrica (*Danio rerio*) (**Slika 2.12.**) zbog niske cijene, jednostavnog uzgoja, dostupnosti molekularnih i genetskih alata [65]. Gu i sur. izložili su odrasle jedinke zebrice mikroplastičnim česticama PS-a od 100 nm, 5  $\mu\text{m}$  i 200  $\mu\text{m}$  na 21 dan [66]. Rezultati su pokazali da primijenjene čestice mogu dovesti do promjena crijevne mikrobiote, te disfunkcije crijevnih imunoloških stanica i povećanog broja patogenih bakterija. Negativan utjecaj na zebricu potvrdili su i Qiao i sur. koristeći MP čestice PS-a veličine 5  $\mu\text{m}$  pružajući još jedan dokaz da MP uzrokuje oštećenje crijeva [67]. Izloženost kroz 21 dan dovela je do upale i oksidativnog stresa unutar crijeva, njihovog oštećenja i promjene u mikrobiomu. Akumulacija MP čestica PS-a u probavnom sustavu ličinki zlatnih ribica *Carassius auratus* utjecala je na povećanje broja otkucaja srca, inhibiciju rasta, te stvaranje reaktivnih oblika kisika koji onda mogu dovesti do oštećenja tkiva [68].



**Slika 2.12.** *Danio rerio* [67]

Rod *Daphnia* (vodenbuha), korisna za laboratorijska ispitivanja, pripada koljenu Arthropoda i potkoljenu Crustacea (rakovi) [69]. To su planktonski rakovi koji žive u slatkovodnim vodama i povezuju primarne proizvođače i potrošače viših trofičkih razina. Vodenbuhe su važna vrsta u eksperimentalnim istraživanjima toksičnih učinaka jer ih karakteriziraju prednosti poput kratkog životnog ciklusa, brzog razmnožavanja i osjetljivosti na toksične tvari. Postoji mnogo provedenih studija na ovoj vrsti a kod većine je praćen mortalitet i subletalni učinci. Neki od parametara koji se mogu pratiti kod vodenbuha kako bi se shvatio utjecaj MP-a su sposobnost plivanja kroz prosječnu brzinu plivanja, broj krvnih stanica kao mjera imunološke aktivnosti, reproduktivna aktivnost kroz učestalost razmnožavanja, vrijeme prvog okota, ukupan broj potomaka po ženki i sl. Primjerice povećan broj krvnih stanica ukazuje na pojačan imunološki odgovor na prisutnost toksičnih tvari. Jednako tako, usmjerena energija na uklanjanje neželjenih tvari iz tijela utječe na usporeni rast i razvoj organizma. Tako je uočen negativan utjecaj PS čestica na mlade vodenbuhe koji je doveo do stope deformiteta od 68 % [69]. MP PS-a negativno je utjecala odgodivši vrijeme prvog okota vrste *D. pulex*, a broj potomaka po ženki smanjio se u 21. danu. Eltemsah i Bøhn pratili su kronične učinke izloženosti vrste *D. magna* (**Slika 2.13.**), mlade i odrasle jedinke, MP česticama PS-a različitih koncentracija [70]. Nakon 40. dana pa sve do kraja pokusa, 77. dana, primijećen je viši stupanj smrtnosti mladih jedinki izloženih većim koncentracijama MP-a (30, 50 i 100 mg/L). Smrtnost odraslih jedinki je bila niža u usporedbi s mladim. Kod njih je primijećena veća smrtnost jedinki izloženih najvišoj koncentraciji od 100 mg/L. Nadalje, promatran je i rast jedinki gdje su mladi, izloženi koncentracijama od 30 mg/L i više, pokazali znatno smanjenje veličine tijela 15. dan. Kod odraslih jedinki je uočena veza između koncentracije MP-a i stupnja smanjenja veličine tijela, pa je porastom koncentracije MP-a došlo do većeg smanjenja tijela, a najmanje jedinke su bile u grupi izloženoj koncentraciji od 100 mg/L u usporedbi s kontrolnom grupom.



**Slika 2.13.** Ženka vrste *Daphnia magna* [71]

Praćenje i ispitivanje utjecaja plastike na ptice i ostale životinje iz višeg hranidbenog lanca i dalje predstavlja izazov. Zbog specifičnog načina prehrane ptice su posebno izložene kontaminaciji MP-om [60], a s obzirom da su osjetljive na vanjske uvjete korisne su u procjeni negativnih utjecaja MP-a i ostalih onečišćivala [72]. MP kod ptica može izazvati upalne procese, crijevna oštećenja, probleme s prehranom i reprodukcijom, infekcije ili čak smrt. Gutanje dijelova plastičnog otpada uzrokovalo je negativan učinak na razinu kalcija u krvi i morfometrijska obilježja ptice iz porodice zovoja, mesnatonogi zovoj [73]. Također došlo je do povećanja kolesterola i amilaze, te mokraćne kiseline. Nadalje, konzumacijom MP čestica raspona veličina 3–4,5 mm dovelo je do manjeg kašnjenja u rastu i spolnoj zrelosti japanskih prepelica [74]. Njihova izloženost MP-u nije imala značajan utjecaj na smrtnost ili reproduktivnost.

MP u okolišu može dovesti do stanja oksidativnog stresa i nakupljanja reaktivnih spojeva kisika (ROS) [75]. Biljke se bore sa oksidativnim stresom povećanjem svojih antioksidativnih enzima i antioksidansa potrebnih za smanjenje ROS-a. Iako su uključene u testove ekotoksičnosti, postoji manjak informacija o mogućoj toksičnosti MP-a na biljke. Bob (*Vicia faba*), jedna od biljki iz naše prehrane, važna je u procjeni toksičnosti MP-a zbog naše sigurnosti [76]. U **Tablici 2.4.** dan je pregled nekoliko testova ekotoksičnosti u kojima su korištene MP čestice PS-a na testnim organizmima, uključujući i spomenuti bob.

**Tablica 2.4.** Pregled testova ekotoksičnosti mikroplastičnih čestica PS-a na različitim testnim organizmima.

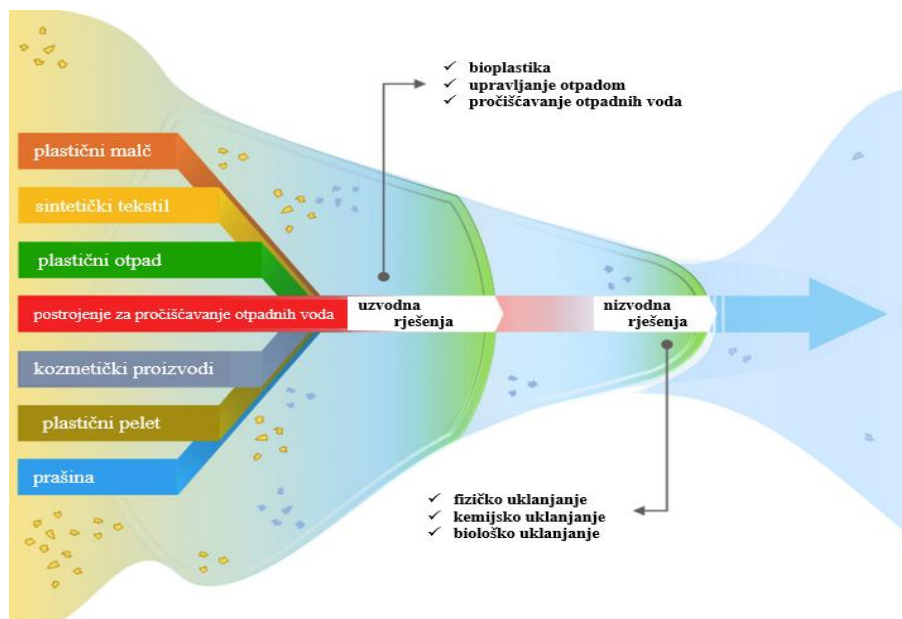
Testni organizam	Učinci	Literatura
<i>Utricularia vulgaris</i>	inhibicija rasta i fotosintetskog kapaciteta	[75]
<i>Vicia faba</i>	smanjenje duljine korijena, te svježee mase i mase suhe tvari korijena	[76]
<i>Chlorella vulgaris</i> Beij	smanjenje stvaranja kolonija i sadržaja fotosintetskog pigmenta	[77]
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	inhibicija rasta i fotosinteze, zadebljanje stanične stijenke	[78]
<i>Danio rerio</i>	promjena sastava mikrobioma u ličinkama, poremećaji energetskog metabolizma, metabolizma glukoze i lipida	[79]

## 2.4. Načini uklanjanja mikroplastike iz okoliša

Važno je pronaći učinkovite načine uklanjanja MP-a iz okoliša obzirom na njezinu široku rasprostranjenost i probleme koje izaziva. Zbog male veličine koja joj omogućuje da izbjegne procese filtracije ili prosijavanja, veliki je izazov u potpunosti je ukloniti. Također, potrebno je nove tehnologije učiniti dostupnim i manje razvijenim zemljama uz minimalne troškove. Na **Slici 2.14.** prikazani su izvori MP-a i potencijalna rješenja za njezino uklanjanje.

Postojeći načini uklanjanja MP-a iz okoliša su konvencionalni i modificirani sustavi za pročišćavanje otpadnih voda, metode sorpcije i filtracije i biološke metode. Sustavi za pročišćavanje otpadnih voda imaju prednosti poput poznatog i jednostavnog principa rada, te niske cijene [80]. Učinkovitost procesa je visoka, ali nedostatak je što se ne mogu odvojiti čestice manje od 100 µm. Postupak uključuje tri faze; primarnu, sekundarnu i tercijarnu. Postoji i preliminarna faza, uklanjanje krupnog otpada, no uglavnom se smatra dijelom primarne faze. U primarnoj fazi fizički se talože krute netopljive tvari zajedno sa zarobljenom MP-om, postupcima kao što su prosijavanje ili sedimentacija. Sekundarna faza je biološko pročišćavanje, odnosno uklanjanje

biološkog sadržaja. Tercijarna faza je završna obrada u kojoj se primjenjuju procesi poput filtracije ili ozonizacije.



**Slika 2.14.** Izvori i potencijalna rješenja uklanjanja MP-a iz okoliša [81]

Modifikacijom konvencionalnih procesa za pročišćavanje otpadnih voda nastoji se postići viša učinkovitost odvajanjem i onih manjih čestica ispod granice od 100  $\mu\text{m}$ . Zbog toga se primjenjuju procesi aglomeracije i koagulacije za vezivanje manjih čestica u veće dodatkom različitih koagulanata kao što su aluminijeve i željezove soli, a potom njihovo odvajanje filtracijom korištenjem ultrafiltracijskih membrana [82]. Osim ultrafiltracije koriste se mikrofiltracija i nanofiltracija. Njihova učinkovitost može se pospješiti ugradnjom biougljena ili filtera s granuliranim aktivnim ugljenom. Neutralizacija naboja i *sweep* flokulacija su mehanizmi odgovorni za uklanjanje MP-a pomoću Al i Fe soli [83]. Čvrste veze između čestica se postižu mehanizmom adsorpcije i kompleksacije inicirani izmjenom liganda. Ekološki prihvatljivija opcija je elektrokoagulacija koja ne zahtijeva kemikalije već se koagulant dobiva električnim putem, a MP čestice bivaju zarobljene unutar stvorenog mulja. Nastali koagulanti narušavaju koloidno stanje i stabilizacijom površinskih naboja suspendiranih čestica omogućavaju da dođe do međusobnih interakcija i vezivanja. Zbog potrebe za napajanjem metoda nije dostupna svima.



Spomenuti procesi mogu biti visoko učinkoviti, no tijekom vremena dolazi do začepjenja pora, sami proces filtracije je jako spor i skup. Membranska tehnologija uspješno je primjenjivana u uklanjanju MP-a, a u kombinaciji s biološkim procesima moguće je povećati učinkovitost do 99,9 % [82]. Tome je dokaz korištenje membranskih bioreaktora u pročišćavanju složenih sustava poput industrijskih otpadnih voda. Potencijal u optimizaciji procesa uklanjanja MP-a imaju mikroalge, gdje se zbog elektrostatičkog naboja pozitivno nabijene čestice MP-a vežu na površinu algi u čijoj su staničnoj stijenci prisutni anionski polisaharidi. Praćenjem vezivanja MP čestica na površinu morske mikroalge *Fucus vesiculosus*, Sundbaek i sur. otkrili su 94,5 % učinkovitost adsorpcije PS čestica promjera ~ 20 µm, koje su bile zarobljene u mikrokanalima alge [84]. Veći broj čestica primijećen je u seciranim područjima zbog otpuštanja spomenutih polisaharidnih tvari. Potrebno je provesti još testova na različitim vrstama i uključujući druge vrste polimera, jer sorpcija uvelike ovisi o površinskom naboju čestica. Napredni oksidacijski procesi su sve više istraživani zbog mogućnosti razgradnje i složenih organskih onečišćivala s posebnim naglaskom na fotokatalitičku oksidaciju za polimere. Proces je potaknut apsorbiranim fotonima na površini poluvodičkog materijala za koji se najčešće koristi titanijev dioksid (TiO<sub>2</sub>) ili cinkov oksid (ZnO). Najprije se fotokatalizator aktivira djelovanjem vidljivog ili ultraljubičastog zračenja čime dolazi do pobuđivanja elektrona i stvaranja para elektron/šupljina koji pokreću redoks reakcije okolnih molekula [85]. Time nastaju radikali koji su zaslužni za razgradnju MP-a. Fotokatalitičkim procesima moguće je razgraditi širok broj vrsta MP-a, no postoje i određeni izazovi. Većina je istraživana na laboratorijskoj razini, pa je potrebno istražiti i optimizirati procese za veće domete. Oprezno se pristupa i u odabiru materijala za fotokatalizatore, jer neki od njih mogu biti toksični. Problem bi mogli predstavljati i visoki troškovi te složenost izvedbe. Fotokatalitički mikromotori koji se sami pokreću pomoću fotokatalitičkih reakcija jedna su od novih i obećavajućih tehnologija u rješavanju (mikro)otpada prisutnog u vodenom okolišu [86]. Prednost je što za pokretanje ovakvih motora nisu potrebna fosilna goriva nego voda i svjetlost koja je obnovljivi izvor energije. Radom motora dolazi do miješanja okolnog medija i većeg prijenosa mase što daje bolje rezultate u uklanjanju ciljanih skupina. No, treba se testirati praktična primjena metode i pronaći način povećanja selektivnosti metode. I metalno–organski okviri mogli bi se koristiti u procesima uklanjanja MP-a zbog svoje porozne strukture i velike površine. Pristup koji bi se mogao uzeti u obzir je da svako kućanstvo posjeduje sustav za filtriranje kako bi se spriječilo širenje MP u okoliš. Osim kemijskih i fizikalnih procesa uklanjanja MP-a postoje i biološki procesi. Primjena kemijskih

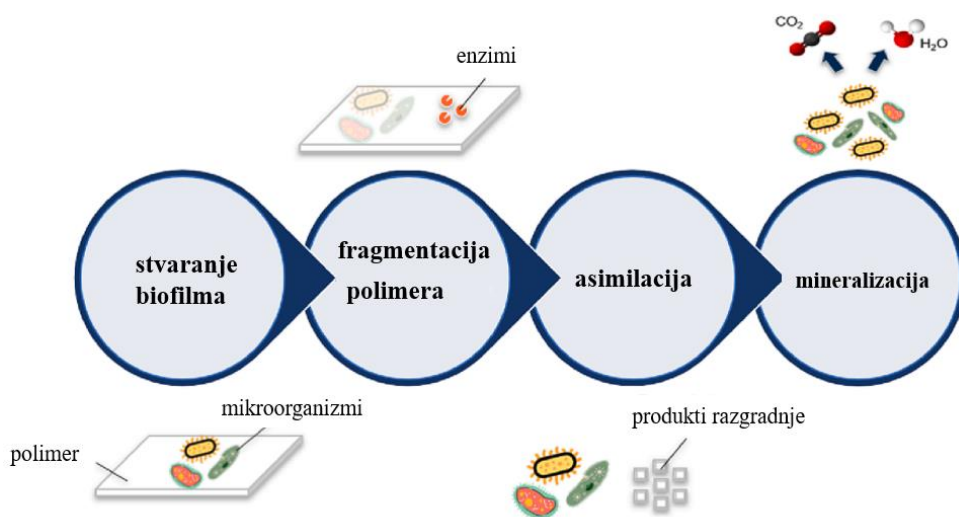
i bioloških procesa omogućuje dobivanje polaznih monomera koji se ponovno mogu koristiti u procesima polimerizacije. Ponekad je u određenim kemijskim procesima potrebno primijeniti agresivne reakcijske uvjete i toksična organska otapala kako bi se razgradili teško razgradivi polimeri. Zbog opasnosti od sekundarnog onečišćenja ekološki je prihvatljivije poslužiti se procesima biorazgradnje. Sve više se proučavaju, a cilj ih je ubrzati jer je biorazgradnja plastike u okolišu iznimno spor proces [87].

