

Bioremedijacija vode onečišćene mikroplastikom primjenom bakterija izoliranih iz okoliša

Miloloža, Martina

Doctoral thesis / Doktorski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:506315>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Martina Miloloža

**BIOREMEDIJACIJA VODE ONEČIŠĆENE
MIKROPLASTIKOM PRIMJENOM BAKTERIJA
IZOLIRANIH IZ OKOLIŠA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Martina Miloloža

**BIOREMEDIATION OF WATER POLLUTED WITH
MICROPLASTICS BY BACTERIA ISOLATED FROM
THE ENVIRONMENT**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Martina Miloloža

**BIOREMEDIJACIJA VODE ONEČIŠĆENE
MIKROPLASTIKOM PRIMJENOM BAKTERIJA
IZOLIRANIH IZ OKOLIŠA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

prof. dr. sc. Šime Ukić

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Martina Miloloža

**BIOREMEDIATION OF WATER POLLUTED WITH
MICROPLASTICS BY BACTERIA ISOLATED FROM
THE ENVIRONMENT**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

prof. dr. sc. Šime Ukić

Zagreb, 2023

Bibliografska stranica

- ❖ Bibliografski podaci:
- ❖ UDK: 628.35:678.5:502/504(043.3)
- ❖ Znanstveno područje: tehničke znanosti
- ❖ Znanstveno polje: kemijsko inženjerstvo
- ❖ Znanstvena grana: zaštita okoliša u kemijskom inženjerstvu
- ❖ Institucija: Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za industrijsku ekologiju
- ❖ Voditelji rada: izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, prof. dr. sc. Šime Ukić
- ❖ Broj stranica: 214
- ❖ Broj slika: 52
- ❖ Broj tablica: 28
- ❖ Broj priloga: 0
- ❖ Broj literaturnih referenci: 451
- ❖ Datum obrane: 14. prosinca 2023.
- ❖ Sastav povjerenstva za obranu: prof. dr. sc. Hrvoje Kušić
izv. prof. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović
dr. sc. Vlatka Filipović Marijić, znan. savj.

- ❖ Rad je pohranjen u:
Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Marulićev trg 20.

Tema rada prihvaćena je na 246. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj 24. svibnja 2021., te odobrena na 3. redovitoj sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj 16. studenog 2021. u 353. akademskoj godini (2021./2022.).

ZAHVALE

Od srca se zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić, na mentoriranju tijekom izrade ovoga doktorskoga rada. Hvala na svim razgovorima i usmjerenjima. Hvala na svojoj podršci i savjetima. Hvala, Dajana, što si imala strpljenja i razumijevanja za mene, posebice u meni težim razdobljima tijekom izrade ovoga doktorskoga rada. Hvala što si svojim primjerom rada pozitivno utjecala na mene i motivirala me. Također se od srca zahvaljujem i mentoru, prof. dr. sc. Šimi Ukiću, na svim savjetima i usmjerenjima. Hvala Vam na prenesenom znanju, razumijevanju i strpljenju koje ste imali za mene tijekom izrade ovoga doktorskoga rada. Izuzetno mi je drago što sam imala mentore poput Vas tijekom ovoga razdoblja.

Hvala prof. dr. sc. Hrvoju Kušiću na ugodnoj suradnji i pruženoj podršci. Zahvaljujem se i dr. sc. Vlatki Filipović Marijić, znan. savj. na ohrabrenjima i savjetima. Hvala i izv. prof. dr. sc. Vesni Očelić Bulatović na svim savjetima i podršci tijekom izvedbe ovoga rada.

Zahvaljujem se djelatnicima Zavoda za industrijsku ekologiju na kojem je rad i izrađen. Posebice se zahvaljujem i svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju. Hvala Vam za podršku, prihvaćanje i razumijevanje. Bilo je vrlo ugodno raditi s Vama.

Zahvaljujem se svim djelatnicima spin of tvrtke Comprehensive Water Technology, CWT, na ustupljenim uređajima za analize i raspoloživosti te ugodnoj atmosferi rada.

Hvala Marijani na svakome bržem rješenju kojim mi je pomogla, savjetima i neizmjerne pomoći pri izradi ovoga doktorskoga rada.

Hvala Kristini na bezuvjetnoj pomoći, bezbrojnim razgovorima i saslušanjima. Hvala za brigu i razumijevanje. Hvala za prijateljstvo!

Hvala Mrkiju, Krkiju i Veky koje su bile neizmjerne podrška, uvijek spremne pomoći, ali i za stvaranje ugodne atmosfere. Uz vas je sve bilo ljepše i lakše!

Hvala svim članovima moje obitelji, kao i mojim prijateljima, bilo na direktnoj i/ili indirektnoj pomoći i strpljenju sa mnom tijekom izrade ovoga doktorskoga rada. Anamarija i Ines, hvala vam na pomoći i podršci.

Hvala dragome Bogu na svemu!



Ovaj doktorski rad izrađen je uz financijsku pomoć Hrvatske zaklade za znanost u sklopu projekta Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike (AdWaTMiR; IP-2019-04-9661).

POSVETA

*Ovaj doktorski rad i sav uloženi trud posvećujem svome prerano preminulom tati,
Jozi Miloloži. Hvala mu na svemu!*

Sažetak

Mikroplastika (MP) je onečišćujuća tvar koja izaziva zabrinutost znanstvene zajednice zbog svoje sveprisutnosti u okolišu. Izvori MP-a su brojni, a izloženost vodenih organizama sve veća, što dovodi do potrebe procjene rizika. Kako MP ne bi negativno utjecala na vodene organizme, potrebno ju je ukloniti iz okoliša, a jedan od perspektivnih postupaka je bioremedijacija primjenom bakterija, kvasaca, plijesni ili mješovitog konzorcija.

U ovoj disertaciji najprije su provedeni testovi ekotoksičnosti za pet vrsta MP-a: polietilen (PE), polipropilen (PP), polistirena (PS), poli(vinil-klorid) (PVC) i poli(etilen-tereftalat) (PET), na mikroalge rodova *Chlorella* i *Scenedesmus*, bakteriju *Pseudomonas putida* te kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. PS i PVC MP pokazali su najveći toksični utjecaj na testne organizme, a najosjetljiviji je bio *Saccharomyces cerevisiae*.

Provedena su i istraživanja bioremedijacije vode onečišćene MP-om primjenom bakterija *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*, izoliranih iz okoliša obogaćenog MP-om. Pri tome je preliminarno ispitan utjecaj sedam parametara: koncentracije (50 – 1000 mg/L) i veličine (100 – 700 µm) MP čestica, broja okretaja rotacijske tresilice (100 – 200 o/min), pH medija (6 – 8), temperature medija (15 – 25 °C), optičke gustoće (0,1 – 0,5) te dodatka glukoze (0 – 100 mg/L). Statističkom analizom za svaki polimer odabrana su tri najznačajnija čimbenika te je na njima provedena optimizacija biorazgradnje.

Kod tretmana bakterijom *Bacillus cereus* utvrđeno je da su tri statistički najznačajnija parametra u biorazgradnji PS MP-a veličina i koncentracija MP-a te broj okretaja rotacijske tresilice (optimalno {413,29 µm; 66,20 mg/L; 100,45 o/min}). Kod tretmana PVC MP-a značajnim su se pokazali veličina i koncentracija MP-a te optička gustoća (optimalno {400,00 µm; 658,40 mg/L; 0,40}).

Analiza biorazgradnje MP-a bakterijom *Bacillus subtilis* ukazala je na značajnost veličine MP-a, broja okretaja tresilice i optičke gustoće kod biorazgradnje PS MP-a (optimalno {440,65 µm; 162,12 o/min; 0,50}), dok su kod PVC MP-a to bili pH medija, broj okretaja tresilice i optička gustoća (optimalno {8,00; 200 o/min; 0,50}).

Za biorazgradnju PS MP-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes* značajnim su se pokazali broj okretaja tresilice, veličina MP čestica i optička gustoća (optimalno {161,08 o/min; 334,73 μ m; 0,35}), a kod biorazgradnje PVC-a to su bili pH medija, koncentracija MP-a i optička gustoća (optimalno {8,00; 50,00 mg/L; 0,50}).

Konačno, kod biorazgradnje bakterijom *Delftia acidovorans* dobiveni su isti značajni parametri za PS MP i PVC MP. To su pH medija, broj okretaja tresilice i optička gustoća (optimalni uvjeti {7,99; 104,93 o/min; 0,46}, odnosno {8,00; 200,00 o/min; 0,50}).

Prema navedenom, primijenjene bakterijske kulture izolirane iz okoliša imaju sposobnost razgradnje MP-a.

Ključne riječi: mikroplastika, ekotoksičnost, bakterije, biorazgradnja

Abstract

Microplastics (MP) is a pollutant of concern in the scientific community due to its ubiquity in the environment. The sources of MP are numerous and exposure to aquatic organisms is increasing, so a risk assessment is needed. To ensure that MP does not have adverse effects on aquatic organisms, it must be removed from the environment, and one of the most promising methods is bioremediation with bacteria, yeasts, molds, or a mixed consortium.

In this dissertation, ecotoxicity tests were first conducted for five types of MP: polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS), poly(vinyl-chloride) (PVC), and poly(ethylene-terephthalate) (PET) with microalgae of the genera *Chlorella* and *Scenedesmus*, the bacterium *Pseudomonas putida*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. PS and PVC MP showed the highest ecotoxic effects on the test organisms, and *Saccharomyces cerevisiae* was the most sensitive.

Studies on bioremediation of MP contaminated water were also performed with the bacteria *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* and *Delftia acidovorans* isolated from the MP enriched environment. The influence of seven parameters was pre-tested: concentration (50 – 1000 mg/L) and size (100 – 700 μm) of particles of MP, agitation speed of the rotary shaker (100 – 200 rpm), pH of the medium (6 – 8), temperature of the medium (15 – 25 $^{\circ}\text{C}$), optical density (0.1 – 0.5) and addition of glucose (0 – 100 mg/L). The three most significant parameters were selected for each polymer by statistical analysis, and biodegradation optimization was performed based on these parameters.

For the treatment with the bacterium *Bacillus cereus*, it was found that the three most statistically significant parameters for the biodegradation of PS MP were the size and concentration of MP and the agitation speed of the rotary shaker (optimum {413.29 μm ; 66.20 mg/L; 100.45 rpm}). For the treatment of PVC MP, the size and concentration of MP and the optical density (optimum {400.00 μm ; 658.40 mg/L; 0.40}) were found to be significant.

Analysis of the degradation of MP by the bacterium *Bacillus subtilis* showed that the size of MP, the agitation speed of the rotary shaker, and the optical density were significant for the biodegradation of PS MP (optimal {440.65 μm ; 162.12 rpm; 0.50}), while for PVC MP it was

the pH of the medium, the number of agitation speed of the rotary shaker, and the optical density (optimal {8.00; 200 rpm; 0.50}).

For biodegradation of PS MP by *Pseudomonas alcaligenes*, the number of agitation speed of the rotary shaker, the size of the MP particles, and the optical density (optimal {161.08 rpm; 334.73 μm ; 0.35}) were significant, while for biodegradation of PVC, the pH of the medium, the MP concentration, and the optical density (optimal {8.00; 50.00 mg/L; 0.50}) were significant.

Finally, in the biodegradation by the bacterium *Delftia acidovorans*, the same significant parameters were obtained for PS MP and PVC MP. These were the pH of the medium, the agitation speed of the rotary shaker and the optical density (optimal conditions {7.99; 104.93 rpm; 0.46} and {8.00; 200.00 rpm; 0.50}, respectively).

Accordingly, the bacterial cultures, isolated from the environment, are capable of degrading MP.

Key words: microplastics, ecotoxicity, bacteria, biodegradation

SADRŽAJ:

1	UVOD.....	1
2	OPĆI DIO	3
2.1	Proizvodnja plastike	3
2.1.1	Vrste plastike.....	4
2.1.2	Korištenje aditiva za proizvodnju plastike.....	8
2.2	Mikroplastika	11
2.2.1	Izvori mikroplastike u okolišu.....	12
2.2.2	Koncentracije mikroplastike u okolišu	15
2.3	Metode identifikacije mikroplastike	17
2.3.1	Vizualna identifikacija	17
2.3.2	Skenirajuća elektronska mikroskopija	18
2.3.3	Infracrvena spektroskopija uz Fourierovu transformaciju	18
2.3.4	Ramanova spektroskopija	21
2.3.5	Kromatografske metode.....	21
2.4	Ekotoksikološke studije utjecaja mikroplastike	23
2.4.1	Ekotoksikološke studije na <i>Vibrio fischeri</i>	31
2.4.2	Ekotoksikološke studije na mikroalgama	32
2.4.3	Ekotoksikološke studije na <i>Daphnia magna</i>	33
2.4.4	Ekotoksikološke studije na ribama	34
2.4.5	Ekotoksikološke studije procjene kumulativnog utjecaja.....	36
2.5	Metode uklanjanja mikroplastike iz okoliša.....	36
2.5.1	Bioremedijacija	37
2.5.2	Potencijal rodova <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> i <i>Delftia</i> u bioremedijaciji okoliša.....	49
2.6	Modeliranje	51
3	EKSPERIMENTALNI DIO.....	55
3.1	Materijali.....	55
3.1.1	Otopine i reagensi.....	55
3.1.2	Plastični polimeri	56
3.2	Aparatura.....	56
3.1.2	Mikroorganizmi.....	57
3.1.3	Mediji i podloge	59

3.2	Metode praćenja biorazgradnje	63
3.3	Opis eksperimentalnog rada.....	65
3.3.1	Priprema mikroplastike.....	65
3.3.2	Testovi ekotoksičnosti mikroplastike	67
3.3.3	Izolacija i identifikacija bakterija i gljiva iz okolišnih uzoraka obogaćenih mikroplastikom.....	70
3.3.4	Pokusi biorazgradnje mikroplastika primjenom bakterija	72
3.3.5	Modeliranje odzivnih površina.....	78
3.3.6	Modeliranje bakterijskoga rasta pomoću Gompertz modela.....	80
4	REZULTATI	82
4.1	Testovi toksičnosti za mikroplastiku primjenom mikroalgi, bakterije i kvasca	82
4.2	Izolacija i identifikacija bakterija i gljiva iz okolišnih uzoraka obogaćenih mikroplastikom.....	91
4.3	Pokusi biorazgradnje mikroplastika primjenom bakterija	94
4.3.1	Preliminarni (screening) pokus biorazgradnje	94
4.3.2	Modeliranje bakterijskoga rasta pomoću Gompertz modela.....	112
5	RASPRAVA	117
5.1	Testovi toksičnosti za mikroplastiku primjenom mikroalgi, bakterije i kvasca	118
5.2	Izolacija i identifikacija bakterija i gljiva iz okolišnih uzoraka obogaćenih mikroplastikom.....	131
5.3	Pokusi biorazgradnje mikroplastika primjenom bakterija	134
5.3.1	Preliminarni (screening) pokus biorazgradnje	134
5.3.2	Glavni pokus biorazgradnje	136
6	ZAKLJUČAK.....	156
7	LITERATURA	160
8	POPIS POKRATA.....	207
	ŽIVOTOPIS	210
	POPIS OBJAVLJENIH RADOVA	211

1 UVOD

Globalna proizvodnja plastike raste od 1950-ih. Najveći proizvođač je Kina s 29,4 % svjetske proizvodnje [1], a najviše se proizvode materijali od polietilena (PE), polipropilena (PP), poli(vinil-klorida) (PVC), poli(etilen-tereftalata) (PET), poliuretana (PUR) i polistirena (PS) [2]. Proizvodnja plastike je ekonomična, a dobiveni proizvodi imaju izvrsna svojstva. Plastika ima iznimno široku primjenu i ogroman značaj u svakodnevnom životu, no sukladno tome, generira se i velika količina plastičnog otpada. Nažalost, čovječanstvo zasad jako loše gospodari plastičnim otpadom. Primjerice, 2015. godine reciklirano je samo 9 % globalnog plastičnog otpada, 12 % je spaljeno, a 79 % odloženo na odlagališta ili nepropisno odloženo [2]. S obzirom na to, ne čudi da mnoge zemlje pokušavaju regulirati ili smanjiti proizvodnju plastike. Nažalost, čini se da su provedene mjere još uvijek nedostatne i ne mogu donijeti opipljive rezultate na globalnoj razini: naime, svjetska proizvodnja plastike porasla je u razdoblju od 2018. do 2021. s 359 na 391 milijun tona godišnje [3]. Ipak, u pojedinim zemljama, uglavnom onim razvijenim, mogu se uočiti blage naznake pozitivnih trendova. Tako je u istom razdoblju Europska unija (EU) smanjila proizvodnju plastike za 6,31 %. Prema ECHA (*The European Chemicals Agency*) strategiji za plastiku [4], EU je predložila ograničenje upotrebe dodane mikroplastike u proizvodima za potrošačku i/ili komercijalnu upotrebu. Upravo je prisutnost mikroplastike u okolišu jedan od značajnijih problema u kontekstu onečišćenja okoliša plastikom.

Mikroplastika (MP) je skupni naziv za plastične čestice veličinom manje od 5 mm, iako je naziv pomalo pogrešan budući se mikro kao prefiks obično koristi za opisivanje mnogo manjih objekata. MP je postala predmet znanstvenog i javnog interesa zbog sveprisutnosti u okolišu, ali i teške razgradivosti jer potiče uglavnom od komercijalno najzastupljenijih polimera koji su izrazito postojani. Pronađena je u različitim vrstama okoliša, kao što su oceani i mora [1,5], slatkovodni sustavi [6,7], tla [8] i sedimenti [6,9], vode iz slavine [10,11], flaširane vode [12], pa čak i u nekim namirnicama poput meda i šećera [13], morske soli i piva [11], te plodova mora [14]. Velik dio MP-a dopijeva u okoliš iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda (UPOV) [15]. U UPOV-ima se uklanja do 95 % MP-a, ali preostalih 5 % je još uvijek značajna količina [16]. Uz to, izdvojenih 95 % MP-a zaostaje u aktivnom mulju kojeg je također potrebno zbrinuti. Nakon što dospije u okoliš, MP može negativno utjecati na organizme, osobito u slučaju unosa.

Naime, moguće je otpuštanje aditiva iz MP-a [17], a neki od njih, poput ftalata ili bisfenola A, imaju izražen štetni potencijal [18]. Nadalje, na površini čestica MP-a mogu se adsorbirati različiti mikroorganizmi, uključujući i patogene, ili pak druge onečišćujuće tvari iz okoliša [19,20], pa gutanjem MP čestica organizmi unose i druge štetne subjekte. Konačno, može doći i do bioakumulacije MP-a u organizmima [21]. Ekotoksikološke studije vezane za MP-a provode se na različitim testnim organizmima [22,23]. Uočeni su razni štetni učinci, kao što su inhibicija rasta, smanjenje fotosinteze, neurotoksičnost, oksidativni stres, poremećaji metabolizma, oštećenje crijeva, pogoršanje vidnog i imunološkog sustava, abnormalno kretanje, smanjena reproduktivnost, poremećaji u radu endokrinog sustava, pa čak i smrtnost [22,24-27]. Stoga je vrlo važno provoditi strategije prevencije i sanacije onečišćenja okoliša koje će omogućiti: i) minimaliziranje ili potpunu eliminaciju daljnjeg unosa MP-a u okoliš i ii) razvoj učinkovitih metoda uklanjanja MP-a iz već onečišćenih ekosustava.

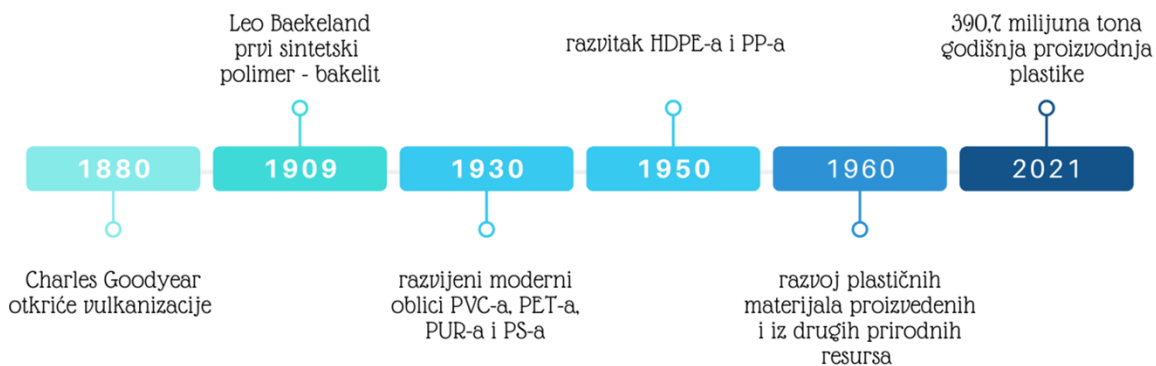
Strategije remedijacije sustava onečišćenih MP-om uključuju različite pristupe: i) fizikalne, kao što su adsorpcija [28] ili filtracija [29], ii) fizikalno-kemijske, poput koagulacije [30], iii) kemijske korištenjem fotokatalitičke razgradnje [31] ili iv) biološke korištenjem aktivnog mulja [32]. Svaki od ovih pristupa ima svoje prednosti i nedostatke. Stoga se različite metode remedijacije često kombiniraju kako bi se postigla bolja učinkovitost uklanjanja ili povećala isplativost procesa. Primjerice, metode sorpcije i filtracije učinkovitije su u kombinaciji s biorazgradnjom [33].

Ovaj doktorski rad usmjeren je na biološke metode uklanjanja MP-a iz slatkovodnih ekosustava. Poznato je da neke bakterije poput *Bacillus cereus* [34], *Rhodococcus ruber* [35], *Pseudomonas aeruginosa* [36] i *Pseudomonas citronellolis* [37] imaju sposobnost biorazgradnje MP-a. Stoga se proučavala biorazgradnja PS i PVC MP-a primjenom bakterija koje su izolirane iz okoliša obogaćenog MP-om. Dobiveni su optimalni uvjeti biorazgradnje na osnovu kojih je moguće predložiti strategiju remedijacije voda onečišćenih PS i PVC MP-om.

2 OPĆI DIO

2.1 Proizvodnja plastike

Začetak korištenja plastike je 1800. razvojem tehnologije proizvodnje gume. Naime, Charles Goodyear otkrio je proces vulkanizacije kojim se kaučuk pretvarao u trajni i elastični materijal [38]. Prvi sintetski polimer koji je ušao u masovnu proizvodnju bio je bakelit, fenol-formaldehidna smola koju je 1909. razvio belgijski kemičar Leo Baekeland [39]. U ranim pedesetim razvijen je polietilen visoke gustoće (HDPE) i PP, a šezdesetih godina 19. stoljeća napredak u inženjerstvu materijala doveo je do razvoja plastičnih materijala proizvedenih i iz drugih prirodnih resursa [40], poput bakterijske fermentacije šećera i lipida, a pritom su se dobili polihidroksialkanoati (PHA), polilaktidi (PLA), alifatski poliesteri i polisaharidi [41]. 30-ih godina 20. st. razvijeni su moderni plastični polimeri PVC, PET, PUR i PS, koji su se sve više obrađivali [39]. Vremenski slijed razvoja plastične proizvodnje prikazan je na slici 1.



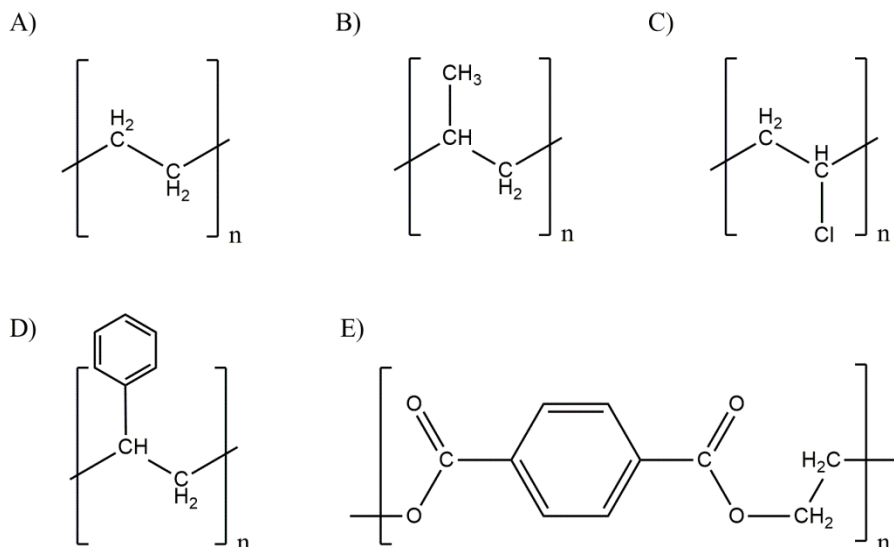
Slika 1. Prikaz vremenskog tijeka razvoja proizvodnje plastike.

Plastika je jeftin, lagan, jak, izdržljiv, na koroziju otporan materijal, s dobrim svojstvima toplinske i električne izolacije. Zbog raznolikosti svojih svojstava koristi se za dobivanje brojnih proizvoda koji donose medicinski i tehnološki napredak, uštedu energije i brojne društvene koristi. Gotovo svi aspekti svakodnevnog života uključuju plastične proizvode; transport, telekomunikacije, odjeća, obuća, kao i ambalažni materijali koji olakšavaju transport i skladištenje širokog spektra hrane, pića i druge robe [41]. Samim time, nije neobično što se proizvodnja plastike eksponencijalno povećala te je s oko 0,5 milijuna tona 1950. godine došla na razinu od preko 367 milijuna tona 2020. godine. Danas, industrija proizvodnje plastike samo u Europi ima promet veći od 330 milijuna eura i zapošljava oko 1,6 milijuna ljudi [42]. No zbog

neadekvatnog zbrinjavanja plastičnog otpada, procjenjuje se da na globalnoj rezini 10 % plastike završi u vodenom okolišu [43]. Naime, odlaganje plastičnog otpada na odlagališta otpada još uvijek je u zemljama u razvoju najjednostavnija i isplativa opcija. Spaljivanje se smatra učinkovitom alternativom, no problem je negativni utjecaj štetnih tvari koje se ispuštaju u atmosferu. Mehaničko sortiranje i recikliranje su poželjniji postupci zbrinjavanja plastičnoga otpada, ali fizikalno-kemijska svojstva većine plastičnih materijala se nakon više ciklusa recikliranja ozbiljno naruše [44].

2.1.1 Vrste plastike

Plastika je izraz koji potječe od grčke riječi *plastikos* što znači prikladan za oblikovanje [45]. Koristi se za širok raspon sintetskih polimera velike molekulske mase. U globalnoj proizvodnji plastike dominiraju sljedeće polimeri: PP (21 %), PE niske gustoće (LDPE) (18 %), PVC (17 %), HDPE (15 %), PS i ekspanzirani PS (8 %), PET (7 %, isključujući PET vlakna) te PUR [46]. Plastični polimeri se ne koriste samo za proizvode široke potrošnje, već i za izradu sintetskih vlakana, pjena, premaza, ljepila i brtvila koji imaju razne primjene. U Europi se najviše plastike koristi u proizvodnji ambalaže (38 %), zatim u građevinarstvu (21 %), automobilske industriji (7 %), te električnom i elektroničkom sektoru (6 %), a najčešći su: PE, PP, PVC, PS i PET [47,48] (slika 2). Ovi polimeri posjeduju specifična svojstva dana u tablici 1.



Slika 2. Prikaz kemijskih struktura: A) polietilena, B) polipropilena, C) poli(vinil-klorida), D) polistirena i E) poli(etilen-tereftalata).

Tablica 1. Svojstva plastičnih polimera koji se najviše proizvode.

Polimer	PE	PP	PVC	PS	PET
Gustoća / g cm ⁻³	0,91-0,97 [48,49]	0,85-0,94 [49]	1,38 [49]	0,96-1,05 [49]	1,34-1,39 [49]
	0,91-0,92 (23/24°C) [50]	0,89-0,92 [48] 0,94-0,97 (23/24°C) [50]	1,30-1,58 [48] 1,35-1,45 (23/24°C) [50]	1,04-1,05 [49] 0,90-0,91 (23/24°C) [50]	1,29 [48] 1,03-1,09 (23/24°C) [50]
Vrelište / °C	90-110 [51] 98-130 [48]	168-175 [48]	115-245 [52]	ataktičan - / izotaktičan - 240 sindiotaktičan - 270 [53]	245 [48]
Staklište / °C	-25 [48]	-10 [48] -20 [53]	75-105 [48] 80-85 [53]	74-105 [48] >80 [53]	73 [48] 70 [53]
Vlačna čvrstoća / MPa	8-32 [48]	31-41 [48]	41-52 [48]	36-52 [48]	48 [48]
Stupanj kristalnosti / %	45-95 [49] 50 [50]	50-80 [49] 65 [53] 50 [50]	visok [49] 5-15 [53] 0 [50]	nizak [49] 0 [50]	visok [53] 30-40 [54] 0-50 [50]
log K _{ow}	6,1 (HDPE) 5,9 (LDPE) [47]	6,0 [47]	5,7 [47]	3,7 [47]	2,7 [47]
Vrijeme razgradnje / god	10-600 [50]	10-600 [50]	50-100 [50]	50-80 [50]	450 [50]

Polietilen

PE je homopolimer koji se sastoji od dugih ugljikovodičnih lanaca etilen monomera (C₂H₄)_n (slika 2A), a primjenjuje se za razne proizvode, poput plastičnih vrećica, boca za mlijeko, vodu, šampone ili motorna ulja, igrački, ambalaže za hranu, cijevi za navodnjavanje i drenažu, te raznih medicinskih i kozmetičkih proizvoda [51,55]. Otporan je na koncentrirane kiseline, lužine i mnoga organska otapala. PE je lagan, viskoelastičan i termoplastičan materijal koji ako se stalno zagrijava, postaje mekan i može se plastično oblikovati. PE se klasificira kao: i) PE ultra visoke molekulske mase (UHMWPE), PE visoke molekulske mase (HMWPE) ili PE ultra niske molekulske mase (ULMWPE), ii) PE visoke gustoće (HDPE), linearni PE visoke gustoće (HDLPE), PE srednje gustoće (MDPE), linearni PE niske gustoće (LLDPE), PE niske gustoće (LDPE) ili PE vrlo niske gustoće (VLDPE) te iii) klorirani PE [51].

PE je dobar električni izolator, niske tvrdoće, krutosti i tališta, te visoke čvrstoće na udar. Ima manju gustoću u usporedbi s vodom (tablica 1), stoga je uobičajeno njegovo prisustvo u površinskim slojevima vodenih ekosustava [47]. S obzirom na brojne primjene ovog polimera u svakodnevnom životu, nije iznenađujuće da je najčešća MP u slatkovodnim ekosustavima upravo PE MP [48]. Vrlo je postojan u okolišu zbog nereaktivnih C–C i C–H veza, velike molekulske

mase, hidrofobnosti (omogućuje mu sorpciju na sediment ili aktivni mulj [47]) i nedostatka funkcionalnih skupina koje su dio strukture koji mikroorganizmi najprije enzimatski razgrađuju [56].

Polipropilen

PP je kristalni termoplastični polimer s metilnom grupom na svakoj podjedinici polimernog lanca (slika 2B): prisutnost metilne grupe poboljšava mehanička svojstva i toplinsku otpornost. PP je, također, vrlo dobar električni izolator. Nadalje, PP je vrlo otporan na vodu, anorganske kemikalije, a pri sobnoj temperaturi i na organska otapala i maziva, pa se za potrebe razgradnje uglavnom koriste jaki oksidansi [57]. Visoko talište čini ga pogodnim materijalom za skladištenje raznih proizvoda [58]. Sukladno tome, ima brojne primjene kao materijal za pakiranje, za medicinsku i elektroničku opremu, proizvodnju namještaja, tekstilnu, automobilsku i industriju dječjih igračaka [47,51,55,59,60]. Prema dostupnim podacima, PP zauzima 30 % proizvedene plastike [58].

PP ima različite strukturne izomere: izotaktičke, sindiotaktičke i ataktičke. Visok stupanj taktičnosti (izo- ili sindio-) osigurava veću kristalnost, bolja mehanička svojstva i kemijsku stabilnost. Nizak stupanj taktičnosti povezan je s manjom tvrdoćom, čvrstoćom, gustoćom, krutosti, stabilnosti i fluidnosti taline. Izotaktički PP ima veći stupanj kristalnosti od druga dva izomera te je stoga manje osjetljiv na biorazgradnju. Komercijalni PP je približno 90 % izotaktičan uz 60 – 70 % kristalnosti [57]. Hidrofobna površina i visoka molekulska masa ograničavaju biorazgradnju PP-a [50]. Adicija hidrofilnih skupina na polimernu površinu PP-a putem fizikalnih ili kemijskih procesa olakšala bi vezivanje mikroorganizama [61].

Poli(vinil-klorid)

Kemijskom formulom $(C_2H_3Cl)_n$ (slika 2C) je označen termoplast PVC, koji sadrži heteroatom klora (56,77 % klora) na svakom drugom C atomu polimernog lanca. Dobiva se slobodno-radikalnim procesima u suspenziji, emulziji ili u masi. Nakon PE najkorišteniji je sintetski polimer za proizvodnju različitih oblika plastike. Upotreba PVC-a u Europi samo za pakiranje prelazi 500 000 tona godišnje [55]. Glavni razlog tome je njegova izdržljivost i dobra električna svojstva. PVC se u različitim oblicima koristi za žice i kablove te izradu fleksibilnih podova. S obzirom na to da je kemijski inertan, vrlo se često koristi kod proizvodnje cijevi

[58,62]. PVC je nezamjenjiv u proizvodnji medicinske opreme (vrećice za krv, kadice za katetere, kirurške rukavice) te zidne i podne obloge [60]. Također se koristi u građevinske svrhe, za cjevovode, izolacije električnih kabela, dovratnika i prozora [47,55]. PVC dolazi u dva oblika: i) kruti koji se koristi za pakiranje hrane, farmaceutskih i medicinskih proizvoda, te ii) fleksibilni koji se zbog svoje rastezljivosti koristi, primjerice, kao folija za zamatanje hrane [57]. Hrana pakirana u PVC ambalaži može trajati dulje zadržavajući svoj okus jer je PVC izvrsna barijera za vodu i kisik. Nadalje, PVC je otporan na kemikalije, ali vrlo osjetljiv na fotorazgradnju [47]. PVC je poznati polimer s iznimnom otpornošću na biorazgradnju, što predstavlja ekološki rizik.

Polistiren

PS je termoplastični polimer amorfne strukture s fenilnim prstenom povezanim na svakom drugom C atomu polimernog lanca (slika 2D). Karakteriziraju ga visoka prozirnost, trajnost, čvrstoća, izdržljivost, te se lako može obojati [47,57]. Prvi puta je sintetiziran u obliku ekspanziranih i ekstrudiranih pjena komercijalno poznatih kao stiropor. Sinteza se vrši slobodno-radikalnim procesima u suspenziji, otapalu ili polimerizacijom u masi. PS ima slaba mehanička svojstva pa se često provodi kopolimerizacija zbog čega materijal u konačnici poprima kvalitetna svojstva. Uobičajen primjer je kopolimer s akrilonitrilom ili uz dodatak butadiena. Masovna proizvodnja PS-a provodi se katalitičkim dehidriranjem etilbenzena, što dovodi do stvaranja stirenskih monomera. Primjenu nalazi kao materijal za pakiranje, zdjele, poklopce i posude, krute ladice, igračke, za izradu CD-a itd [55,57,58,63,64]. Njegov pjenasti oblik je niske gustoće (pluta na površini vode) i može se reciklirati [65]. Globalna proizvodnja PS-a u 2013. iznosila je oko 21 Mt [63], a proizvodi se u četiri oblika: i) PS opće namjene (eng. *general purpose PS*; GPPS), ii) PS visokog utjecaja (eng. *high impact PS*; HIPS), iii) PS pjena te iv) ekspanzirana PS pjena (EPS) [63,65].

Poli(etilen-tereftalat)

PET je prozirni i bezbojni termoplastični polukristalni polimer (slika 2E) s djelomično alifatskom i aromatskom strukturom, a od velikog je komercijalnog značaja zbog svoje primjene područjima poput tekstila, ambalaže, građevine, automobilske industrije i biomedicine [55,57,66]. Dobra je alternativa za staklo pa se koristi za proizvodnju boca/posuda za pića [57] što je njegova najpoznatija primjena. Dobra mehanička i termička svojstva, kao i niska cijena

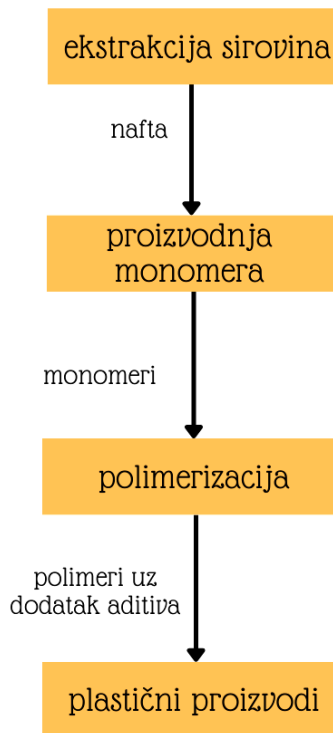
njegove su prednosti. Osim toga, lako se obrađuje, ima visoku kemijsku otpornost te dobra barijerna svojstva [67]. Nadalje, čisti PET pokazuje otpornost na bojanje i razne reagense pa nije podložan promjenama boje koje su uobičajene zbog učestalog unosa pića i hrane [58,68]. PET je, uz PE, jedan od glavnih materijala za pakiranje hrane. U tekstilnoj industriji se obično koristi kao: i) vlaknasta punila u izoliranoj odjeći, namještaju i jastucima, ii) fini filamenti u umjetnoj svili te iii) filamenti velikog promjera u proizvodnji tepiha [57,66]. Onečišćenje okoliša PET-om je problematično zbog visoke trajnosti i niske biorazgradivosti PET-a. Kao PP i PS, PET ima hidrofobnu površinu, čime se smanjuje učinkovita adsorpcija mikroorganizama i pristup hidrolitičkih enzima (hidrolaze, lipaze, esterase i kutinaze) potrebnih za razgradnju polimera [69].

2.1.2 Korištenje aditiva za proizvodnju plastike

Za proizvodnju plastičnih proizvoda koriste se odgovarajući polimeri uz dodatak prikladnih aditiva (slika 3). Aditivi su kemijski spojevi koji se dodaju u svrhu poboljšanja svojstava i funkcionalnosti polimera. Dije se u 4 kategorije [46]:

- funkcionalni aditivi (stabilizatori, antistatici, usporivači plamena, plastifikatori, maziva, sredstva za klizanje, sredstva za stvrdnjavanje, sredstva za pjenjenje, biocidi),
- bojila (pigmenti, topiva azo bojila),
- punila (glina, kalcijev karbonat, barijev sulfat, azbest, staklene mikrokuglice) i
- pojačivači (staklena i ugljična vlakna).

Od nabrojanih aditiva, plastičnim polimerima se najviše dodaju plastifikatori, od 10 do 70 % (w/w), a najčešće se koriste za poboljšanje fleksibilnosti, trajnosti i rastezljivosti polimernih filmova. Smanjuju smicanje tijekom miješanja u proizvodnji polimera, poboljšavaju otpornost na udarce u proizvedenoj plastičnoj foliji, te daju materijalu ljepljivo svojstvo, odnosno svojstvo prijanjanja. U plastifikatore se ubrajaju klorirani parafini, ftalati te adipati (eng. *adipate*). Najvažniji su ftalni esteri, kao što je di(2-etilheksil) ftalat, koji čini oko 80 % plastifikatora prilikom PVC proizvodnje [46,70], a dodaje se u svrhu poboljšanja fleksibilnosti i trajnosti. Općenito, kruti PVC sadrži manje od 10 % plastifikatora (w/w), dok fleksibilni PVC može sadržavati do 70 % plastifikatora (w/w) [70].



Slika 3. Shematski prikaz koraka tijekom proizvodnje plastičnih proizvoda.

Među ostalima češće korištenim plastifikatorima su dioktil ftalat, dibutil ftalat, heptil oktil adipat i heksandiol adipat. Nadalje, usporivači plamena se dodaju u rasponu 0,7 – 25 % (w/w). Dijele se u tri grupe: i) organski nereaktivni usporivači (fosfatni esteri, halogenirani fosfatni esteri i halogenirani ugljikovodici), ii) anorganski nereaktivni usporivači (antimonov oksid, aluminijev oksid trihidrat, cinkov borat, amonijev ortofosfat, amonijev sulfamat) te iii) reaktivni usporivači plamena (halogenirani fenoli, anhidrid ftalne kiseline, fosfonatni esteri, dibromoneopentil alkohol). Dodatak stabilizatora, antioksidansa i UV stabilizatora ovisi o kemijskoj strukturi, kako aditiva tako i polimera, ali okvirni raspon njihova dodatka je 0,05 – 3 % (w/w). Veći udjeli navedenih aditiva se dodaju prilikom proizvodnje HIPS-a, dok su manji udjeli potrebni za LLDPE i HDPE [46]. Svrha antioksidansa je odgoda oksidativne razgradnje plastike prilikom izloženosti UV svjetlu. U ove se svrhe primjenjuju fenoli i organofosfiti, dok su arilamini najčešće korišteni antioksidansi u plastičnim ambalažama za hranu. Za sprječavanje toplinske razgradnje polimera prilikom izloženosti povišenim temperaturama, služe toplinski stabilizatori (0,5 – 3 % (w/w)). Generalno, stabilizatori topline se dijele na primarne i sekundarne. Primarni obuhvaćaju mješavine metalnih soli, organokositrene spojeve i spojeve

olova, a u sekundarne se ubrajaju alkilni organofosfiti, epoksi spojevi i beta diketoni. Neke vrste polimera, primjerice PVC, zahtijevaju dodatak stabilizatora topline u svrhu zadržavanja njihove funkcionalnosti, dok LDPE i poliamidi mogu zadržati stabilnost unatoč izloženosti toplini i bez dodatka stabilizatora topline. Amidi i esteri viših masnih kiselina te metalni stereati se ubrajaju u sredstva za klizanje koja utječu na smanjenje površinskog koeficijenta trenja plastike. Nadalje, u svrhu postizanja obojenosti dodaju se bojila (u okvirnom rasponu 0,25 – 5 % (w/w)). Biocidi, spojevi bazirani na Sn, Hg, As, Cu i Sb, dodaju se u niskom postotku (0,001 – 1 % (w/w)), i to najviše u fleksibilni PVC i pjenasti PUR. Među aditivima navodi se i titanijev dioksid, koji se ubraja u anorganske pigmente. Punila mogu imati udio i do 50 %, dok je udio pojačivača od 15 do 30 % (w/w). Nadalje, u novije se doba dodaju i tzv. nanoaditivi, kojima se postiže povećanje specifične aktivne površine te poboljšanje reoloških, mehaničkih, termalnih i električnih svojstava polimera. Izvrsna svojstva proizvedenih polimera se postižu dodavanjem nanoaditiva u niskim koncentracijama [44]. Potrebno je naglasiti da aditivi najčešće nisu kemijski vezani za polimer. Reaktivni organski aditivi, kao što su usporivači plamena, polimeriziraju s molekulama plastike i postaju dio polimernog lanca [46]. Također treba napomenuti da se tvari koje se koriste u proizvodnji plastike (zaostali monomeri, međuprodukti, katalizatori) ne smatraju aditivima.

Većina polimera proizvedena je imajući na umu dugoročnu stabilnost te nije predviđeno da se lako razgrađuju. Dodatna stabilnost postiže se dodatkom aditiva. Nažalost, aditivi se mogu otpustiti iz plastičnih proizvoda čime postaju štetni po okolinu. Neki od potencijalno toksičnih aditiva su: ftalati, bromirani usporivači plamena, bisfenol A i njegove modifikacije, spojevi bazirani na teškim metalima (Pb, Sn i Cd), formaldehid i acetaldehid, metil *terc*-butil eter i drugi. Stoga je potrebno provoditi istraživanja otpuštanja aditiva iz plastičnih proizvoda. Otpuštanje aditiva može se podijeliti u četiri glavna koraka, koja su prikazana kao primjer za materijale u kontaktu s hranom: i) difuzija aditiva kroz polimernu masu, ii) desorpcija aditiva s površine polimera, iii) adsorpcija aditiva na površini hrane i iv) difuzija aditiva u hrani [71]. Otpuštanje organskih aditiva ovisi o veličini molekule aditiva. Naime, male molekule se u pravilu otpuštaju brže, dok spojevi s velikom molekulskom masom imaju sporu stopu otpuštanja. Početna koncentracija aditiva u plastici, debljina, kristalnost te površinska struktura plastike, čimbenici su koji utječu na brzinu otpuštanja aditiva iz plastike.

2.2 Mikroplastika

S obzirom na veličinu čestica plastika se dijeli na: *nanoplastiku* ($< 1 \mu\text{m}$) *mikroplastiku* ($< 0,5 \text{ cm}$), *mezoplastiku* ($0,5 - 5 \text{ cm}$), *makroplastiku* ($5 - 50 \text{ cm}$) i *megoplastiku* ($> 50 \text{ cm}$) [72]. Od 1970-tih, interes znanstvene zajednice usmjeren je na istraživanje manjih čestica plastike mikroplastike (MP) (slika 4). MP čestice se, osim po sastavu, dijele i prema boji i obliku. Prema obliku dijele se na fragmente, filmove, kuglice, pelete, pjenaste oblike i vlakna [73,74]. S obzirom na izvor nastanka, postoji primarna i sekundarna MP [61]. Primarna MP je ona koja je proizvedena u navedenoj veličini, najčešće kao dodatak sredstvima za osobnu higijenu i kozmetičkim proizvodima (eng. *personal care and cosmetic products*) (pasta za zube, pilinzi za lice, gelovi za tuširanje i slično). Mikroplastika koja nastaje raspadom većih čestica plastike pod utjecajem fizikalnih, kemijskih i/ili bioloških utjecaja naziva se sekundarnom MP [75].



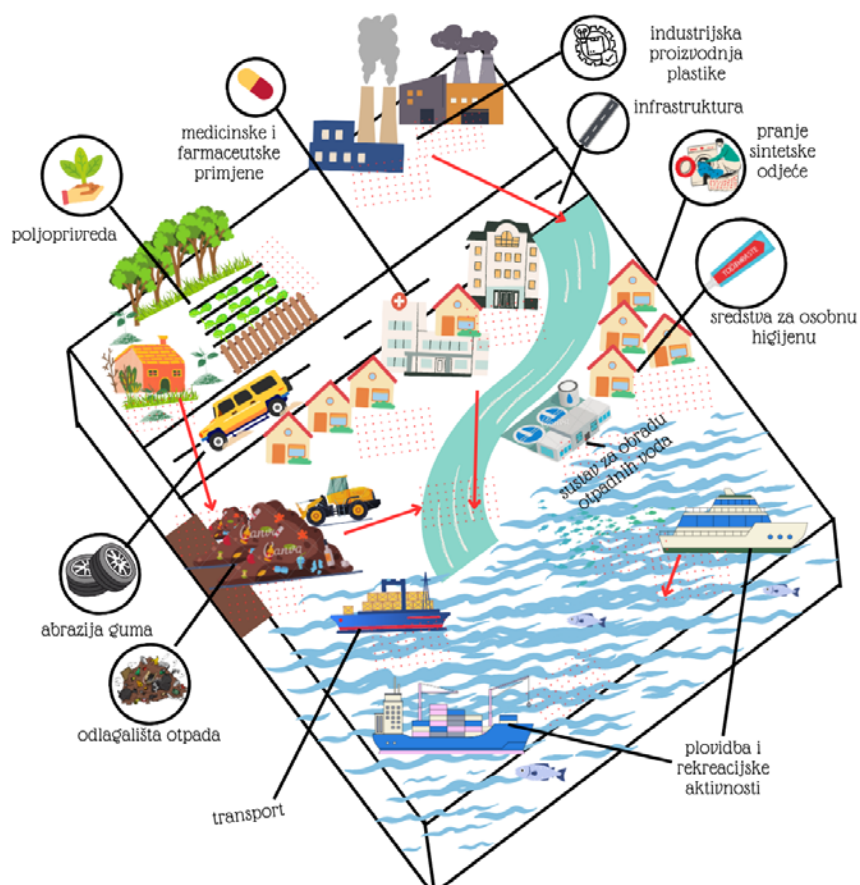
Slika 4. Prikaz čestica mikroplastika različitog oblika i boje na ljudskoj ruci.

Primarna se MP-a najviše upotrebljava u sredstvima za osobnu higijenu, što je i uočeno izolacijom čestica MP-a iz takvih proizvoda. Naime, pronađene čestice u sredstvima za čišćenje lica/pilingu i pastama za zube bile su najvećim dijelom okruglog oblika te obojene. Raspon veličina čestica pronađenih u pasti za zube je bio između 3 i 145 μm , dok je 10 – 178 μm iznosio za čestice izolirane iz sredstava za čišćenje lica/pilingu. Najčešće pronađene vrste MP-a bile su LDPE i PP u svim sredstvima za čišćenje lica/pilingu, dok je LDPE najčešće prisutan u pasti za zube [76]. Nadalje, PE čestice pronađene su u sredstvima za čišćenje lica prosječne veličine $313 \pm 130 \mu\text{m}$, ali i u gelovima za tuširanje veličine $422 \pm 185 \mu\text{m}$ [77]. Prema procjenama, oko 39 tona MP-a dopiye u okoliš s obzirom na korištenje sredstva za osobnu higijenu na području Kine

[77], dok se 4360 tona MP-a koristi u proizvodnji sredstava za osobnu higijenu prema procjenama za Europu [78]. I primarna i sekundarna MP zaostaju u okolišu, ali sekundarna MP-a je učestalija [79]. Veličine čestica koje su najčešće pronađene u okolišu su u rasponu 400 – 1000 μm [80].

2.2.1 Izvori mikroplastike u okolišu

Izvori primarne MP uključuju namjerno proizvedene čestice MP za proizvode poput tekstila, kozmetike, te elektroničke opreme [81-83]. Većina njih ulazi u okoliš kroz otpadne vode nastale tijekom faza proizvodnje ili korištenja (slika 5).



Slika 5. Prikaz izvora mikroplastike u okolišu.

Izvori sekundarne MP uključuju razbijanje većih plastičnih fragmenata, kao što su plastične vrećice, boce ili ribarske mreže unesene u okoliš, a razgradnja se odvija uslijed UV zračenja, fizičke abrazije, kemijske oksidacije i biorazgradnje [81,82,84,85]. Poljoprivreda je

jedna od glavnih ulaznih izvora MP-a u okolišu [86], osobito uslijed primjene anaerobnog digestata ili kanalizacijskog mulja, gnojiva/komposta, sredstva za poboljšanje tla (plastificirana gnojiva) i vinilnih obloga [87]. LDPE folije, koje se koriste u velikim količinama za zaštitu usjeva, suzbijanje korova, povećanje temperature i zadržavanje vode u tlu, mogu se razgraditi u male fragmente i završiti u tlu ili vodnim resursima kroz kanale za navodnjavanje. EPS pahuljice i PUR pjena koriste se u hortikulturi za poboljšanje kvalitete tla, odnosno kao dodatak za kompostiranje [75,78,88]. Međutim, značajne količine MP-a potječu iz raznih industrija, primjerice proizvodnje plastike i farmaceutske industrije (preko otpadnih voda ili plastičnih ostataka) te kućanstava (vlakna od pranja sintetske odjeće, korištenje sredstava za osobnu higijenu). Jednom ispuštena u okoliš, MP se može transportirati vjetrom, oborinama isprati s kopna u površinske vode i mora [47,59,79,82,89,90]. Industrijske i komunalne otpadne vode također su među glavnim izvorima MP-a, koji sadrže sintetička vlakna [91]. Naime, Browne i suradnici [92] kvantificirali su da se tijekom jednog pranja sintetske odjeće oslobađa više od 1900 PES vlakana. Stoga se otpadne vode koje sadrže MP trebaju pročišćavati prije ispuštanja u okoliš. Nažalost, porazna je činjenica da se svega oko 60 % komunalnih otpadnih pročišćava [93]. Osim toga, UPOV-i, koji se obično temelje na jedinicama za primarnu i sekundarnu obradu, nisu dizajnirani za uklanjanje MP-a. Tercijarni tretman, uključujući dezinfekciju, nije obavezan i nije relevantan za uklanjanje MP-a. Nakon primjene primarne obrade, uključujući uklanjanje materijala koji pluta ili lako sedimentira gravitacijom, otpadna voda može sadržavati više od 20 % MP-a [94]. Sekundarni tretman je biološki tretman aktivnim muljem u kojem zajednica mikroorganizama ima ključnu ulogu u uklanjanju onečišćujućih tvari iz otpadne vode. Iako učinkovitost uobičajenih UPOV-a doseže 95 % uklonjenosti MP-a, veliki dio uklonjenih MP čestica zaostaje u aktivnome mulju [94]. Općenito, UPOV-i nisu učinkoviti u uklanjanju čestica manjih od 10 μm [79]. Čestice ovih veličina zaostaju u izlaznoj struji i posljedično se ispuštaju u prirodne vodene sustave. Osim što je mogući prijenos MP-a iz izlaznih struja iz UPOV-a, dodatne količine MP-a u okoliš dopijevaju i s obzirom na odlaganje aktivnoga mulja. Naime, godišnje se na poljoprivredna zemljišta odloži približno 4 do 5 Mt aktivnog mulja [95]. Nadalje, nepravilnim zbrinjavanjem plastičnoga otpada na odlagališta otpada, također, MP-a dopijeva u okoliš, a gibanjem zračnih masa čestice se prenose zrakom te preko procjednih voda mogu prodrijeti u dublje dijelove tla i/ili podzemne vode. Na ovo se nadovezuju ne samo tehnološka

rješenja, već i zakonodavna pitanja. Primjerice, aktualna Direktiva 91/271/EEC [96] ne razmatra praćenje MP-a u pročišćenim otpadnim vodama ili aktivnom mulju.

Prema navedenom, čestice MP-a su prisutne u svim sastavnicama okoliša. Ipak, od početaka razvijanja svijesti o onečišćenju okoliša (mikro)plastikom, najveći naglasak je stavljen na onečišćenje morskog okoliša.

U svrhu smanjenja unosa plastike u okoliš, Europski je parlament 2019. donio *Direktivu o plastici za jednokratnu upotrebu i ribolovnoj opremi* [97]. Ova Direktiva promiče kružno gospodarstvo koje daje prednost održivim i netoksičnim proizvodima koji se mogu ponovno uporabiti (eng. *reusable products*), a ne proizvodima za jednokratnu upotrebu. Iako opseg ove Direktive ne obuhvaća MP, indirektno potiče na ograničeno korištenje iste (i za proizvođače i za potrošače). Direktivom se uveo čitav niz proaktivnih mjera. Naime, zabranjeno je korištenje plastičnih proizvoda za jednokratnu upotrebu za koje postoje alternative – vatirani štapići, pribor za jelo, tanjuri, slamke, štapići za balone, kao i šalice te posude za hranu i piće napravljeni od EPS-a. Uvedene su mjere za smanjenje potrošnje plastične ambalaže za hranu i piće uz posebno označavanje pojedinih proizvoda.

Povećana je odgovornost proizvođača koji pokrivaju troškove zbrinjavanja otpada, a primjenjuje se na proizvode kao što su filteri za cigarete i ribolovna oprema. Postavljen je i relativno ambiciozan cilj da se prikupljanje plastičnih boca vrši odvojeno, i to u iznosu od 77 % do 2025., a čak 90 % do 2029. Uz to, zahtjeva se uvođenje čepova dizajniranih na način da ostaju spojeni na boce. Također, cilj je da se 25 % reciklirane plastike uključi u proizvodnju PET boca do 2025., te 30 % u sve plastične boce do 2030. [97]. Zaključno, postavljeni su propisi zabrane proizvodnje/prodaje i upotrebe primarne MP (primjerice mikrozrnca). Međutim, budući veliki udio prisutne MP u okolišu otpada na sekundarnu MP, nužno je predložiti i implementirati adekvatne zakone koji bi se znatno smanjili količinu MP-a u okolišu i time reducirali njen utjecaj na okoliš. Potrebno je poduzeti mjere kojima bi se poticali proizvođači i korisnici da usvoje princip kružnog gospodarstva „smanji – uporabi – recikliraj“ (eng. *Reduce – Reuse – Recycle*), jer on predstavlja isplativ način smanjenja količine plastičnog otpada i čestica MP koji dospijevaju u okoliš [98].