### **2.4.1. Biorazgradnja**

Blaži radni uvjeti s minimalnim energetske potrebama čine procese biorazgradnje zanimljivim i dobrim rješenjima uklanjanja MP-a iz okoliša. Mikroorganizmi koji se prilagođavaju toksičnim tvarima povećavaju učinkovitost biorazgradnje i koriste ih kao izvor energije, te prevode u netoksične oblike. Prirodnim procesom biorazgradnje u čijem je središtu mikroorganizam s odgovarajućim metaboličkim sposobnostima, složene organske tvari prelaze u jednostavnije spojeve. Takve organske tvari služe mikroorganizmima kao izvor ugljika i energije potrebni za rast i razmnožavanje. Ovisno o okruženju, koje može biti tlo, voda, odlagalište i kompost, prisutni su različiti mikroorganizmi [88]. Istraživanje genetske i metaboličke raznolikosti pruža mogućnosti razvoja genetski modificiranih mikroorganizama za specifična onečišćivala u okolišu [89]. Ipak, ograničene su *in situ* studije za takve vrste zbog moguće opasnosti za okoliš i raznih regulatornih ograničenja. Značajnu ulogu imaju bakterije i gljivice uključujući plijesni i kvasce za *in situ* i *ex situ* razgradnju. Često primjenjivane su bakterije zbog mogućnosti razgradnje velikog broja toksičnih ugljikovodika poput benzena i toluena. Biorazgradnja se može odvijati u aerobnim i anaerobnim uvjetima, tj. u prisutnosti odnosno odsutnosti kisika [90]. Primjerice kisik je važan u aktivaciji enzima mono- i dioksidaze odgovornih za oksidaciju aromatskog prstena, dok su u anaerobnim uvjetima važni elektron akceptori poput nitrata ili sulfata. Bakterije koje mogu živjeti samo u prisutnosti kisika nazivaju se aerobi, a oksidacijskim procesom aerobnog staničnog disanja razgrađuju supstrat i prevode ga u potrebnu energiju, te vodu i ugljikov dioksid. Prije procesa staničnog disanja molekule glukoze se, unutar citoplazme, cijepaju na dvije manje molekule [91]. Zatim manje molekule odlaze u mitohondrij gdje se odvija proces staničnog disanja. Molekule se razgrađuju kemijskim reakcijama uz djelovanje kisika. Pri nedostatku kisika dolazi do anaerobne razgradnje, koja se koristi u obradi mulja iz otpadnih voda zbog smanjenja volumena i mase ulaznog materijala. Postoji pet ključnih faza u anaerobnim uvjetima: hidroliza, acidogeneza,

acetogeneza, metanogeneza i hidroliza. U prvoj fazi hidrolize složene organske molekule razgrađuju se na jednostavnije šećere, aminokiseline i masne kiseline. Acidogenezom se odvija daljnja razgradnja pomoću fermentativnih bakterija. U trećoj fazi djeluju acetogeni koji nastavljaju razgradnju i najčešće proizvode octenu kiselinu, ugljikov dioksid i vodik. U posljednjoj fazi intermedijarni proizvodi iz prethodne faze prelaze u metan, ugljikov dioksid i vodu djelovanjem metanogena.

Razgradnja složenih ugljikovodika kompleksan je proces zbog hidrofobnosti i toksičnosti određenih vrsta, prisutnih višefaznih sustava uz raznolikost mikrobnih zajednica i okolišnih uvjeta. Biorazgradnja plastike započinje stvaranjem površinskog biofilma te izlučivanja izvanstaničnih enzima čija je uloga razgradnja plastike na manje fragmente (spojeve) [14]. Njima se mikroorganizmi hrane uz oslobađanje CO<sub>2</sub> i vode (**Slika 2.15.**).



**Slika 2.15.** Koraci procesa biorazgradnje plastike djelovanjem mikroorganizama [14]

Postoji više faktora koji utječu na brzinu biorazgradnje, a glavni su svojstva polimera poput molekulske mase, kristalnosti, hidrofилnosti, te okolišni uvjeti (pH, temperatura, sadržaj vlage). Dostupnost hranjivih tvari poput ugljika, dušika i kalija, ključna je za rast i aktivnost mikroorganizama. Nadalje, što je veći stupanj kristalnosti i veća molekulska masa polimera kojeg je potrebno razgraditi, sporiji je proces biorazgradnje. Polimeri veće molekulske mase manje su topljivi što mikroorganizmima otežava djelovanje, a amorfni dijelovi polimera podložniji su napadima mikroorganizama. Bioraspoloživost organskih tvari je još jedan važan čimbenik koji

utječe na proces biorazgradnje odnosno na njegovu brzinu, a ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima polimera. Okolišni uvjeti kao što je vlaga pozitivno utječe na rast mikroorganizama, a odgovarajući pH i temperatura značajno doprinose uspješnosti biorazgradnje. Uočena je smanjena stopa rasta i razmnožavanja mikroorganizama pri niskim temperaturama, dok je pri povišenim temperaturama moguće povećati topljivost ugljikovodika [89]. Zbog hidrofobne prirode polimera često se primjenjuje predobrada plastike u obliku kemijske ili toplinske obrade ili UV zračenja kako bi se razgradili na manje molekule.

U **Tablici 2.5.** dan je pregled rezultata dosadašnjih eksperimenata u kojima se ispitala učinkovitost biorazgradnje PS-a primjenom određenih mikroorganizama. Makromolekularna priroda, visoka molekulska masa i hidrofobnost su glavni razlozi otežane biorazgradnje veoma stabilnog PS-a [92]. Nemogućnost otapanja u vodi štiti PS od djelovanja enzima.

**Tablica 2.5.** Pregled rezultata procesa biorazgradnje PS-a primjenom različitih testnih organizama.

Testni organizam	Vrijeme inkubacije	Rezultati eksperimenta	Literatura
<i>Klebsiella</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	1 mjesec	kemijske promjene u strukturi	[87]
<i>Cephalosporium</i> sp.	8 tjedana	gubitak mase od $2,17 \pm 0,16$ %, morfološke promjene na površini (pukotine, rupe), smanjenje prosječne molekulske mase za 4,96 %	[92]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Bacillus velezensis</i>	60 dana	gubitak mase od $43,5 \pm 0,8$ %	[93]
larva <i>Tenebrio molitor</i>	15 dana	gubitak mase za 54 %	[94]
<i>Curvularia</i> sp.	9 tjedana	penetracija i prianjanje na polimer	[95]
<i>Pseudomonas</i> sp.	30 dana	gubitak mase >10 %	[95]

Osim otpornosti na hidrolizu, hidrofobna priroda PS-a smanjuje sposobnost prijanjanja mikroorganizama na njegovu površinu. Zbog postojećih zapreka procesu biorazgradnje potrebno je istražiti učinkovite načine i najpovoljnije uvjete proučavajući slabosti unutar same strukture. Fenilne skupine vezane na glavni C–C lanac PS-a iznimno su otporne na procese razgradnje, no tercijarni atomi ugljika koji su vezani na fenilne skupine, slabija su mjesta unutar molekule [96]. Ona mogu poslužiti za pokretanje samog procesa kemijskim reakcijama, a napadom slobodnih radikala može doći do pucanja lanca ili stvaranja karbonilnih skupina.

Određene vrste bakterija kao što je *Bacillus*, oslobađaju ekstracelularne hidrolitičke enzime (ksilanaza, lipaza, proteaza) koji pomažu u razgradnji okolišnih onečišćivala [47]. Studije su pokazale mogućnost korištenja voštanih crva s ciljem biorazgradnje plastike pomoću crijevnog mikrobioma [14]. Jednom kad se MP nađe u vodenom okolišu, mikroorganizmi na njezinoj površini formiraju biofilm. Prisutnost određenih funkcionalnih skupina pomaže pri razgradnji MP-a. Primjer su esteri koje biofilmovi preferirano hidroliziraju [97]. Razgradnja MP-a odvija se pomoću mikroorganizama unutar stvorenog biofilma koji metaboliziraju oligomere ili monomere nastali prethodnim djelovanjem enzima. Proces biorazgradnje stvaranjem biofilma može se podijeliti u 4 faze. U prvoj fazi mikroorganizmi se vežu na površinu MP-a mijenjajući njezina površinska svojstva. U drugoj fazi otpuštaju se aditivi i monomeri, pri čemu uspješnost biorazgradnje uvelike ovisi o ovom koraku. Tijekom treće faze djeluju enzimi ili slobodni radikali. Njihovim djelovanjem slabe mehanička svojstva plastike. Tako u posljednjoj četvrtoj fazi dolazi do prodora vode i mikrobnih filamenata.

Kako bi se što više primjenjivala u budućnosti, potrebno je prevladati izazove procesa biorazgradnje. Neki od njih su standardizacija metoda za procjenu sposobnosti razgradnje mikroorganizama i enzima i utjecaj prisutnih aditiva u komercijalnoj plastici na učinkovitost biorazgradnje. Daljnje provođenje istraživanja ključno je za pronalazak novih mikroorganizama i enzima visoko djelotvornih u procesima biorazgradnje kao i optimalnih uvjeta za specifične procese.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroplastika

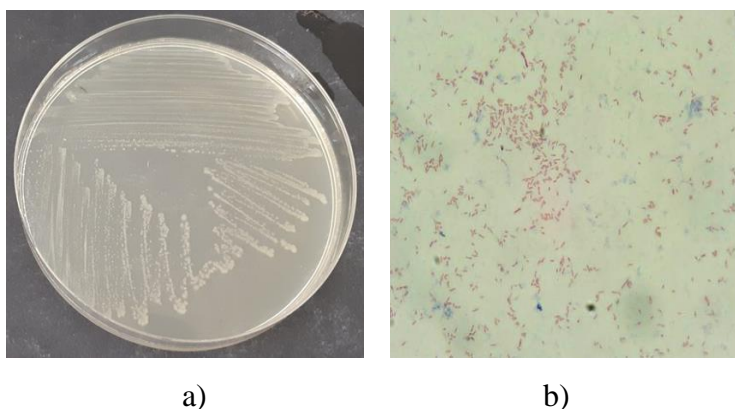
Prilikom provedbe pokusa biorazgradnje korištena je mikroplastika polistiren (PS), koja je usitnjena na veličine čestica **300-500  $\mu\text{m}$**  (Slika 3.1.).



**Slika 3.1.** Plastični pribor, jednokratne plastične žlice, od polistirena (PS) korištene za dobivanje MP-a.

##### 3.1.2 Mikroorganizam

Bakterijska kultura *Delftia acidovorans* (Slika 3.2.) korištena u pokusu biorazgradnje pohranjena je u zbirci mikroorganizama na Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 3.2.** Fotografiska snimka izrasle bakterijske kulture *Delftia acidovorans* na hranjivom agaru a) dobivene tehnikom iscrpljivanja pri 37 °C tijekom 24 h i mikrofotografija *Delftia acidovorans* b) obojene po Gramu i snimljene optičkim mikroskopom pri P = 1000x.

## 3.2. Mediji i kemikalije

### 3.2.1. Hranjivi agar

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

### 3.2.2. Mineralni medij

Za biorazgradnju MP-a pripremljene su tri tikvice od 2,0 L mineralnog medija (MM) pH-vrijednosti 6, 7 i 8. pH-vrijednost MM-a podešavala se pomoću 1 M NaOH i 1 M HCl. Pripremljeni MM sterilizirao se prije upotrebe i koristio za pripremu suspenzije bakterijske kulture, čime su osigurani minimalni uvjeti za rast bakterija. MM pripremljen je prema literaturi [98], a njegov točan sastav prikazan je u **Tablici 3.1**.

**Tablica 3.1.** Sastav mineralnog medija za 1 L prema Kyaw i sur., 2012 [99].

Tvar	<i>m</i> (spoja) / g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,80
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,00
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,10
5 mL elemenata u tragovima:	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,232
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,174
FeSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,116
CoSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,096
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,022
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	8,0 mg/L
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	8,0 mg/L

### 3.2.3. Fiziološka otopina

Za pripremu decimalnih razrjeđenja, odnosno za određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija (eng. *Colony Forming Units*, CFU), korištena je 0,9 % fiziološka otopina koja je pripremljena dodatkom 9 g NaCl-a u 1000 mL deionizirane vode. Tako pripremljena otopina sterilizirana je prije upotrebe vlažnom sterilizacijom.

### 3.2.4. Etanol

Za sterilizaciju MP-a korišten je etanol,  $w = 70 \%$ , koji je pripremljen u odmjerne tikvici od 1000 mL. Pomoću menzure odmjereno 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. Priprema otopina za određivanje ekotoksičnosti primjenom bakterijske kulture *Vibrio fischeri*

#### ❖ Podloga za održavanje bakterije

Kruta podloga za održavanje čiste bakterijske kulture priprema se otapanjem sljedećih sastojaka (Tablica 3.2.) u 1 L deionizirane vode zagrijavanjem do vrenja.

Tablica 3.2. Podloga za 1 L za održavanje morske bakterije *Vibrio fischeri*.

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

#### ❖ Otopina za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture *Vibrio fischeri* koja je pripremljena otapanjem tvari (Tablica 3.3.) u 1 L 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.



**Tablica 3.3.** Sastav otopine za resuspenziju za 1 L.

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

#### ❖ Otopina 2 % NaCl

2%-tna otopina NaCl-a korištena je kao radna otopina za pripremu niza razrjeđenja prilikom provedbe testa ekotoksičnosti MP-a primjenom bakterijske kulture *Vibrio fischeri*. Ova je otopina pripremljena 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, Latvia). Za usitnjavanje plastičnih materijala korišten je kriomlin nadopunjen s 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 uz sterilni celulozno nitratni (C/N) membranski filteri Ahlstrom ReliaDisc™, promjera pora 0,45 μm. Za sterilizaciju hranjive podloge, MM-a, fiziološke otopine, čistog staklenog posuđa, kao i onečišćenog posuđa, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija. Za pripremu decimalnih razrjeđenja korišten je homogenizator Heidolph, REAX top. Optička gustoća određivana je na spektrofotometru Hach, Model DR/2400, SAD pri valnoj duljini  $\lambda = 600$  nm. Za uzgoj bakterije korišten je termostat Termomedicinski aparati, Hrvatska pri 37 °C. Za podešavanje pH-vrijednosti MM-a korištena je magnetska miješalica WiseStir MSH-20A. Za određivanje pH-vrijednosti korištena je pH elektroda SenTix® 940. Navedeni mjerni instrumenti i oprema prikazani su na **Slici 3.3**.



(a)

(b)

(c)



(d)

(e)

(f)



(g)

**Slika 3.3.** Mjerni instrumenti i oprema korišteni pri provođenju eksperimenta: rotacijska tresilica a); kriomlin b); mehanička sita c); analitička vaga d); vakumski filter lijevak e); autoklav f); termostat g).

PS karakterizirana je prije i poslije procesa biorazgradnje pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovim transformacijama tj. FTIR-ATR spektrometru, PerkinElmer, Spectrum One (**Slika 3.4.**).



**Slika 3.4.** FTIR-ATR spektrometar.

Ukupni ugljik (TC), organski (TOC) i anorganski ugljik (TIC) određivao se pomoću uređaja za određivanje ukupnog organskog ugljika, TOC-V, Shimadzu prikazan na **slici 3.5.**



**Slika 3.5.** TOC-V uređaj.

Uzorci su razdvajani po masi korištenjem uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU (**Slika 3.6.**).



**Slika 3.6.** Uređaj za LC/MS.

Na luminometru LUMIStox 300 (**Slika 3.7.**), koji dolazi u kombinaciji s termometrom LUMIStherm, Hach-Lange GmbH, proveden je test toksičnosti uzoraka na luminiscentnu bakteriju *Vibrio fischeri*. Radna temperatura instrumenta je 15 °C ( $\pm$  1°C). Kao i računalo, LUMIStox 300 ima vlastiti operativni sustav s ugrađenom disketom na kojoj se nalaze svi potrebni podaci i programi za rad. Osim toga ima ugrađen fotometar s automatskim mjerenjem i procjenom podataka što mu omogućuje prepoznavanje boje u testu s luminiscentnim bakterijama.



**Slika 3.7.** Luminometar LUMIStox 300 i termometar LUMIStherm, Hach-Lange GmbH.

### **3.4. Primjena analitičkih i instrumentalnih metoda za praćenje biorazgradnje plastike**

#### **3.4.1. Određivanje broja živih stanica bakterija (eng. *Colony Forming Units*, CFU)**

Za potrebe određivanja broja živih stanica bakterija (CFU), pripremala su se decimalna razrjeđenja uzoraka (s i bez MP-a) izuzimanih 0., 3., 7., 14., 21. i 30. dan. 1 mL pripremljenog razrjeđenja inokuliranog uzorka zalio se s HA u sterilnoj Petrijevoj zdjelici i potom homogenizirao 7–10 puta u obliku broja osam. Petrijeve zdjelice potom su stavljene na inkubaciju u termostatu na 37 °C tijekom 24 – 48 sati. Nakon inkubacije izbrojane su kolonije čime je određen broj izraslih stanica u 1 mL.

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

Za određivanje TC-a i TOC-a izuzimano je 0,5 mL uzorka poluautomatskom pipetom sa sterilnim nastavkom koji se stavljao u špricu. Na špricu se stavljao filter veličine pora 0,45 µm kroz koji je potisnut uzorak u staklene bočice u kojima se provodila analiza. U bočice s 0,5 mL uzorka dodavalo se 9,5 mL deionizirane vode kako bi ukupni volumen iznosio 10 mL. Dodatno, u bočicama s uzorcima za određivanje TOC-a dodavale su se 3 kapi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kako bi se neutralizirao anorganski ugljik, dok se kiselina ne dodaje u bočice za određivanje TC-a. Vrijednost TIC-a dobivena je iz razlike vrijednosti TC-a i TOC-a.

#### **3.4.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama (eng. *Fourier–Transform Infrared Spectroscopy–Attenuated Total Reflectance*, FTIR–ATR)**

Prije i nakon procesa biorazgradnje, čestice MP PS-a analizirane su FTIR–ATR spektroskopijom zbog usporedbe i utvrđivanja promjene strukture. Nakon završetka pokusa biorazgradnje čestice PS-a izdvojene su procesom membranske filtracije, te isprane sterilnom deioniziranom vodom. Nije bila potrebna posebna priprema uzoraka za analizu, no ono što je bitno je da su čestice PS-a raspoređene preko cijele površine kristala. Spektri dobiveni FTIR–ATR spektroskopijom prikazuju karakteristične funkcionalne skupine analizirane tvari. Analiza je provedena u svrhu dobivanja spektara te praćenja promjena intenziteta, kao i nastanka, nestanka ili pomaka karakterističnih pikova za PS. Spektri su snimani u području 400 – 4000 cm<sup>-1</sup>. 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. Uređaj je prikazan prethodno na **slici 3.4**.

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

Provedena je LC/MS analiza za praćenje potencijalno otpuštenih aditiva s površine čestica MP-a i popratnih produkata razgradnje. U tu svrhu korištena je LC metoda bez kolone zbog nepoznavanja sastava uzorka. Uređaj za LC koristio je dvije pumpe za podešavanje protoka mobilne faze (0,1 % mravlje kiseline + MiliQ i acetonitril/metanol) vrijednosti 0,5 cm<sup>3</sup>/min, a volumen injektiranog uzorka iznosio je 10 µL.