2.2.2 Koncentracije mikroplastike u okolišu

Koncentracije MP-a u okolišu izražavaju se kao broj čestica MP-a po volumenu vodenog medija, te po kg suhe ili vlažne tvari za tlo i sediment [47]. Iako je točna količina plastike koja ulazi u morski okoliš još uvijek nepoznata, s obzirom na svjetske podatke o čvrstom otpadu i korištenjem gustoće naseljenosti, gruba je procjena da godišnje oko 4,8 do 12,7 Mt MP s kopna ulazi u oceane [46,99]. MP u mora dopijeva preko različitih ljudskih djelatnosti i na kopnu i u moru. Iz površinskih sustava te prilikom ljudskih aktivnosti na kopnu većina čestica MP dopijevaju u mora te oceane (čak 80 %), dok manji dio dopijeva u mora kao posljedica aktivnosti na moru – plovidba, ribarenje te rekreacijske aktivnosti (20 %). S obzirom na navedeno, MP je pronađena u moru, površinskim vodama, plažama, sedimentu, gradskim estuarijima, izlaznim strujama iz sustava za obradu otpadnih voda, pa čak i u arktičkome ledu [47] (tablica 2). Neke zabilježene koncentracije MP-a u oceanima iznosile su vrlo niskih 0,34 čestica/m³ [100] do vrlo visokih 1,0·10⁵ čestica/m³ [101]. Oko 94 % plastike pronađene u sjeveroistočnom dijelu Atlantskog oceana otpada na MP, dok je učestalost pojave MP-a u Tihom oceanu 96 % [102]. Istraživanja pokazuju da su vlakna i čestice nepravilnog oblika najčešći oblici MP-a u oceanima uz učestalost i do 80 % [100]. Istraživanje Sredozemnog mora pokazalo je da su 87,7 % – 93,2 % MP-a čestice nepravilnog oblika, dok je 2,0 % granula [103]. Na arktičkome ledu vlakna su najzastupljenija (95,0 %), a slijede ih čestice nepravilnog oblika (4,9 %) [100]. PE, PP i PS globalno su najčešći plastični otpad u površinskim vodama [104].

Što se tiče površinskih vodenih sustava, maksimalna koncentracija MP-a u obalnim vodama Švedske iznosila je 1,0·10⁵ čestica/m³. Uočena maksimalna koncentracija MP-a iznosi 3,3·10³ čestice/kg_{ST} (kg izražen po suhoj tvari sedimenta) u uzorku morskog sedimenta u blizini industrijske luke u Švedskoj [81]. U površinskim vodama SAD-a maksimalno je pronađeno 4,7·10⁵ čestica/km², a u uzorku sedimenta u Njemačkoj koncentracija je 64,0 čestica/kg_{ST} [47]. Nadalje, dokumentirana je i koncentracija MP-a od 4,1·10³ čestica/m³ u estuariju rijeke Yangtze [105], te je u izlaznoj struji iz UPOV-a u Sloveniji procijenjena vrijednost za PE od 13,9 mg/m³ [106]. Većinom se na plažama pronalazi MP s učestalošću od 0,03 % [75]. Najučestalije pronađene čestice su PE (85 %) i PP (14 %) [75]. Nadalje, procjenjuje se da godišnje rijekom Dunav u Crno more dopije 530 – 1500 tona MP [107]. Čestice MP-a su pronađene i u ostalim većim europskim rijekama, kao što su Rajna, Majna te Sena. Istraživanja na obalama Rajne i Majne pokazala su prisutnost velike količine MP-a različitih oblika i sastava (najviše PE, PP i

PS) [108]. Ovime se potvrđuje da su koncentracija i sastav MP-a koja se nalazi u sedimentu riječne obale usporedive s onima za sedimente morskih staništa.

Čestice MP-a mogu se otpuhati s površina odlagališta ili nepravilno odloženog plastičnog otpada te ostati u zraku. Vrlo male čestice ili vlakna mogu se širiti i zrakom te naknadno slijegati na tlo [95,109]. Istraživanja su pokazala da se MP može naći u zraku kako u otvorenim, tako i zatvorenim prostorima [110]. Koncentracija čestica MP-a u zraku u otvorenim prostorima je u rasponu < 1 i > 1000 MP/m³, dok je koncentracija MP-a u zraku u otvorenim prostorima u rasponu od < 1 do 1583 MP/m³. Prema vrsti MP-a, najčešće su pronađene čestice PE, PP i PET. Treba istaknuti da se udisanje čestica i vlakana MP-a smatra zdravstvenim rizikom [110].

Tablica 2. Prikaz koncentracija mikroplastike u okolišu.

Područje	Koncentracija mikroplastike	Literatura
Sjeverozapadni Atlantik	$6,7 \cdot 10^4$ čestica/km ²	[111]
Tihi ocean	9 180 čestica/m ³	[112]
Sjeverni Mediteran	135 čestica/m ²	[113]
Jadransko more	$4,1 \cdot 10^5$ čestica/km ²	[114]
Arktik	38 – 234 čestice/m ³ leda	[115]
Dunav, Austrija	141,7 čestica/m ³	[116]
Rajna, Njemačka	$3,9 \cdot 10^6$ čestica/km ²	[117]
Jezero Geneva, Francuski dio	$4,8 \cdot 10^4$ čestica/km ²	[118]
Jezero Hovsgol, Mongolija	$2,0 \cdot 10^4$ čestica/km ²	[119]
Jezero Winnipeg, Kanada	$1,9 \cdot 10^5$ čestica/km ²	[120]
Laurentinska Velika Jezera, SAD	$4,7 \cdot 10^5$ čestica/km ²	[121]
Gradska površinska voda, Kina	8925 čestica/m ³	[122]
Estuarij rijeke Yangtze, Kina	$4,1 \cdot 10^3$ čestica/m ³	[105]
17 pročištača otpadnih voda, SAD	izlazna struja: 50,0 čestica/m ³	[123]
Pročištač otpadnih voda, Finska	ulazna struja: $9,0 \cdot 10^5$ čestica/m ³ izlazna struja: $3,5 \cdot 10^3$ čestica/m ³	[16]
Pročištač otpadnih voda St. Petersburg, Rusija	ulazna struja: $1,6 \cdot 10^5$ čestica/m ³ izlazna struja: $7,0 \cdot 10^3$ čestica/m ³	[124]
7 pročištača otpadnih voda, Nizozemska	ulazna struja: $7,3 \cdot 10^4$ čestica/m ³ izlazna struja: $5,2 \cdot 10^4$ čestica/m ³	[125]
Sediment, jezero Garda, Italija	1108 čestica/kg suhe tvari	[126]
Plaža, Malta	$> 1 000$ čestica/m ²	[127]

Prema navedenom pregledu koncentracija MP-a u okolišu (tablica 2), može se uočiti različita sudbina čestica MP-a. Svojstva kao što su veličina, gustoća i oblik čestica su važni čimbenici koji utječu na sudbinu, ponašanje i prijenos MP-a u okolišu [74]. Naime, hidrogeološki utjecaji poput gibanja vodenih struja, gibanja zračnih masa te ispiranja tla, pospješuju širenje MP-a [79]. Koncentracije MP-a u okolišu ovise o vrsti polimera i karakteristikama okoliša, klimatskim uvjetima te naravno stupnju razvoja i standardu života

društva koje naseljava neko područje [127]. Ulaskom u izvore slatke vode, MP može plutati na površini vode, biti suspendirana u vodnom stupcu ili sedimentirati na dno. Navedeno ovisi o gustoći MP-a. Čestice niske gustoće plutaju, dok one s većom gustoćom sedimentiraju [75]. Nadalje, stvaranje biofilma na površini MP-a i/ili adsorpcija drugih tvari može povećati masu čestice, što pospješuje njihovu sedimentaciju. Na položaj MP-a u vodenom stupcu može utjecati i agregacija čestica, kao i aktivnost vodenih organizama [128]. Nadalje, više koncentracije MP-a uočene su u rijekama koje se nalaze uz gušće naseljena područja: urbaniziranija područja karakterizira ubrzaniji način života i viši standard koji potiču veću upotrebu jednokratne ambalaže i plastičnih proizvoda što posljedično povećava koncentraciju MP-a u okolišu.

2.3 Metode identifikacije mikroplastike

Za određivanje MP-a u različitim uzorcima koriste se različite analitičke tehnike, a nerijetko treba koristiti dvije ili više metoda za potpuni uvid u svojstva MP-a, posebice kada se želi pratiti njena (bio)razgradnja. U tom slučaju, metode koje mogu otkriti promjene u strukturi MP-a (npr. spektroskopske metode) su korisnije od onih koje pružaju uvid u površinske i morfološke promjene (npr. mikroskopske metode). Metode koje će biti objašnjene u poglavljima 2.4.1–5 koriste se za analizu, točnije identifikaciju MP-a iz okolišnih uzoraka i/ili utvrđivanje promjena nastalih na česticama MP-a tijekom i nakon (bio)razgradnje.

2.3.1 Vizualna identifikacija

Vizualna identifikacija polarizacijskim mikroskopom koristi se za fizikalnu karakterizaciju MP-a po boji, obliku, teksturi površine i veličini. Vizualni pristup također je koristan za razlikovanje MP-a od drugih čestica slične veličine i oblika (npr. gline ili algi), te za brojanje čestica [129]. Veće čestice, dimenzija 1 do 5 mm, mogu se analizirati i golim okom, no analiza manjih čestica zahtijeva primjenu mikroskopa [82,130,131]. Sierra i suradnici [132] identificirali su različite MP iz otpadnih voda polarizacijskim mikroskopom uz potvrdu Ramonovom mikroskopijom (kombinacija Ramanove spektroskopije i optičke mikroskopije uz polarizirano svjetlo). Polarizirano svjetlo omogućuje klasifikaciju materijala s određenim tipom anizotropije.

Jedan od glavnih nedostataka vizualne identifikacije je nepouzdanost. Naime, Hidalgo-Ruz i suradnici [133] izvijestili su da 70 % vizualno sortiranih čestica nije identificirano kao

plastika nakon dodatne analize infracrvenom spektroskopijom uz Fourierovu transformaciju (FTIR). Analiza polarizacijskim mikroskopom ograničena je u identifikaciji polimera, kao što je PVC. Također, iako je vizualni pristup jednostavan, ekonomičan i može se implementirati *in situ* u kratkom vremenu, ne daje informacije o kemijskom sastavu. Ukratko, vizualna identifikacija može pružiti informacije o MP-u, ali za dobivanje relevantnijih informacija u praksi se koriste pouzdanije tehnike (spektroskopija ili kromatografija) [79,129].

2.3.2 Skenirajuća elektronska mikroskopija

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) koristi se za određivanje veličine i oblika MP-a, promjena na površini, kao i za potvrdu nastanka biofilma. Uzorci za SEM analizu moraju biti u čvrstom stanju, ne smiju biti radioaktivni i imati magnetska svojstva, ne smiju sadržavati vlagu te moraju imati stabilan sastav [134]. Površina MP-a skenira se elektronskom zrakom kako bi se dobilo veliko uvećanje i visoka razlučivost slike površine [134] što omogućuje točniju identifikaciju MP-a. SEM se može upariti s energijski disperzivnom rendgenskom spektroskopijom (EDS), čime se dobiva nedestruktivna tehnika koja uz slike površine čestica u visokoj razlučivosti pruža i elementarnu analizu površinskog sloja. Time je moguće razlikovati MP od anorganskih čestica [135]. Elementi u tragovima (kao što su Al, Na, Ca, Mg ili Si) također se mogu identificirati, što ukazuje na prisutnost aditiva ili čestica adsorbiranih na površini MP [98,135]. Međutim, relevantniji rezultati u identifikaciji MP-a mogu se postići kombiniranjem SEM-EDS analize s drugima spektroskopskim tehnikama kao što su Ramanova ili FTIR spektroskopija. Tako su Mehdinia i suradnici [135] za potrebe identifikacije MP-a kombinirali tri tehnike: i) boja, veličina i morfologija su određeni polarizacijskim mikroskopom, ii) SEM-EDS je korišten za specifičnu strukturu, morfološka svojstva i kemijski sastav pojedinačnih MP-a, te iii) Ramanova spektroskopija je primijenjena za određivanje vrste polimera.

2.3.3 Infracrvena spektroskopija uz Fourierovu transformaciju

FTIR je najčešće korištena metoda za analizu MP-a [137] koja omogućuje točnu identifikaciju polimera plastike s obzirom na njegov IR spektar. Naime, kada je polimer ozračen, molekula polimera apsorbira određenu količinu energije uzrokujući molekulske vibracije koje sveukupno daju IR spektar karakterističan za taj polimer. Vibracije ovise o strukturi polimera i

primijenjenim valnim duljinama zračenja [138]. Općenito, FTIR analiza se provodi u srednjem IR rasponu od $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ [139]. Generalno, plastični materijali (bio)razgradnjom gube masu, što ukazuje na strukturne promjene [151]. Stoga se razgradnja polimera može potvrditi analizom funkcionalnih skupina s obzirom da neke skupine nedostaju ili imaju niži ili veći intenzitet vrpce u usporedbi s referentnim FTIR spektrom [79,140]. Tipične vrpce vibracija PE, PP, PVC, PET i PS polimera sažete su u tablici 3. Nedostatak FTIR analize je u činjenici da se vrpce organskih i anorganskih nečistoća mogu preklapati s polimernim vrpcoma u IR spektru, ometajući spektroskopsku karakterizaciju [143]. Sukladno tome, uzorke je potrebno obraditi prije analize kako bi se uklonili faktori koji smetaju u interpretaciji podataka; primjerice vlaga često uzrokuje smetnje te ju je potrebno ukloniti [79,144].

Transmisijska IR spektroskopija koristi se za tanke i prozirne uzorke, dok se refleksijski način obično koristi za debele i netransparentne uzorke. FTIR prigušene potpune refleksije (eng. *Attenuated Total Reflectance*, FTIR-ATR) uobičajena je FTIR tehnika mjerenja IR spektra površine polimera ili spektara debelih i jako apsorbirajućih polimera [144]. Ova metoda je relativno jeftina, no nije u stanju identificirati male uzorke i konveksne čestice [40]. Naime, FTIR-ATR se uglavnom primjenjuje za analizu čestica većih od $500 \mu\text{m}$ [79], iako različiti ATR dodaci omogućuju analizu uzoraka veličine do $70 \mu\text{m}$ [139]. FTIR-ATR je uspješno primijenjen za identifikaciju MP-a u površinskim vodama i sedimentima [145]. FTIR spojen s mikroskopom (eng. *Microscopy coupled FTIR*, μ -FTIR) ima poboljšanu razlučivost [146] i obično se primjenjuje za analizu MP čestica manjih od $100 \mu\text{m}$ [139]. Posebno je zanimljiva njegova primjenjivost za identifikaciju MP-a prisutnih izravno na membranskim filtrima [146]. K ppler i suradnici [143] primijenili su μ -ATR-FTIR analizu i Pyr-GC-MS (piroliza uz plinsku kromatografiju i masenu spektrometriju) analizom za karakterizaciju 27 MP čestica izoliranih iz riječnih sedimenata. Studija je pokazala da su obje metode prikladne za karakterizaciju MP-a, ali i da se mogu međusobno nadopunjavati. Nadalje, μ -FTIR (FPA- μ -FTIR) može se primijeniti za analizu sitnijih MP čestica [146]. Osim FTIR spektroskopije, za provjeru oksidiranih funkcionalnih skupina u strukturi polimera može se koristiti i protonska nuklearna magnetska rezonancija ($^1\text{H NMR}$) [70]. Međutim, karbonilne grupe, kao polarne funkcionalne grupe, lako se detektiraju primjenom FTIR-a, dok se aromatske i dvostruke veze bolje identificiraju primjenom Ramanove spektroskopije [87].

Tablica 3. Karakteristične funkcionalne skupine za pet najviše korištenih polimera uz naznačene valne brojeve u FTIR spektru [147-150].

Polimer	Funkcionalna grupa	Valni broj / cm^{-1}
PE	CH ₂ simetrično rastezanje	2918; 2850
	CH ₂ asimetrično rastezanje	2919
	CH ₂ savijanje	1473; 1463
	CH ₃ simetrično rastezanje	1377
	CH ₂ njihanje	1366; 1351; 1176
	CH ₂ uvijanje	1050
	CH ₂ njihanje	731–720
PP	CH ₂ asimetrično rastezanje	2919
	CH ₃ asimetrično rastezanje	2951
	CH ₃ simetrično rastezanje	2868
	CH ₂ simetrično rastezanje	2837
	CH ₂ ukrštavanje	1458
	CH ₃ simetrično savijanje, CH ₂ njihanje	1377
	CH savijanje, CH ₂ uvijanje, CH ₃ ljuljanje	1256
	CH ₂ uvijanje, C–C rastezanje, C–H savijanje	1220
	CH savijanje, CH ₃ ljuljanje, C–C rastezanje	1168
	C–C rastezanje, CH ₃ ljuljanje, CH ₂ njihanje, CH uvijanje, CH savijanje	1104
	C–CH ₃ rastezanje, C–C rastezanje, CH savijanje	1045
	CH ₃ ljuljanje, CH ₃ njihanje, CH savijanje	998
	CH ₃ ljuljanje, C–C rastezanje	941
	CH ₃ rastezanje	937
	CH ₃ rastezanje, CH ₃ rastezanje, CH savijanje	899
	CH ₂ ljuljanje, C–CH ₃ rastezanje	841
	CH ₂ ljuljanje, C–C rastezanje, C–CH rastezanje	809
PVC	CH ₂ ljuljanje	730; 720
	CH ₂ asimetrično rastezanje	2904
	CH ₂ simetrično rastezanje	2837
	CH ₂ njihanje	1354
	CH savijanje	1333; 1254; 1243
	C–C rastezanje	1099
	CH ₂ ljuljanje	970; 957
	C–Cl rastezanje	603
PET	CH ₂ asimetrično rastezanje	2969
	C=O rastezanje	1740–1710
	CH ₂ savijanje	1470
	CH ₂ njihanje	1370–1340
	C–C–O asimetrično rastezanje vezano uz aromatski prsten	1250
	C–O rastezanje	1260
	C–O–C rastezanje	1100
	aromatsko CH svijanje u ravnini savijanjeoksi-metil grupe	1019 973–898
aromatsko CH njihanje van ravnine	875	
PS	C=O ljuljanje, C–O deformacija	795
	aromatsko CH njihanje u ravnini	730
	CH ₂ asimetrično rastezanje	2924
	CH ₂ simetrično rastezanje	2850
	CH ₂ svijanje	1451
	aromatsko CH rastezanje	3024
	aromatsko rastezanje prstena aromatsko CH savijanje	1604; 1492 1027

2.3.4 Ramanova spektroskopija

Ramanova spektroskopija koristi karakteristični Ramanov spektar za identifikaciju MP-a prilikom čega je polimer ozračen monokromatskom zrakom u rasponu valnih duljina od 500 do 800 nm. Jednom kada zraka dođe do uzorka, stupa u interakciju s polimerom koji apsorbira određenu količinu energije zrake. Posljedično, dolazi do Ramanovog pomaka, tj. frekvencija raspršene svjetlosti postaje drugačija od ulazne, dajući karakterističan Ramanov spektar analiziranoga polimera [9]. Dobiveni spektar mora se usporediti s referentnim spektrom kako bi se izvršila identifikacija [82]. Ramanova spektroskopija daje komplementarnu sliku molekulskih vibracija u usporedbi s FTIR-om. Dok je FTIR spektroskopija osjetljiva na vibracije koje utječu na molekulski dipolni moment, Ramanova spektroskopija je osjetljiva na vibracije koje utječu na polarizabilnost molekule [144]. Ramanova spektroskopija nudi veliku razlučivost (zbog smanjene širine linije između vrpci koje su blizu jedna drugoj u spektru) uz nisku interferenciju vode [151]. Sukladno tome, Ramanova spektroskopija je moćna tehnika za analizu MP-a ne samo u uzorcima vode, već i u sedimentu, organizmima, hrani i kozmetici [137]. Nadalje, zahtijeva malu količinu uzorka i može razlučiti vrlo male čestice ($< 1 \mu\text{m}$). Nažalost, Ramanova spektroskopija je vrlo osjetljiva na fluorescenciju uzorka koja može prekriti dio Ramanovih linija [151]. Međutim, ona ostaje najpoželjnija tehnika za analizu MP za čestice veličinom $< 10 \mu\text{m}$ [9]. Sukladno tome, Ramanova spektrometrija uspješno je korišten za identifikaciju MP u sedimentu [152], morskoj vodi [153], slatkoj vodi [154], otpadnoj vodi [155] i vodenim organizmima [156].

2.3.5 Kromatografske metode

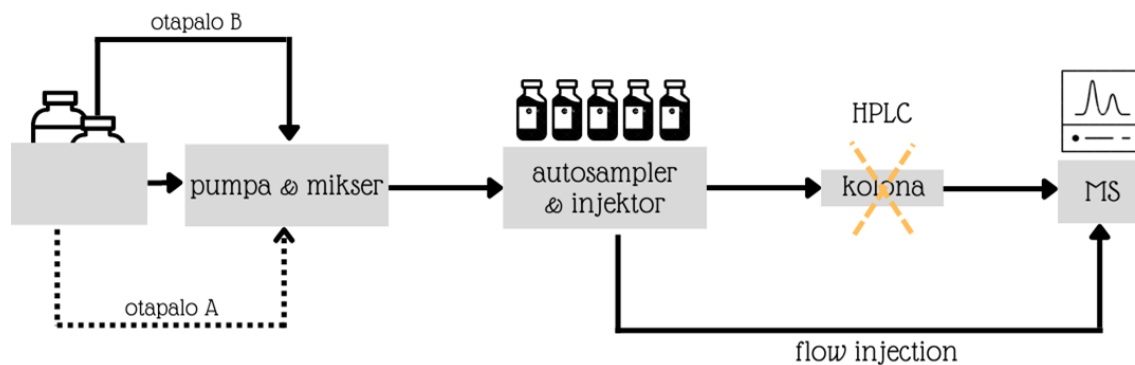
Piroliza praćena GC-MS (Pyr-GC-MS) je destruktivna, ali učinkovita metoda za identifikaciju MP-a. Prilikom analize dolazi do pirolitičke razgradnje uzorka, kojeg je za analizu potrebno samo 5 – 200 μg . Nadalje, primjenom ove metode i vrste polimera i organski aditivi mogu se učinkovito identificirati prema njihovoj masi [129]. Međutim, brojnost i morfologija MP-a se ne može odrediti, što zahtijeva kombinaciju Pyr-GC-MS analize s mikroskopskim metodama (npr. optička mikroskopija ili SEM).

Termička ekstrakcija i desorpcija uz GC-MS (eng. *Thermal extraction-desorption gas chromatography mass spectrometry*, TED-GC-MS) je tehnika prikladna za analizu polimera i njihovih međuprodukta razgradnje. Primarni korak uključuje termogravimetrijsku analizu

(TGA), nakon čega slijedi sakupljanje nastalih plinovitih produkata na čvrstom adsorbensu. Nakon toga, produkti se desorbiraju i analiziraju GC-MS-om [157]. Prednost TED-GC-MS metode je što ne zahtijeva prethodno izdvajanje MP-a iz uzorka, kao u slučaju Pyr-GC-MS-a [129].

Tekuća kromatografija visoke učinkovitosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC) također se može primijeniti za identifikaciju MP-a iz okolišnih vodenih uzoraka. Međutim, čestice MP-a moraju se prije analize otopiti u odgovarajućem organskom otapalu. Tetrahidrofuran i heksafluorizopropanol su otapala koja se koriste za otapanje PS-a i PET-a [79], dok se ostali PE, PP i PVC obično analiziraju GC-MS-om. Biale i suradnici [158] proveli su analizu HDPE, LDPE, PS, PP i PET mikročestica dimenzija 509 – 857 μm nakon 4 tjedna fotooksidacije; provedena je i analiza nastalih razgradnih produkata niske molekulske mase. Fotooksidirane čestice MP-a su podvrgnute ekstrakciji u polarnim organskim otapalima (HDPE, LDPE, PP i PET u diklorometanu, a PS u metanolu) u svrhu izdvajanja frakcije koja sadrži produkte niske molekulske mase. Za ekstrahiranu frakciju provedena je analiza oslobođenih plinova uz masenu spektroskopiju (eng. *Evolved gas analysis-mass spectrometry*, EGA-MS), Pyr-GC-MS analiza i analiza gel-propusnom kromatografijom (eng. *Gel-permeation chromatography*, GPC). GPC analiza omogućava uvid u promjenu molekulske mase polimera, prema kojoj se uočava da li je došlo do depolimerizacije polimera [70]. Nastanak razgradnih produkata tijekom razgradnje MP-a i/ili otpuštenih aditiva s površine MP čestica, općenito se zanemaruje u studijama o MP-u, a čak ovi spojevi mogu predstavljati i veći rizik za okoliš i vodene organizme u odnosu na čestice MP-a [158]. Aditivi koji se dodaju tijekom proizvodnje plastike uglavnom se analiziraju se Pyr-GC-MS-om [159]. Kao alternativni pristup nudi se analiza injektiranjem u protok uz masenu spektrometriju (eng. *Flow injection analysis-mass spectrometry*, FIA-MS) [160] gdje se analiti izravno injektiraju u izvor ionizacije masenog spektrometra bez prethodnog kromatografskog odvajanja [161]. FIA-MS je isplativa, brza (uobičajeno vrijeme analize je manje od minute), precizna, osjetljiva, točna i jednostavno izvediva tehnika, no uz nižu selektivnost u odnosu na kromatografske analize uz maseni spektrometar (nema podatka o vremenu zadržavanja koje kod kromatografskih metoda može biti korišteno za identifikaciju) [162]. Dijelovi FIA-MS sustava su pokretna faza, pumpa, automatski uzorkivač i injektor te maseni spektrometar [162-164], kao što je prikazano na slici 6. Kao rezultat analize dobiva se maseni spektar intenziteta i m/z omjera nabijenih čestica, tj. iona. Ova

se analiza može provoditi u dva ionizacijska načina – pozitivnom i negativnom načinu ionizacije, a ionizacija elektrosprejom nudi pozitivni način rada [165].



Slika 6. Shematski prikaz FIA-MS sustava.

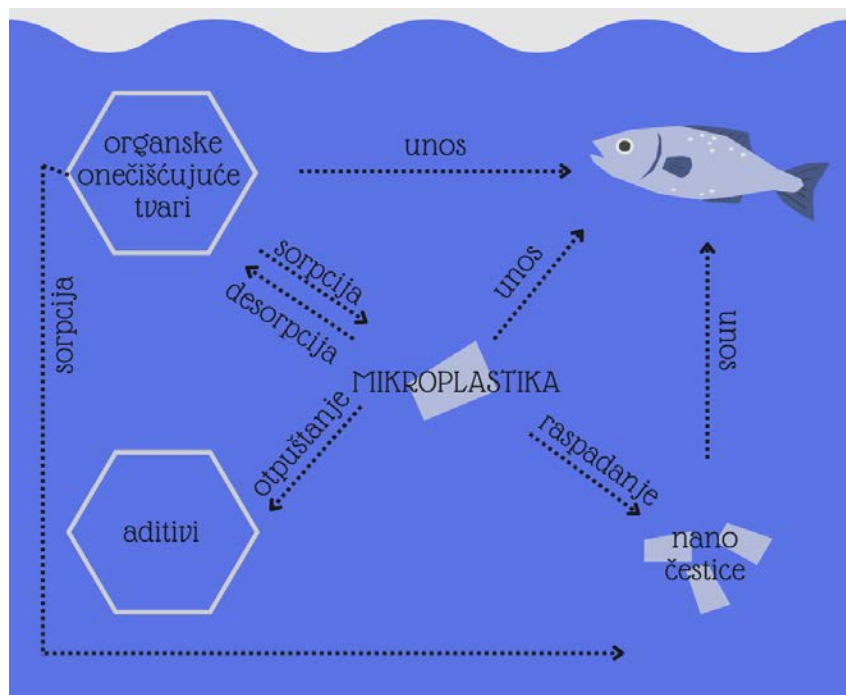
Prema navedenome, postoji nekoliko mogućnosti za karakterizaciju MP-a u okolišu, međutim, budući da MP varira u kemijskom sastavu, veličini, gustoći i oblicima, kao i da su prisutni u različitim vodnim matricama, jedinstvena metoda za karakterizaciju ne postoji. Navedene metode imaju svoje prednosti u odnosu na druge u pogledu određenog ciljanog svojstva MP-a, međutim, ako je potrebna temeljita analiza, mora se primijeniti kombinacija metoda. Svakako je daljnji razvoj postojećih ili potpuno novih metoda za identifikaciju i karakterizaciju MP-a nužan u svrhu boljeg razumijevanja sudbine MP čestica u okolišu.

2.4 Ekotoksikološke studije utjecaja mikroplastike

Svojstva MP-a, ponajprije, oblik i gustoća čestica, utječu na biodostupnost vodenim organizmima. Primjerice pelagični organizmi (fitoplankton i zooplankton) imaju veću vjerojatnost izloženosti MP-u niže gustoće, dok su bentonski organizmi (vodozemci, mekušci i bodljokošci) izloženi MP-u više gustoće zbog tendencije takvih čestica da sedimentiraju [166,167].

Unos čestica MP-a iz vodenog medija u organizme može biti aktivan (zamijena čestica MP-a za hranu) ili pasivan (filtracija vode preko škrge ili konzumacije plijena kontaminiranog MP-om) [87]. Pasivnim unosom čestice MP-a prenose se hranidbenim lancem od organizama na nižoj prema organizmima na višim trofičkim razinama, što se naziva biomagnifikacija [112]. Na takav način je i čovjek izložen MP-a.

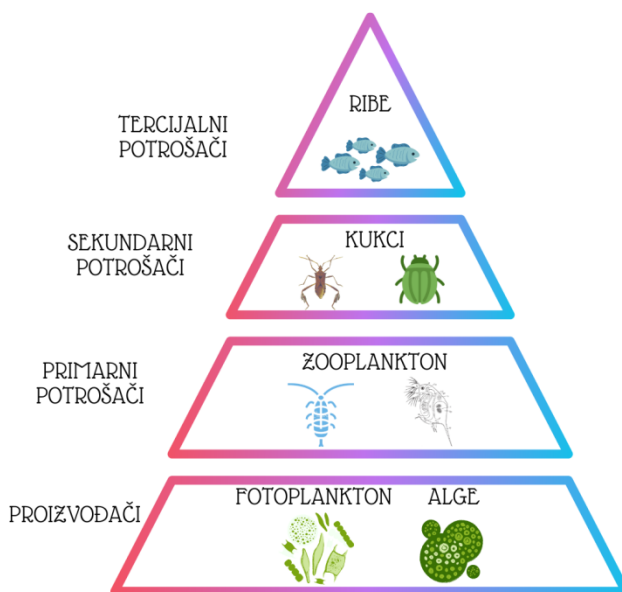
Jednom unesena u organizam, MP može imati fizikalnan, kemijski i biološki utjecaj [79] (slika 7). Kao primjer fizikalnog utjecaja može se uzeti situacija u kojoj organizmi gutaju MP čestice misleći da su hrana. Unosom MP čestica u probavni sustav može doći do njihove bioakumulacije što stvara lažan osjećaj sitosti, dovodi do izgladnjivanja organizma te u konačnici može rezultirati smrtnošću. Nakon unosa čestica MP-a u organizam, može doći i do desorpcije potencijalno toksičnih (uglavnom organskih) tvari adsorbiranih na površini ili izluživanja aditiva s površine MP čestica. Desorbirane tvari i izluženi aditivi imaju kemijski utjecaj na organizme. Biološki utjecaj MP-a vidljiv je u situacijama kada su na površini MP-a adsorbirani patogeni mikroorganizmi, poput primjerice *Vibrio* spp. ili fekalnih koliforma [168].



Slika 7. Prikaz ekotoksikološkog utjecaja čestica mikroplastike na vodene organizme.

S obzirom da čestice MP-a predstavljaju rizik i po vodene organizme i po ljudsko zdravlje, potrebno je provoditi ekotoksikološka istraživanja. Ekotoksikološke studije mogu se razlikovati prema testnim organizmima i mjestu analize (*in situ* ili *ex situ*). Testni organizmi u ekotoksikološkim studijama su različiti, a većinom se koriste oni organizmi koji su pri dnu hranidbenog lanca. Mikroalge, kao primarni proizvođači, važne su u hranidbenom lancu, a nalaze se na dnu hranidbene piramide, kako je prikazano na slici 8. Čak i mali poremećaji na mikroalgama mogu utjecati na druge više organizme na trofičkim razinama. Mikroalge su

odabrani organizmi za ispitivanje u ekotoksikološkim studijama zbog jednostavnosti izvođenja testa toksičnosti, pouzdanosti, isplativosti testa te njihova kratkog životnog ciklusa. Zbog sličnih prednosti (kratko generacijsko vrijeme, jeftino hranjenje i održavanje račića te jednostavan izvedba testa) se odabiru i račići *Daphnia magna* za ekotoksikološke studije. One se hrane algama, a spadaju u primarne potrošače u hranidbenoj piramidi. Prema vrhu piramide se nalaze ribe kao tercijalni potrošači, na koje utječu niži navedeni organizmi, posebice uslijed biomagnifikacije. U ekotoksikološkim studijama koje uključuju MP uglavnom se koriste vodeni organizmi, osobito morski. U tablici 4 dan je literaturni pregled dostupnih ekotoksikoloških studija na MP-u. Ribe se najviše koriste u *in situ* studijama, dok račići prevladavaju među organizmima korištenim u laboratorijskim testovima (*ex situ*) [169-174].



Slika 8. Prikaz hranidbene piramide.

Tablica 4. Literaturni pregled istraživanja ekotoksičnosti mikroplastike (MP) na različitim testnim organizmima.

Testni organizam	Vrsta MP-a	Veličina MP čestica	Koncentracija MP-a	Utjecaji	Rezultati	Literatura
Bakterija						
<i>Vibrio fischeri</i>	PE	1,0 – 3,0 µm	1000,0 mg/L	smanjenje bioluminiscencije	EC ₂₀ = 3600,0 mg/L (5 min)	[175]
					EC ₂₀ = 2600,0 mg/L (30 min)	
	PS-PEI	0,06 µm	3,0 – 1000,0 mg/L		EC ₅₀ ≥ 1000,0 mg/L (30 min)	[176]
					EC ₅₀ ≥ 1000,0 mg/L (30 min)	
Alge						
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	PS-PEI	0,06 µm	0,1 – 1,0 mg/L	inhibicija rasta	EC ₅₀ = 0,6 mg/L (72 h)	[176]
		0,11 µm	0,1 – 0,8 mg/L		EC ₅₀ = 0,5 mg/L (72 h)	
<i>Chlorella</i> sp.	PS	0,02 µm	80,0 – 800,0 mg/L	adsorpcija čestica na alge, smanjenje fotosinteze, oksidativni stres	$k = 580,0 \text{ (mg/L)}^{1-1,70}$	[177]
<i>Scenedesmus</i> sp.					$k = 540,0 \text{ (mg/L)}^{1-0,55}$	
<i>Scenedesmus</i> sp.	PS	0,1 µm	10,0, 50,0 i 100,0 mg/L	inhibicija rasta (IR), morfološke promjene, oksidativni stres	IR = 21,0, 29,0 i 38,5 %	[178]
		1,0 µm			IR = 20,9, 28,4 i 38,1 %	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	PP	64,0 – 236,0 µm	5,0, 10,0, 50,0, 100,0, 250,0 i 500,0 mg/L	smanjenje udjela klorofila (SK) i fotosintetske aktivnosti	SK = 10,6, 15,9, 22,1, 31,1, 25,5 i 24,6 %	[179]
	PVC	111,0 – 216,0 µm			SK = 20,4, 37,7, 49,5, 48,5, 55,2 i 55,2 %	
	PP	64,0 – 236,0 µm			SK = 11,1, 1,29, 10,5, 13,1, 13,1 i 16,9 %	
<i>Microcystis flosaquae</i>	PVC	111,0 – 216,0 µm			SK = 9,6, 24,9, 23,9, 18,6, 32,2 i 46,9 %	
<i>Chlamydomas reinhardtii</i>	PP	400,0 – 1000,0 µm	400,0 mg/L	inhibicija rasta, nastanak heteroagregata	IR ≈ 18,0 % (78 d)	[180]

PS-PEI = polietilenimin polistiren; k = Freundlichov koeficijent

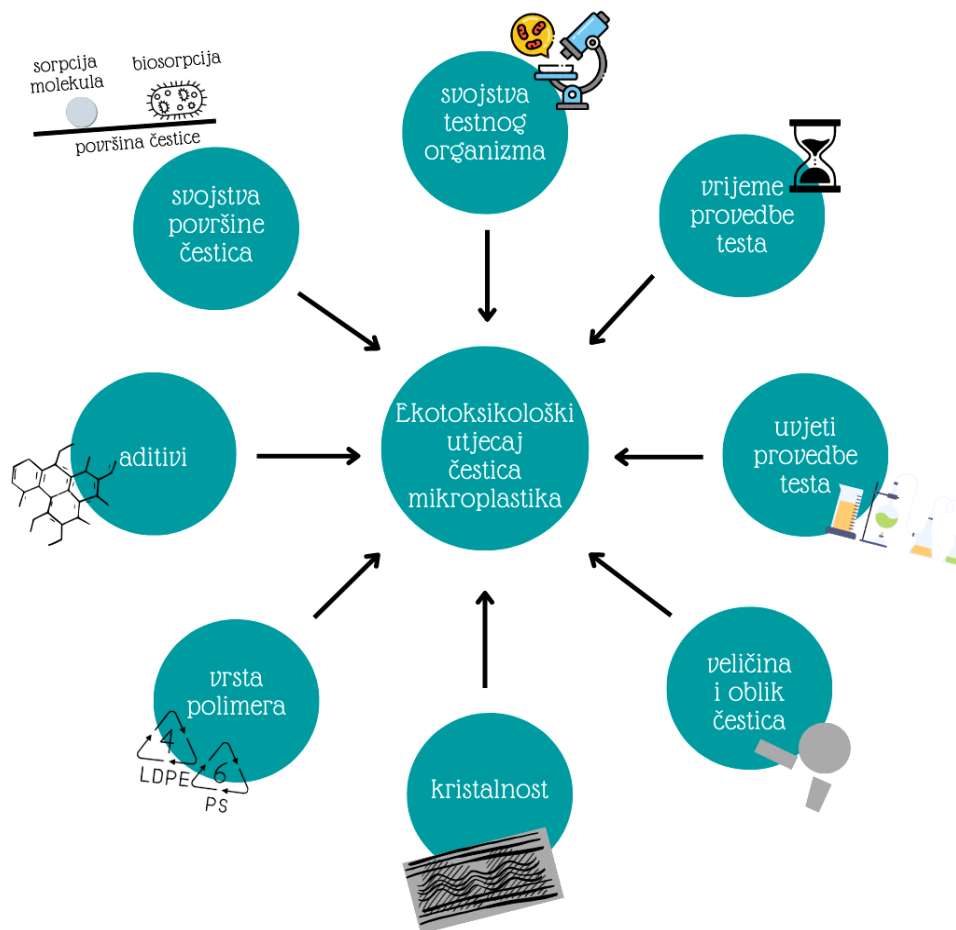
Tablica 4. Nastavak 1.

Testni organizam	Vrsta MP-a	Veličina MP čestica	Koncentracija MP-a	Utjecaji	Rezultati	Literatura	
<i>Daphnia magna</i>	PE fragmenti	17,2 i 34,4 µm	5,0 mg/L	značajniji utjecaj PE fragmenata veličine 17,2 µm: bioakumulacija, smanjenje duljine tijela i reproduktivnosti	80,0 % smrtnost	[180]	
	PE kuglice	39,5 µm					
	PS-PEI	0,06 µm	0,3 – 3,3 mg/L		imobilizacija	EC ₅₀ = 0,8 mg/L (48 h)	[176]
		0,11 µm				EC ₅₀ = 0,7 mg/L (48 h)	
	PS	1,0 µm	0,1 – 600,0 mg/L		imobilizacija, oksidativni stres, smrtnost	EC ₅₀ = 66,9 mg/L (48 h) LC ₅₀ = 87,8 mg/L (48 h)	[181]
		10,0 µm				EC ₅₀ = 199,9 mg/L (48 h) LC ₅₀ = 291,7 mg/L (48 h)	
	PE	10,0 – 100,0 µm	0,1 g/L	imobilizacija, smrtnost	33,3 % smrtnost 46,7 % imobilizacija 46,7 % smrtnost 53,3 % imobilizacija	[182]	
	PP	< 176,0 µm	1,0, 10,0 i 100,0 mg/L	bioakumulacija	-	[183]	
	PS	6,0 µm	5,0, 15,0, 30,0, 60,0, 120,0, 240,0 i 300,0 mg/L		-	EC ₅₀ = 34,3 mg/L (120 h)	[184]
			100,0 i 800,0 MP/mL			EC ₅₀ = 52,0 mg/L (120 h)	[185]
	PET	22,8 µm	100,0 mg/L	bioakumulacija	-	[186]	
	PVC	20,0 µm	10,0, 50,0, 100,0 i 500,0 mg/L	-	-	EC ₅₀ = 45,5 mg/L (21 d)	[187]
	kruti PVC fleksibilan PVC	4,0 – 141,0 µm (kruti) 12,0 – 276,0 µm (fleksibilan)	0,2 mg/L	smanjenje duljine tijela i reproduktivnosti	-	-	[188]

Tablica 4. Nastavak 2.

Testni organizam	Vrsta MP-a	Veličina MP čestica	Koncentracija MP-a	Utjecaji	Rezultati	Literatura
Ribe						
<i>Danio rerio</i>	PS	0,05 µm	1,0 mg/l	smanjenje pokretljivosti, duljine tijela, oštećenje vidnog i nervnog sustava	22,0 % smanjena pokretljivost 6,1 % smanjena duljina tijela	[189]
	PS	150,0 µm	3,0 mg/L	akumulacija, oksidativni stres	1,8 čestica po ribi (12 d) 7,0 čestica po ribi (24 d)	[190]
	PS	10,0 µm	0,05, 0,1, 1,0, 5,0 i 10,0 mg/L	akumulacija na korionu embrija, otkucaji srca, duljina tijela, smrtnost	-	[191]
	PS	4,5 µm	0,03, 0,05, 0,5, 5,0 i 50,1 mg/L	stopa malformacije	10,3, 16,7, 7,1, 16,7 i 20,0 %	[192]
<i>Cyprinus carpio</i> <i>Carassius auratus</i> <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> <i>Pseudorasbora parva</i> <i>Megalobrama amblycephala</i> <i>Hemiculter bleekeri</i>	49,1 % celofan	76,3 % čestica < 5 mm	-	bioakumulacija	2,5±1,3 čestica po ribi 1,9±1,0 čestica po ribi 3,8±2,0 čestica po ribi 2,5±1,8 čestica po ribi 1,8±1,7 čestica po ribi 2,1±1,1 čestica po ribi	[193]
<i>Bagre bagre</i> <i>Bagre marinus</i> <i>Caranx hippos</i> <i>Lutjanus analis</i> <i>Polydactylus oligodon</i> <i>Cynoscion leiarchus</i> <i>Sphyrna tiburo</i> <i>Trichiurus lepturus</i>	97,4 % poliamid	0,4 – 4,2 mm	-	bioakumulacija	2,8 čestica po ribi 7,8 čestica po ribi 30,7 čestica po ribi 1,0 čestica po ribi 3,0 čestica po ribi 2,0 čestica po ribi 9,0 čestica po ribi 2,0 čestica po ribi	[194]

Ekotoksični utjecaj MP-a ovisi o brojnim svojstvima (slika 9) kao što su veličina, specifična površina i oblik čestica, udio kristalnosti, vrsta polimera, prisutnost aditiva, itd. [40]. Čestice MP-a se uslijed okolišnih uvjeta postepeno raspadaju na sitnije čestice, a smanjenjem veličine čestica povećava se aktivna površina na koju se mogu adsorbirati razni (potencijalno štetni) agensi. Ujedno, izgledno je da će sitnije čestice lakše ući u mikro(organizme) čime je veća vjerojatnost njihova štetnog utjecaja.

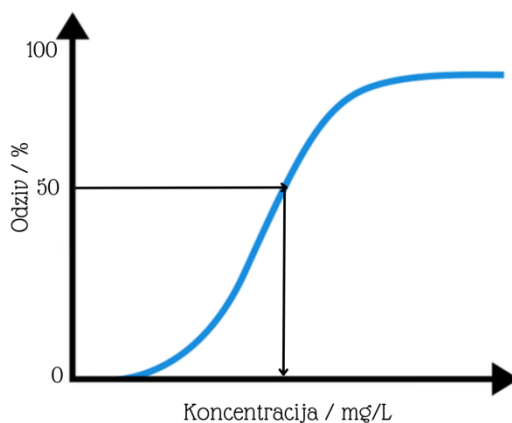


Slika 9. Čimbenici koji utječu na ekotoksikološki utjecaj mikroplastike.

Raspadom čestica MP-a najprije se gubi amorfni dio čestice čime se kod nastalih čestica povećava udio kristalnosti. Kristalnost ima ključan utjecaj na adsorpciju na MP česticama [195] kao i na otpuštanje aditiva, te samim time i na ekotoksičnost MP-a. Što se oblika čestica tiče, istraživanjem [174] je dokazano da se čestice nepravilnog oblika i igličastih rubova duže zadržavaju u organizmima, čime se povećava vjerojatnost štetnog utjecaja ovakvih oblika MP-a.

Različiti plastični polimeri imaju različite kemijske strukture koje utječu na njihovu ekotoksičnost. Tako je ekotoksičnost PVC-a najvjerojatnije povezana s klorom kojeg sadrži u svojoj strukturi [196,197] dok se kod PS-a zna da njegov monomer, stiren, ima kancerogena svojstva [196]. Ekotoksičnost aditiva također varira s njihovom strukturom. Jedan od najpoznatijih štetnih aditiva je bisfenol A koji uzrokuje poremećaj endokrinog sustava. Otpuštanje aditiva s površine MP čestica ovisi o fizikalnim svojstvima čestica (veličini monomera, starost i stupanj razgradnje MP-a), ali i o svojstvima molekule aditiva (molekulska masa, koncentracija aditiva u polimernoj strukturi ili koeficijent raspodjele). Primjerice, aditivi manje molekulske mase će se prije otpustiti iz polimerne strukture u odnosu na aditive veće molekulske mase [40]. Svojstva površine čestica MP-a mijenjaju se starenjem (uslijed foto razgradnje i oksidacije). Tako nastaju nove funkcionalne grupe, ali i oštećenja na površini čestica MP-a. Čestice oslabljene strukture se lakše dalje raspadaju čime je veća mogućnost njihova unosa u organizme, povećano otpuštanje aditiva, te su čestice biodostupnije mikroorganizmima za kolonizaciju. Osim navedenih svojstava čestica MP-a, ekotoksičnost ovisi i o svojstvima testnog organizma (vrsta i osjetljivost), vremenu izloženosti (kraće ili duže), te eksperimentalnim uvjetima (temperatura, koncentracija otopljenoga kisika, pH).

Rezultati ekotoksikoloških studija obično se izražavaju kao koncentracija ispitivanog spoja koja uzrokuje određeni učinak (u postocima) na izloženoj populaciji. Promjena učinka obično se opisuje karakterističnom sigmoidnom krivuljom (slika 10).



Slika 10. Shematski prikaz krivulje ovisnosti odziva o koncentraciji ispitivane tvari.

Na temelju krivulje odziva određuje se utjecajna koncentracija, EC (eng. *Effective concentration*), tj. ona koncentracija ispitivane tvari koja uzrokuje x % štetnog učinka u izloženoj

populaciji. Pri tome se krivulja obično prikazuje u lineariziranom obliku koji omogućava lakšu procjenu EC vrijednosti. Najčešće se procjenjuje koncentracija koja uzrokuje 50 % štetnog učinka (EC₅₀), iako se po potrebi (da se izbjegne pogreška uslijed ekstrapolacije podataka) mogu primijeniti i niže razine (tj. EC₁₀ [198] ili EC₂₀ [199]). U slučaju da je se ispitivani štetni učinak odnosi na smrtnost organizama, koristi se termin letalna koncentracija (eng. *Lethal concentration*, LC). U svrhu procjene ekotoksičnog utjecaja tvari može se koristiti i test inhibicije rasta [173].

2.4.1 Ekotoksikološke studije na *Vibrio fischeri*

Ekotoksikološki test primjenom bakterije *Vibrio fischeri* smatra se jednostavnim, relativno brzim i isplativim. Stoga ne čudi što se, unatoč činjenici da je *Vibrio fischeri* morska bakterija, ovaj test često primjenjuje za ekotoksikološku analizu nemorskih uzoraka, kao što su otpadne vode, slatkovodne vode, procjedne vode i slično. Test se temelji na mjerenju intenziteta plavo-zelene bioluminiscentne svjetlosti koju bakteriji omogućava enzim luciferaza. Široka primjena testa uključuje ispitivanja raznih tvari koje imaju potencijalno štetne učinke na vodeni okoliš, kao što su metali, antibiotici, herbicidi i drugi spojevi [200]. Ipak, do sada je svega nekoliko autora koristilo test s *Vibrio fischeri* za određivanje ekotoksikoloških učinaka MP-a, vjerojatno zbog nedovoljne osjetljivosti bakterije na ispitivanu tvar [173]. Primjerice, Gambardella i suradnici [173] izložili su *Vibrio fischeri* oksidiranim i neoksidiranim PE mikročesticama u rasponu veličina 1 – 500 µm i koncentracija 0,625 – 10 mg/L. Nakon 30 min kontakta, čestice se nisu pokazale toksičnima. Autori su pretpostavili da je stanična stijenka bakterija djelovala kao barijera za mikročestice korištenog raspona veličina te da bi čestice manjih dimenzija mogle izazvati ekotoksični učinak [200]. Međutim, Gagné i suradnici [199] izložili su *Vibrio fischeri* PE mikrosferama (1 – 3 µm) koncentracije 1000,0 mg/L tijekom 5 i 30 minuta i dobili EC₂₀ vrijednosti od 3600,0, odnosno 2600,0 mg/L.

Poteškoće prilikom provedbe testa ekotoksičnosti MP-a primjenom *Vibrio fischeri* mogu se povezati s činjenicom da je MP-a u suspenziji u krutom obliku te može ometati mjerenje bioluminiscencije, a uz to vrijeme izlaganja od 15 ili 30 minuta (prema ISO 11348-3) je prilično kratko da bi se vidjeli učinci MP-a na bakteriju. MP se može otopiti u odgovarajućem otapalu, međutim, radi se o organskim otapalima koja također imaju ekotoksični učinak.

Moguće je ispitati i ekotoksični utjecaj aditiva dodanih plastici, a koji se mogu ispustiti iz MP čestica, osobito tijekom procesa razgradnje. Tada je prije provedbe testa ekotoksičnosti potrebno ukloniti čvrste čestice MP-a filtracijom. Piccardo i suradnici [201] ispitivali su ekotoksični utjecaj procjednih voda suspenzija PET mikročestica. Ispitana su tri raspona veličina čestica: 5 – 60 μm , 61 – 499 μm i 500 – 3000 μm primjenom testa s *Vibrio fischeri* pri pH medija od 8,0 i 7,5. Uočen je ekotoksični utjecaj nakon 15 min izlaganja bakterije procjednim vodama PET čestica veličine 500 – 3000 μm pri pH 7,5 u iznosu od 18,2 %, dok je za ostale veličine čestica došlo do biostimulacije bakterije [201]. Dakle, otpuštanje aditiva s MP-a predstavlja neizravan kemijski utjecaj na ekosustave te je potrebno provoditi ovakva ispitivanja.

2.4.2 Ekotoksikološke studije na mikroalgama

Mikroalge, osobito fitoplankton, su primarni proizvođači u hranidbenom lancu. Stoga, svaki štetni učinak na mikroalge utječe na cijeli ekosustav [202]. Već su zabilježeni različiti štetni učinci MP-a na mikroalge poput smanjenja sposobnosti obavljanja fotosinteze uslijed smanjenog udjela klorofila [203] i/ili pojave efekta zasjenjenja (eng. *shading effect*) uslijed adsorpcije na površinu mikroalge [204], no uglavnom je istraživana negativan utjecaj na rast mikroalgi. Adsorpcija MP-a na mikroalgama ujedno ometa razmjenu hranjivih tvari, plinova i toksičnih metabolita.

Wu i suradnici [203] izvijestili su da su PP i PVC MP u koncentracijama od 5, 10, 50, 100, 250 i 500 mg/L pokazali negativan učinak na udio klorofila kod slatkovodnih mikroalgi *Chlorella pyrenoidosa* i *Microcystis flosaquae*, s tim da je PVC bio nešto toksičniji. Mao i suradnici [202] izvijestili su da su čestice PS-a veličine u rasponu između 0,1 i 1,0 μm i u koncentracijama 10, 50 i 100 mg/L izazvale inhibiciju rasta (veći učinak uočen je za manje čestice) i oksidativni stres te prouzročile morfološke promjene na slatkovodnoj mikroalgi *Chlorella pyrenoidosa*. Morfološke promjene stanice mikroalgi obično su povezane s pojavom heteroagregacije između čestica MP-a i mikroalgi, čime se dobivaju veće i teže strukture nego početne čestice MP-a, što na kraju rezultira fizičkim oštećenjem stanica mikroalgi [205]. Takve čestice lakše dospijevaju u dublje slojeve vode, tako da heteroagregacija podržava prijenos MP-a prema dnu vodenih ekosustava [202].

Općenito se može zaključiti da na ekotoksični utjecaj MP-a na mikroalge osim vrste polimera, utječe veličina, naboj i koncentracija čestica. Svojstva MP polimera, poput gustoće ili

svojstva površine čestica, imaju utjecaj na raspodjelu MP-a u vodenom stupcu čime MP postaje više dostupan pojedinim organizmima [206]. Manje MP čestice najčešće su ekotoksičnije za mikroalge. Potvrđeno je da 0,05 μm čestice PS-a izazivaju veće smanjenje broja stanica mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* u odnosu na čestice veličina 0,5 i 6,0 μm [207]. Zhang i suradnici [208] su izvijestili da su PVC čestice veličine 1,0 μm izazvale negativniji utjecaj na rast mikroalgi *Skeletonema costatum*, udio klorofila i sposobnost obavljanja fotosinteze u odnosu na čestice 1,0 μm . Nadalje, pozitivno nabijene čestice MP-a pokazale su veću interakciju s mikroalgama i veću ekotoksičnost nego negativno nabijene čestice [204]. Povišenjem koncentracije MP-a, ekotoksičnost na mikroalge se povećava [197].

I u slučaju mikroalgi, dosadašnje studije su uglavnom primjenjivale morske mikroalge, pa bi istraživanja na slatkovodnim mikroalgama doprinjela ispravnijoj procjeni ekotoksikološkog utjecaja MP-a u slatkovodnim ekosustavima.

2.4.3 Ekotoksikološke studije na *Daphnia magna*

Dafnije, planktonski slatkovodni račići, često se koriste u ekotoksikološkim laboratorijskim istraživanjima, posebice *Daphnia magna* [29,209-211]. Važni su temeljni članovi prehrambenog lanca o kojima ovise više trofičke razine u slatkovodnim ekosustavima, odnosno imaju važnu ulogu u hranidbenom lancu voda stajaćica [212]. S obzirom na globalno onečišćenje MP-om, potrebno je provoditi ekotoksikološke studije na *Daphnia magna* jer su zajednice zooplanktona ključne za očuvanje vodene biološke raznolikosti te funkcioniranje ekosustava [212].