#### **3.4.5. Postupak određivanja ekotoksičnosti MP primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri***

U svrhu određivanja ekotoksičnosti PS-a odvojene su čestice MP-a i dobiveni filtrat korišten je u testu ekotoksičnosti. Metoda se temelji na procjeni smanjenja luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri*, koje je njezino prirodno svojstvo, izlažući je rastućem nizu koncentracija toksične tvari. Pored toga za potrebe provedbe testa korištena je resuspenzija bakterije *Vibrio fischeri* i 2%-tna otopina NaCl-a. Bitno je da kivete budu u termostatnom bloku na 15 °C najmanje 15 minuta prije izvođenja testa. Postupak uključuje pripremu uzoraka, resuspenziju bakterija i na kraju provođenje samog testa ekotoksičnosti.

- Priprema uzoraka

Uzorke je potrebno čuvati na temperaturi 2–5 °C u zatamnjenoj posudi ne duže od 48 h, a ukoliko se čuvaju duže od dva tjedna potrebno ih je držati na temperaturi -20 °C. pH-vrijednost uzoraka, koja prema uputama mora biti između 6 i 8,5, podešena je prije ispitivanja s NaOH ili HCl.

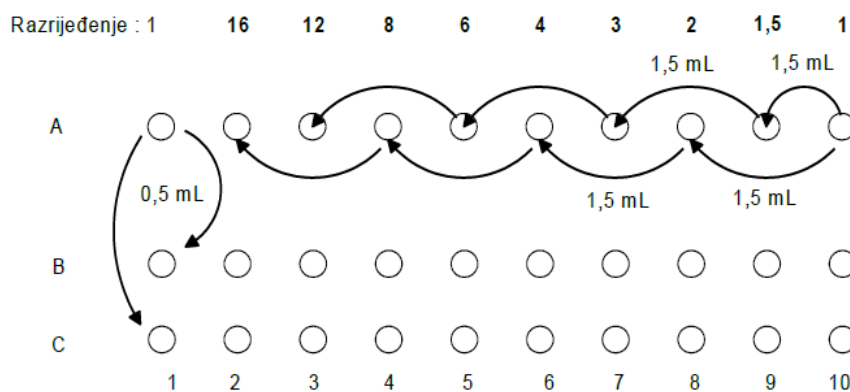
- Resuspenzija bakterija

U epruvetu, nadopunjenu 2/3 otopinom za resuspenziju, resuspendirana je čista kultura bakterije *Vibrio fischeri* prethodno zahvaćena ušicom eze. Tako pripremljena resuspenzija stavljena je 15 minuta u termostat na 15 °C zbog prilagodbe bakterijske kulture. Kako bi se test ekotoksičnosti

mogao provesti potrebno je izmjeriti relativnu luminiscenciju bakterijske suspenzije (od 0,5 mL) koja mora iznositi najmanje 1000 (eng. *screening test*). Nakon što je to zadovoljeno, test je proveden prema linearnom nizu.

### Linearni niz

1. U prvu kivetu stavi se 2/3 2%-tne otopine NaCl-a, a u zadnju kivetu 2/3 uzorka razrijeđenog onoliko puta koliko je utvrđeno u screening testu. U predzadnju kivetu stavi se 1 mL 2% NaCl, a u sve ostale po 1,5 mL 2% NaCl.
2. U A nizu napravi se niz željenih razrjeđenja na način prikazan na **slici 3.8**.
3. U sve ostale kivete B i C niza stavi se po 0,5 mL inokuluma.



**Slika 3.8.** Shematski prikaz pripreme razrjeđenja ispitivane tvari prema linearnom nizu.

Na kraju mjerenja instrument očitava dva rezultata,  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  koji se odnose na volumni udio uzorka pri kojem dolazi do 20 %-tnog, odnosno 50 %-tnog pada luminiscencije, te faktor  $f$  koji mora biti oko 1 (0,6 do 1,3).

### **3.5. Provođenje pokusa biorazgradnje MP PS-a**

#### **3.5.1. Priprema mikroplastike**

Za provedbu pokusa biorazgradnje MP-e korišteni su plastični proizvodi koji se upotrebljavaju u svakodnevnom životu, PS jednokratna ambalaža. 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 µm**.

#### **3.5.2. Sterilizacija mikroplastike**

Prije same provedbe eksperimenta, čestice PS-a sterilizirane su pomoću 70 %-tnog etanola tijekom 10 min pri 160 o/min i sobnoj temperaturi na rotacijskoj tresilici. Čestice MP-a su se izdvojile iz etanola metodom membranske filtracije uz ispiranje sterilnom deioniziranom vodom poštivajući sterilnu tehniku rada. Čestice MP-a zaostale na sterilnom membranskom filtru (veličine pora 0,45 µm) su se pomoću sterilne žlice i pincete prebacile u Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL za postavljanje pokusa.

#### **3.5.3. Uzgoj bakterije *Delftia acidovorans***

Za preduzgoj kulture pripremljena je 24-satna kultura *D. acidovorans* uzgojena na HA pri 37 °C. U MM odgovarajuće pH-vrijednosti priređena je suspenzija koja je postavljena na tresilicu tijekom 24 h, 160 o/min pri sobnoj temperaturi. Razlog provođenja preduzgoja kulture je prilagodba bakterije na uvjete mineralnog medija i postizanje logaritamske faze rasta.

#### **3.5.4. Određivanje optimalnih uvjeta za proces biorazgradnje MP PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* prema dizajnu punog faktorskog plana**

Svrha pokusa bilo je ispitivanje optimalnih uvjeta za proces biorazgradnje MP PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* prema dizajnu punog faktorskog plana koji daje kombinaciju čimbenika na određenim razinama. Za ovaj su pokus predviđena tri čimbenika na tri razine (minimalna, srednja i maksimalna vrijednost); pH-vrijednost (A), broj okretaja rotacijske tresilice (B) i optička gustoća (OG) (C) prikazani u **tablici 3.4**. Nakon unosa ispitivanih čimbenika i razina, prema programu se dobiva matrica (**Tablica 3.5.**) koja predstavlja broj tikvica i



pripadajuću kombinaciju čimbenika na tri razine. Prema tome pokus se sastojao od 27 tikvica (Slika 3.9.) s MP, te dodatne tikvice sa slijepom probom. Tikvica se sastojala od mineralnog medija odgovarajuće pH-vrijednosti, suspenzije mikroorganizma *Delftia acidovarans* odgovarajuće optičke gustoće, i mikroplastike – PS, veličine čestica 300-500 µm i koncentracije 500 mg/L. Veličina i koncentracija čestica MP-a je konstantna. Kontrolna tikvica (slijepa proba) sadržavala je sve osim čestica MP-a. Pokus se provodio u tikvicama od 250 mL s radnim volumenom od 100 mL tijekom 30 dana. Na dan postavljanja pokusa pripremila se suspenzija bakterije u mineralnome mediju te se odredila optička gustoća pri valnoj duljini od 600 nm.

**Tablica 3.4.** Ispitivani čimbenici na tri razine prema dizajnu punog faktorskog plana.

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



**Slika 3.9.** Postavljene tikvice za provedbu pokusa biorazgradnje PS-a.

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

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

U 0., 3, 7., 14., 21. i 30. danu provođenja pokusa izuziman je uzorak određenog volumena te je određen CFU. Provedena je i TOC analiza, LC/MS analiza, FTIR-ATR spektroskopija te je ispitana ekotoksičnost filtrata nakon procesa biorazgradnje pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*.

U 0. danu određeni su početni uvjeti za provedbu pokusa biorazgradnje čestica PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* koji su prikazani u **Tablici 3.6.**

**Tablica 3.6.** Početni uvjeti za pokus biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Delftia acidovorans*.

MP	OG <sub>0</sub> /-	CFU <sub>0</sub> /st/mL	log (CFU)/-	γ(TC <sub>0</sub> )/mg/L	γ(TOC <sub>0</sub> )/mg/L	γ(TIC <sub>0</sub> )/mg/L
PS	0,1	3,1·10 <sup>8</sup>	8,49	4,982	2,700	2,282
	0,3	6,7·10 <sup>8</sup>	8,82	5,149	2,291	2,858
	0,5	1,0·10 <sup>9</sup>	9,00	4,795	2,386	2,409

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Zbog svojih svojstava poput lakoće, te niske cijene plastika je postala sveprisutan i nezamjenjiv materijal u svakodnevnom životu. Posebno je stavljen fokus na MP, koja je sveprisutna u okolišu. MP dospijeva u okoliš na razne načine, preko površinskog otjecanja oborinskih voda, prenošenjem vjetrom, ispuštanjem otpadnih voda ili jednostavno nekontroliranim bacanjem otpada u okoliš [100]. Velike količine upravo završavaju u vodenom okolišu. Provedene analize su pokazale da su upravo postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda glavni uzročnik prisutnosti MP-a u vodenom sustavu [100]. Zbog svoje velike specifične površine i visokog stupnja adsorpcije, MP vrlo lako postaje prijenosnik različitih onečišćujućih tvari iz okoliša poput teških metala, postojanih organskih tvari ili različitih patogenih bakterija. Zbog toga predstavlja opasnost po ljudsko zdravlje ukoliko dospije u hranidbeni lanac. Veliki potencijal u uklanjanju MP-a pokazuju izolirani sojevi mikroba ili obogaćene zajednice koje mogu razgraditi 50 % ili više prethodno obrađene MP [101]. Stoga sve veću pažnju privlači kombinacija određene vrste predobrade MP-a i mikroba razgradnja. Mogućnost određenih bakterija i gljivica da razgrađuju plastiku koristeći ugljikovodike kao izvor hrane, učinila je biotehnologiju važnom granom za istraživanja i potencijalni napredak [102]. Zbog specifičnih svojstava MP-a i potrebnog daljnjeg razvoja tehnologije, ovakva istraživanja predstavljaju značajan izazov. Upravo je procjena toksičnog učinka MP-a u kombinaciji s apsorbiranim onečišćivalima važna tema u području toksikologije, a razvoj procesa biorazgradnje bez stvaranja dodatnog otpada važan način rješavanja problema plastike u okolišu. S obzirom da je za potpunu razgradnju PS-a u prirodnim uvjetima potrebno i nekoliko stotina godina, važno je pronaći učinkovite načine i optimalne uvjete za ubrzanje procesa biorazgradnje.

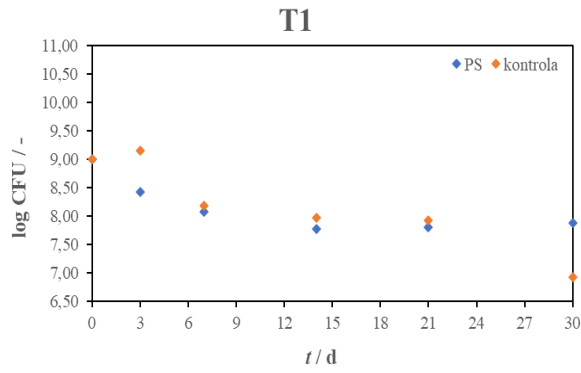
U ovom radu proveden je pokus biorazgradnje MP PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* proučavajući optimalne uvjete prema dizajnu punog faktorskog plana.

## 4.1. Rezultati pokusa

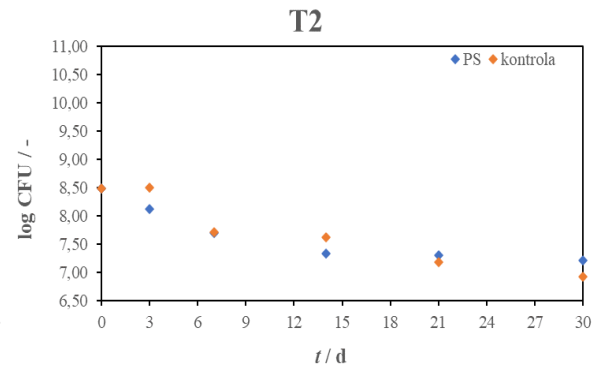
### 4.1.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje PS-a

CFU vrijednosti praćene su tijekom 30 dana, kao jedan od parametara za praćenje tijeka biorazgradnje i dobiveni rezultati prikazani su grafički na **slikama 4.1.–4.3.** Postupak određivanja prethodno je objašnjen u podpoglavlju 3.4.1. U nastavku će biti prikazan pregled dobivenih rezultata CFU bakterijske kulture *Delftia acidovorans*.

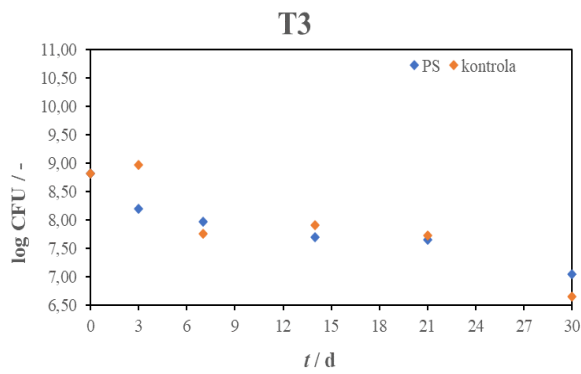
Broj kolonija u 0. danu za OG=0,1 iznosio je  $3,1 \cdot 10^8$  st/mL, za OG=0,3  $6,7 \cdot 10^8$  st/mL, dok je najveći bio za OG=0,5 i iznosio je  $1,0 \cdot 10^9$  st/mL. S obzirom na dobivene rezultate u većini slučajeva je najviša CFU vrijednost bila 0. dan, a nakon toga vrijednosti su se postupno smanjivale. Usporedbom s kontrolnim pokusom (slijepom probom) dobivene CFU vrijednosti za pokuse s MP-om nisu se posebno razlikovale, a u većini slučajeva su bile i niže u odnosu na SP. To upućuje da je bakterija minimalno iskorištavala PS kao supstrat, odnosno izvor energije. Vrijednosti CFU od 7. do 21. dana su uglavnom oscilirale oko približnih vrijednosti, što se može povezati s uspostavljanjem stacionarne faze bakterijskog rasta. Nadalje, primijećeno je da je vrijednost CFU za 30. dan bila veća za uzorke s MP-om od SP-a, upućujući na prilagodbu bakterijske kulture na eksperimentalne uvjete i početak intenzivnijeg korištenja PS-a kao supstrata. U 30. danu je i najveća razlika u vrijednostima CFU pokusa s i bez MP-a za T1, T4, T8 i T9. Nadalje, u pokusima T6, T7, T8 i T9 dolazi do naglog porasta broja kolonija u 30. danu, što bi moglo upućivati da je bakterija koristila PS-a kao izvor energije za rast i razmnožavanje. Takav porast može se povezati i s potrebnim dužim periodom izlaganja bakterijske kulture MP-u ili se radilo o eksperimentalnoj pogrešci. Osim toga, dolazi do naglog pada broja kolonija za SP u 30. danu, za OG 0,1 i 0,5 iznosi  $8,5 \cdot 10^6$  st/mL, a za OG=0,3  $4,5 \cdot 10^6$  st/mL.



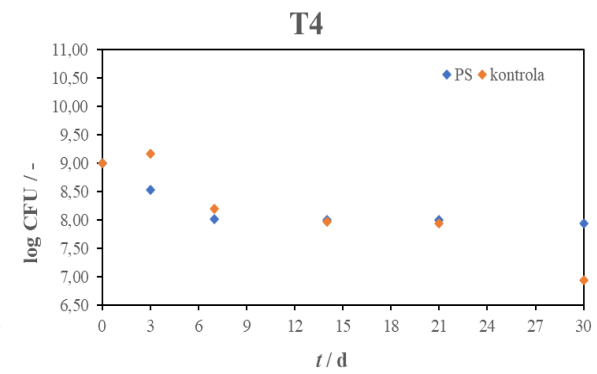
(a)



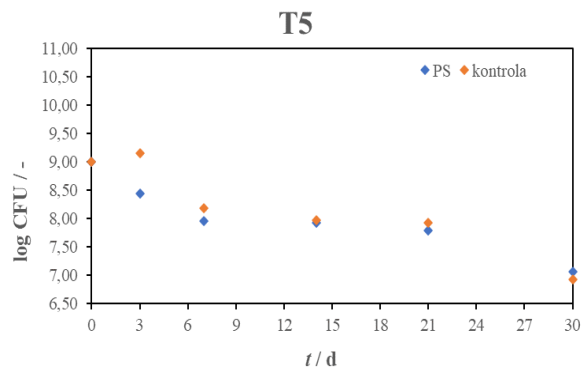
(b)



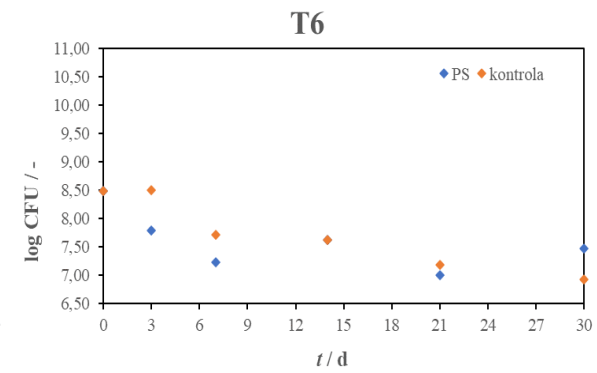
(c)