Dosadašnja istraživanja ukazala su da unos MP-a u dafnije ovisi o veličini, obliku, vrsti i koncentraciji MP-a [29,209]. *Daphnia magna* najčešće gutaju čestice MP do 5 μm što predstavlja sličan raspon veličina kao i njihov uobičajeni izvor hrane: mikroalge [211,213-216]. Međutim, potvrđen je i unos PE čestica do 75 μm [29] te PET vlakna do 1,4 mm [209]. Aglomeracija, koja se događa pri višim koncentracijama MP-a, doprinosi smanjenju stope gutanja [174,209-211]. Krogh Frydkjær i suradnici [174] su uočili da povišene koncentracije PE mikročestica smanjuju pokretljivost *Daphnia magna*, dok nepravilni fragmenti intenzivnije djeluju na dafnije od čestica pravilnog sfernog oblika. Naime, čestice pravilnog oblika *Daphnia magna* može lakše izbaciti iz organizma čime smanjuje negativan učinak [24,174]. Rehse i suradnici [214] primijetili su razlike u inhibiciji ovisno o veličini MP-a, te zaključili da su manje PE čestice toksičnije za

dafnije. Isti rezultati dobiveni su i za PS čestice [210]. Sitnije MP čestice utječu negativnije na dafnije zbog bioakumulacije koja narušava rad crijeva dafnija uz mogućnost širenja MP-a u ostala tkiva [173]. An i suradnici [180] istraživali su učinke sintetskih fragmenata PE veličine 17,2 μm i komercijalnih mikroznaca PE veličine 34,4 μm koncentracije 5 mg/L i uočili smanjenje rasta i reprodukcije *Daphnia magna* ovisno o veličini. To je bilo povezano s bioakumulacijom fragmenata PE u crijevima, što je rezultiralo smanjenim unosom hrane, duljinom tijela i brojem potomaka, te posljedično većom smrtnošću dafnija. Ovi utjecaji su prilično zabrinjavajući jer je MP nepravilnih oblika češće prisutna u vodenim ekosustavima [173].

Jaikumar i suradnici [217] izlagali su MP trima vrstama dafnija: *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* i *Ceriodaphnia dubia* te utvrdili da osjetljivost prema pojedinim vrstama MP-a može varirati ovisno o testnom organizmu. Također, primijećeno je da akutna osjetljivost dafnija naglo raste s temperaturom. Jemec i suradnici [209] testirali su potencijalni učinak hranjenja dafnija na ekotoksičnost prema MP-u. Sitost dafnija nije utjecala na unos MP-a, ali je imala značajan utjecaj na smrtnost organizama: nenahranjena populacija dafnija imala je porast smrtnosti uslijed izlaganja MP-u, što nije bio slučaj kod sitih organizama. Besseling i suradnici [213] otkrili su da sitne čestice PS-a negativno utječu na veličinu tijela i reprodukciju dafnija s obzirom da je opaženo 67,7 % malformiranih potomaka.

2.4.4 Ekotoksikološke studije na ribama

Čestice MP-a pronađene su u crijevima riba bilo da su ulovljene u površinskim vodama (urbana područja [218,219], nizvodno od UPOV-a [220]) ili u oceanima (i pelagične i pridnene ribe) [25]. Jednako tako pronađene su i u ribljem mesu [221]. Čini se da su najčešći oblik MP-a koji završi u probavnom sustavu riba vlakna [218], a što se polimera tiče to su PE, PET, najlon, celofan, poliester i poliamid [25,194,218, 222].

Izlaganje riba MP-u može imati ozbiljne učinke, uključujući neurotoksičnost [223], genotoksičnost, smanjenje predatorstva, rasta i reprodukcije [172], oksidativni stres, narušavanje imunološkog sustava, metabolizma i hormonske ravnoteže, ali i mortalitet [224]. Viša koncentracija MP-a utjecala je na mortalitet i duljinu tijela riba u slučaju europskog grgeča *Perca fluviatilis* [225]. Riba *Oryzias latipes* bila je dijetetski izložena PE mikročesticama (< 0,5 mm), a rezultati su pokazali bioakumulaciju MP-a, stres jetre i nastanak tumora [226]. Embriji iste vrste

bili su izloženi MP česticama na koje su adsorbirane različite štetne tvari poput policikličkih aromatskih ugljikovodika, polikloriranih bifenila i polibromiranih difenil etera [227]. MP-a je pridonijela unosu adsorbiranih tvari u embrije, što je negativno utjecalo na njihov rast i stopu preživljavanja.

Jedan od najčešće korištenih slatkovodnih organizama u ekotoksikološkim studijama je riba zebrica: *Danio rerio* (Hamilton, 1822). Dokazano je da MP može uzrokovati morfološke deformacije kod *Danio rerio* [228], kao i oštećenje živčanog, vizualnog [229], reproduktivnog [23] i imunološkog sustava [230], oksidativni stres [228] te oštećenje crijeva [231]. Lu i suradnici [228] proučavali su akumulaciju PS-a u odraslim jedinkama *Danio rerio* tijekom 7 dana. Čestice veličine 5 μm pronađene su u škragama, jetri i crijevima, dok su čestice od 20 μm pronađene samo u škragama i crijevima. Zhao i suradnici [232] izložili su samo muške odrasle zebrice PS-u veličine 5 μm tijekom 21 dana i utvrdili značajno smanjenje težine jedinki i poremećaj u funkcioniranju jetre. Chen i suradnici [229] su izložili zebrice PS-u mikro i nano-veličine i utvrdili 22 % inhibicije lokomotornih aktivnosti uz smanjenje duljine tijela za 6 %, neurotoksičnost i genotoksičnost. Lee i suradnici [233] testirali su štetne učinke PS-a (50, 200 i 500 nm) na embrijima zebrica. Kroz pore koriona, prošle su čestice veličine 50 nm i prodrle u tijelo te se nakupile u tkivima (mozak, mrežnica oka, krvne žile) i žumanjku. Parenti i suradnici [234] detektirali su prodor većih čestica (veličine do 500 nm) u tkiva embrija. Malafaia i suradnici [235] ispitivali su ekotoksičnost PE MP-a ($38,26 \pm 15,64 \mu\text{m}$) u koncentracijama 6,2, 12,5, 25, 50 i 100 mg/L izlaganjem *Danio rerio* pri statičnim i polustatičnim uvjetima tijekom 24, 48, 72, 96, 120 i 144 sati. Niže ispitivane koncentracije PE-a pokazale su ekotoksični utjecaj i na embrije i na odrasle jedinke. Primijećen je negativan utjecaj PE na stopu izlijeganja embrija. Izloženost zebrica pri 50 i 100 mg/L PE u polustatičnim uvjetima uzrokovala je značajne morfološke promjene uz visoki teratogeni učinak [235]. Sve navedeno upućuje na subletalni učinak MP-a. Nadalje, osim ispitivanja MP čestica različitog polimernog sastava, ekotoksikološka ispitivanja se provode i za različite oblike MP-a. Prilikom ispitivanja utjecaja PP vlakana, duljine $50 \pm 26 \mu\text{m}$ i $200 \pm 90 \mu\text{m}$, na embrije *Danio rerio* stare 7 dana (izlaganje od 2 dana) te odrasle jedinke (izlaganje 21 dan) [236] uočeno je da za istu duljinu vlakna viša koncentracija uzrokuje veći ekotoksični utjecaj, dok pri istoj koncentraciji dulja vlakna uzrokuju veća oštećenja. Ekotoksičnost se manifestirala preko histopatoloških promjena uz oksidativni stres i upale. Rezultati su pokazali da vlaknasta MP može pojačati metabolizam

glicerofosfolipida što pojačava oksidativna oštećenja, dovodi do nastanka upale i usporavanja metabolizma.

Kako je riba glavni izvor proteina za ljude, prevalencija i ekotoksikološki učinci MP-a u ribama mogu utjecati na sigurnost ove hrane po ljudsko zdravlje [237].

2.4.5 Ekotoksikološke studije procjene kumulativnog utjecaja

MP ispuštena u okoliš izložena je drugim potencijalno štetnim tvarima (npr. teški metali, organske onečišćujuće tvari). MP ima snažan adsorpcijski kapacitet zbog male veličine čestica, velike specifične površine i visoke hidrofobnosti [238,239], pa stoga može djelovati kao vektor za daljnji prijenos tih tvari. Tako PE, PP, PS i PVC čestice imaju visok sorpcijski potencijal za heksaklorocikloheksane, policikličke aromatske ugljikovodike, klorirane benzene i druge onečišćujuće tvari [240]. Kapacitet sorpcije MP-a ovisi o fizikalno-kemijskim karakteristikama onečišćujućih tvari, vrsti, boji, obliku i veličini čestica MP-a [83].

Uz to, pri ekotoksikološkim studijama kumulativnog utjecaja ne smije se isključiti mogućnost pojačanog (sinergizam) ili smanjenog (antagonizam) ekotoksičnog djelovanja uslijed istovremene izloženosti MP-u i drugim agensima [210,241,242].

2.5 Metode uklanjanja mikroplastike iz okoliša

Razgradnja polimera u okolišu odvija se kroz 4 mehanizma ili njihovom kombinacijom. To su: i) fotorazgradnja, ii) hidroliza, iii) termooksidacija i iv) biorazgradnja [44,46]. U prirodnim uvjetima razgradnja polimera započinje fotooksidacijom te se nastavlja termooksidacijom te, u manjem udjelu, hidrolizom. Navedeno dovodi do raspadanja polimera na manje dijelove, povećanja krhkosti materijala te smanjenja molekulske mase polimera. Nastale komponente manjih molekulskih masa mogu lakše biti metabolizirane od strane mikroorganizmima. Ovako opisan proces razgradnje je vrlo dugotrajan te bi za mineralizaciju polimera, tj. razgradnju do CO₂, H₂O i anorganskih molekula, potencijalno trebalo i više od 50 godina [44].

U svrhu uklanjanja MP-a iz otpadnih voda proučavaju se razni pristupi poput koagulacije [243], filtracije [6], elektrokoagulacije [243], adsorpcije [244], fotokatalitičkih procesa [245], membranskih procesa [246], naprednih oksidacijskih procesa [247], pa čak i upotrebe magneta

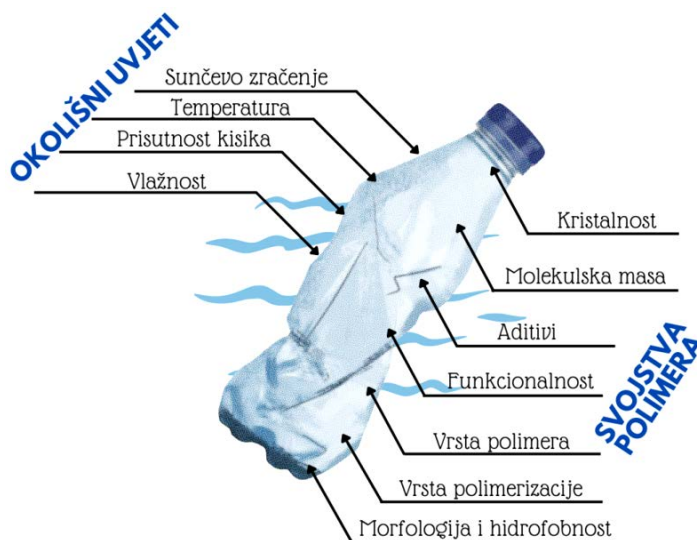
[248], ali i bioloških procesa primjenom aktivnog mulja [249]. Svaki od ovih pristupa ima svoje prednosti i nedostatke. Primjerice, učinkovitost aktivnog mulja u uklanjanju malih čestica poput MP-a relativno je niska, a osim toga, dodatan problem postaje zbrinjavanje mulja nakon procesa obrade [249]. Fotokatalitička razgradnja je ekološki prihvatljiv pristup, ali s nižom učinkovitošću od, primjerice, membranskih procesa [250]. Membranski procesi općenito imaju najveću učinkovitost uklanjanja (može ići iznad 90 % [251]), no veliki nedostatak je potreba za održavanjem membrana [250,252]. Također se pokazalo da najtanja MP vlakna mogu pod visokim tlakom proći kroz membrane [125,253]. Stoga se često kombiniraju različiti postupci ne bi li se postigla bolja učinkovitost uklanjanja ili povećala ekonomičnost procesa. Primjerice, postupci sorpcije i filtracije su učinkovitiji u kombinaciji s biorazgradnjom [33]. Membranski procesi često se kombiniraju s biološkom predobradom (membranski bioreaktori) [254], a čak se i membranski bioreaktori kombiniraju dodatno s fizičkim [33] ili kemijskim obradama [255].

Kako god, razna su gledišta preko kojih se može pristupiti ovoj problematici, a u sljedećim poglavljima dat će se pregled primjene i učinkovitosti bioloških procesa.

2.5.1 Bioremedijacija

Bioremedijacija je jedan od najpopularnijih pristupa pročišćavanju otpadnih voda, a najčešće korištene tehnike su bioaugmentacija i biostimulacija [256] (ove tehnike detaljnije su objašnjene kasnije). Na biorazgradnju MP-a mogu utjecati okolišni uvjeti, svojstva mikroorganizama te svojstva polimera [257], kao što je prikazano na slici 11. Okolišni uvjeti ili abiotski čimbenici su: temperatura i pH medija, UV zračenje, salinitet, koncentracija kisika, sadržaj vlage i slično. Njihovim utjecajem plastika u pravilu postaje pogodnija za kolonizaciju i biorazgradnju. Geografska lokacija, klimatski uvjeti (vlažnost, sunčeva svjetlost, prisutnost kisika i slično), kao i onečišćenje zraka, mogu utjecati na mehanizme i brzinu procesa razgradnje plastike. Geografska lokacija se smatra važnim čimbenikom prirodne razgradnje polimera; primjerice u dubini mora je smanjen prodor i intenzitet sunčeve svjetlosti što dovodi do smanjene stope fotorazgradnje polimera, dok je na površini mora utjecaj svjetlosti veći [258]. Vlažnost je bitan čimbenik za razgradnju zbog hidrolitičkog cijepanja funkcionalnih skupina koje su osjetljive na hidrolizu, što dovodi do raspada polimernog lanca [44]. Hidroliza polimernog lanca također se povećava s temperaturom, jer utječe i na brzinu difuzije kisika i na stvaranje slobodnih radikala [258]. Brzina razgradnje raste s intenzitetom sunčeve svjetlosti zbog

povećanja brzine fotooksidacije [259]. Pishedda i suradnici [260] otkrili su da se brzina razgradnje polimera povećava s porastom temperature pri čemu se brzina reakcije duplicira svakih 10 °C. Nadalje, povećanje temperature povećava pokretljivost polimernog lanca utječući tako na mikrobnu aktivnost tijekom biorazgradnje. Povećana koncentracija kisika ubrzava razgradnju polimera [261] pa se može zaključiti da su visoka razina kisika i vlage idealni okolišni uvjeti za (bio)razgradnju polimernih materijala.



Slika 11. Čimbenici koji utječu na biorazgradnju polimera u okolišu.

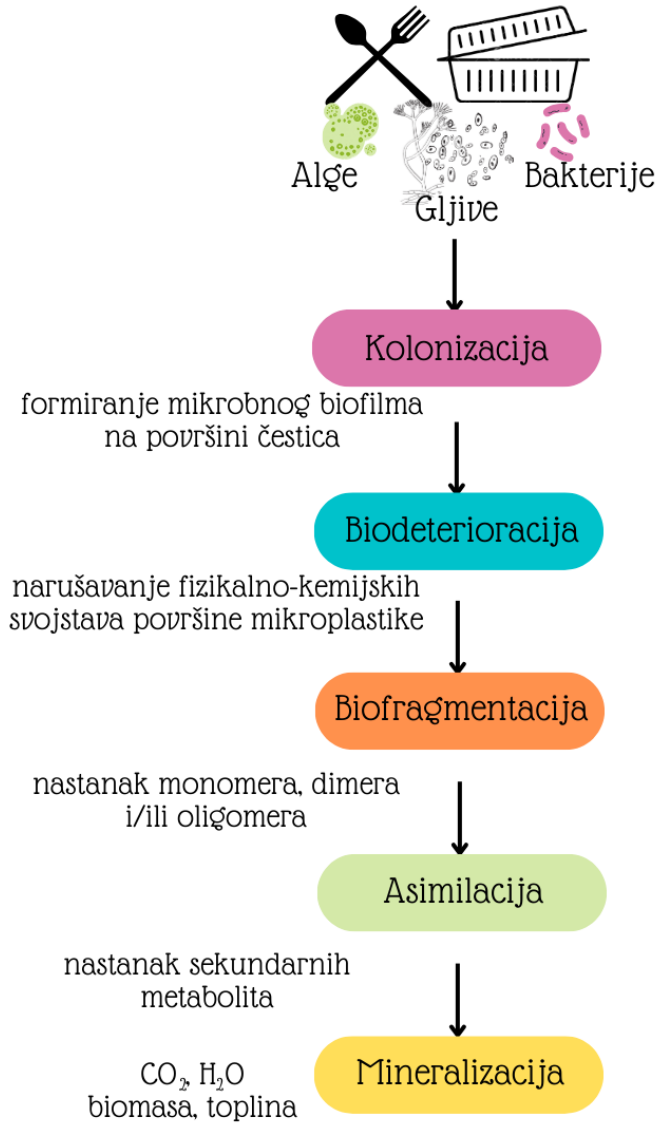
Biotskim čimbenicima ili svojstva mikroorganizama smatraju se vrsta mikroorganizma i broj živih stanica, prisutnost pojedinačne ili mješovite kulture, hidrofobnost stanica, raznolikost enzimskog sustava, izlučivanje izvanstaničnih enzima i mogućnost proizvodnje biosurfaktanata. Svojstva polimera kao što su površina, hidrofobnost, morfoloģija, funkcionalne skupine, molekulska masa, fleksibilnost, staklište, talište, elastičnost, taktičnost, kristalnost, ali i vrsta (npr. mješavine polimera, kopolimeri, umreženi polimeri, prisutnost aditiva), također definiraju mehanizam i brzinu biorazgradnje [44, 55, 61].

Svojstva mikroorganizama uključuju vrstu mikroorganizma (bakterije, plijesni ili kvasci). Zasad je istraživano oko 250 vrsta bakterija koje imaju potencijal za biorazgradnju polimernih materijala [257]. Brojnost bakterija utječe na proces biorazgradnje jer veći CFU na početku procesa pospješuje biorazgradnju. Mješovita kultura ili konzorcij može imati veću učinkovitost biorazgradnje od pojedinačnih kultura. Svaka od kultura konzorcija može poboljšati

biorazgradnju neizravno metaboličkim unakrsnim hranjenjem ili proizvodnjom metabolita koji potiču kometaboličku razgradnju.

Fizikalno-kemijska svojstva polimernih materijala, poput duljina lanca i postrani lanci, značajno utječu i određuju njihovu biorazgradnju. Naime, polimeri s dugačkim ugljikovim lancima su otporniji na biorazgradnju, dok su polimeri s heteroatomima (kao što je PET) i/ili bočnim lancima dostupniji za biorazgradnju [44,69]. Nadalje, povećanjem hidrofobnosti polimera, povećava se učinkovitost razgradnje [44], no povećanje molekulske mase polimera rezultira nižom biorazgradivošću s obzirom na manju aktivnu površinu [262,263]. Više temperature taljenja obično su povezane s nižom biorazgradivošću [264]. Biorazgradnja će se povećati s hrapavošću površine čestica jer se zbog veće aktivne površine, pospješuje stvaranje biofilma više nego na glatkim površinama [44]. Polimerni lanac mora biti fleksibilan kako bi se uklopio u aktivno mjesto enzima; tako su alifatski polimeri, s fleksibilnijim lancima, podložniji biorazgradnji primjerice lipolitičkim enzimima, u odnosu na aromatske polimere [61,264]. Općenito, enzimi napadaju amorfne regije polimera jer kristalna područja imaju ograničeno kretanje lanca i, sukladno tome, otpornija su na biorazgradnju [44,67]. Nadalje, ukoliko polimer sadrži funkcionalne skupine koje enzimi mogu lakše napasti, kao što su esterske, karbonilne ili amidne funkcionalne skupine, brzina biorazgradnje će biti veća. Nadalje, vrsta strukture polimera također utječe na biorazgradivost polimera pa je, primjerice, kopolimerizirani PP manje osjetljiv na foto- i biorazgradnju od PP-a proizvedenog polimerizacijom u masi ili Ziegler-Natta katalizatorom [265]. Dodatak aditiva pospješuje svojstva polimernih materijala što ih može učiniti teže biorazgradivima [266].

Biorazgradnja polimera uključuje najmanje tri reakcije: i) depolimerizaciju dugih lanaca, ii) stvaranje oksidiranih razgradnih produkata, te iii) mineralizaciju nastalih razgradnih produkata [70]. Mikroorganizmi mogu razgraditi MP izravnim djelovanjem, ako MP djeluje kao supstrat za rast mikroorganizama, ili neizravnim djelovanjem kada izlučeni metabolički produkti utječu na biorazgradnju. Biorazgradnja općenito uključuje nekoliko faza (slika 12).



Slika 12. Shematski prikaz stupnjeva biorazgradnje polimernih materijala uz popis mogućih analitičkih i instrumentalnih metoda za potvrdu biorazgradnje.

Primarno, dolazi do kolonizacije površine MP-a mikroorganizmima [61]. Na kolonizaciju snažan negativni utjecaj ima hidrofobnost površina plastičnih materijala budući su stijenke stanica mikroorganizama hidrofilne [267]. Dodatak tenzida, odnosno ulja i mineralnih soli koji stimuliraju proizvodnju biosurfaktanata može pozitivno utjecati na kolonizaciju [61,268]. Nakon kolonizacije, mikroorganizmi prisutni na površini MP-a izlučuju izvanstanične enzime koji djeluju na površinu MP čestica. Kemijske veze u strukturama plastičnih polimera mogu biti hidrolizirajuće (npr. C–O veze) ili nehidrolizirajuće (npr. C–C veze) [44,269,270].

Depolimerizacija polimera koji ne mogu hidrolizirati zahtijeva enzime s visokim redukcijskim potencijalom za oksidativno cijepanje C–C veza [270] pa su, generalno, polimeri s hidrolizirajućim vezama su podložniji biorazgradnji. Depolimerizacijom nastaju jednostavnije molekule: monomeri, dimeri i drugi oligomeri, koji su mikroorganizmima lakše dostupni i biorazgradljiviji. Monomeri topivi u vodi mogu proći kroz staničnu membranu i ući u stanicu gdje postaju izloženi unutarstaničnim enzimima. Kada mikroorganizmi iskorištavaju monomer kao izvor energije i ugljika (tzv. asimilacija), to rezultira mineralizacijom [61]. Iako primjena mješovitih kultura općenito osigurava bolju biorazgradnju od korištenja čistih kultura [271], korištenje čistih kultura nudi mogućnost proučavanja metaboličkih putova, kao i utjecaja različitih okolišnih uvjeta na proces biorazgradnje. Rijetki se enzimi u literaturi povezuju s razgradnjom PE, PP, PS, PVC i PET polimera.

Oksidacijski enzimi koji mogu depolimerizirati PE uključuju peroksidazu, monoooksigenazu, mangan peroksidazu, oksidazu i dehidrogenazu, a mehanizam djelovanja je oksidacija etilenskih skupina [268]. Takvi su enzimi izvanstanična lakaza koju luči bakterija *Rhodococcus ruber* [272], gljive *Aspergillus flavus* [273] i *Pleurotus ostreatus* [274], sojina peroksidaza iz gljiva *Phanerochaete chrysosporium* [275] i *Trnetes versicolor* [276], kao i alkan hidroksilaza i reduktaza iz bakterija roda *Pseudomonas* [277,278].

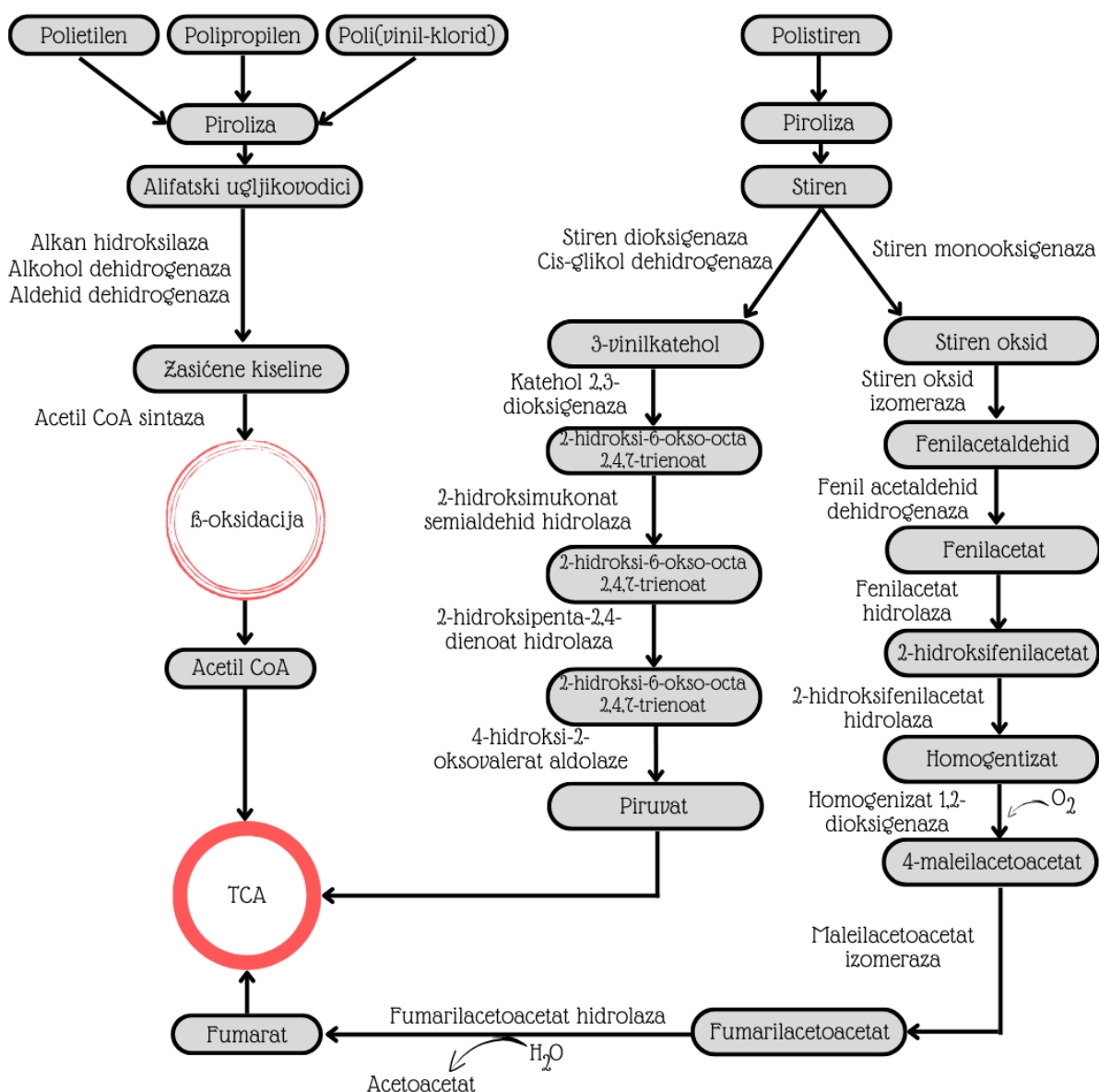
Prema dostupnim istraživanjima, zasad nisu pronađeni enzimi za biorazgradnju PP-a, dok je poznato da u mineralizaciji PET-a ključnu ulogu imaju dvije grupe hidrolaza poznatijih pod nazivom PETaze i MHETaze. Jedan od mikroorganizama za kojeg je potvrđeno da ima mogućnost stvaranja ovih enzima te može koristiti PET kao izvor ugljika i energije je bakterija *Ideonella sakaiensis* [279,280].

Dosadašnja istraživanja biorazgradnje PVC-a obuhvaćaju najviše upotrebu gljiva poput *Aureobasidium pullulans* [281], *Phanerochaete chrysosporium* [44,282], *Poliporus versicolor* i *Pleurotus* spp. [282], a tek nekoliko radova ispitalo je primjenu bakterijskih kultura [37,283] (tablica 5). U većini istraživanja biorazgradnje PVC-a prati se rast mikroorganizama, a u manjoj mjeri smanjenje molekulske mase PVC-a. Također, uglavnom se ne nudi informacija o sadržaju plastifikatora u ispitivanim uzorcima pa nije moguće sa sigurnošću zaključiti da li je opaženi rast mikroorganizama posljedica razgradnje plastifikatora ili PVC polimera [70]. Ipak, za nekoliko bakterija se utvrdilo da imaju sposobnost biorazgradnje PVC-a. Tako je uočena promjena morfologije površine PVC mikročestica nakon 70 dana izlaganja sljedećim bakterijama

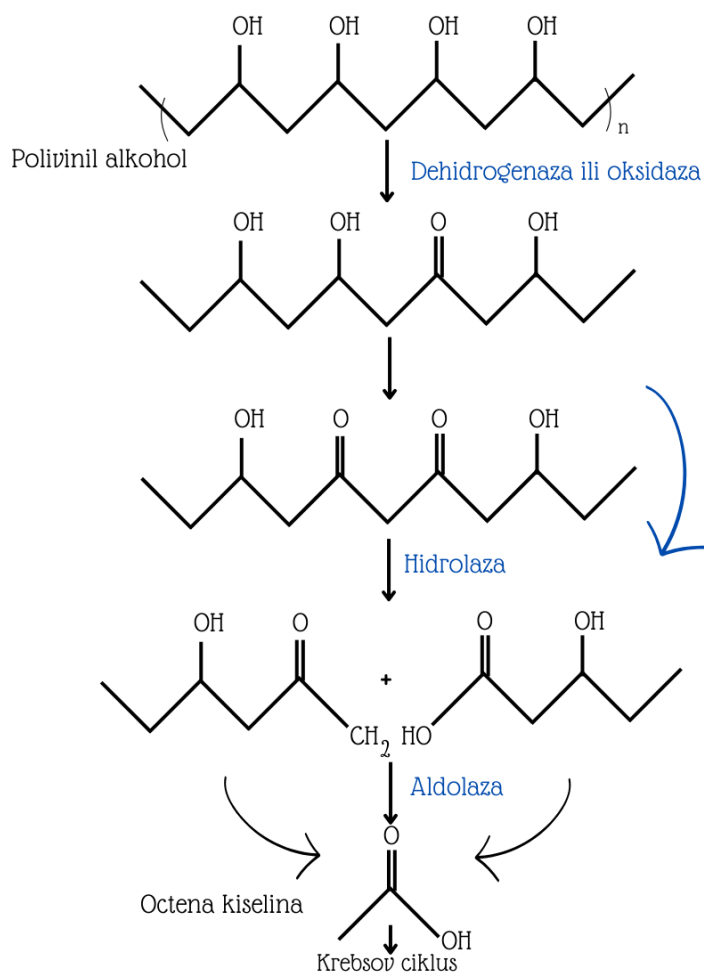
izoliranim iz tla: *Microbacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus aerius*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas otitidis* i *Acanthopleurobacter pedis* [284]. Zadnjih se godina proučavaju i ličinke insekata poput *Tenebrio molitor*, *Tenebrio obscurus*, *Tribolium castaneum*, *Plesiophtalmus davidis* i *Zophobas astratusa* u svrhu istraživanja biorazgradnje i PVC-a, ali i PS-a [70,285,286]. Prema dosadašnjim literaturnim podacima, enzimi koji su izravno uključeni u biorazgradnju PVC-a još nisu poznati. Stoga neki znanstvenici predlažu da se metabolički put razgradnje PVC-a opiše na način kako se odvija metabolizam razgradnje polivinil alkohola, koji ima alkoholnu funkcionalnu skupinu tamo gdje je u strukturi PVC-a klor (slika 14). Djelovanjem dehidrogenaze ili oksidaze dolazi do depolimerizacije izvan stanice i cijepanja glavnog polimernog lanca. Nakon toga hidrolazom ili aldolazom produkti se prevode u octenu kiselinu koja pak ulazi u Krebsov ciklus [287]. Drugi pak predlažu metabolizam razgradnje do kojeg dolazi nakon što se polimerni lanci pirolizom prevedu u alifatske ugljikovodike. Nastale alifatske ugljikovodike alkan hidrosilaza prevodi u alkane, a oksidaciju od alkohola do aldehida enzimima provode alkohol i aldehyd dehidrogenaze. Zatim nastaju zasićene kiseline koje acetyl koenzim A sintaza dovodi do procesa β -oksidacije (slika 13).

Bakterije *Bacillus* sp., *Sphingobacterium* sp. i *Xanthomonas* sp. pokazale su učinkovitost biorazgradnje PS-a [288] te očito posjeduju enzimski sustav sposoban razgraditi ovaj polimer. Mor i Sivan [65] ispitivali su primjenu bakterije *Rhodococcus ruber* u svrhu razgradnje PS-a, te je nakon 56 dana učinkovitost razgradnje iznosila 0,8 %. Nadalje, Hwang i suradnici [289] potvrdili su potencijal bakterije *Brevibacillus* sp. za biorazgradnju PS-a. Krueger i suradnici [60] otkrili su smanjenje molekulske mase PS sulfonata tijekom izloženosti bakteriji *Gloeophyllum trabeum*, dok su Sekhar i suradnici [290] potvrdili smanjenje mase HIPS-a uslijed izloženosti trima bakterijama izoliranim iz okoliša: *Citrobacter sedlakii*, *Enterobacter* sp. i *Brevundimonas diminuta*, s tim da je najveći gubitak mase utvrđen za *Enterobacter* sp. Neki autori ukazuju i na potencijal bakterijskih kultura *Acinetobacter johnsonii* i *Pseudomonas lini* [291]. Metabolički put prikazan na slici 13, prikazuje razgradnju PS-a do Krebsova ciklusa što su sposobni provesti mikroorganizmi rodova *Xanthomonas*, *Sphingobacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizopus*, *Aspergillus* i *Exiguobacterium* [287]. Sam proces razgradnje može započeti i prije ingestije PS-a, izlučivanjem izvanstaničnih enzima koji hidrolitički cijepaju površinske polimerne lance [63]. Nakon asimilacije nastalih produkata unutarstanični enzimi nastavljaju proces razgradnje. Kao enzimi za biorazgradnju PS-a navode se

hidrokinon peroksidaza (*Azotobacter beijerinckii*) [292], ekstracelularna esteraza (*Lentinus tigrinus*) [293], stiren monooksigenaza (*Bacillus cereus*, *Rhodococcus* sp., *Pseudomonas* sp. i *Pseudomonas putida*) [294], te polimeraze iz bakterija rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* [140]. Također, poznato je da se monomer PS-a, stiren, prije ulaska u ciklus trikarboksilne kiseline (TCA) razgrađuje pomoću sljedećih enzima: stiren monooksigenaze, stiren oksidne izomeraze, fenilacetaldehid dehidrogenaze i fenilacetil koenzim A ligaze (slika 13) [63,295]. Navedeni enzimi uključeni su u niz reakcija koje uključuju oksidaciju stirena u fenilacetat te ugradnju fenilacetata u Krebsov ciklus.



Slika 13. Shematski prikaz razgradnje poli(vinil-klorida) i polistirena.



Slika 14. Shematski prikaz razgradnje polivinil alkohola.

Naposljetku potrebno je istaknuti da se mikroorganizmi koji mogu razgraditi MP razlikuju ovisno o karakteristikama okoliša iz kojeg su izolirani. Naime, brzina biorazgradnje ovisi o fiziološkom stanju primijenjenog mikroorganizma, na koje snažno utječu okolišni uvjeti [296]. Stoga bi autohtoni mikroorganizmi (mikroorganizmi izolirani iz okoliša, osobito onog s povećanim udjelom MP-a) trebali osigurati učinkovitiju biorazgradnju jer su već donekle prilagođeni na uvjete kojima se izlažu. Sukladno tome, važno je identificirati autohtone mikroorganizme iz različitih ekosustava i provjeriti njihovu sposobnost biorazgradnje MP-a [264]. Primjena autohtonih mikroorganizama vrlo je obećavajući pristup bioremedijaciji koji omogućuje pročišćavanje onečišćenih ekosustava bez nepotrebnih intervencija [34]. U tablici 5 dan je pregled dosad izoliranih bakterija s potencijalom za biorazgradnju MP-a.

Tablica 5. Popis bakterija koje imaju sposobnost biorazgradnje mikroplastike.

MP	Bakterija	Izvor izolacije	Gubitak mase / %	t / dan	Enzimi	Dodatne analize	Lit.
PE	<i>Bacillus cereus</i>	odlagalište otpada	14,0	90	lakaza i manganova peroksidaza	FTIR, SEM	[297]
			35,7	112	-	FTIR, GC-MS	[298]
	<i>Bacillus gottheilii</i>	sediment mangrova	10,6	40	-	FTIR, SEM	[34]
			60,2	40	-	FTIR, SEM	[34]
	<i>Bacillus mycoides</i>	sediment mangrova	10,5 (HDPE)	60	-	FTIR	[299]
			11,4 (LDPE)				
	<i>Bacillus subtilis</i>	sediment mangrova	9,3	30	-	FTIR	[300]
			17,7 (HDPE)	60	-	FTIR	[299]
	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	odlagalište otpada	11,0				
			20,3	112	-	FTIR, GC-MS	[297]
	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	tlo onečišćeno plastikom	16,2	30	-	-	[302]
	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	-	61,0	60	-	FTIR	[303]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	50,5	60	-	FTIR	[303]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	20,0	120	-	FTIR, GC-MS, SEM	[36]
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	tlo onečišćeno plastikom	20,1	30	-	-	[302]
	<i>Pseudomonas putida</i>	-	9,0	120	-	FTIR, GC-MS, SEM	[36]
	<i>Pseudomonas syringae</i>	-	11,3				
	<i>Zalerion maritimum</i>	-	43,0	28	-	FTIR, NMR, SEM	[304]
	<i>Aneurinibacillus sp. i Brevibacillus sp.</i>	UPOV i odlagalište otpada	58,2 (LDPE)	140	-	FTIR, NMR, AFM, EDS, GC-MS, SEM	[305]
			46,6 (HDPE)				
<i>Bacillus sp. i Paenibacillus sp.</i>	sediment odlagališta otpada	14,7	60	-	FTIR, GC-MS, TGA, SEM	[306]	
	tlo šume i kratera vulkana	7,5	75	-	FTIR, GC-MS, SEM	[307]	
<i>Bacillus sp., Pseudomonas sp. i Staphylococcus sp.</i>	tlo	20,0	40	-	-	[308]	

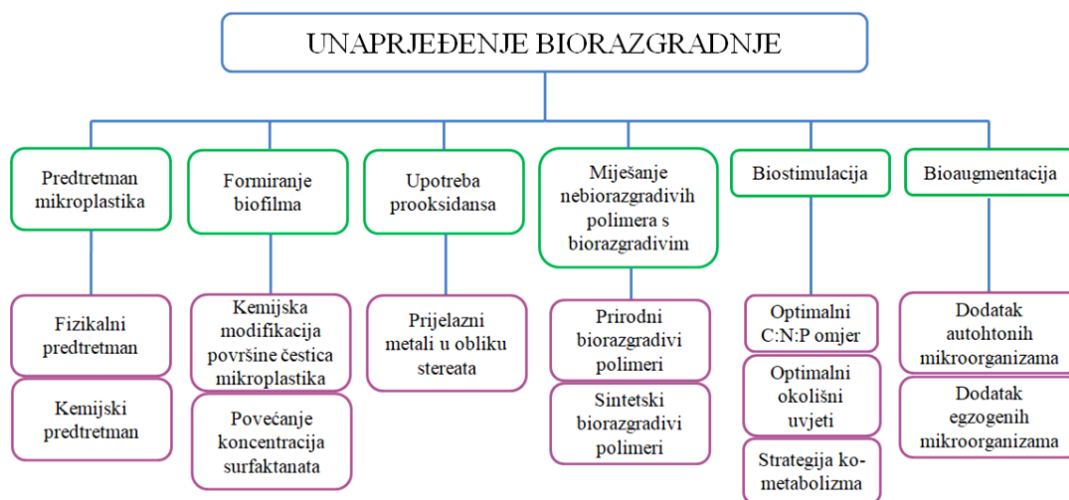
Tablica 5. Nastavak

MP	Bakterija	Izvor izolacije	Gubitak mase / %	t / dan	Enzimi	Dodatne analize	Lit.
PP	<i>Bacillus cereus</i>	sediment mangrova	12,0	40	-	-	[35]
	<i>Bacillus</i> sp.		4,0		-	FTIR, SEM	[309]
	<i>Rhodococcus</i> sp.		6,4		-	-	
	<i>Sporosarcina globispora</i>		11,0		-	-	[37]
	<i>Brevibacillus</i> sp. i <i>Aneurinibacillus</i> sp.	UPOV i odlagalište otpada	56,3	140	-	FTIR, NMR ¹ AFM, EDS, GC-MS, SEM	[305]
PVC	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	-	18,6	45	-	TGA	[37]
	<i>Bacillus</i> spp.	voda onečišćena plastikom	0,3	90	-	FTIR, AFM, SEM	[310]
	<i>Klebsiella</i> sp.	crijevo crva <i>Spodoptera frugiperda</i>	19,6		katalaza-peroksidaza, aldehid dehidrogenaza	FTIR, NMR, GC-MS, SEM	[311]
PET	<i>Bacillus cereus</i>	sediment mangrova	6,6	40	-	FTIR, SEM	[37]
	<i>Bacillus gotheilii</i>		3,0				
	<i>Ideonella sakaiensis</i>	tlo, otpadna voda i aktivni mulj s mjesta za reciklažu PET boca	100,0	42	PETaza i MHETaza	SEM, HPLC	[279]
	<i>Bacillus cereus</i>	sediment mangrova	7,4	40	-	FTIR i SEM	[37]
	<i>Bacillus gotheilii</i>		5,8				
PS	<i>Bacillus</i> spp.	tlo s odlagališta plastike	23,7	30	depolimeraze	FTIR, NMR, TGA, HPLC	[140]
	<i>Pseudomonas</i> spp.		< 10,0		depolimeraze	FTIR, NMR, TGA, HPLC, SEM	[140]
	<i>Pseudomonas lini</i>	tlo s odlagališta otpada	1,45	30	homoserin dehidrogenaza, S-formilglutation hidrolaza	FE-SEM, kontaktni kut	[312]
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>		1,52		alkan hidroksilaza, alkohol dehidrogenaza		
	<i>Rhodococcus ruber</i>	tlo	0,8	56	-	SEM	[60]
<i>Exiguobacterium</i> sp.	crijevo crva <i>Tenebrio molitor</i>	7,4	60	-	SEM, XPS, GPC, kontaktni kut	[313]	
<i>Enterobacter</i> sp.	plastični otpad	12,4	30	depolimeraza	FTIR, NMR, TGA, SEM	[314]	
<i>Pseudomonas putida</i>	industrijski bioreaktor	10,0	2	-	-	[315]	

NMR: Nuklearna magnetska rezonancija; AFM: Mikroskopija atomskih sila; EDS: Energijska disperzivna spektroskopija; TGD: Termogravimetrijska analiza; FE-SEM: Skenirajuća elektronska mikroskopija s emisijom polja; XPS: Fotoelektronska spektroskopija X-zraka

Unaprjeđenje procesa biorazgradnje mikroplastike

Istraženi su različiti pristupi u povećanju efikasnosti biorazgradnje MP-a (slika 15) koji se uglavnom svode na neki vid predobrade MP čestica. Svrha predobrade je razbijanje kemijskih veza u polimernoj strukturi, što omogućuje lakšu naknadnu biorazgradnju [61].



Slika 15. Prikaz unaprjeđenja procesa biorazgradnje.

Površina čestica se može predobraditi kemijskim sredstvima, a najčešća je dušična kiselina koja uzrokuje oksidaciju polimera i nastanak karbonilnih skupina i dvostrukih veza u polimernom lancu [316]. Osim dušične kiseline često se koristi i ozon [317]. Fizikalna obrada uključuje zračenje ili termičku obradu. UV zračenje omogućava fotolizu MP-a, što je proces koji se događa u prirodnom okruženju tijekom izlaganja Sunčevoj svjetlosti [301]. Povećana temperatura općenito uzrokuje depolimerizaciju te je stoga termička obrada pogodna kao predtretman biorazgradnji [318]. Termička predobrada rezultira povećanim udjelom karbonilnih skupina i pogoduje stvaranju manjih ili nesavršenih kristala, što uzrokuje strukturne promjene u polimernom lancu te pozitivno utječe na daljnju biorazgradnju.

Kolonizacija površine MP mikroorganizmima je preduvjet za pokretanje biorazgradnje. Međutim, površinska hidrofobnost sprječava kolonizaciju. Stoga je održiv pristup poboljšanju biorazgradnje poboljšati prijanjanje mikroorganizama na površinu MP-a (formiranje biofilma). To se može olakšati smanjenjem površinske hidrofobnosti kemijskom obradom lužinama ili aminima [61]. Alternativna opcija je smanjenje površinske napetosti između stanične stjenke mikroorganizama i površine MP-a. To se može učiniti izravno dodatkom tenzida ili neizravno poticanjem proizvodnje biosurfaktanata [61]. Biosurfaktanti su spojevi koje sintetiziraju

mikroorganizmi: njihova amfifilna struktura omogućava povećanje specifične površine i bioraspoloživosti hidrofobnih tvari [300]. Biosurfaktanti mogu biti aktivni pri ekstremnim temperaturama, pH i salinitetima, te imaju nižu ekotoksičnost, kao i veću biorazgradivost, selektivnost i pjenjenje u usporedbi sa sintetskim tenzidima [319]. Stimulacija mikroorganizama za proizvodnju biosurfaktanata može se postići dodatkom različitih molekula (glukoza, saharoza, etanol, glicerol) ili optimizacijom parametara biorazgradnje (pH, temperatura, broj okretaja, koncentracija kisika) [320]. Mikroorganizmi koji mogu proizvoditi biosurfaktante uključuju rodove *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Halomonas*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus* [320].

Biološki procesi su vrlo specifični jer zahtijevaju enzimsku aktivnost mikrobne zajednice, optimalne uvjete za njihov rast i razmnožavanje te adekvatan omjer hranjivih tvari i supstrata [296]. Stoga se povećanje učinkovitosti bioremedijacije može postići biostimulacijom i bioaugmentacijom. Biostimulacija se odnosi na stvaranje uvjeta koji stimuliraju mikroorganizme da razgrađuju supstrat. Dakle, nedostatak nekih hranjivih tvari u supstratu može uzrokovati njegovu nisku razgradivost pa se hranjive tvari moraju osigurati izvana [321]. Svaki mikroorganizam ima povoljan omjer C:N:P za svoj rast, a njegova prilagodba je svakako korisna za biorazgradnju. Povoljni uvjeti mogu se postići tvarima, kao što su glukoza, KNO_3 , NaNO_3 i K_2HPO_4 . Mikroorganizmi su također osjetljivi na stanje okoliša te stoga promjene kiselosti okoliša općenito imaju značajan utjecaj na aktivnost mikroorganizama [296]. Korisno je postići optimalan pH koja se razlikuje među mikroorganizmima. Primjerice bakterije preferiraju neutralni pH, dok kiseli mediji bolje odgovaraju gljivama [322]. Za održavanje aktivnosti aerobnih mikroorganizama potrebna je dovoljna razina kisika. Optimalna temperatura također se razlikuje među mikroorganizmima. Svi ovi čimbenici utječu na rast mikroorganizma, njegovu prisutnost u okolišu, te na brzinu i učinkovitost biorazgradnje supstrata.

Mikroorganizmi obično proizvode enzime za razgradnju primarnog supstrata, tj. spoja koji se koristi kao primarni izvor energije. Međutim, enzimi mogu razgraditi i neke druge supstrate (npr. MP), iako sekundarni supstrati često ne stimuliraju proizvodnju enzima na odgovarajući način. Stoga se poboljšanje biostimulacije može postići kometabolizmom, uključujući dodavanje primarnog supstrata u onečišćeni medij, čime se potiče mikroorganizam da proizvodi enzime razgradnje [323].

Autohtoni mikroorganizmi prirodno su prisutni u onečišćenom području, te su stoga već prilagođeni uvjetima okoliša i stoga vrlo važni za biorazgradnju. Njihova se koncentracija može umjetno povećati za učinkovitiju biorazgradnju. Ako autohtoni mikroorganizmi nisu sposobni razgraditi onečišćujuću tvar, mogu se dodati egzogeni mikroorganizmi, što se odnosi na bioaugmentaciju. Egzogeni mikroorganizmi su klasificirani kao: i) nespecifični (mikroorganizmi iz komposta, aktivnog mulja ili tla), ii) visoko specifični (mikroorganizmi koji posjeduju specifične enzime za razgradnju ciljanih onečišćujućih tvari) ili iii) genetski modificirani mikroorganizmi [323]. Međutim, unošenje egzogenih mikroorganizama često je povezano s izazovima poput prilagodbe novim uvjetima okoliša. To znači da je ponekad potrebno prilagoditi uvjete kako bi se osiguralo napredovanje egzogenih mikroorganizama. Nadalje, ovi egzogeni mikroorganizmi moraju se uzgajati u laboratoriju, a kako bi se postigla maksimalna učinkovitost biorazgradnje u što kraćem vremenu, potrebno je odrediti optimalne uvjete za njihov rast i razmnožavanje. Problem se može pojaviti tijekom provedbe *in situ* bioremedijacije; laboratorijski utvrđeni optimalni uvjeti mogu se razlikovati od uvjeta u onečišćenom području, što može dovesti do izumiranja pojedinih biljnih i životinjskih vrsta. Nadalje, može doći do konkurencije između autohtonih i egzogenih vrsta što može poremetiti raznolikost i sastav autohtone zajednice [324].

2.5.2 Potencijal rodova *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Delftia* u bioremedijaciji okoliša

Prema dostupnim literaturnim podacima [257], za biorazgradnju različitih polimera do sada je identificirano 245 kultura bakterija od kojih većina pripada rodovima *Pseudomonas* i *Bacillus*. Bakterije roda *Bacillus* su Gram-pozitivne, imaju sposobnost stvaranja spora te mogu dugo preživjeti pod nepovoljnim uvjetima te su sveprisutne u okolišu. Nadalje, koriste se za pripremu lijekova, industrijskih i poljoprivrednih proizvoda, a također imaju blagotvorni učinak na usjeve jer poboljšavaju produktivnost biljaka u nepovoljnim klimatskim uvjetima [325]. Bakterije roda *Pseudomonas* su Gram-negativne, aerobne, štapičaste, širine 0,5 – 0,8 µm i duljine 1,5 – 3,0 µm. Nesporogene su i kreću se jednostrukim polarnim bičem. Do sada je poznato više od 140 vrsta, od kojih su većina heterotrofne, odnosno saprofiti. Vrste iz ovog roda široko su proučavane zbog svoje sveprisutnosti u morskom i kopnenom okolišu te brojnih drugih podobnih karakteristika. *Delftia acidovorans* (inicijalno poznata kao *Pseudomonas acidovorans* ili *Comamonas acidovorans*) je aerobna, Gram-negativna, blago savijena štapičasta bakterija

koja može živjeti kao jedna stanica ili u paru. Vrlo je raširena te se može pronaći u tlu i vodi. Mezofilna je i optimalna temperatura za njen rast iznosi 30 °C, a preferira okolinu s minimalnom koncentracijom soli [326]. Iako je Gram-negativna bakterija, odlikuje ju dobra otpornost na različite biotičke i abiotičke uvjete te koristi ugljik iz različitih izvora za rast i razvoj biofilma. Specifične vrste ovog roda prilagođene su okolišnim uvjetima, ekstremnijim temperaturama i vlazi, nedostatku kisika i hranjivih tvari, ali i prisutnosti antibiotika [327].

Bakterije roda *Bacillus* imaju značajnu primjenu u bioremedijaciji koja ovisi o vrsti bakterije, mogućnosti proizvodnje antimikrobnih tvari, sposobnosti formiranja biofilma, ali i vrsti onečišćujuće tvari [328]. Ove bakterije zaslužuju pozornost kao biorazgradivi agensi, budući da su sposobne tvoriti korozivne spojeve te spojeve koji razgrađuju polimere, antimikrobne tvari i tvari koji stvaraju antibiofilm. *Bacillus* spp. mogu razgraditi teške metale, pesticide, policiklične aromatske ugljikovodike, bojila, farmaceutike, a mogu i proizvoditi biosurfaktante [329]. Potencijal biorazgradnje PE, PP, PS, PVC, PET i PUR MP-a ispitan je za sljedeće bakterije roda *Bacillus*: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus flexus*, *Bacillus gottheilii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* i *Bacillus chitinolyticus* [328].

Rod *Pseudomonas* pokazao je potencijal za razgradnju PE, PP, PVC, PS, PUR te PET MP-a [316,330,331-333]. Bakterija *Pseudomonas alcaligenes* pokazala je dobru mogućnost bioremedijacije tla onečišćenog kancerogenim i mutagenim policikličnim ugljikovodicima [332]. Biorazgradnja PS-a nije široko proučavana, ali poznato je da biorazgradnjom nastaju stiren, toluen i benzen (slika 13) za koje je poznato da ih *Pseudomonas* sp. može metabolizirati [333]. Prema dostupnim istraživanjima, od prethodno navedenih šest plastičnih polimera, *Pseudomonas* sp. pokazuje najmanju učinkovitost razgradnje prema PP, PVC i PET jer njihovi intermedijeri mogu imati inhibitorni utjecaj na aktivnost proizvedenih enzima. Poznato je da neke vrste iz roda *Pseudomonas* proizvode biosurfaktante, a još važnija karakteristika je mogućnost proizvodnje enzima lipaze. Naime, za biorazgradnju polimernih materijala značajni su izvanstanični enzimi iz grupe hidrolaza: esteraze, lipaze, kutinaze i poliuretanaze [316].

Iz literaturno dostupnih podataka o bioremedijacijskoj aktivnosti, pokazalo se da *Delftia acidovorans* može koristiti fenantren, piruvat, vanilat, sukcinat, mravlju kiselinu, mliječnu kiselinu i propionsku kiselinu kao izvor ugljika [334]. Također, bakterija je otporna na razna antimikrobna sredstva. Prema radu koji su objavili Dynes i suradnici [335], *Delftia acidovorans*

formira efektivni biofilm koji štiti bakteriju od klorheksidina, koji se najčešće koristi kao antibakterijsko sredstvo. Sposobna je pretvarati toksične spojeve selenija i kroma u manje toksične produkte [334]. Bakterija *Delftia acidovorans* ima sposobnost razgradnje PUR-a koji bakteriji služi kao izvor ugljika i dušika [336].

2.6 Modeliranje

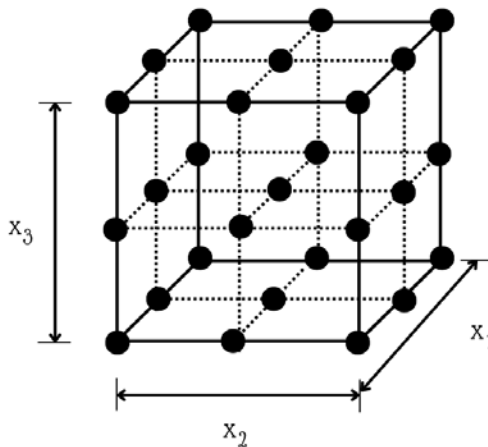
U konvencionalnom pristupu optimizaciji, optimizacija se obično provodi mijenjanjem jedne varijable, dok sve ostale varijable su fiksne u ispitivanom skupu uvjeta. Ova ispitivanja mogu duže potrajati, a zbog činjenice da ne uvažavaju interakcije među varijablama, obično se ne postigne pravi optimum. S druge strane, korištenjem faktorskog dizajna, interakcije mogućih utjecajnih čimbenika na učinkovitost procesa mogu se procijeniti uz ograničen broj planiranih eksperimenata. Postoje različiti dizajni eksperimenata (poznato pod kraticom DoE), a ovdje će biti detaljnije opisani Taguchijev dizajn i puni faktorski plan.