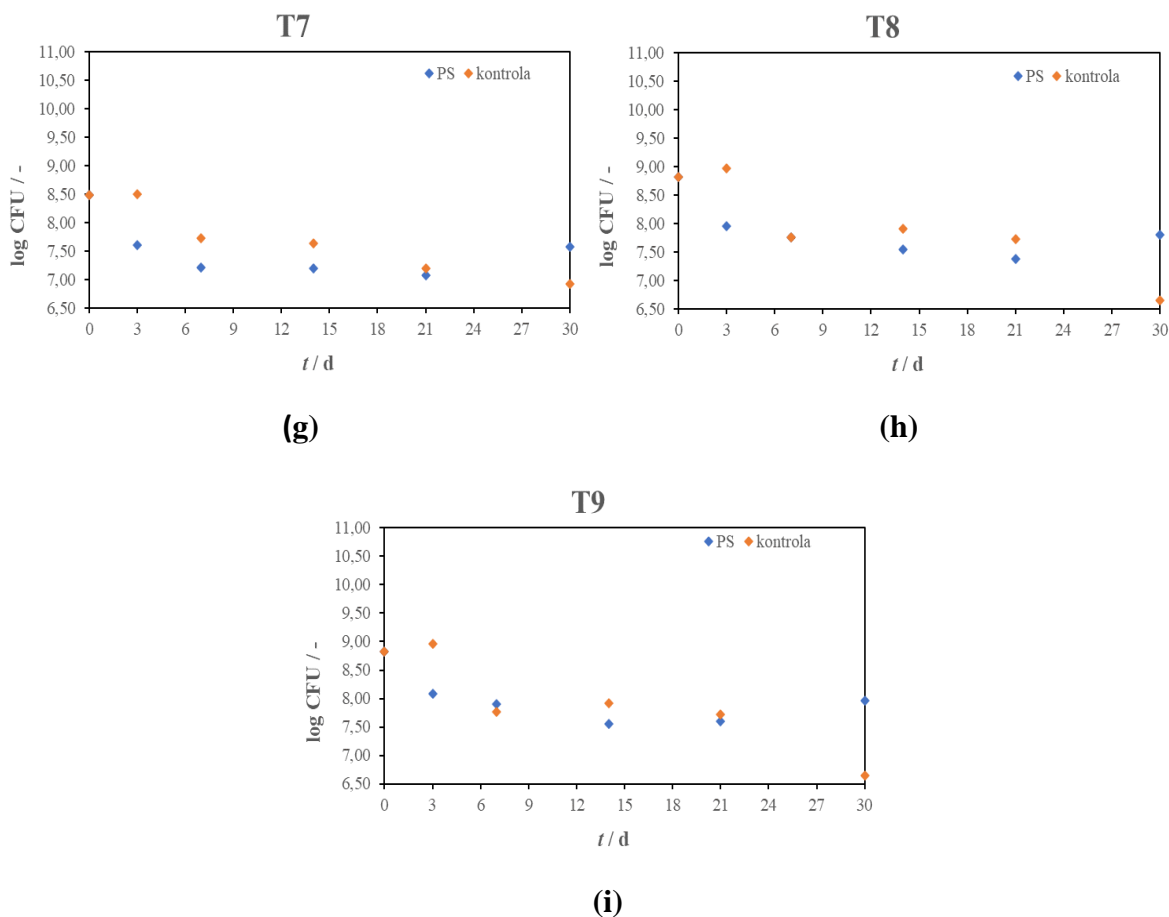
(d)



(e)



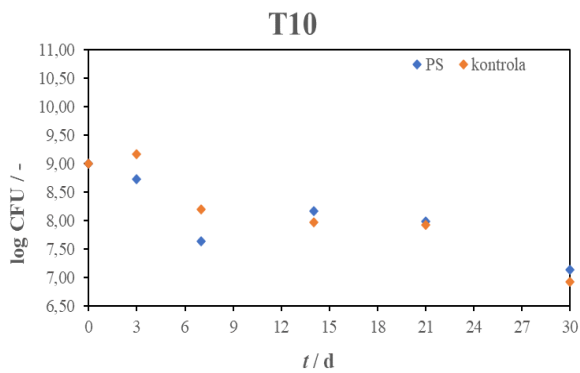
(f)



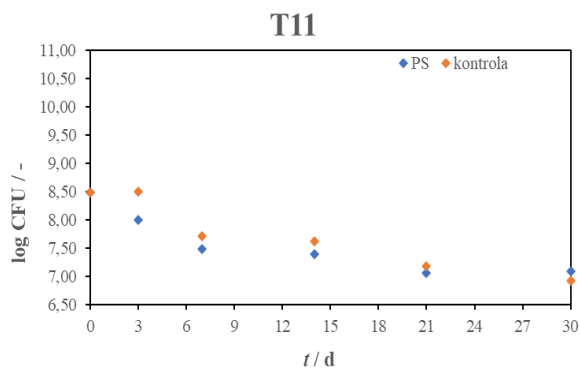
**Slika 4.1.** Promjena CFU vrijednosti bakterije *Delftia acidovorans* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: T1 (a); T2 (b); T3 (c); T4 (d); T5 (e); T6 (f); T7 (g); T8 (h); T9 (i).

Za pokuse T10–T18 (Slika 4.2; a–i) primijećen je sličan trend, kao i kod prvih 9 pokusa; neznatna razlika između CFU vrijednosti za SP i pokuse s MP-om, te nagli pad broja živih stanica za SP u 30. danu. Najveća vrijednost CFU postignuta je u SP-u za sve tri optičke gustoće i to u 3. danu, nakon čega slijedi nagli pad. Za OG=0,1 iznosila je  $3,2 \cdot 10^8$  st/mL, za OG=0,3  $9,1 \cdot 10^8$  st/mL, te za OG=0,5  $1,4 \cdot 10^9$  st/mL. Postepeni rast broja kolonija nakon 0. dana pokazuje da je preduzgoj bakterijske kulture uspješno proveden. Najveća razlika između SP i pokusa s MP-om bila je u 3. ili 30. danu, izuzev za T10 gdje je najveća razlika bila u 7. danu. Najmanji broj kolonija u pokusima s MP-om postignut je u 30. danu za T10, T15, T16 i T18, u 21. danu za T11, T12, T13 i T14, dok je kod T17 postignut već u 3. danu i to je ujedno i najmanji broj kolonija postignut u cijelom

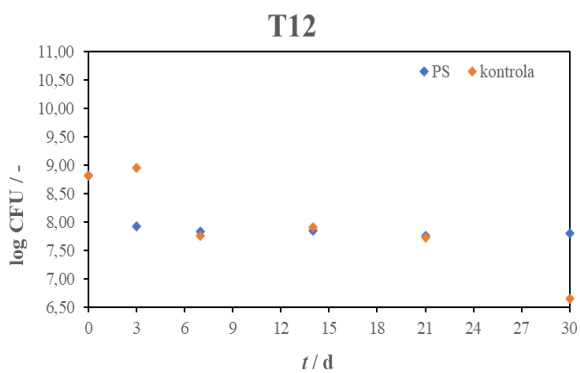
pokusu za svih 30 tikvica. Najveći broj kolonija za odabrani pokus T15 postignut je u 21. danu ako se izuzme 0. dan, i iznosio je  $2,6 \cdot 10^8$  st/mL.



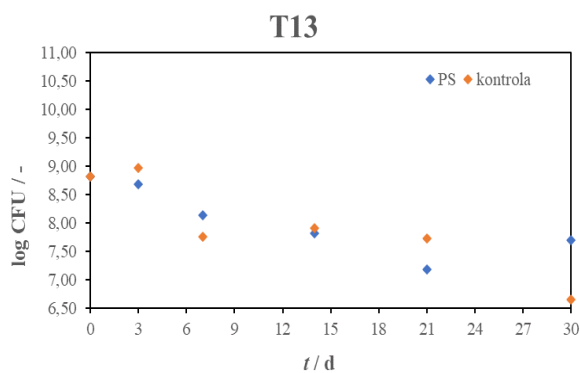
(a)



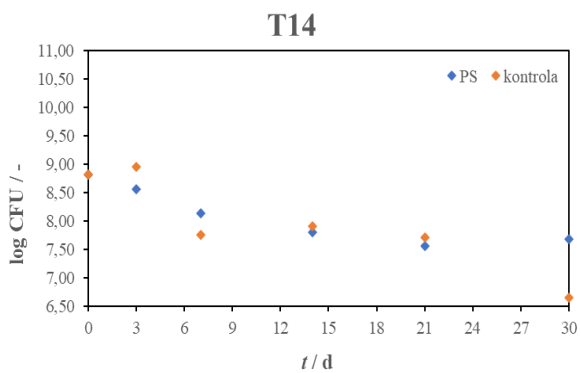
(b)



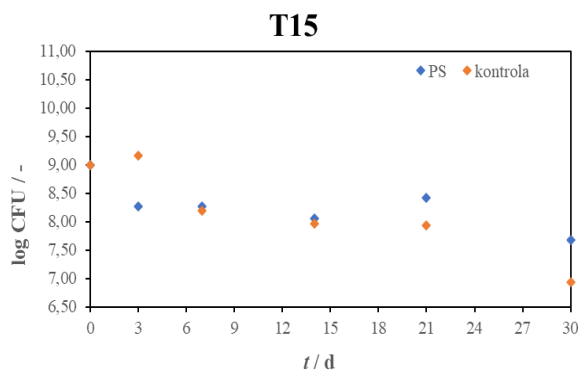
(c)



(d)

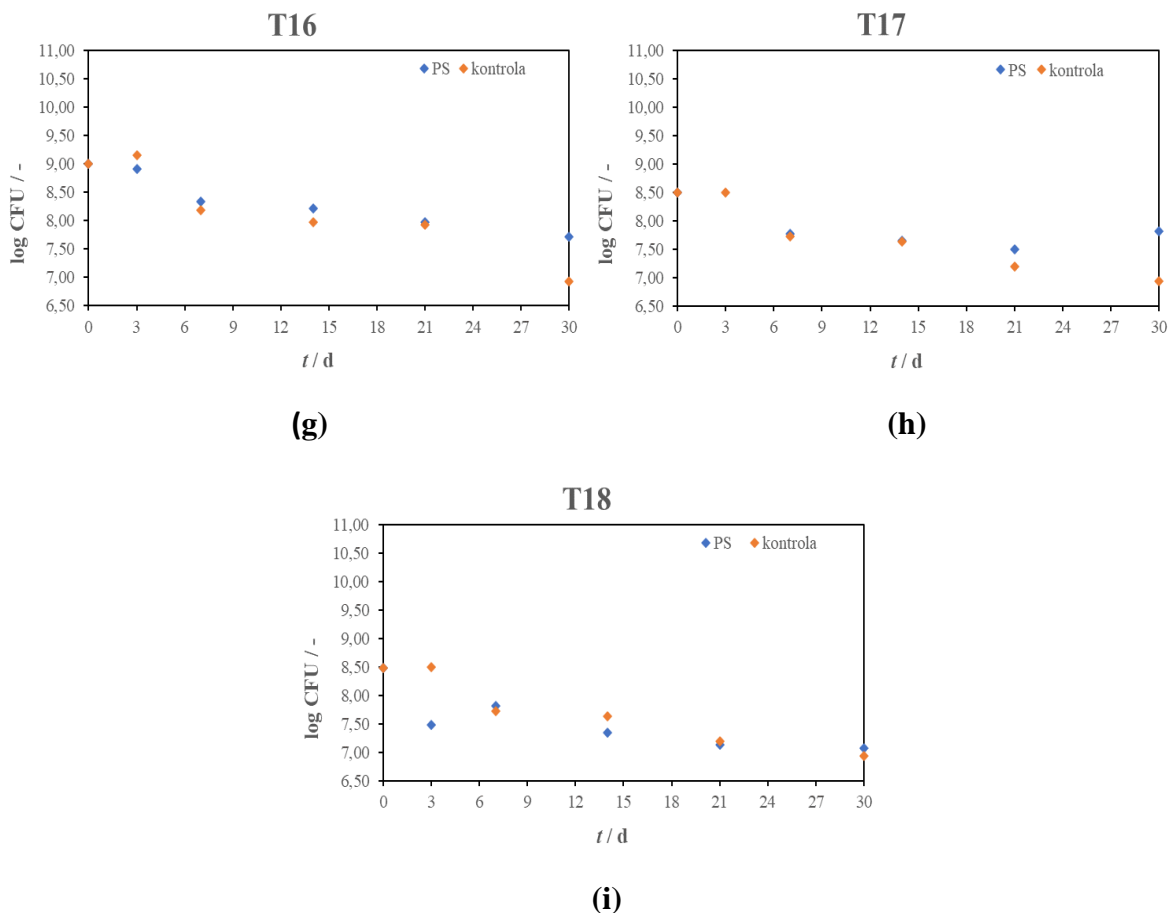


(e)



(f)

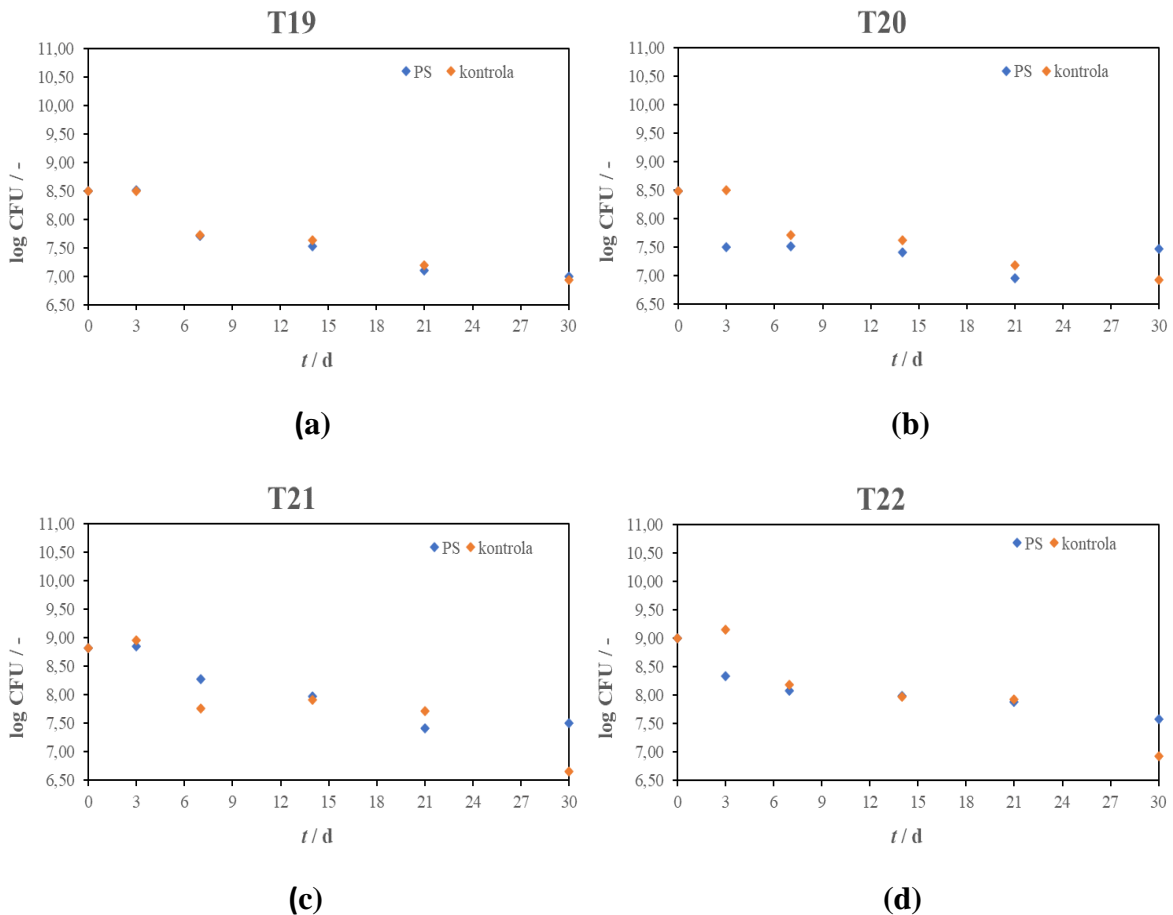


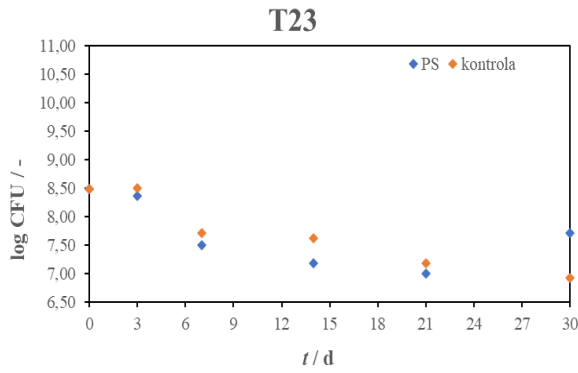


**Slika 4.2.** Promjena CFU vrijednosti bakterije *Delftia acidovorans* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: T10 (a); T11 (b); T12 (c); T13 (d); T14 (e); T15 (f); T16 (g); T17 (h); T18 (i).

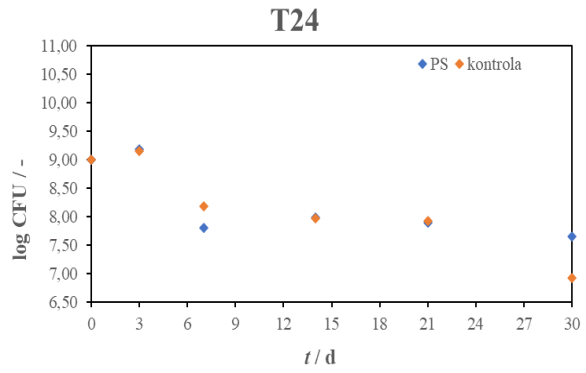
Za pokuse prikazane na **slici 4.3.** sličan je trend promjene, kao i u prethodno opisanim pokusima. Vrijednosti CFU uglavnom su veće za SP, osim za 30. dan gdje je veći broj kolonija razvijen u pokusima s MP-om. Pored toga neznatno veći broj živih stanica bakterije postignut je u 3. danu u pokusima T19 i T24 u odnosu na SP. U 7. danu je uočen veći broj kolonija u pokusima T21, T25, T26 i T27 u odnosu na SP. U pokusima T19, T21, T24, T25 i T26 najveći broj kolonija postignut je 3. dan, a on iznosi  $3,3 \cdot 10^8$  st/mL,  $7,3 \cdot 10^8$  st/mL,  $1,5 \cdot 10^9$  st/mL,  $1,4 \cdot 10^9$  st/mL i  $7,8 \cdot 10^8$  st/mL, dok je u ostalim pokusima (T20, T22, T23 i T27) CFU najveći u 0. danu. Najniži broj živih bakterijskih stanica bio je 21. dan u pokusu T20, a iznosio je  $9,2 \cdot 10^6$  st/mL. S obzirom da se vrijednosti CFU nisu posebno razlikovale za pokuse s i bez MP-a može se zaključiti da bakterijska kultura *Delftia acidovorans* u danim eksperimentalnim uvjetima nije značajno iskoristila PS kao izvor hrane i energije. Upravo je jedinstvena struktura PS-a, koju čini ugljikovodični lanac na koji

je vezana fenilna skupina, razlog težeg postizanja potpune biorazgradnje [103]. PS spada u skupinu termoplastičnih polimera koji zbog svoje hidrofobnosti otežava mikroorganizmima njegov prijenos u stanice koje obavljaju kataboličke procese [104]. Ipak, određene bakterije i gljive pokazale su sposobnost razgradnje stvaranjem biofilma na površini PS filmova, što može utjecati na kemijska svojstva PS-a. U jednom od istraživanja koje su proveli Naz i suradnici [105], praćeni su rast i fiziološke aktivnosti biofilma tijekom sukcesije na PS-u iz aktivnog mulja pod aerobnim i anaerobnim uvjetima. Inkubacija u aktivnom mulju, gdje je uglavnom bakterija *Bacillus cereus* bila zaslužna za formiranje biofilma, trajala je 9 tjedana. Rezultati su pokazali da je razvoj biofilma doprinio razgradnji PS-a.