Taguchi je osmislio metodu dizajniranja eksperimenata koja se temelji na ortogonalnim nizovima. Ovi nizovi, koji su odabrani prema broju ispitivanih čimbenika i broju njihovih razina, određuju način provođenja minimalnog broja eksperimenata koji bi mogli dati potpunu informaciju o utjecajima svih čimbenika na odziv. Dakle, temelj metode ortogonalnih nizova leži u odabiru kombinacija razina ulaznih varijabli. Taguchijev dizajn prikladan je za istraživanje procesa u kojima je samo nekoliko interakcija između čimbenika [337,338]. Primjenom Taguchijeva dizajna, analiza utjecajnih čimbenika može se provesti uz minimalan broj eksperimenata čime se štede vrijeme i resursi. Iako postoji mnogo standardnih ortogonalnih nizova, svaki od nizova je namijenjen za određeni broj nezavisnih varijabli i razina. Primjerice, ukoliko se ispituje utjecaj 4 različite nezavisne varijable na 3 razine, odabrao bi se L_9 ortogonalni niz koji pretpostavlja da ne postoji interakcija između bilo koja dva čimbenika. Pretpostavka Taguchijeva dizajna je da su pojedinačni učinci nezavisnih varijabli na odziv odvojivi, a učinak svakog čimbenika može biti linearan, kvadratni ili višeg reda. Prije odabira ortogonalnog niza potrebno je odabrati nezavisne varijable za ispitivani proces odnosno proučiti koji su to čimbenici koji bi mogli imati utjecaj na ispitivani proces. Potom se odabiru razine nezavisnih varijabli. U pravilu se odabiru 2 razine za svaki ispitivani čimbenik, no potrebno je paziti da minimalni broj osmišljenih eksperimenata mora biti veći od ukupnog broja stupnjeva slobode. Broj stupnjeva slobode za svaki ispitivani čimbenik za jedan je manji od broja razina za

svaki čimbenik, a ukupni broj stupnjeva slobode, bez interakcijskog učinka, za jedan veći od broja čimbenika. Primjerice, u slučaju ispitivanja utjecaja 7 čimbenika, od kojih se svaka ispituje na 2 razine, ukupan broj stupnjeva slobode je 8. Stoga odabrani ortogonalni niz mora imati najmanje 8 eksperimenata, pa je L_8 niz dobar odabir.

Taguchijev dizajn našao je brojne primjene u ekoinženjerstvu, posebice u bioremedijacijskim procesima poput razgradnje PE i PP [339], biorazgradnje polilaktične kiseline [340], bakterijske biorazgradnje malahitnog zelenila [341], obrade otpadnih voda [338,342-345]. S obzirom da Taguchijev dizajn ne uključuje interakcije između ispitivanih čimbenika, a ispituje veći broj čimbenika uz minimalni broj pokusa, ovaj se dizajn najčešće koristi u preliminarnim istraživanjima s ciljem utvrđivanja najutjecajnijih čimbenika. Jednom kada se utvrde najutjecajnije čimbenici, na njima se primjenjuju potpuniji dizajni poput punog faktorskog plana (eng. *Full Factorial Design*).

Puni faktorski plan najčešće je korišten za sustave u kojima se proučava do 5 čimbenika. Ovaj plan eksperimenta sastoji se od svih mogućih kombinacija razina za sve ispitivane čimbenike. Ukupan broj eksperimenata za proučavanje k čimbenika na 2 razine je 2^k . Puni faktorski plan 2^k je najčešće koristan u ranim fazama eksperimenta, osobito kada je broj čimbenika procesa manji ili jednak 4. Polazi se od pretpostavke da je odgovor približno linearan u rasponu odabranih čimbenika. Također, postoji i mogućnost dizajniranja eksperimentalnoga plana na 3 razine. Primjerice, ukoliko se ispituju 3 čimbenika na 3 razine, to se označava kao 3^3 , a obuhvaća ukupno 27 pokusa (3^3) kako je prikazano na slici 16.



Slika 16. Prikaz punog faktorskog plana za 3 ispitivana čimbenika na 3 razine.

Nakon provedbe eksperimenata predviđenih eksperimentalnim planom, potrebno je prikladnim modelom opisati ovisnost odziva o neovisnim varijablama. Pri tome se najčešće primjenjuje modeliranje odzivnih površina (eng. *Response Surface Methodology*, RSM). RSM predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika za dobivanje empirijskih modela. Glavna svrha RSM-a je odrediti optimalne uvjete za ispitivani sustav ili odrediti uvjete koji zadovoljavaju eksperimentalne zahtjeve. Odnos između zavisne i nezavisnih varijabli inicijalno je nepoznat tako da je cilj pronaći odgovarajuću aproksimaciju ovoga odnosa. To je moguće uraditi prikladnim polinomom [292]. Ovisnost odziva može biti prikazana grafički (primjerice preko 3D grafova ili odzivnih površina) što pomaže vizualizaciji ponašanja.

Statistička analiza RSM modela uključuje analizu varijance (eng. *Analysis of variance*; ANOVA). ANOVA predstavlja glavnu statističku metodu za testiranje međuovisnost i procesnih parametara, odnosno izračuna razlikuju li se dvije ili više grupa nezavisnih varijabli s obzirom na jednu zavisnu varijablu. Tim postupkom je moguće raščlaniti i procijeniti varijabilnost koja je uvjetovana različitim čimbenicima [347]. ANOVA omogućuje definiranje razlika u odstupanjima rezultata od srednjih vrijednosti, što omogućuje testiranje nulte hipoteze (H_0). Nulta hipoteza podrazumijeva da su srednje vrijednosti unutar tretmana (iste razine čimbenika) jednake, te pripadaju istoj populaciji, a varijanca je posljedica pogreške. Granična razina statističke značajnosti (α) je mjerilo osjetljivosti statističkog testa te označava postotak u kojem je dozvoljena greška odbacivanja nulte hipoteze. Primjerice, ukoliko p -vrijednost iznosi 0,05, nulta hipoteza je ispravna s vjerojatnošću od 95 %, odnosno vjerojatnost da nije ispravna iznosi 5 %. Preporučljivo je da se navodi točan iznos p -vrijednosti, a ne samo njen odnos naspram razine značajnosti ($p < \alpha$, $p \geq \alpha$) [348]. ANOVA generira sljedeće parametre [348,349]:

- R^2 (eng. *R-Squared*) je koeficijent determinacije koji predstavlja procjenu ukupne varijance podataka objašnjenih pomoću modela, odnosno to je mjera odstupanja od aritmetičke sredine koja je objašnjena modelom; što je R^2 bliži 1, to model bolje slijedi eksperimentalne podatke, odnosno bolje opisuje sustav
- R^2_{adj} (eng. *Adjusted R-Squared*) je R^2 vrijednost prilagođena broju članova modela
- R^2_{pred} (eng. *Predicted R-Squared*) je mjera iznosa varijance u novim podacima objašnjenim modelom. Vrijednosti R^2_{adj} i R^2_{pred} trebale bi biti blizu jedinice, a ako

su jednaki 1, onda je 100 % varijance promatranih vrijednosti objašnjeno modelom.

- *Pure Error* označava pogrešku ponavljanja pojedinih pokusa u svrhu procjene varijance odziva, kao i broja stupnjeva slobode za adekvatno statističko testiranje izrađenog modela.
- Odgovarajuća preciznost (eng. *Adequate precision*) predstavlja omjer signala i šuma. Poželjno je da je ovaj omjer veći od 4.
- *PRESS* je predviđena suma kvadrata reziduala
- C.V. (eng. *Coefficient of Variation*) je koeficijent varijacije koji ukazuje na relativnu mjeru rasipanja izraženu u postocima. Veća vrijednost C.V. pokazuje veću raspršenost, odnosno manju reprezentativnost aritmetičke sredine. C.V. može i prijeći vrijednost 100 %, ali u slučajevima kad se radi o veoma heterogenom nizu.
- Standardna devijacija, σ , se općenito koristi za kvantificiranje iznosa varijacije ili disperzije vrijednosti skupa podataka. Što je ova vrijednost manja, podaci su manje raspršeni i bliži očekivanim vrijednostima.

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Otopine i reagensi

U tablici 6 dan je popis korištenih otopina i reagensa korištenih prilikom provedbe ekperimentalnog dijela rada.

Tablica 6. Popis korištenih otopina i reagensa.

Ime kemikalije	Čistoća	Proizvođač	Država
Agar	-	Biolife Italiana	Italija
NH ₄ Cl	p.a.	Kemika	Hrvatska
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
(NH ₄) ₂ SO ₄	p.a.	Kemika	Hrvatska
CuCl ₂ ·2H ₂ O	p.a.	Kemika	Hrvatska
CuSO ₄ ·5H ₂ O	p.a.	Sigma Aldrich	SAD
H ₃ BO ₃	p.a.	Kemika	Hrvatska
ZnCl ₂	p.a.	Sigma Aldrich	SAD
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	p.a.	Sigma Aldrich	SAD
D(+) glukoza monohidrat	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
CH ₃ CH ₂ OH	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
Ekstrakt kvasca	-	Biolife Italiana	Italija
Ekstrakt sladi	-	Biolife Italiana	Italija
Glicerol	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
HCl	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
K ₂ HPO ₄	p.a.	Kemika	Hrvatska
KH ₂ PO ₄	p.a.	BDH Prolabo	Engleska
CaCO ₃	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
CaCl ₂ ·2H ₂ O	p.a.	Kemika	Hrvatska
CoCl ₂ ·6H ₂ O	p.a.	Sigma Aldrich	SAD
CoSO ₄ ·7H ₂ O	p.a.	Sigma Aldrich	SAD
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	p.a.	Kemika	Hrvatska
MgSO ₄ ·7H ₂ O	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
MgCl ₂ ·6H ₂ O	p.a.	Acros Organics	Španjolska
MnCl ₂ ·4H ₂ O	p.a.	Kemika	Hrvatska
MnSO ₄ ·4H ₂ O	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
NaOH	p.a.	Lachner	Češka
NaHCO ₃	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
NaCl	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	p.a.	Sigma Aldrich	SAD
NaNO ₃	p.a.	Kemika	Hrvatska
Pepton	-	Biolife Italiana	Italija
Rafinoza	p.a.	Applichem	Njemačka
Saharoza	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	p.a.	Sigma Aldrich	SAD
FeCl ₃ ·6H ₂ O	p.a.	Gram-Mol	Hrvatska
FeSO ₄ ·(NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	p.a.	Merck	SAD

3.1.2. Plastični polimeri

Čestice PE, PP, PS, PET i PVC MP-a, korištene u ovome radu, dobivene su ustinjavanjem komercijalne plastike, točnije jednokratnog plastičnoga pribora: PE vrećica, PP i PS žlica i noževa, PET plastičnih boca i kutija, te PVC kutija za pakiranje (slika 17).



Slika 17. Prikaz plastičnih predmeta korištenih za dobivanje mikroplastike.

3.2. Aparatura

Prilikom izradu ovoga rada korištena je sljedeća aparatura:

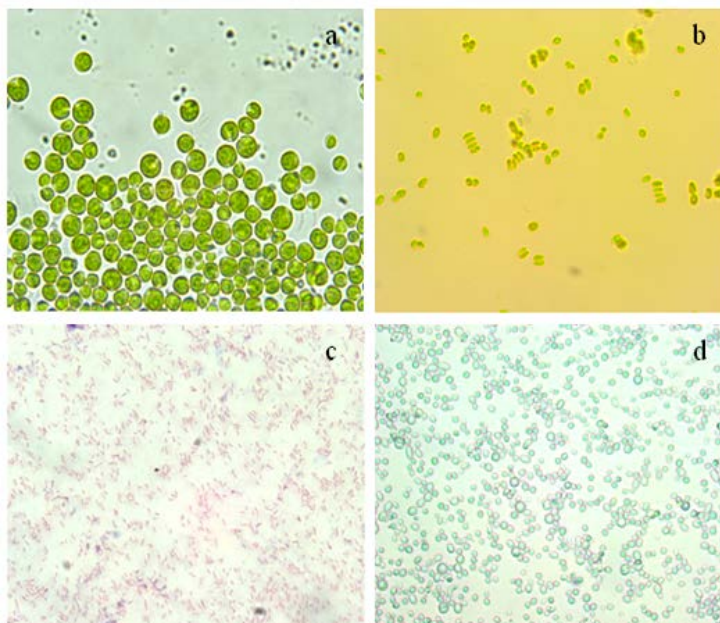
- kriomlin nadopunjen tekućim dušikom, Retsch, Njemačka
- mehanička sita, W. S. Tyler RX-86-1, SAD
- sterilni membranski filter uz sterilni celulozno nitratni membranski filter papir veličine pora 0,45 μm , Ahlstrom ReliaDiscTM, Finska
- vaga KERN ALJ 220-4NM, Njemačka
- autoklav Sutjeska, Jugoslavija
- termostati Termomedicinski aparati, Hrvatska i Liebherr, FKU 1800-20C/774, Njemačka
- spektrofotometar Hach, Model DR/2400, SAD
- rotacijske tresilice Heidolph unimax 1010, Heidolph incubator 1000, Njemačka i SIA BIOSAN PSU-10i Orbital Shaker, Latvija
- magnetska tresilica WiseStir MSH-20A, Švicarska
- pH elektroda SenTix[®] 940 i kisikova elektroda FDO[®] 925 uz prijenosni mjerac WTW Multi 340i, Njemačka
- API Strip 20 E i API 20 C aux, Analytical Profile Index, BioMérieux[®], Francuska
- uređaj za određivanje ukupnog organskog ugljika, TOC-V, Shimadzu, Japan

- uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU, Japan
- infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, FTIR-ATR spektrometar Spectrum One, PerkinElmer, SAD
- luminometar LUMIStox 300 i termostat LUMIStherm, Hach-Lange GmbH, Austrija
- svjetlosni mikroskop, Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan, opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija, Olympus DP 10 kamera

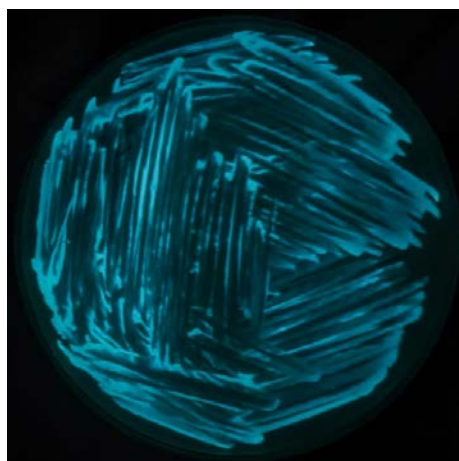
3.1.2 Mikroorganizmi

Mikroalga *Chlorella* sp. (slika 18a) dobivena je s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a *Scenedesmus* sp. (slika 18b) s Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Uzgajane su u tekućem bazalnom mediju pri 27 ± 2 °C tijekom 12/12 sati ciklusa svjetlo/tama [350,351]. Bakterija *Pseudomonas putida* (slika 18c) i kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (slika 18d) uzgajani su sukladno standardnim metodama [352,353]. Bakterija *Vibrio fischeri* je uzgajana na čvrstoj hranjivoj podlozi pri 20 °C tijekom 24 – 48 sati (slika 19). Kulture su pohranjene u zbirci mikroorganizama na Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Mikroorganizmi (bakterije i gljive) koji su se koristili u pokusima biorazgradnje izolirani su iz okolišnih uzoraka obogaćenih MP-om: točnije, iz aktivnoga mulja iz UPOV-a grada Vrgorca (Splitsko-dalmatinska županija), komposta dobivenog kompostiranjem biorazgradive frakcije komunalnog otpada Zagrebačke županije, te sedimenta iz rijeke Kupe u Karlovačkoj županiji. Izolirane kulture iz navedenih uzoraka pročišćene su i identificirane te su pohranjene u zbirci mikroorganizama u Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 18. Mikrofotografije organizama korištenih za provedbu testova ekotoksičnosti: a) mikroalga *Chlorella* sp., b) mikroalga *Scenedesmus* sp., c) bakterija *Pseudomonas putida* i d) kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Mikrofotografije su snimljene u prolaznoj svjetlosti pri povećanjima 400× za mikroalge i kvasac, te pri 1000× za bakteriju.



Slika 19. Fotografski snimak bakterijske kulture *Vibrio fischeri* uzgojene na čvrstoj hranjivoj podlozi pri 20 °C tijekom 24 – 48 sati.

3.1.3 Mediji i podloge

Otopina etanola za sterilizaciju mikroplastike

70 %-tna otopina etanola pripravljena je u odmjernoj tikvici od 1000 mL tako da je menzurom dodano 730 mL 96 %-tne otopine etanola te tikvica potom nadopunjena do oznake deioniziranom vodom.

Bazalni medij za uzgoj mikroalgi

Za uzgoj mikroalgi *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp. korišten je bazalni medij sastava prikazanog u tablici 7, čiji je pH bio podešen na 8 pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl. Nakon pripreme, bazalni je medij vlažno steriliziran u autoklavu pri 121 °C i 1 atm, tijekom 15 – 30 min.

Tablica 7. Sastav bazalnoga medija korištenoga za uzgoj mikroalgi *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp.

Tvar	γ / mg/L
NH ₄ Cl	15,0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15,0
KH ₂ PO ₄	1,6
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,08
C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O	0,1
H ₃ BO ₃	0,185
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,415
ZnCl ₂	3·10 ⁻³
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5·10 ⁻³
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7·10 ⁻³
NaHCO ₃	50,0

Hranjiva podloga za uzgoj Pseudomonas putida i medij za provedbu testa ekotoksičnosti

Bakterija *Pseudomonas putida* je uzgojena na čvrstoj hranjivoj podlozi, čiji je sastav prikazan u tablici 8. Čvrsta hranjiva podloga pripravljena je od triju otopina – otopine I, otopine II i otopine III, dok se otopina IV koristila za pripremu medija za preduzgoj bakterijske kulture.

Tablica 8. Sastav otopina korištenih za pripremu čvrste hranjive podloge za uzgoj bakterije *Pseudomonas putida*.

Otopina I	Otopina II	Otopina III	Otopina IV
20,0 g/L NaNO ₃		40,0 g/L D(+) glukoza	20,0 g/L NaNO ₃
4,8 g/L K ₂ HPO ₄	4,0 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O	monohidrat	4,8 g/L K ₂ HPO ₄
2,4 g/L KH ₂ PO ₄	0,01 g/L C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	(C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	2,4 g/L KH ₂ PO ₄
2,0 g/L ekstrakt kvasca			

Za pripremu medija za preduzgoj bakterije, potrebno je pomiješati 25 mL otopine I, 50 mL otopine II i 25 mL otopine III te 900 mL deionizirane vode. pH medija podešen je na $7,2 \pm 0,2$ pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl.

Kako bi se pripremila hranjiva podloga, potrebno je pomiješati 50 mL otopine I, 100 mL otopine III, 125 mL otopine IV i razrijediti s deioniziranom vodom do 1000 mL. U svrhu dobivanja čvrste hranjive podloge, potrebno je dodati 18 g agara te zagrijati. Pripremljenu čvrstu podlogu je potrebno sterilizirati vlažnom sterilizacijom u autoklavu.

Mineralni je medij dobiven otapanjem soli, izlistanih u tablici 9, u deioniziranoj vodi, te je korišten za provedbu testova toksičnosti MP-a primjenom *Pseudomonas putida*. Prije upotrebe, medij je sterilizan vlažnom sterilizacijom u autoklavu. pH medija podešen je na $7,2 \pm 0,2$ pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl.

Tablica 9. Sastav medija korištenoga za provedbu testova toksičnosti MP-a primjenom *Pseudomonas putida*.

Tvar	γ / mg/L
NaNO ₃	500,0
K ₂ HPO ₄	120,0
KH ₂ PO ₄	60,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200,0
C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	0,5

Prema standardnoj metodi [352], medij bi trebao sadržavati i glukozu. Međutim, budući da je uočeno da dodatak glukoze prikriva ekotoksični utjecaj MP-a na bakteriju, napravljena je modifikacija metode te je korišten medij bez dodatka glukoze.

Hranjive podloge za kvasac Saccharomyces cerevisiae

Kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* uzgajala se na čvrstoj hranjivoj podlozi *Yeast Medium*, YM. Sastav čvrste hranjive podloge prikazan je u tablici 10.

Tablica 10. Sastav čvrste hranjive podloge za uzgoj kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

Tvar	γ / g/L
Ekstrakt kvasca	3,0
Ekstrakt sladi	3,0
Pepton	5,0
Glukoza	10,0
Agar	15,0

Podloga se zagrijavala do vrenja te se sterilizirala vlažnom sterilizacijom u autoklavu. pH čvrste hranjive podloge podešen je na $7,0 \pm 0,2$ pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl.

Za postavljanje testova toksičnosti MP-a primjenom *Saccharomyces cerevisiae* korištena je tekuća hranjiva podloga čiji je sastav prikazan u tablici 11.

Tablica 11. Sastav tekuće hranjive podloge korištene za provedbu testa toksičnosti MP-a primjenom *Saccharomyces cerevisiae*.

Tvar	γ / g/L
Saharoza	40,0
Pepton	20,0
Ekstrakt kvasca	17,0

Hranjivi agar i sladni (malt) agar

Hranjivi se agar koristio za uzgoj bakterija, dok se sladni ili malt agar koristio samo tijekom izolacije gljiva (plijesni i kvasaca) iz uzoraka aktivnoga mulja, komposta i riječnog sedimenta. Obje su hranjive podloge pripremane prema uputama proizvođača (Biolife Italiana, Italija).

Fiziološka otopina

Za pripremu decimalnih razrjeđenja u svrhu određivanja ukupnog broja živih stanica korištenih mikroorganizama, tzv. CFU vrijednosti (eng. *Colony forming units*), korištena je 0,9 %-tna fiziološka otopina. Pripremala se otapanjem 0,9 g NaCl-a u 100 mL destilirane vode. Prije upotrebe, fiziološka otopina je vlažno sterilizirana u autoklavu.

Mineralni medij korišten za pokuse biorazgradnje MP-a

Sastav mineralnog medija koji se koristio za provedbu pokusa biorazgradnje MP-a primjenom bakterija prikazan je u tablici 12. Prije upotrebe je vlažno steriliziran u autoklavu, a pH mu je podešen na 6,0, 7,0 i 8,0, ovisno o pokusu, pomoću 1 M NaOH i 1 M HCl.

Tablica 12. Sastav mineralnoga medija korištenoga za provedbu pokusa biorazgradnje MP-a primjenom bakterija [36].

Tvar	γ / g/L
K ₂ HPO ₄	12,500
KH ₂ PO ₄	3,800
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,100
H ₃ BO ₃	0,232
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,174
FeSO ₄ ·(NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	0,116
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,096
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,022
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,008
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,008

Hranjiva podloga za uzgoj bakterije Vibrio fischeri

Sastav čvrste hranjive podloge za uzgoj *Vibrio fischeri* prikazan je u tablici 13. Otopine potrebne za provedbu testa ekotoksičnosti primjenom *Vibrio fischeri* su otopina za resuspenziju i 2 %-tna otopina NaCl-a. Otopina za resuspenziju je hranjiva izoosmotska otopina bakterijske kulture koja se pripremala otapanjem sastojaka (tablica 14) u 1 L deionizirane vode. Potom se prokuhala i ohladila te čuvala u hladnjaku. pH otopine podešen je na raspon od 6,8 do 7,2 pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl.

Tablica 13. Sastav čvrste hranjive podloge za uzgoj bakterije *Vibrio fischeri*.

Tvar	γ / g/L
NaCl	30,0
Agar	15,0
Glicerol	10,0
CaCO ₃	5,0
Pepton	5,0
Ekstrakt kvasca	3,0

Tablica 14. Sastav otopine za resuspenziju korištene za provedbu testa toksičnosti filtrata dobivenog nakon pokusa biorazgradnje MP-a primjenom *Vibrio fischeri*.

Tvar	γ / g/L
NaCl	20,0
KH ₂ PO ₄	0,2
CaCl ₂	0,5
MgSO ₄	0,2
Glicerol	0,6
Glukoza	10,0
Rafinoza	10,0

Radna otopina za pripremu niza razrjeđenja ispitivanog uzorka tijekom provedbe testa toksičnosti primjenom *Vibrio fischeri* je otopina 2 %-tnog NaCl-a. Otopina se pripremala otapanjem 2 g NaCl-a u 100 mL deionizirane vode. pH otopine je podešen pomoću 1 M NaOH ili HCl, a iznosio je između 6,8 i 7,2.

3.2 Metode praćenja biorazgradnje

Određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija (CFU)

Određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija, provodilo se pripremom decimalnih razrjeđenja. Izuzimao se 1 mL suspenzije i razrjeđivao do željenog razrjeđenja. Pripremljeno razrjeđenje uzorka se, potom, zalilo hranjivom podlogom u svrhu uzgoja bakterija.

Određivanje koncentracije ukupnog, organskog i anorganskog ugljika

Procedura za određivanje TC i TOC vrijednosti bila je ista. Izuzimano je 0,5 mL uzorka koji se potom filtrirao kroz membranski filter veličine pora 0,45 μ m. Nakon filtracije, uzorku je dodano 9,5 mL vode kako bi ukupni volumen otopine bio 10,0 mL. Prilikom određivanja TOC vrijednosti u otopinu su dodavane 3 kapi H₂SO₄ radi neutralizacije anorganskog ugljika što nije bio slučaj kod određivanja TC vrijednosti. TIC vrijednost računala se kao razlika TC i TOC vrijednosti.

LC/MS analiza otpuštenih aditiva

Tekućinska kromatografija uz detekciju masenim spektrometrom (LC-MS) primjenjena je za uvid u aditive otpuštene s površine MP-a čestica u vodenu fazu tijekom pokusa biorazgradnje. Prilikom LC/MS analize protok mobilnih faza (0,1 % mravlje kiseline + MilliQ kao vodena faza i metanol kao organske faze) iznosio je 0,5 mL/min, a korištene su dvije pumpe. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 5 µL. S obzirom da se ne zna točan sastav uzorka, korištena je metoda bez kolone. Detektor koji se koristio u ovoj metodi je bio maseni spektrofotometar pri voltaži od 1,20 kV, brzini od 1500 u/s te raspona m/z omjera od 50 do 1500.

*Test toksičnosti primjenom *Vibrio fischeri**

Test toksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* izvršen je prema normi HRN EN ISO 11348-3:2010 [354]. Ispitala se ekotoksičnost vodene faze nakon što su filtracijom odvojene MP čestice nakon 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje. Ukoliko je bilo potrebe, pH uzorka namještao se da bude unutar raspona od 6,0 do 8,5 pomoću 1 M NaOH ili 1 M HCl. Bakterijska suspenzija pripremljena je na način da se ušicom mikrobiološke eze zahvatilo čiste kulture *Vibrio fischeri* koja je potom suspendirana u bočici 2/3 volumena napunjenoj otopinom za resuspenziju. Tako pripremljena suspenzija ostavljena je 15 minuta u termostatu na 15 °C radi aktivacije bakterijske kulture. Prije provođenja samog testa toksičnosti izmjerena je relativna luminiscencija bakterijske suspenzije *Vibrio fischeri* koja je morala iznositi najmanje 1000 jedinica da bi se ispitivanje moglo provesti. Uzorak se razrjeđivao 2 %-tnom vodenom otopinom NaCl-a prema linearnom nizu. Pratila se promjena bioluminescencije *Vibrio fischeri* nakon 30 min izlaganja MP-u.