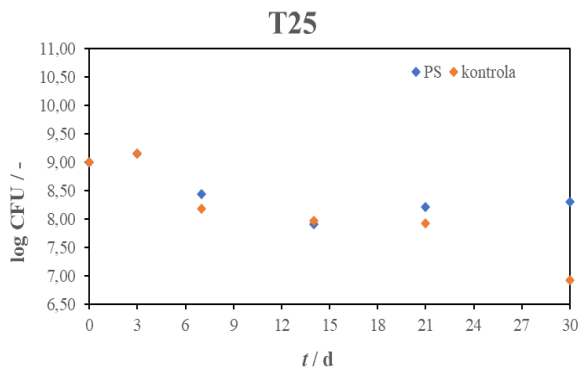




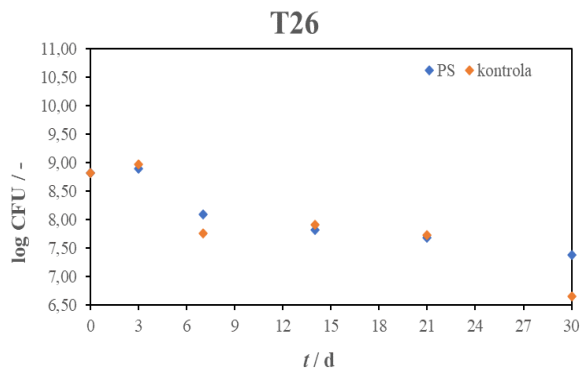
**(e)**



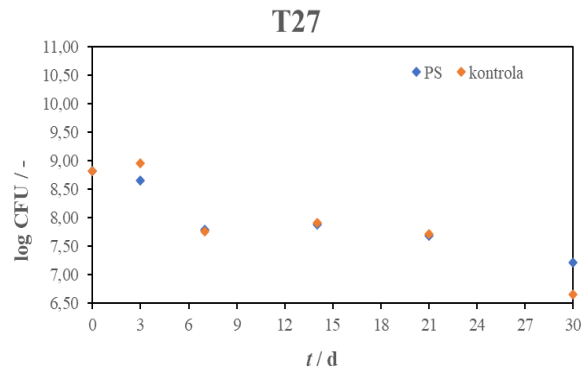
**(f)**



**(g)**



**(h)**



**(i)**

**Slika 4.3.** Promjena CFU vrijednosti bakterije *Delftia acidovorans* tijekom biorazgradnje PS-a za pokuse: T19 (a); T20 (b); T21 (c); T22 (d); T23 (e); T24 (f); T25 (g); T26 (h); T27 (i).

#### 4.1.2. Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i TIC-a tijekom procesa biorazgradnje PS-a

Provedenom TOC analizom dobivene su vrijednosti TC-a, TOC-a i TIC-a za odabrani pokus T15 procesa biorazgradnje PS-a bakterijskom kulturom *Delftia acidovorans*, prikazane u **tablici 4.1**.

**Tablica 4.1.** Promjena vrijednosti ukupnog ugljika (TC), organskog ugljika (TOC) i anorganskog ugljika (TIC) tijekom procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Delftia acidovorans* za odabrani pokus T15.

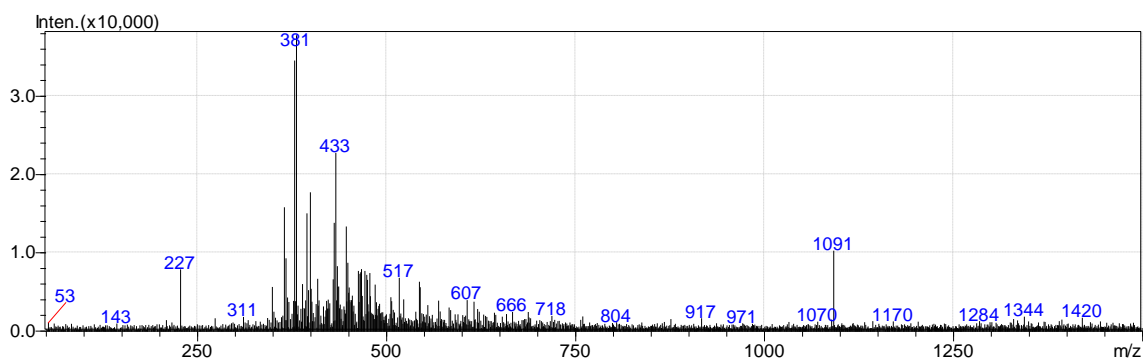
<i>t</i> / dan	$\gamma(\text{TC-T15})$ / mg/L	$\gamma(\text{TC-SP})$ / mg/L	$\gamma(\text{TOC-T15})$ / mg/L	$\gamma(\text{TOC-SP})$ / mg/L	$\gamma(\text{TIC-T15})$ / mg/L	$\gamma(\text{TIC-SP})$ / mg/L
0.	4,795	4,795	2,386	2,386	2,409	2,409
3.	2,309	3,661	0,2037	0,510	2,1053	3,151
7.	2,552	2,308	1,798	-	0,754	2,308
14.	3,874	21,290	2,878	12,020	0,996	9,270
21.	7,156	4,920	3,794	5,014	3,362	-
30.	8,639	5,700	3,611	1,739	5,028	3,961

Koncentracija TC-a 0. dan za odabrani pokus T15 iznosila je 4,795 mg/L, u 3. danu je došlo do pada vrijednosti, a nakon toga postiže se pozitivan trend rasta. Najviša vrijednost TC-a za T15 postignuta je u 30. danu i iznosila je 8,639 mg/L. U pokusu bez MP-a dolazi do naglog skoka vrijednosti TC-a u 14. danu i ona iznosi 21,290 mg/L. Koncentracija TOC-a u 0. danu za T15 iznosila je 2,386 mg/L, u 3. danu je vidljiv nagli pad vrijednosti na 0,2037 mg/L nakon čega dolazi do rasta. TOC vrijednost, koja se vezuje uz organski ugljik i kojeg bakterije koriste kao izvor energije za rast i razmnožavanje, ukazuje na to da ne dolazi do značajne biorazgradnje ili da se u procesu biorazgradnje otpuštaju određeni organski aditivi ili produkti razgradnje koji povisuju koncentraciju TOC-a. Najviša vrijednost TOC-a za T15 postignuta je u 21. danu i iznosila je 3,794 mg/L, kada je i uočen najveći broj kolonija (CFU) (Slika 4.2. f) . Ovime se potvrđuje slaganje trenda promjene TOC i CFU vrijednosti. Nadalje, vrijednosti TOC-a manje su u pokusu s MP-om nego u SP-u, što ukazuje da je u SP došlo do liziranja (raspada) stanica. Ovo potvrđuju i niže CFU

vrijednosti za SP u odnosu na CFU u T15 za 21. i 30. dan (Slika 4.2. f). Nadalje, koncentracije TOC-a za SP varirale su tijekom pokusa, gdje je najniža koncentracija bila 3. dan (0,510 mg/L), a najviša 14. dan (12,020 mg/L). Vrijednost TOC-a za 7. dan nije bilo moguće odrediti. Koncentracija TIC-a za pokus T15 doseže najvišu vrijednost 30. dan pokusa i iznosi 5,028 mg/L. Vrijednosti TIC-a opadaju do 7. dana, nakon čega postižu povećanje do kraja pokusa, što se slaže s promjenom CFU vrijednosti. Najniža vrijednost postignuta je 7. dan i iznosila je 0,754 mg/L. Kod SP-a vrijednosti TIC-a dosta su oscilirale, pri čemu je najviša vrijednost postignuta 14. dan i iznosila je 9,270 mg/L, a najniža vrijednost od 2,308 mg/L 7. dan pokusa. Vrijednost za 21. dan nije bilo moguće odrediti. U usporedbi sa SP-om, niže su koncentracije TIC-a postignute za pokus s MP-om. Stoga je za detaljnija saznanja bilo potrebno provesti dodatne analize kako bi se utvrdilo je li zaista došlo do biorazgradnje PS-a. TIC se osim za karbonate i bikarbonate, veže za razvijanje ugljikovog dioksida, CO<sub>2</sub> koji je jedan od produkata biorazgradnje [106]. Stoga je to jedan od pokazatelja stupnja razgradnje MP-a. Prema dobivenim rezultatima TIC-a najintenzivnija razgradnja u pokusu T15 postignuta je 30. dan.

#### 4.1.3. Praćenje potencijalno otpuštenih aditiva i/ili produkata razgradnje s površine MP PS-a tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (LC/MS)

Provedenom LC/MS analizom dobiven je maseni spektar za odabrani pokus T15 procesa biorazgradnje MP PS-a bakterijskom kulturom *Delftia acidovorans* prikazan na slici 4.4. Cilj analize bio je ispitati je li došlo do razgradnje PS-a identifikacijom spojeva (mogućih aditiva i produkata biorazgradnje). Rezultati su prikazani za 21. dan biorazgradnje PS-a s obzirom da je taj dan određen najviši broj živih stanica bakterije (izuzev 0. dana), ali i najviša koncentracija TOC-a koja bi mogla upućivati na intenzivnije otpuštanje različitih aditiva ili stvaranje organskih produkata razgradnje. Također u tom danu je uočen veći broj kolonija u pokusu s MP-om nego u SP-u.



**Slika 4.4.** Maseni spektrometar za odabrani pokus T15 u 21. danu biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans*.

U **tablici 4.2.** prikazana su imena identificiranih spojeva i forme iona s pripadajućim  $m/z$  omjerom za 21. dan procesa biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans*. Prema literaturi [107] navedena je i njihova molekulska formula, te uloga u obliku aditiva. Može se vidjeti da proizvod uglavnom sadrži antioksidanse i plastifikatore. Prvi identificirani spoj na  $m/z$  227 je butilirani hidroksi toluen, skraćeno BHT koji se koristi kao antioksidans. Forma iona je  $[M+H]^+$ , a molekulska formula  $C_{15}H_{24}O$ . BHT je široko rasprostranjen aditiv koji se koristi kao prehrambeni aditiv, kao dodatak kozmetičkim i proizvodima za osobnu higijenu, farmaceutskim proizvodima, plastici itd. [108]. Kao antioksidans sprječava degradaciju proizvoda i pomaže u održavanju stabilnosti svojstava kad je proizvod izložen atmosferskim uvjetima. Sljedeći identificirani spoj je na  $m/z$  381 i to je pik najvećeg intenziteta. Radi se o plastifikatoru bis(2-etilheksil) adipatu

(DEHA), formule  $C_{15}H_{24}O$  i ionskog oblika  $[M+H]^+$ . Poboljšava fleksibilnost proizvoda, a u većini zemalja zamijenio je korištenje di(2-etilheksil) ftalata (DEHP) zbog njegovog toksičnog učinka na reproduktivni sustav i izazivanja endokrinih poremećaja [109]. Korištenje DEHA-e dopušteno je u proizvodima koji dolaze u kontakt s hranom, odnosno raznim vrstama ambalaže u mnogim zemljama. Pojavljuje se u okolišu, a smatra se da su glavni čimbenici odgovorni za migraciju ovog plastifikatora skladišni uvjeti i količina masti u hrani koja je u kontaktu s ambalažom. Iako je označen kao sigurna zamjena ftalata, određena istraživanja na štakorima i miševima pokazala su njegov negativan učinak pri visokim razinama izloženosti. Pik na  $m/z$  433 identificiran je kao diizooktil ftalat molekulske formule  $C_{24}H_{38}O_4$ , te ionskog oblika  $[M+K]^+$ . Radi se o diesteru ftalne kiseline koji ima ulogu plastifikatora [110]. Ftalati su spojevi sveprisutni u okolišu zbog široke primjene kao aditivi u industriji plastike, kao i prehrambenoj industriji [111]. Utjecajem topline ovi spojevi lako migriraju u hranu i zbog svojeg toksičnog učinka predmet su brojnih istraživanja. Ftalati su pokazali da imaju utjecaj na poremećaj metabolizma glukoze, kao i razvoj pretilosti. Nadalje, pik na  $m/z$  517 identificiran je kao spoj didodecil 3,3'-tiodipropionat (DDTDP) molekulske formule  $C_{30}H_{58}O_4S$ , forme iona  $[M+H]^+$ . Ima ulogu sprječavanja oksidacijske razgradnje sintetskih polimera [112].

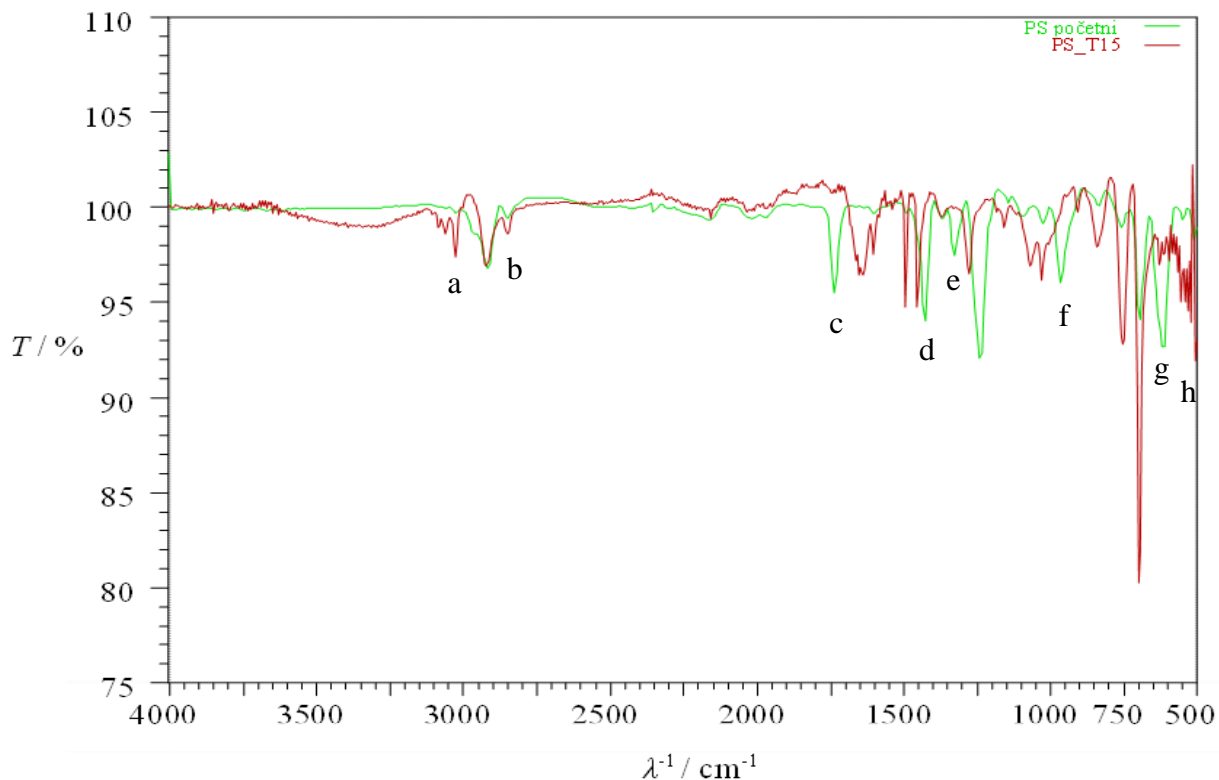
**Tablica 4.2.** Ionski oblici i imena spojeva identificiranih za odabrani pokus T15 u 21. danu biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* [107].

<i>m/z</i> omjer	forma iona	spoj
227	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{24}O$ BHT, butilirani hidroksi toluen, antioksidans
381	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{42}O_4$ DEHA, bis(2-etilheksil) adipat, plastifikator
433	$[M+K]^+$	$C_{24}H_{38}O_4$ Diizooktil ftalat, plastifikator
517	$[M+H]^+$	$C_{30}H_{58}O_4S$ DDTDP, Didodecil 3,3'-tiodipropionat, antioksidans

#### 4.1.4. FTIR–ATR spektroskopija MP PS-a

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom važna je metoda za identifikaciju organskih spojeva, prisutnih kemijskih veza i kemijskog sastava. Može se koristiti za analizu tekućina, plinova, prašaka, filmova, itd. s značajnom osjetljivošću i točnošću, te kratkim vremenom potrebnim za analizu [113]. U FTIR analizi ispitivani uzorci podvrgavaju se infracrvenom zračenju koje izaziva vibracije u molekulama, a to rezultira apsorpcijom ili transmisijom energije karakterističnom za određenu molekulsku strukturu. Dobiveni spektri mogu biti prikazani kao ovisnost apsorpcije, odnosno transmisije o valnom broju. Infracrveno zračenje može se podijeliti na tri područja; daleko područje (engl. *far-IR spectrum*) valnog broja  $<400\text{ cm}^{-1}$ , srednje (engl. *mid-IR spectrum*) valnog broja  $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$  i blisko područje (engl. *near-IR spectrum*) valnog broja  $4000 - 13000\text{ cm}^{-1}$ . Srednje područje infracrvenog zračenja je najčešće korišteno u analizi. Prigušena totalna refleksija (engl. *attenuated total reflectance*, ATR) korištena je metoda infracrvene spektroskopije, kojom se analizira MP. Pogodna je za MP nepravilnih površina, no do određene dimenzije s obzirom da bi analizirane čestice trebale prekriti površinu ATR kristala [114]. FTIR–ATR spektroskopija provedena je za čestice MP-a prije i nakon pokusa biorazgradnje čestica MP-a bakterijom *Delftia acidovorans* s ciljem usporedbe strukture i praćenja mogućih promjena ukoliko je došlo do biorazgradnje. Na **slici 4.5.** prikazani su dobiveni FTIR–ATR spektri snimljeni prije (označen zelenom bojom) i poslije procesa biorazgradnje PS-a za odabrani pokus T15 (označen crvenom bojom). U **tablici 4.3.** navedene su karakteristične vibracije s pripadajućim valnim brojevima za PS ( $\lambda^{-1} / \text{cm}^{-1}$ ).





**Slika 4.5.** FTIR spektar snimljen prije (SP) i poslije procesa biorazgradnje bakterijskom kulturom *Delftia acidovorans* za odabrani pokus T15.

**Tablica 4.3.** Karakteristični pikovi na FTIR spektrogramu PS-a za pokus T15 s pripadajućim valnim brojevima [115].

	$\lambda^{-1} / \text{cm}^{-1}$	vibracije
<b>a</b>	3024	istezanje aromatskih C-H
<b>b</b>	2847	istezanje C-H
<b>c</b>	1601	istezanje aromatskog prstena
<b>d</b>	1492	istezanje aromatskog prstena
<b>e</b>	1451	CH <sub>2</sub> savijanje
<b>f</b>	1027	savijanje aromatskih C-H
<b>g</b>	694	savijanje aromatskih C-H izvan ravnine
<b>h</b>	537	savijanje aromatskog prstena izvan ravnine

FTIR–ATR spektroskopijom dobiveni su spektri za PS s karakterističnim pikovima koji pripadaju određenim molekulskim vibracijama, a snimani su u području  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ . Kao što je označeno na **slici 4.5.** i navedeno u **tablici 4.3.** PS spektar karakteriziraju signali na  $3024 \text{ cm}^{-1}$  koji odgovara istezanju aromatskih C-H veza, na  $2847 \text{ cm}^{-1}$  koji odgovara istezanju C-H veza, zatim na  $1601$  i  $1492 \text{ cm}^{-1}$  koji odgovaraju istezanju aromatskog prstena. Pik prisutan na  $1451 \text{ cm}^{-1}$  odgovara savijanju skupine  $\text{CH}_2$ . Preostala tri signala pripadaju vibracijama savijanja, točnije signal na  $1027 \text{ cm}^{-1}$  odgovara savijanju aromatskih C-H, signal na  $694 \text{ cm}^{-1}$  savijanju aromatskih C-H izvan ravnine, te signal na  $537 \text{ cm}^{-1}$  savijanju aromatskog prstena izvan ravnine. Uspoređujući spektre za PS prije i poslije procesa biorazgradnje, može se vidjeti da je došlo do određenih promjena uključujući promjenu intenziteta, nestanka te nastanka novih pikova. Ipak, većina karakterističnih pikova ostala je i dalje prisutna nakon pokusa biorazgradnje. Na spektru za PS nakon pokusa biorazgradnje došlo je do promjene, odnosno povećanja intenziteta pika na  $3024 \text{ cm}^{-1}$ , te na  $\sim 750$  i  $\sim 700 \text{ cm}^{-1}$  pikovi koji se vezuju za savijanje aromatskog prstena i koji su pomaknuti sa  $694 \text{ cm}^{-1}$  na veće valne duljine. Pik na  $1601 \text{ cm}^{-1}$  pomaknuo se na veću valnu duljinu ( $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ ) i došlo je do njegovog proširenja. Primijećen je novi pik na  $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$  koji odgovara istezanju aromatskog prstena, a kod pika na  $1492 \text{ cm}^{-1}$  došlo je do manjeg pomaka i smanjenja intenziteta. Pik na  $1451 \text{ cm}^{-1}$  nakon pokusa biorazgradnje pomaknuo se prema manjoj valnoj duljini od  $\sim 1300 \text{ cm}^{-1}$ , pri čemu je došlo do povećanja intenziteta. Sljedeća promjena u obliku pojave novog pika uočena je na valnoj duljini  $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$ , koji je karakterističan za C-O istezanje u primarnom alkoholu. Pik na  $\sim 1027 \text{ cm}^{-1}$  pomaknut je na  $\sim 900 \text{ cm}^{-1}$  značajno smanjenog intenziteta, dok je na  $\sim 850 \text{ cm}^{-1}$  došlo do povećanja intenziteta pika koji se povezuje sa savijanjem aromatskog prstena. FTIR spektar za PS nakon pokusa biorazgradnje pokazao je da je došlo do nestanka pika na  $694 \text{ cm}^{-1}$ . Dobiveni rezultati upućuju da je u određenoj mjeri došlo do biorazgradnje PS-a. U jednom od istraživanja [116] gdje je praćena biorazgradnja PS-a bakterijama *Gordonia* sp. i *Novosphingobium* sp. FTIR spektar je pokazao da je došlo do prigušenja pikova koji se vezuju za aromatski prsten, što je bio dokaz cijepanja prstena, te da je došlo do stvaranja karbonilne grupe (C=O istezanje) i pika povezanog s vibracijama istezanja C-O. Time je dokazano da je došlo do biorazgradnje PS-a primjenom ovih morskih bakterija.

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

Činjenica da svake godine milijarde tona plastike završe upravo u oceanima i da takav problem ozbiljno prijete morskom okolišu, dovoljan je razlog za intenzivno istraživanje utjecaja plastike na morske organizme. Važno mjesto u svijetu plastike zauzima PS, zbog široke upotrebe i posljedično široke prisutnosti u okolišu. Zbog strukturne stabilnosti, hidrofobnosti i velike molekulske mase, PS predstavlja značajan izazov znanstvenicima u pronalasku optimalnog načina i uvjeta biorazgradnje. Lee i suradnici [117] ispitivali su utjecaj MP PS-a na planktonsku vrstu kopepoda (veslonožaca) i došli su do rezultata da je najviša korištena koncentracija PS od 25 µg/mL uzrokovala značajno smanjenje preživljavanja ispitivane vrste u kroničnom testu toksičnosti. Jedan od najčešće korištenih testova ekotoksičnosti je onaj primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* zbog cijene, jednostavnosti, pouzdanosti i visoke osjetljivosti [118]. Radi se o bakteriji sa svojstvom bioluminiscencije, koje je izravno povezano s disanjem i posljedično staničnim metabolizmom. Stoga, utjecaj toksičnih tvari na metabolizam bakterije izravno utječe na smanjenje emisije svjetlosti što se može pratiti i time odrediti stupanj toksičnosti ispitivane vrste. U testu je korišten filtrat, odnosno vodena faza dobivena prema postupku objašnjenom u poglavlju 3.4.5. Rezultati (**Tablica 4.4.**) su prikazani u obliku postotka inhibicije luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* (INH), vrijednosti efektivne koncentracije EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub>, tj. koncentracije koja izaziva negativan utjecaj na 20 %, odnosno 50 % ispitivane populacije također izraženu u postocima. Što je niža vrijednost EC<sub>20</sub>, odnosno EC<sub>50</sub>, to je i veći toksični učinak ispitivane tvari. Prema dobivenim vrijednostima uočeno je da je najveća inhibicija luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* od 70,62 % postignuta u pokusu T3, a najniže u pokusima T22, T26 i T27, gdje je najniži postotak inhibicije od 12,28 % uočen za T26. Zbog niske toksičnosti za tri navedena pokusa (T22, T26, T27) nije bilo moguće procijeniti EC vrijednosti. Najniže EC<sub>20</sub>, te EC<sub>50</sub> vrijednosti postignute su u pokusima T1, T8, T9 i T19. Prema tome najveći toksični učinak na morsku bakteriju *Vibrio fischeri* postignut je kod pokusa T9 s vrijednostima EC<sub>20</sub> od 0,22 % i EC<sub>50</sub> od 13,30 %. Najmanji toksični učinak postignut je u pokusu T4 s vrijednošću EC<sub>20</sub> od 51,20 %, dok vrijednost EC<sub>50</sub> nije bilo moguće odrediti. Nadalje, dobivene vrijednosti INH, EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub> za pokus T15 ukazuju da je došlo do otpuštanja aditiva s površine PS-a s obzirom da je ispitivani filtrat u određenoj mjeri utjecao na morsku bakteriju *Vibrio fischeri*. Postignuta je vrijednost INH od 24,30 %, EC<sub>20</sub> od 26,53 %, te EC<sub>50</sub> od 31,15 %. To znači da će koncentracija od 26,53 % toksičnih tvari u filtratu

uzrokovati negativan učinak na 20 % ispitivane populacije, odnosno koncentracija od 31,15 % na 50 % ispitivane populacije.

**Tablica 4.4.** Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*.

Pokus	INH / %	EC <sub>20</sub> / %	EC <sub>50</sub> / %
T1	48,95	4,59	18,15
T2	67,47	*	88,50
T3	70,62	28,29	58,48
T4	35,20	51,20	*
T5	48,24	17,36	*
T6	32,84	10,07	*
T7	25,37	18,73	*
T8	48,99	2,38	18,63
T9	43,37	0,22	13,30
T10	58,90	15,02	81,97
T11	39,17	28,57	*
T12	61,50	17,21	78,13
T13	45,55	10,68	29,80
T14	49,11	18,35	*
<b>T15</b>	<b>24,30</b>	<b>26,53</b>	<b>31,15</b>
T16	38,02	15,37	*
T17	33,52	21,31	46,10
T18	48,93	45,45	*
T19	50,45	4,81	25,22
T20	61,89	17,36	54,35
T21	47,99	22,99	*
T22	17,00	*	*
T23	*	*	*
T24	34,07	20,23	*
T25	61,48	26,04	86,96
T26	12,28	*	*
T27	15,59	*	*

\*vrijednost nije bilo moguće odrediti.

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

Matematički i simulacijski modeli važni su alati u istraživanju potencijalnih toksičnih učinaka različitih organskih tvari, jer pomažu u dubljem razumijevanju mehanizma i učinaka djelovanja [119]. Osim otkrivanja toksičnog učinka, mogu se koristiti za ispitivanja biorazgradnje ili bioakumulacije. Razvijeni modeli omogućuju predviđanje ponašanja i učinaka širokog spektra spojeva u različitim okolišnim uvjetima. No, potrebno je uzeti u obzir da postoji više procesnih varijabli koje utječu na proces biorazgradnje i njihova međudjelovanja. Analiza varijance (engl. *ANalysis Of VAriance*, ANOVA) statistička je metoda koja se koristi za određivanje jednakosti za više od dvije srednje vrijednosti populacije [120]. ANOVA daje informacije o razlici između procjene varijance unutar uzorka i između uzoraka. Na temelju F-testa moguće je donijeti zaključak o postojanju, odnosno nepostojanju značajnih razlika unutar, odnosno između populacije. Pokus je proveden prema dizajnu punog faktorskog plana, što znači da se prate odzivi kombinacije svih razina faktora, u ovom slučaju tri faktora na tri razine. Analizom varijance ispitani su utjecaji 3 faktora (pH–vrijednost, broj okretaja rotacijske tresilice i optička gustoća) na proces biorazgradnje MP PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans*. Broj razvijenih kolonija, odnosno logaritamska vrijednost CFU služila je kao odziv procesa, a analiza je provedena pomoću programa *Design Expert*. U **tablici 4.5.** prikazane su eksperimentalne vrijednosti parametara dobiveni ANOVA analizom za biorazgradnju PS-a. Vrijednost  $V_{jv.} > F$  manja od 0,0500 ukazuje da su čimbenici modela značajni, a u ovom slučaju C, odnosno OG je značajan čimbenik modela.

**Tablica 4.5.** Eksperimentalne vrijednosti parametara analize varijance (ANOVA) za proces biorazgradnje MP PS-a bakterijom *Delftia acidovorans*.

	Zbroj kvadrata	df	Srednji kvadrat	F-vrijednost	P-vrijednost Vjv. > F
<b>Model</b>	3,64	9	0,40	11,69	<0,0001
<b>A-pH vrijednost / -</b>	0,024	1	0,024	0,70	0,4143
<b>B-broj okretaja / o/min</b>	$2,939 \cdot 10^{-3}$	1	$2,939 \cdot 10^{-3}$	0,085	0,7741
<b>C-OG / -</b>	3,41	1	3,41	98,55	<0,0001
<b>AB</b>	$8,333 \cdot 10^{-4}$	1	$8,333 \cdot 10^{-4}$	0,024	0,8784
<b>AC</b>	0,069	1	0,069	2,00	0,1757
<b>BC</b>	0,042	1	0,042	1,22	0,2856
<b>A<sup>2</sup></b>	0,039	1	0,039	1,14	0,3001
<b>B<sup>2</sup></b>	0,049	1	0,049	1,42	0,2492
<b>C<sup>2</sup></b>	$1,557 \cdot 10^{-3}$	1	$1,557 \cdot 10^{-3}$	0,045	0,8344
<b>Ostatak</b>	0,59	17	0,035	/	/
<b>Ukupno</b>	4,22	26	/	/	/

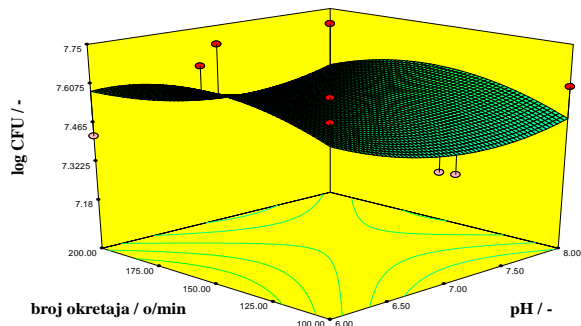
Na **slici 4.6.** prikazani su 3D dijagrami odzivne površine u međuovisnosti čimbenika. Plava boja područja na 3D prikazima označava najmanji utjecaj praćenog parametra na broj razvijenih kolonija, odnosno log CFU. Na **slici 4.6. (a)** gdje je prikazana ovisnost broja okretaja i pH-vrijednosti o log CFU, može se primijetiti da povećanjem broja okretaja i pH-vrijednosti postiže se i veća vrijednost log CFU. Nadalje, na **slici 4.6. (b)** vidljivo je da je prema odzivnoj površini veći utjecaj OG i pH-vrijednosti na CFU vrijednosti u odnosu na broj okretaja i pH-vrijednost. S obzirom na plavo područje na odzivnoj površini može se reći da je OG najviše utjecala na povećanje log CFU. Na **slici 4.6. (c)** koja prikazuje 3D dijagram utjecaja OG i broja okretaja, može se uočiti da je ponovno veći utjecaj na CFU vrijednost imala OG. To je vidljivo i prema boji područja odzivne površine. U konačnici može se zaključiti da je OG imala značajniji utjecaj na broj razvijenih kolonija (CFU) odnosno njezinim povećanjem dolazilo je do porasta broja CFU,

ali njezinu povećanju doprinijele su i veće vrijednosti pH, kao i broja okretaja rotacijske tresilice. Prema tome može se zaključiti da OG ima značajan utjecaj na proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans*.

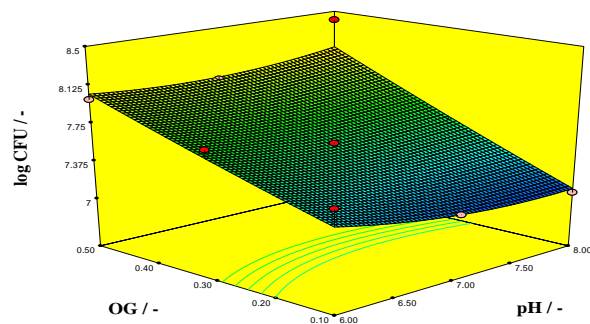
**Tablica 4.6.** Pregled statističkih podataka modela.

$R^2$	0,8609
Prilagođeni $R^2$	0,7872
Predviđeni $R^2$	0,6420
Odgovarajuća preciznost	10,167
Standardna devijacija	0,19
Srednja vrijednost	7,56
Koeficijent varijacije (C.V.%)	2,46
PRESS	1,51

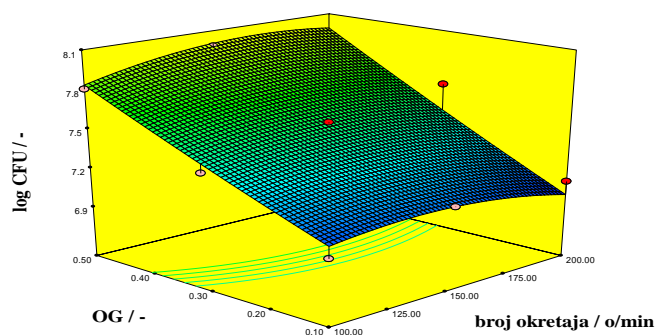
U **tablici 4.6.** dan je pregled statističkih podataka modela.  $R^2$  je koeficijent determinacije, i poželjno je da njegova vrijednost iznosi 1. Što je njegova vrijednost bliže 1, veće je slaganje između očekivanih i eksperimentalnih rezultata, a za ovaj pokus iznosi 0,8609. Vrijednost predviđenog  $R^2$  iznosi 0,6420 i u manjoj mjeri se razlikuje od prilagođenog  $R^2$  koji iznosi 0,7872. Vrijednost odgovarajuće preciznosti, za koju je poželjno da bude veća od 4, je 10,167. Standardna devijacija, koja ukazuje na disperziju vrijednosti podataka, u ovom slučaju iznosi 0,19. Zapravo, što je njena vrijednost manja, manja je i raspršenost podataka.



(a)



(b)



(c)

**Slika 4.6.** 3D prikaz odzivne površine u međuovisnosti čimbenika: AB (pH-vrijednost i broj okretaja) (a), AC (pH-vrijednost i OG) (b) i BC (broj okretaja i OG) (c).

Prema ANOVA analizi vidljivo je da je potrebno kombinirati odgovarajuće vrijednosti sva tri čimbenika kako bi se postigli optimalni uvjeti razgradnje. Uvjeti prikazani u **tablici 4.7.** odnose se na optimalne uvjete provedenog pokusa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Delftia acidovorans*. Na kraju može se reći da će u uvjetima najviše vrijednosti OG (0,5) i pH-vrijednosti (8), te broja okretaja rotacijske tresilice (172,12 o/min) biti najintenzivniji proces biorazgradnje.



**Tablica 4.7.** Optimalni uvjeti za proces biorazgradnje PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* dobiveni pomoću *Design Expert-a*.

pH-vrijednost / -	8
broj okretaja / o/min	172,12
OG / -	0,5

S obzirom da su mikroorganizmi pod snažnim utjecajem pH-vrijednosti okoline, različitim mikrobima odgovara različita pH-vrijednost pri kojoj je aktivnost njihovih enzima maksimalna [121, 122]. Većini mikroorganizama odgovara neutralan pH, pri čemu mnogim bakterijama odgovaraju blago alkalni uvjeti, kao i u ovom slučaju. Raspon pH-vrijednosti koji odgovara rastu bakterijske kulture *Delftia acidovorans* je 5 – 8 [123]. Nadalje, aerobnim bakterijama poput ove potreban je kisik kako bi uspješno razgradile ugljikovodike i iskoristile ih kao izvor energije [124], a to se postiže odgovarajućim brojem okretaja rotacijske tresilice koja osigurava potrebnu koncentraciju otopljenog kisika. U ovom slučaju to je vrijednost između srednje i maksimalne od 172,12 o/min. Dobivena optimalna vrijednost OG, koja se odnosi na koncentraciju bakterija u suspenziji, najviša je vrijednost od 0,5, što je i jasno s obzirom na izazovnu biorazgradnju PS-a gdje je potreban što veći broj bakterija.

## 5. ZAKLJUČAK

Pronalaženje najboljih rješenja u procesima biorazgradnje PS-a sve je veća potreba. PS, kao jedna od najčešće korištenih vrsta plastike, često završava u okolišu. Zbog ranije spomenutih svojstava, poput hidrofobnosti, visoke molekulske mase teško ga je razgraditi. Stoga je potrebno pronaći optimalne uvjete kako bi se sami proces biorazgradnje odgovarajućim bakterijskim kulturama značajno ubrzao i pospješio. Razni matematički i simulacijski modeli važni su alati koji bi mogli pomoći u otkrivanju najboljih rješenja, no postoje i veliki izazovi s obzirom da na proces biorazgradnje utječe više parametara kompleksne međuovisnosti. Cilj ovog rada bio je ispitati optimalne uvjete za proces biorazgradnje MP PS-a primjenom bakterijske kulture *Delftia acidovorans* prema punom faktorskom dizajnu uzimajući u obzir 3 faktora na 3 razine. Tri faktora, odnosno čimbenika koja su uzeta u obzir su pH-vrijednost, broj okretaja rotacijske tresilice i optička gustoća (OG) minimalne, srednje i maksimalne vrijednosti. Pokus je trajao 30 dana tijekom kojih je određivan broj živih stanica bakterija (CFU), koncentracija ugljika (TC, TOC i TIC), te analizirane moguće promjene u strukturi kao i potencijalno otpuštanje aditiva s površine. Sve je trebalo upućivati je li zaista došlo do biorazgradnje korištenih čestica PS-a. Broj živih bakterijskih stanica, CFU određivan tijekom 30 dana pokusa u odgovarajućim vremenskim razmacima, pokazao je da su najviše vrijednosti uglavnom postignute 0. ili 3. dan pokusa, te se nakon toga broj kolonija uglavnom smanjivao. Najviša vrijednost CFU (izuzev za 0. dan) za odabrani pokus T15 postignuta je 21. dan i iznosila je  $2,6 \cdot 10^8$  st/mL. Koncentracije TOC-a za odabrani pokus T15 rasle su nakon 3. dana što se i slaže s rezultatima CFU-a, upućujući da nije dolazilo do značajne biorazgradnje ili da je došlo do otpuštanja aditiva s površine plastike. Ipak da je došlo do određene biorazgradnje pokazale su vrijednosti TIC-a, koje se vezuju uz stvaranje CO<sub>2</sub> kao jednog od produkata biorazgradnje plastike. Koncentracija TIC-a padala je do 7. dana, nakon čega je došlo do porasta do kraja pokusa. LC/MS analizom detektirani su aditivi otpušteni s površine plastike, a ATR-FTIR spektroskopijom dobiveni su spektri koji su pokazali određene promjene u samoj strukturi PS-a. Rezultati ovih analiza bili su pokazatelji da je ipak došlo do određene biorazgradnje MP-a. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* potvrdili su da je došlo do otpuštanja aditiva s obzirom na negativne učinke koji su postignuti praćenjem vrijednosti INH, EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub>. Korišten je dizajn punog faktorskog plana ispitivajući 3 čimbenika na 3 razine i pomoću programa *Design Expert* određeni su optimalni uvjeti za proces

biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Delftia acidovorans*. Kao optimalni uvjeti pokazali su se najveća pH-vrijednost (8), najveća OG (0,5) i broj okretaja rotacijske tresilice od 172,12 rpm. Time je pokazano da kombinacijom pravih čimbenika odgovarajućih vrijednosti može se postići biorazgradnja i onih teško razgradivih polimera.

## 6. LITERATURA

- [1] Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S., Biological degradation of plastics: A comprehensive review, *Biotechnology Advances*, 26(3), 246–265 (2008).
- [2] Varnava, C. K., & Patrickios, C. S., Polymer Networks One Hundred Years after the Macromolecular Hypothesis: A Tutorial Review. *Polymer*, 123322 (2020).
- [3] <https://earth.org/plastic-pollution-statistics/> (pristup 15. lipnja 2023.).
- [4] <https://www.plasticsoupfoundation.org/en/plastic-facts-and-figures/> (pristup 15. lipnja 2023.).
- [5] <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/> (pristup 15. lipnja 2023.).
- [6] <https://www.statista.com/topics/10136/plastic-packaging-industry-worldwide/#topicOverview> (pristup 15. lipnja 2023.).
- [7] Kwon, G., Cho, D. W., Park, J., Bhatnagar A., Song, H., A review of plastic pollution and their treatment technology: A circular economy platform by thermochemical pathway, *Chemical Engineering Journal*, 464 (2023).
- [8] Walker, T. R., Fequet, L., Current trends of unsustainable plastic production and micro(nano)plastic pollution, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 160 (2023).
- [9] Haindongo, N. N. K., Breen, C. J., Neretin, L., Chapter 18 - Emerging contaminants related to plastic and microplastic pollution, *Present Knowledge in Food Safety*, 270-280 (2023).
- [10] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:52018DC0028> (pristup 21. lipnja 2023.).
- [11] <https://ourworldindata.org/plastic-pollution#citation> (pristup 21. lipnja 2023.).
- [12] Li, X., Wang, J., Zhang, T., Yang, S., Sun, M., Qian, X., Wang, T., Zhao, Y., Sustainable catalytic strategies for the transformation of plastic wastes into valued products, *Chemical Engineering Science*, 276 (2023).
- [13] Chigwada, A. D., Tekere, M., The plastic and microplastic waste menace and bacterial biodegradation for sustainable environmental clean-up a review, *Environmental Research*, 231 (2023).

- [14] Thew, C. X. E., Lee, Z. S., Srinophakun, P., Ooi, C. W., Recent advances and challenges in sustainable management of plastic waste using biodegradation approach (review), *Bioresource Technology*, 374 (2023).
- [15] Ukrainczyk, M., Planiranje pokusa u industriji, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 96-105 (2010).
- [16] Antony, J., *Fundamentals of Design of Experiments, Design of Experiments for Engineers and Scientists*, 6–16 (2003).
- [17] Veza, I., Spraggon, M., Fattah, I. M. R., Idris, M., Response surface methodology (RSM) for optimizing engine performance and emissions fueled with biofuel: Review of RSM for sustainability energy transition, *Results in Engineering*, 18 (2023).
- [18] Bahl, S., Dolma, J., Jyot Singh, J., & Sehgal, S., Biodegradation of plastics: A state of the art review, *Materials Today: Proceedings* (2020).
- [19] Pinto da Costa, J., Avellan, A., Mouneyrac C., Duarte, A., Rocha-Santos, T., Plastic additives and microplastics as emerging contaminants: Mechanisms and analytical assessment, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 158 (2023).
- [20] Shrivastava, A., Additives for Plastics. *Introduction to Plastics Engineering*, 111–141 (2018).
- [21] Pires, A., Cuccaro, A., Sole, M., Freitas, R., Micro(nano)plastics and plastic additives effects in marine annelids: A literature review, *Environmental Research*, 214 (2022).
- [22] Filho, W. L., Salvia, A. L., Bonoli, A., Saari, U. A., Voronova, V., Klöga, M., Barbir, J., An assessment of attitudes towards plastics and bioplastics in Europe. *Science of The Total Environment*, 755, 142732 (2021).
- [23] Crawford, C. B., & Quinn, B., Microplastics, standardisation and spatial distribution. *Microplastic Pollutants*, 101–130 (2017).
- [24] Souza Machado, A. A., Kloas, W., Zarfl, C., Hempel, S., Rillig, M. C., Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems, *Glob Change Biol.*, 1405– 1416 (2018).
- [25] Koerner, G. R., Hsuan, Y. G., & Koerner, R. M., The durability of geosynthetics., *Geosynthetics in Civil Engineering*, 36–65 (2007).

- [26] Sastri, V. R., Commodity Thermoplastics, *Plastics in Medical Devices*, 73–119 (2010).
- [27] Massey, L. K., High Impact Polystyrene, *The Effects of UV Light and Weather on Plastics and Elastomers*, 231–238 (2007).
- [28] Satterthwaite, K., Plastics Based on Styrene, *Brydson's Plastics Materials*, 311–328 (2017).
- [29] Peacock, A. J., & Calhoun, A., Polystyrene, *Polymer Chemistry*, 309–323 (2006).
- [30] Zhang, Y., Nedergaard Pedersen, J., Engin Eser, B., Guo, Z., Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme discovery, *Biotechnology Advances*, 60 (2022).
- [31] McKeen, L., Styrenic Plastics, *The Effect of Sterilization on Plastics and Elastomers*, 85–132 (2012).
- [32] <https://www.chemicalsafetyfacts.org/chemicals/polystyrene/> (pristup 26. lipnja 2023.).
- [33] Napper, I. E., Thompson, R. C., Plastic Debris in the Marine Environment: History and Future Challenges, *Glob. Chall.*, 6 (2020).
- [34] Kim, Y. N., Yoon, J. H., Kim, K. H., Microplastic contamination in soil environment – a review, *Soil Science Annual*, 71 (4), 300-308 (2020).
- [35] Melchor-Martínez, E.M., Macías-Garbett, R., Alvarado-Ramírez, L., Araújo, R.G., Sosa-Hernández, J.E., Ramírez-Gamboa, D., Parra-Arroyo, L., Alvarez, A.G., Monteverde, R.P.B., Cazares, K.A.S., et al. Towards a Circular Economy of Plastics: An Evaluation of the Systematic Transition to a New Generation of Bioplastics, *Polymers*, 14 (6), 1203 (2022).
- [36] Florance, I., Chandrasekaran, N., Gopinath, P. M., Mukherjee, A., Exposure to polystyrene nanoplastics impairs lipid metabolism in human and murine macrophages in vitro, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 238, 113612 (2022).
- [37] <https://www.consilium.europa.eu/hr/press/press-releases/2019/05/21/council-adopts-ban-on-single-use-plastics/> (pristup 4. srpnja 2023.).
- [38] Elkhatab, D., Oyanedel-Craver, V., A critical review of extraction and identification methods of microplastics in wastewater and drinking water, *Environmental Science & Technology* (2020).

- [39] Fan, W., Qiu, C., Qu, Q., Hu, X., Mu, L., Gao, Z., Tang, X., Sources and identification of microplastics in soils, 1(2), 100019 (2023).
- [40] Kabir, M. S., Wang, H., Luster–Teasley, S., Zhang, L., Zhao, R., Microplastics in landfill leachate: Sources, detection, occurrence, and removal, Environmental Science and Ecotechnology, 16, 100256 (2023).
- [41] Cheng, Y. L., Zhang, R., Tisinger, L., Cali, S., Yu, Z., Chen, H. Y., Li, A., Characterization of microplastics in sediment using stereomicroscopy and laser direct infrared (LDIR) spectroscopy, Gondwana Research, 108, 22–30 (2022).
- [42] Perumal, K., Muthuramalingam, S., Global sources, abundance, size, and distribution of microplastics in marine sediments - A critical review, Estuarine, Coastal and Shelf Science, 264, 107702 (2022).
- [43] Tirkey, A., Upadhyay, L. S. B., Microplastics: An overview on separation, identification and characterization of microplastics, Marine Pollution Bulletin, 170, 112604 (2021).
- [44] <http://www.phy.pmf.unizg.hr/~atonejc/MATEKAR%203-4%20Spektroskopske%20metode.pdf>, prof. dr. sc. Antun Tonejc, interna skripta, Metode pripreme i karakterizacije materijala.
- [45] Drzeżdżon, J., Jacewicz, D., Sielicka, A., Chmurzyński, L., MALDI-MS for polymer characterization – Recent developments and future prospects, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 115, 121–128 (2019).
- [46] Fu, W., Min, J., Jiang, W., Li, Y., Zhang, W., Separation, characterization and identification of microplastics and nanoplastics in the environment, Science of The Total Environment, 137561 (2020).
- [47] Pourebrahimi, S., Pirooz, M., Microplastic pollution in the marine environment: A review, Journal of Hazardous Materials Advances, 10, 100327 (2023).
- [48] Ita–Nagy, D., Vázquez–Rowe, I., Kahhat, R., Prevalence of microplastics in the ocean in Latin America and the Caribbean, Journal of Hazardous Materials Advances, 5, 100037 (2022).

- [49] Huang, L., Zhang, S., Li, L., Zhang, S., Wang, J., Liu, X., Zhang, W., Research progress on microplastics pollution in polar oceans, *Polar Science*, 36, 100946 (2023).
- [50] Patchaiyappan, A., Dowarah, K., Zaki Ahmed, S., Prabakaran, M., Jayakumar, S., Thirunavukkarasu, C., Devipriya, S. P., Prevalence and characteristics of microplastics present in the street dust collected from Chennai metropolitan city, India, *Chemosphere*, 269, 128757 (2020).
- [51] Leitão, I. A., van Schaik, L., Ferreira, A. J. D., Alexandre, N., Geissen, V., The spatial distribution of microplastics in topsoils of an urban environment – Coimbra city case-study, *Environmental Research*, 218, 114961 (2023).
- [52] Eo, S., Hong, S. H., Song, Y. K., Han, G. M., Seo, S., Shim, W. J., Prevalence of small high-density microplastics in the continental shelf and deep sea waters of East Asia, *Water Research*, 200, 117238 (2021).
- [53] Kye, H., Kim, J., Ju, S., Lee, J., Lim, C., Yoon Y., Microplastics in water systems: A review of their impacts on the environment and their potential hazards, *Heliyon*, 9(3), e14359 (2023).
- [54] Prasittisopin, L., Ferdous, W., Kamchoom, V., Microplastics in construction and built environment, *Developments in the Built Environment*, 15, 100188 (2023).
- [55] Wong, K. H. J., Lee, K. K., Tang, K. H. D., Yap, P.-S., Microplastics in the freshwater and terrestrial environments: Prevalence, fates, impacts and sustainable solutions, *Science of The Total Environment*, 719, 137512 (2020).
- [56] Hitchcock, J. N., Storm events as key moments of microplastic contamination in aquatic ecosystems, *Science of The Total Environment*, 734, 139436 (2020).
- [57] Panno, S. V., Kelly, W. R., Scott, J., Zheng, W., McNeish, R. E., Holm, N., Hoellein, T. J., Baranski, E. L., Microplastic Contamination in Karst Groundwater Systems, *Groundwater*, 57, 189–196 (2019).
- [58] Gatidou, G., Arvaniti, O. S., Stasinakis, A. S., Review on the occurrence and fate of microplastics in Sewage Treatment Plants, *Journal of Hazardous Materials*, 367, 504–512 (2018).



- [59] Van den Berg, P., Huerta-Lwanga, E., Corradini, F., & Geissen, V., Sewage sludge application as a vehicle for microplastics in eastern Spanish agricultural soils, *Environmental Pollution*, 261, 114198 (2020).
- [60] Elgarahy, A. M., Akhdhar, A., Elwakeel, K. Z., Microplastics prevalence, interactions, and remediation in the aquatic environment: A critical review, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 106224 (2021).
- [61] Carbery, M., O'Connor, W., Palanisami, T., Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health, *Environment International*, 115, 400–409 (2018).
- [62] Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., Giorgini, E., Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta, *Environ Int.*, 146, 106274 (2021).
- [63] Van Weert, S., Redondo-Hasselerharm, P. E., Diepens, N. J., Koelmans, A. A., Effects of nanoplastics and microplastics on the growth of sediment-rooted macrophytes, *Science of The Total Environment*, 654, 1040–1047 (2018).
- [64] Kalčíková, G., Žgajnar Gotvajn, A., Kladnik, A., Jemec, A., Impact of polyethylene microbeads on the floating freshwater plant duckweed *Lemna minor*, *Environmental Pollution*, 230, 1108–1115 (2017).
- [65] Jacob, H., Besson, M., Swarzenski, P. W., Lecchini, D., Metian, M., Effects of Virgin Micro- and Nanoplastics on Fish: Trends, Meta-Analysis, and Perspectives. *Environ. Sci. Technol.*, 54(8), 4733–4745 (2020).
- [66] Gu, W., Liu, S., Chen, L., Liu, Y., Gu, C., Ren, H., Wu, B., Single-cell RNA sequencing reveals size-dependent effects of polystyrene microplastics on immune and secretory cell populations from zebrafish intestines, *Environ. Sci. Technol.*, 54, 3417–3427 (2020).
- [67] Qiao, R., Sheng, C., Lu, Y., Zhang, Y., Ren, H., Lemos, B., Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish, *Science of The Total Environment*, 662, 246–253 (2019).

- [68] Yang, H., Xiong, H., Mi, K., Xue, W., Wei, W., Zhang, Y., Toxicity Comparison of nano-sized and micron-sized microplastics to Goldfish *Carassius auratus* Larvae, *Journal of Hazardous Materials*, 388, 122058 (2020).
- [69] Yin, J., Long, Y., Xiao, W., Liu, D., Tian, Q., Li, Y., Liu, C., Chen, L., Pan, Y., Ecotoxicology of microplastics in *Daphnia*: A review focusing on microplastic properties and multiscale attributes of *Daphnia*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249, 114433 (2023).
- [70] Eltemsah, Y.S., Bøhn, T., Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*, *Environmental Pollution*, 254, 112919 (2019).
- [71] [https://en.wikipedia.org/wiki/Daphnia\\_magna](https://en.wikipedia.org/wiki/Daphnia_magna) (pristup 2. srpnja 2023.).
- [72] Wang, L., Nabi, G., Yin, L., Wang, Y., Li, S., Hao, Z., Li, D., Birds and plastic pollution: recent advances, *Avian Research* 12, 59 (2021).
- [73] Lavers, J. L., Hutton, I., Bond, A. L., Clinical pathology of plastic ingestion in marine birds and relationships with blood chemistry, *Environ. Sci. Technol.*, 53, 9224–9231 (2019).
- [74] Roman, L., Lowenstine, L., Parsley, L. M., Wilcox, C., Hardesty, B. D., Gilardi, K., Hindell, M., Is plastic ingestion in birds as toxic as we think? Insights from a plastic feeding experiment, *Science of The Total Environment*, 665, 660–667 (2019).
- [75] Yu, H., Zhang, X., Hu, J., Peng, J., Qu, J., Ecotoxicity of polystyrene microplastics to submerged carnivorous *Utricularia vulgaris* plants in freshwater ecosystems, *Environmental Pollution*, 265, 114830 (2020).
- [76] Jiang, X., Chen, H., Liao, Y., Ye, Z., Li, M., Klobučar, G., Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*, *Environmental Pollution*, 250, 831–838 (2019).
- [77] Wang, X., Zhao, Y., Zhao, L., Wan, Q., Ma, L., Liang, J., Li, H., Dong, J., Zhang, M., Effects of microplastics on the growth, photosynthetic efficiency and nutrient composition in freshwater algae *Chlorella vulgaris* Beij, *Aquatic Toxicology*, 261, 106615 (2023).

- [78] Mao, Y., Ai, H., Chen, Y., Zhang, Z., Zeng, P., Kang, L., Li, W., Gu, W., He, Q., Li, H., Phytoplankton response to polystyrene microplastics: Perspective from an entire growth period, *Chemosphere*, 208, 59–68 (2018).
- [79] Wan, Z., Wang, C., Zhou, J., Shen, M., Wang, X., Fu, Z., & Jin, Y., Effects of polystyrene microplastics on the composition of the microbiome and metabolism in larval zebrafish, *Chemosphere*, 217, 646–658 (2018).
- [80] Singh, S., Kalyanasundaram, M., Diwan, V., Removal of microplastics from wastewater: available techniques and way forward, *Water Sci. Technol.*, 84(12), 3689–3704 (2021).
- [81] Wong, K. H. J., Lee, K. K., Tang, K. H. D., Yap, P.-S., Microplastics in the freshwater and terrestrial environments: Prevalence, fates, impacts and sustainable solutions, *Science of The Total Environment*, 719, 137512 (2020).
- [82] Padervand, M., Lichtfouse, E., Robert, D., Wang, C., Removal of microplastics from the environment. A review, *Environmental Chemistry Letters* (2020).
- [83] Ma, B., Xue, W., Hu, C., Liu, H., Qu, J., Li, L., Characteristics of microplastic removal via coagulation and ultrafiltration during drinking water treatment, *Chemical Engineering Journal*, 359, 159–167 (2019).
- [84] Sundbæk, K. B., Koch, I. D. W., Villaro, C. G., Rasmussen, N. S., Holdt, S. L., Hartmann, N. B., Sorption of fluorescent polystyrene microplastic particles to edible seaweed *Fucus vesiculosus*, *Journal of Applied Phycology* (2018).
- [85] Xie, A., Jin, M., Zhu, J., Zhou, Q., Fu, L., Wu, W., Photocatalytic Technologies for Transformation and Degradation of Microplastics in the Environment: Current Achievements and Future Prospects, *Catalysts*, 13, 846 (2023).
- [86] Wang, L., Kaepler, A., Fischer, D., Simmchen, J., Photocatalytic TiO<sub>2</sub> micromotors for removal of microplastics and suspended matter, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 11, 32937–32944 (2019).
- [87] Zhang, Y., Pedersen, J. N., Eser, B. E., Guo, Z., Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme discovery, *Biotechnology Advances*, 60, 107991 (2022).

- [88] Hodzic, A., Re-use, recycling and degradation of composites, *Green Composites*, 12, 252–271 (2004).
- [89] Singh, P., Singh, V. K., Singh, R., Borthakur, A., Madhav, S., Ahamad, A., Kumar, A., Pal, D. B., Tiwary, D., Mishra, P. K., Bioremediation: a sustainable approach for management of environmental contaminants, *Abatement of Environmental Pollutants*, 1, 1–23 (2020).
- [90] Poznyak, T. I., Chairez Oria, I., Poznyak, A. S., Biodegradation, Ozonation and Biodegradation in Environmental Engineering, 11, 353–388 (2019).
- [91] Bremer, J. R. A., Aerobic and Anaerobic Biodegradation, *J. Ecosys. Ecograph.*, 12(4), 1000325 (2022).
- [92] Chaudhary, A. K., Vijayakumar, R. P., Studies on biological degradation of polystyrene by pure fungal cultures. *Environment, Development and Sustainability* (2019).
- [93] Xiang, P., Zhang, Y., Zhang, T., Wu, Q., Zhao, C., Li, Q., A novel bacterial combination for efficient degradation of polystyrene microplastics, *Journal of Hazardous Materials*, 458, 131856 (2023).
- [94] Espinoza Pinchi, J., Ordoñez Gálvez, J. J., Castañeda Olivera, C., Benites–Alfaro, E., *Environmental Biotechnology: Biodegradation of Microplastics with Larvae of Tenebrio Molitor and Galleria Mellonella*, *Chemical Engineering Transactions*, 93, 187-192 (2022).
- [95] Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., Levin, D. B., Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics, *Front. Microbiol.*, 11, 580709 (2020).
- [96] Kotova, I. B., Taktarova, Y. V., Tsavkelova, E. A., Egorova, M. A., Bubnov, I. A., Malakhova, D. V., Shirinkina, L. I., Sokolova, T. G., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Microbial Degradation of Plastics and Approaches to Make it More Efficient, *Microbiology*, 90, 671–701 (2021).
- [97] Sun, X.-L., Xiang, H., Xiong, H.-Q., Fang, Y.-C., Wang, Y., Bioremediation of microplastics in freshwater environments: A systematic review of biofilm culture, degradation mechanisms, and analytical methods, *Science of The Total Environment*, 863, 160953 (2023).

- [98] Shashoua, Y., Conservation of Plastics – Materials Science, Degradation and Preservation. Elsevier978-0-7506-6495-0 (2008).
- [99] Kyaw, B. M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., Sakharkar, K. R., Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by Pseudomonas Species, Indian Journal of Microbiology, 52(3), 411–419 (2012).
- [100] Zhang, B., Wu, Q., Gao, S., Ruan, Y., Qi, G., Guo, K., Zeng, J., Distribution and removal mechanism of microplastics in urban wastewater plants systems via different processes, Environmental Pollution, 320, 121076 (2023).
- [101] Pan, Y., Gao, S.-H., Ge, C., Gao, Q., Huang, S., Kang, Y., Luo, G., Zhang, Z., Fan, L., Zhu, Y., Wang, A.-J., Removing microplastics from aquatic environments: A critical review, Environmental Science and Ecotechnology, 13, 100222 (2023).
- [102] Shen, M., Xiong, W., Song, B., Zhou, C., Almatrafi, E., Zeng, G., Zhang, Y., Microplastics in landfill and leachate: Occurrence, environmental behavior and removal strategies, Chemosphere, 305, 135325 (2022).
- [103] Kim, H.-W., Jo, J. H., Kim, Y.-B., Le, T.-K., Cho, C.-W., Yun, C.-H., Chi, W. S., Yeom, S.-J., Biodegradation of polystyrene by bacteria from the soil in common environments, Journal of Hazardous Materials, 416, 126239 (2021).
- [104] Ho, B. T., Roberts, T. K., Lucas, S., An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach, Critical Reviews in Biotechnology, 38(2), 308–320 (2017).
- [105] Naz, I., Batool, S. A., Ali, N., Khatoon, N., Atiq, N., Hameed, A., Ahmed, S., Monitoring of growth and physiological activities of biofilm during succession on polystyrene from activated sludge under aerobic and anaerobic conditions, Environmental Monitoring and Assessment, 185(8), 6881–6892 (2013).
- [106] Bisutti, I., Hilke, I., Raessler, M., Determination of total organic carbon – an overview of current methods, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 23(10-11), 716–726 (2004).
- [107] Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B., Whittall, R. M., Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry, Analytica Chimica Acta, 627(1), 71–81 (2008).

- [108] [https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/sccs\\_o\\_257.pdf](https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-08/sccs_o_257.pdf) (pristup 21. travnja 2023.).
- [109] Behairy, A., Abd El-Rahman, G.I., Aly, S. S. H., Fahmy, E. M., Abd-Elhakim, Y. M., Di(2-ethylhexyl) adipate plasticizer triggers hepatic, brain, and cardiac injury in rats: Mitigating effect of Peganum harmala oil, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111620 (2021).
- [110] Saillenfait, A.-M., Sabaté, J.-P., Robert, A., Cossec, B., Roudot, A.-C., Denis, F., Burgart, M., Adverse effects of diisooctyl phthalate on the male rat reproductive development following prenatal exposure, *Reproductive Toxicology*, 42, 192–202 (2013).
- [111] De Toni, L., Tisato, F., Seraglia, R., Roverso, M., Gandin, V., Marzano, C., Padrini, R., Foresta, C., Phthalates and heavy metals as endocrine disruptors in food: A study on pre-packed coffee products, *Toxicology Reports*, 4, 234-239 (2017).
- [112] Xia, Y.-Q., Patel, S., Bakhtiar, R., Franklin, R. B., Doss, G. A., Identification of a new source of interference leached from polypropylene tubes in mass-selective analysis, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(3), 417-421 (2005).
- [113] Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., Ragadhita, R., How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material, *Indonesian Journal of Science & Technology*, 4(1), 97–118 (2019).
- [114] Chen, Y., Wen, D., Pei, J., Fei, Y., Ouyang, D., Zhang, H., Luo, Y., Identification and quantification of microplastics using Fourier Transform Infrared Spectroscopy: current status and future prospects, *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 14-19 (2020).
- [115] Jung, M. R., Horgen, F. D., Orski, S. V., Rodriguez C., V., Beers, K. L., Balazs, G. H., Jones, T. T., Work, T. M., Brignac, K. C., Royer, S.-J., Hyrenbach, K. D., Jensen, B. A., Lynch, J. M., Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms, *Marine Pollution Bulletin*, 127, 704–716 (2018).
- [116] Liu, R., Zhao, S., Zhang, B., Li, G., Fu, X., Yan, P., Shao, Z., Biodegradation of polystyrene (PS) by marine bacteria in mangrove ecosystem, *Journal of Hazardous Materials*, 442, 130056 (2023).

- [117] Lee, K.-W., Shim, W. J., Kwon, O. Y., Kang, J.-H., Size-Dependent Effects of Micro Polystyrene Particles in the Marine Copepod *Tigriopus japonicus*, *Environ. Sci. Technol.*, 47(19), 11278–11283 (2013).
- [118] Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Shar, G. A., Tahir, M. A., Iqbal, M., *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review, *Science of The Total Environment*, 626, 1295–1309 (2018).
- [119] Focks, A., Grisoni, F., Barsi, A., Vighi, M., Predictive Models in Ecotoxicology: Bridging the Gap Between Scientific Progress and Regulatory Applicability, *Integrated Environmental Assessment and Management*, 14(5), 601–603 (2018).
- [120] Molugaram, K., Rao, G. S., ANOVA (Analysis of Variance), *Statistical Techniques for Transportation Engineering*, 451–462 (2017).
- [121] Meng, T. K., Beng, D. Y. Y., Mohd Kassim, A. S., Razak, A. H. A., Mohd Fauzi, N. A., Optimization of Polystyrene Biodegradation using Response Surface Methodology (RSM) Measured by Simple Colorimetric Method, *International Journal of Engineering & Technology*, 7(4.14), 216-220 (2018).
- [122] Hogg, S., *Microbial Nutrition, Growth and Metabolism*, *Essential Microbiology*, John Wiley & Sons, 77–157 (2005).
- [123] Willems, A., The Family Comamonadaceae, *The Prokaryotes*, 777–851 (2014).
- [124] [https://clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/bioremediation/cat/Aerobic\\_Bioremediation\\_\(Direct\)/](https://clu-in.org/techfocus/default.focus/sec/bioremediation/cat/Aerobic_Bioremediation_(Direct)/) (pristup 30. svibnja 2023.).

## 7. POPIS SIMBOLA I OZNAKA

PE – polietilen

PP – polipropilen

PVC – poli(vinil–klorid)

PET – poli(etilen–tereftalat)

PBDE – polibromirani difenil eteri (eng. *Polybrominated Diphenyl Ethers*)

PA – poliamid

PS – polistiren

GPPS – polistiren opće namjene (eng. *General Purpose Polystyrene*)

HIPS – polistiren visoke udarne žilavosti (eng. *High Impact Polystyrene*)

EPS – ekspanzirani polistiren (eng. *Expanded Polystyrene*)

XPS – ekstrudirani polistiren (eng. *Extruded Polystyrene*)

BHT – butilirani hidroksi toluen

DEHA – di(2-etilheksil) adipat

DEHP – di(2-etilheksil) ftalat

DDTDP – didodecil 3,3'-tiodipropionat

MP – mikroplastika

NP – nanoplastika

RSM – metoda odzivne površine (eng. *Response Surface Methodology*)

EU – Europska unija

NOAA – Nacionalna agencija za istraživanje oceana i atmosfere (eng. *National Oceanic and Atmospheric Administration*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija (eng. *Nuclear Magnetic Resonance*)

<sup>1</sup>H NMR – protonska nuklearna magnetska rezonancija (eng. *Proton nuclear magnetic resonance*)

SEM – pretražni elektronski mikroskop (eng. *Scanning Electron Microscopy*)

AFM – mikroskop atomskih sila (eng. *Atomic Force Microscopy*)

NIR – bliska infracrvena spektroskopija (eng. *Near-Infrared Spectroscopy*)

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (eng. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*)



FTIR-ATR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom uz prigušenu totalnu refleksiju (eng. *Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared*)

$\mu$ -FTIR – mikro-infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (eng. *Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

LDIR – laserska infracrvena spektroskopija (eng. *Laser direct infrared*)

SERS – površinski pojačana Ramanova spektroskopija (eng. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*)

EDS – energijski razlučujuća rendgenska spektrometrija (eng. *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*)

SIMS – sekundarna ionska masena spektrometrija (eng. *Secondary Ion Mass Spectrometry*)

TOF-SIMS – vrijeme proleta SIMS (eng. *Time-Of-Flight SIMS*)

MALDI-MS – matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)

GC-MS – plinska kromatografija–masena spektrometrija (eng. *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*)

Py-GC/MS – masena spektrometrija pirolizne plinske kromatografije (eng. *Pyrolysis–Gas Chromatography–Mass Spectrometry*)

LC/MS – tekućinska kromatografija masene spektrometrije (eng. *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*)

TGA – termogravimetrijska analiza (eng. *Thermogravimetric Analysis*)

DSC – diferencijalna pretražna kalorimetrija (eng. *Differential Scanning Calorimetry*)

XPS – rendgenska fotoelektronska spektroskopija (eng. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*)

ROS – reaktivni spojevi kisika (eng. *Reactive Oxygen Species*)

HA – hranjivi agar

MM – mineralni medij

P – povećanje mikroskopa

$m$  – masa tvari [g]

CFU – broj živih stanica bakterija (eng. *Colony Forming Units*)

$w$  – maseni udio [%]

$M$  – molarna masa [g/mol]

$\rho$  – gustoća [kg/m<sup>3</sup>]

$\lambda$  – valna duljina [m]

OG – optička gustoća

TC – ukupni ugljik (eng. *Total Carbon*)

TOC – ukupni organski ugljik (eng. *Total Organic Carbon*)

TIC – ukupni anorganski ugljik (eng. *Total Inorganic Carbon*)

EC<sub>20</sub> – efektivna koncentracija koja izaziva negativan utjecaj na 20 % ispitivane populacije [%]

EC<sub>50</sub> – efektivna koncentracija koja izaziva negativan utjecaj na 50 % ispitivane populacije [%]

INH – inhibicija [%]

R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije (eng. *R-Squared*)

C.V. – koeficijent varijacije [%]

## 8. ŽIVOTOPIS

Katarina Zovko [REDACTED] Nakon završetka osnovne škole u Mostaru, pohađala je srednju školu Gimnazija Mostar. Godine 2017. upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Kemija i inženjerstvo materijala. Tijekom studija obavila je stručnu praksu na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Obranivši završni rad pod naslovom „Kemijski aditivi prisutni u plastici“, 2021. god. stekla je zvanje sveučilišne prvostupnice inženjerka kemijskog inženjerstva. Iste godine upisala je diplomski studij, smjer Kemija i inženjerstvo materijala.