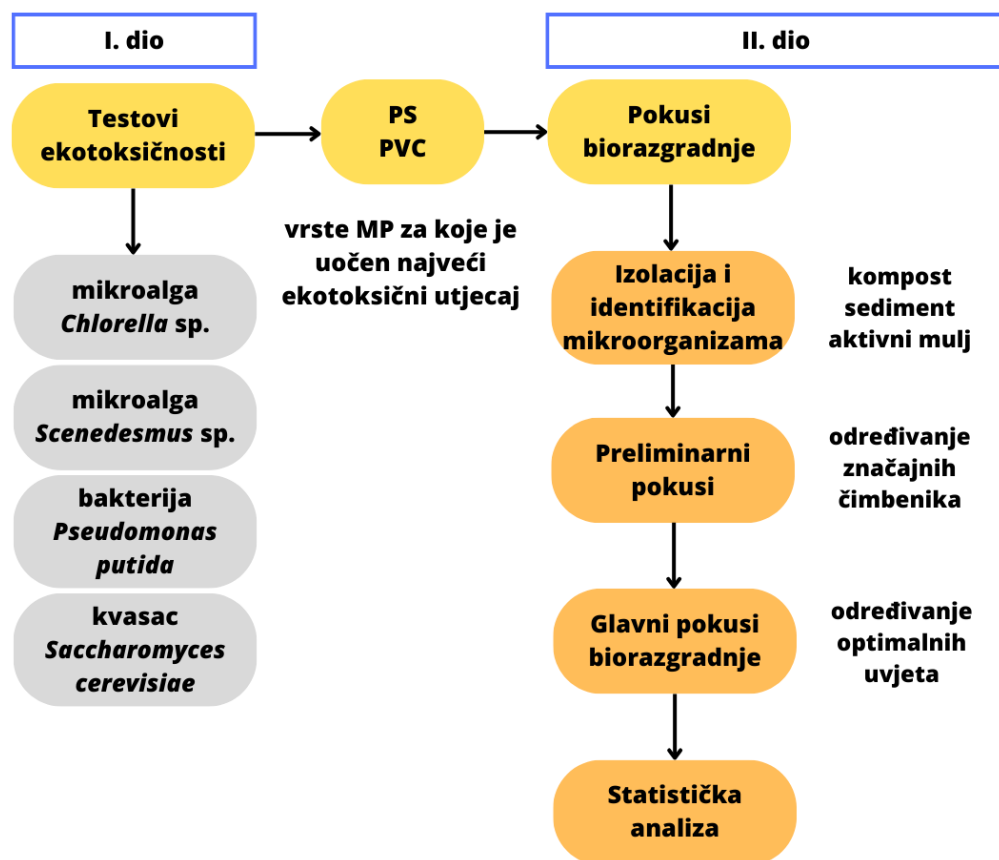
Karakterizacija MP čestica FTIR-ATR-om

Nakon provedbe pokusa biorazgradnje MP-a, čestice su izdvojene membranskom filtracijom te isprane sterilnom deioniziranom vodom. Da se utvrdi je li došlo do narušavanja strukture MP-a, čestice su analizirane FTIR-ATR spektroskopijom. Spektri su snimani u

području valnih brojeva 4000 – 500 cm⁻¹. Obrada snimljenih spektara provedena je u programu IR Solution, EP, Japan.

3.3 Opis eksperimentalnog rada

Na slici 20. prikazana je shema provedbe eksperimentalnoga dijela doktorskog rada.

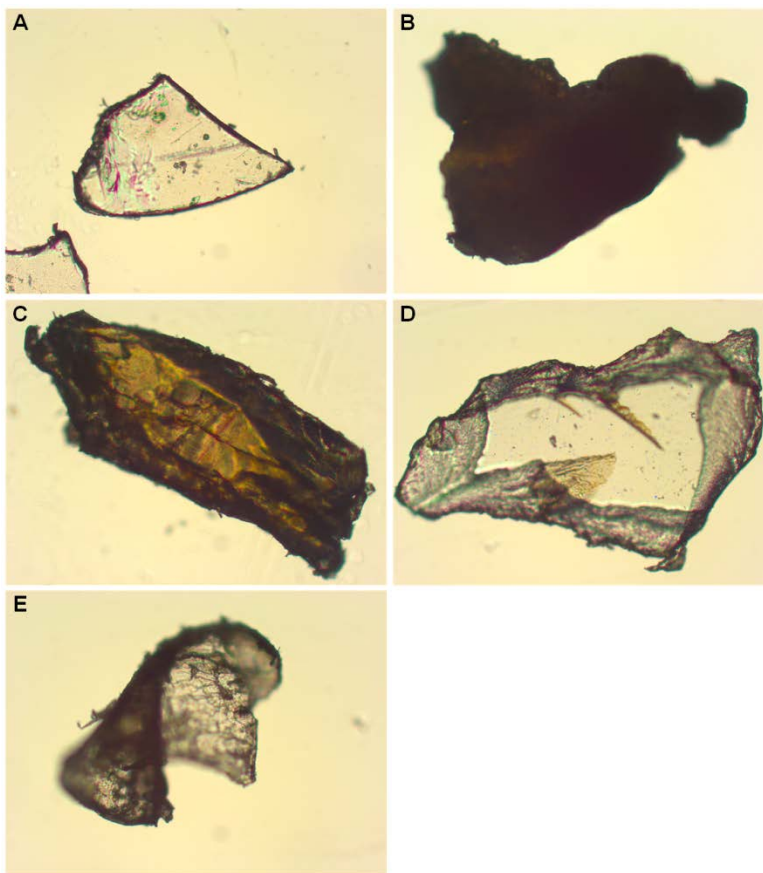


Slika 20. Shematski prikaz provedbe eksperimenata obuhvaćenih ovim doktorskim radom.

3.3.1 Priprema mikroplastike

U ovome radu korišteni su plastični materijali koji se inače koriste u svakodnevnoj upotrebi, prethodno spomenuta jednokratna ambalaža vrste PE, PP, PS, PET i PVC. Prvo su materijali bili usitnjeni škarama te potom u kriomlinu nadopunjenim s tekućim dušikom. Dobivene čestice su se potom sušile na sobnoj temperaturi tijekom 48 sati. Zatim su se osušene čestice prosijale pomoću mehaničkih sita u svrhu dobivanja raspodjele veličine čestica u rasponima: 100 – 300 µm, 300 – 500 µm te 500 – 700 µm (slika 21). Nakon prosijavanja, čestice

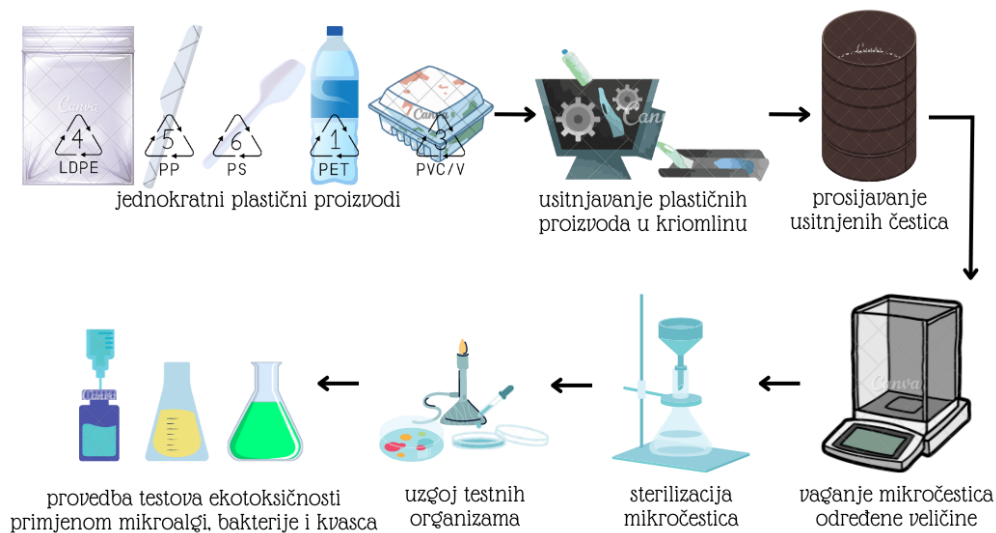
su spremljene u staklene bočice. Prije postavljanja pokusa, čestice MP-a su izvagane u sterilne tikvice volumena 100 mL te sterilizirane pomoću 70 %-tnog etanola tijekom 10 min na rotacijskog tresilici pri 160 o/min. Zatim su se čestice MP-a membranskom filtracijom izdvojile iz etanola, dodatno isprale sterilnom deioniziranom vodom te prenijele u sterilne Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL poštujući sterilnu tehniku rada. U svrhu potvrde vrste materijala, čestice su analizirane FTIR-ATR spektroskopijom.



Slika 21. Fotografije MP-a veličine 300 – 500 μm dobivenog usitnjavanjem makroplastike u kriomlinu. Fotografije su snimljene optičkim mikroskopom opremljenim kamerom ($P = 100\times$), a predstavljaju: A) polietilen, B) polipropilen, C) polistiren, D) poli(vinil-klorid) i E) poli(etilen-tereftalat).

3.3.2 Testovi toksičnosti mikroplastike

Testovi toksičnosti za 5 vrsta MP-a (PE, PP, PS, PET i PVC) provedeni su primjenom četiri testna organizma: mikroalgi *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp., bakterije *Pseudomonas putida* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, kako je prikazano na slici 22.



Slika 22. Shematski prikaz provedbe testova toksičnosti za MP primjenom mikroalgi *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp., bakterije *Pseudomonas putida* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

Ispitivana su dva čimbenika: koncentracija i veličina čestica MP-a. Ispitivanja su se provodila za 5 koncentracija MP-a (10/50, 250, 500, 750 i 1000 mg/L) i 3 veličine čestica MP-a (200, 400 i 600 μm) prema punom faktorskom planu.

Standardni test toksičnosti primjenom mikroalgi traje 72 h (3 dana), dok je trajanje standardnih testova primjenom *Pseudomonas putida* i *Saccharomyces cerevisiae* 16 h. Testovi primjenom *Pseudomonas putida* i *Saccharomyces cerevisiae* izvorno se primjenjuju za ispitivanje otopina, a ne suspenzija kao što je bio slučaj u ovome doktorskom radu. Stoga su napravljeni preliminarni pokusi za ova dva testa kako bi se vidjelo da li su standardne metode primjenjive. Preliminarni pokusi su pokazali da se CFU nije promijenio unutar 16 h, što nije bio slučaj za vrijednosti dobivene u 72. satu. Stoga je postavljeno identično vrijeme izlaganja testnih organizama česticama MP-a od 3 dana za sva tri testa.

Testovi toksičnosti MP-a primjenom mikroalgi

Mikroalge *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp. uzgajane su u bazalnome mediju pri 25 ± 2 °C uz ciklus 12/12 h svijetlo/tama. Sedimentacija mikroalgi je prevenirana aeracijom kroz sterilni filter veličina pora 0,45 µm. Preduzgoj mikroalgi je proveden u cilju postizanja logaritamske faze rasta. Početna CFU vrijednost mikroalgi iznosila je $10^4 - 10^5$ st/mL. Ukupan broj živih stanica mikroalgi određivao se pomoću Thomine komorice. Testovi toksičnosti su provedeni prema OECD uputama [350,351]. Pokusi su provedeni u sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama volumena 250 mL uz radni volumen od 100 mL na rotacijskoj tresilici tijekom 3 dana pri 25 ± 2 °C i 160 o/min. Tikvice su sadržavale suspenziju prethodno uzgojene mikroalge, bazalni medij i čestice MP-a. Postavljene su i kontrolne tikvice koje su sadržavale sve isto kao i tikvice s uzorcima, ali bez čestica MP-a. Kontrolne tikvice su služile za usporedbu rasta mikroalgi. Početne vrijednosti u testovima toksičnosti za MP-a (PE, PP, PS, PET i PVC) primjenom *Chlorella* sp. iznosile su: $\text{pH} = 7,55 \pm 0,18$, $\gamma(\text{O}_2) = 8,72 \pm 0,11$ mg/L, te $\text{CFU} = 7,0 \cdot 10^5$ st/mL. U testovima toksičnosti za navedenih 5 vrsta MP-a primjenom *Scenedesmus* sp. početne vrijednosti bile su $\text{pH} = 8,08 \pm 0,17$, $\gamma(\text{O}_2) = 8,65 \pm 0,24$ mg/L, i $\text{CFU} = 4,2 \cdot 10^5$ st/mL. Tijekom 3 dana provedbe pokusa, određivan je CFU, a vrijednosti za treći dan su uzete u obzir za izračun inhibicije (INH) rasta mikroalgi. Vrijednosti INH izračunate su prema sljedećoj jednadžbi (1):

$$\text{INH} = \frac{\log \text{CFU}_{\text{SP}} - \log \text{CFU}_{\text{UZ}}}{\log \text{CFU}_{\text{SP}}} \times 100 \% \quad (1)$$

gdje $\log \text{CFU}_{\text{SP}}$ predstavlja logaritamski broj ukupanog broja živih stanica mikroalgi u kontrolnoj tikvici, a $\log \text{CFU}_{\text{UZ}}$ logaritamski broj ukupanog broja živih stanica mikroalgi u tikvici s uzorkom (u ovome slučaju MP-a), te INH inhibiciju rasta mikroalgi izraženu u postotcima.

Testovi toksičnosti primjenom Pseudomonas putida

Bakterija *Pseudomonas putida* uzgojena je na čvrstoj hranjivoj podlozi pri 37 °C tijekom 24 h te se takva kultura koristila za pripremu bakterijske suspenzije. Suspenzija se pripremala u mediju za preduzgoj i stavljena je na preduzgoj tijekom $5 \pm 0,5$ h na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min i sobnoj temperaturi. Nakon preduzgoja, postavljeni su pokusi prema ISO uputama [352] u sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama volumena 100 mL. Radni volumen je bio 25 mL, a tikvice su postavljene na rotacijsku tresilicu pri 160 o/min i 23 ± 2 °C tijekom 3 dana. Tikvice su sadržavale suspenziju *Pseudomonas putida*, mineralni medij za provedbu testa i čestice MP-a.

Pripremljena suspenzija s preduzgoja je razrijeđivana tako da je početna vrijednost optičke gustoće iznosila 0,2, a optička gustoća se određivala spektrofotometrijski pri $\lambda = 436$ nm. Početni CFU iznosio je $5,4 \cdot 10^6$ st/mL, dok je pH bio $7,04 \pm 0,90$, a koncentracija otopljenoga kisika $\gamma(O_2) = 8,08 \pm 0,22$ mg/L. Postavljene su i kontrolne tikvice u svrhu usporedbe bakterijskoga rasta. Sadržavale su samo bakterijsku suspenziju i mineralni medij za provedbu testa, bez čestica MP-a. Tijekom 3 dana provedbe testa, određivana je CFU vrijednost, a prema vrijednostima za treći dan je izračunata inhibicija rasta bakterije. Inhibicija je izračunata prema istoj jednadžbi (1) kao i za testove toksičnosti primjenom mikroalgi.

Testovi toksičnosti primjenom Saccharomyces cerevisiae

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* uzgajan je na čvrstoj hranjivoj podlozi, YM agaru, tijekom 10 – 12 h pri $30 \pm 0,1$ °C. Nakon uzgoja, pripremljena je suspenzija kvasca u sterilnoj deioniziranoj vodi tako da početna optička gustoća suspenzije iznosi 3,0 pri $\lambda = 550$ nm. Potom je postavljen pokus u sterilnim staklenim bočicama radnoga volumena 30 mL tijekom 3 dana pri $28 \pm 0,1$ °C. Bočice su sadržavale 0,6 mL suspenzije kvasca, 5,0 mL tekuće hranjive podloge i čestice MP-a. Kontrolne bočice su, također, postavljene u svrhu usporedbe, a nisu sadržavale čestice MP-a. Nakon punjenja bočica, hermetički su zatvarane i kroz čep je utisnuta sterilna igla u koju je dodana graduirana šprica. Tijekom provedbe pokusa, praćen je volumen istisnute tekućine i/ili nastanak CO₂ s obzirom da se test temelji na fermentaciji saharoze od strane kvasca [355]. Produkt fermentacije saharoze je CO₂ te tada raste pritisak u bočici, što se prati u šprici. Volumen istisnute tekućine jednak je volumenu nastaloga CO₂. Volumen je praćen svaki dan te su se vrijednosti za svaki dan zbrojile i koristile su se za izračun inhibicije kvašćeve fermentacije saharoze. Inhibicije su računane prema sljedećoj jednadžbi (2):

$$INH = \frac{V_{SP} - V_{UZ}}{V_{SP}} \times 100 \% \quad (2)$$

gdje V_{SP} predstavlja ukupni istisnuti volumen tekućine i/ili nastaloga plina u kontrolnoj bočici, a V_{UZ} ukupni istisnuti volumen tekućine i/ili nastaloga plina u bočici s uzorkom (u ovome slučaju MP-a), te INH inhibiciju fermentacije saharoze od strane kvasca *Saccharomyces cerevisiae* izraženu u postocima.

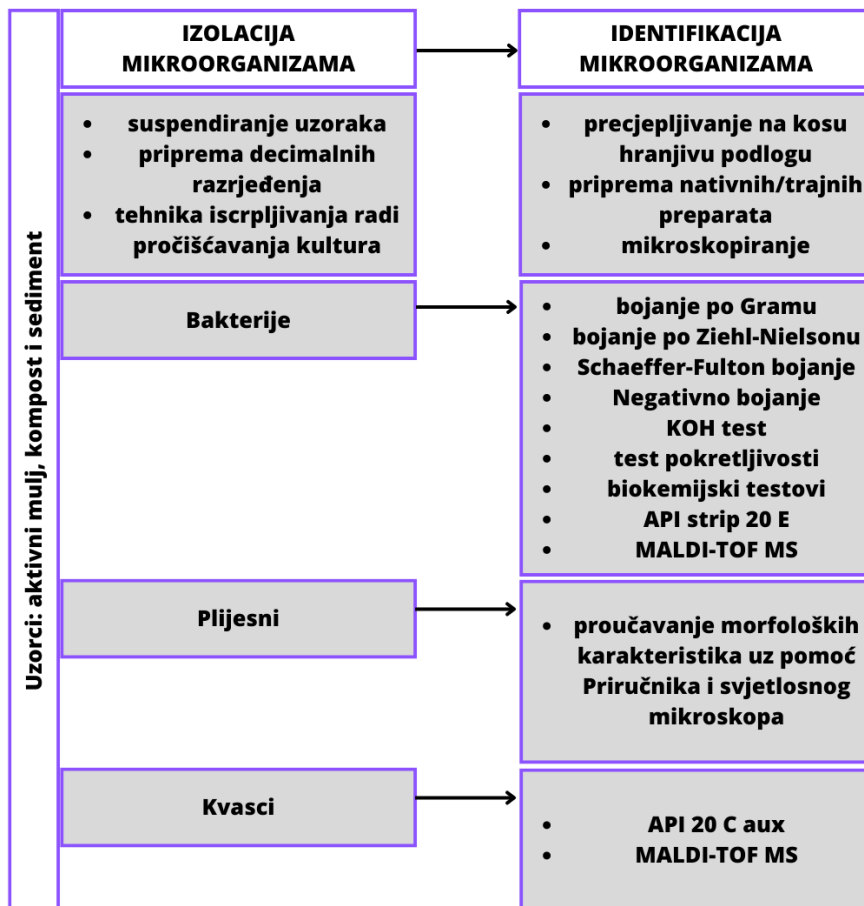
3.3.3 Izolacija i identifikacija bakterija i gljiva iz okolišnih uzoraka obogaćenih mikroplastikom

Mikroorganizmi, bakterije i gljive, izolirani su iz tri različita okolišna uzorka: aktivnog mulja, sedimenta i komposta, što je prikazano na slici 23.

100 mL aktivnog mulja i riječnog sedimenta stavljeno je u sterilne Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL, koje su stavljene na termostatiranu rotacijsku tresilicu pri 160 o/min tijekom 24 sata na sobnoj temperaturi. 10 g komposta (suhe tvari) stavljeno je u 100 mL sterilizirane deionizirane vode te na termostatiranu rotacijsku tresilicu tijekom 24 sata. Nakon 24 sata određen je CFU i bakterija i gljiva upotrebom hranjivoga agara za bakterije i sladnog agara za gljive pripremom decimalnih razrijeđenja [356]. Priprema decimalnih razrijeđenja je rađena upotrebom fiziološke otopine, a razrijeđenja su rađena u svrhu brojanja kolonija. Petrijeve zdjelice su inkubirane pri 80 % relativne vlažnosti na 28 °C tijekom 3 do 5 dana za uzgoj gljiva te na 37 °C tijekom 24 – 48 sata za uzgoj bakterija. Nakon inkubacije, određen je CFU brojanjem izraslih kolonija na agaru u Petrijevim zdjelicama. Rezultati su izraženi kao CFU bakterija i gljiva po mL. Kolonije bakterija i gljiva koje su bile morfološki različite i koje su dominirale na Petrijevim zdjelicama s hranjivim agarom i sladnim agarom, precijepljene su na Petrijeve zdjelice s hranjivim agarom i sladnim agarom te inkubirane u termostatima.

U svrhu pročišćavanja kulture i dobivanja pojedinačnih kolonija, precijepljivanje se vršilo dok se navedeno nije postiglo. Nakon što su dobivene čiste kulture (i bakterija i gljiva), kulture su pohranjene na kosim hranjivim podlogama. Izolati su označeni oznakama od I1 do I15.

U cilju identifikacije kultura najprije je promatran rast (izgled, boja i oblik) dobivenih čistih kultura (bakterija, gljiva (kvasaca i plijesni)) izraslih na agaru u Petrijevim zdjelicama [357], dok je morfologija stanica za svaku kulturu promatrana pod svjetlosnim mikroskopom. Karakteristike izoliranih bakterija određene su postupcima definiranim u Priručniku [357], kao što su bojenje po Gramu, bojenje po Ziehl-Nielsonu, bojanje po Schaffer-Fulton i negativno bojenje, te KOH test i test pokretljivosti.

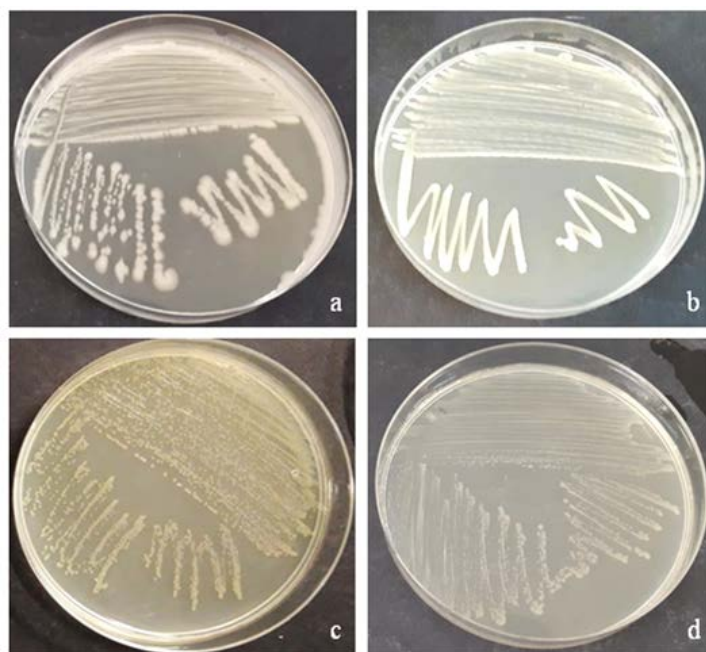


Slika 23. Prikaz tijeka izolacije i identifikacije bakterija i gljiva iz okolišnih uzoraka aktivnoga mulja, sedimenta i komposta.

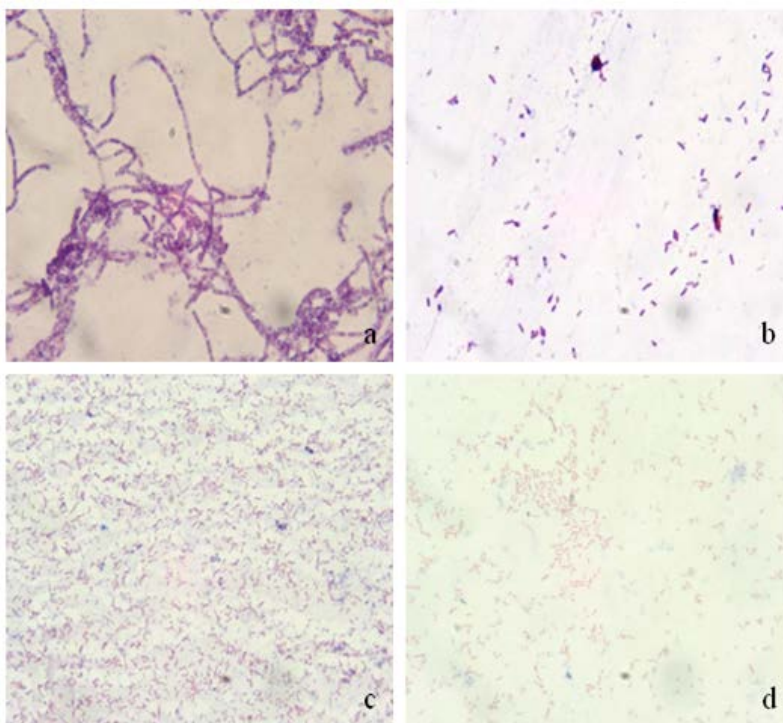
Nakon bojanja po Gramu, proveden je niz biokemijskih testova poznatih kao API (eng. *Analytical Profile Index*). Gram-negativna bakterija identificirana je pomoću API Strip 20 E. Posljednji korak identifikacije bakterija bila je analiza masene spektrometrije uz pomoć laserske desorpcije/ionizacije (eng. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF/MS), koja se temelji na identifikaciji proteina pulsirajućih pojedinačnih ionskih analita (čista mikroba kultura), zajedno s TOF analizatorom za mjerenje mase, uz određivanje točne masa proteina. Kvasac je identificiran pomoću API 20 C aux i MALDI-TOF/MS analize. Plijesni su identificirane proučavanjem njihovog rasta, promjene boje tijekom rasta i promatranjem pod svjetlosnim mikroskopom. Njihove morfološke karakteristike određene su postupcima definiranim u Priručniku [358].

3.3.4 Pokusi biorazgradnje mikroplastika primjenom bakterija

Bakterije *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* izolirane su iz okolišnih uzoraka obogaćenih MP-a. Pokusi biorazgradnje MP-a provodili su se primjenom dvije Gram-pozitivne bakterije, *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis*, te dvije Gram-negativne bakterije, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. *Bacillus cereus* je izolirana iz aktivnoga mulja, *Bacillus subtilis* iz uzorka komposta, dok su *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* izolirane iz riječnog sedimenta. Bakterije su uzgajane na hranjivome agaru pri 37 °C tijekom 24 – 48 sati (slika 24). Morfologija stanica bakterijskih kultura snimljena je mikroskopom pri povećanju od 1000x, kao što je prikazano na slici 25.



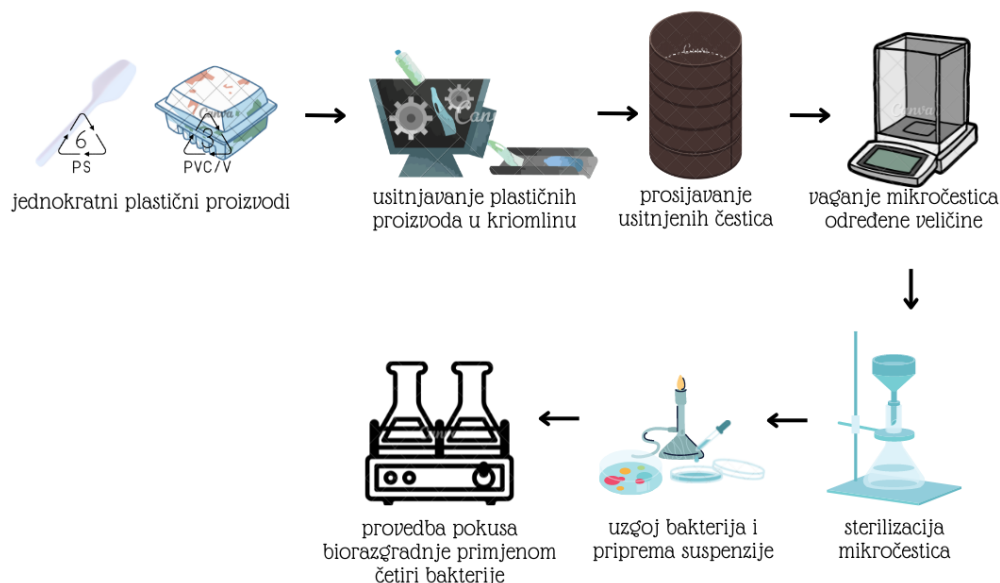
Slika 24. Fotografski snimak izraslih bakterijskih kultura a) *Bacillus cereus*, b) *Bacillus subtilis*, c) *Pseudomonas alcaligenes*, d) *Delftia acidovorans* dobivene tehnikom iscrpljivanja na hranjivom agaru pri 37 °C tijekom 24 – 48 sati.



Slika 25. Mikrofotografije bakterijskih kultura a) *Bacillus cereus*, b) *Bacillus subtilis*, c) *Pseudomonas alcaligenes*, d) *Delftia acidovorans* obojanih po Gramu i snimljenih u prolaznoj svjetlosti, P = 1000×.

24-satne uzgojene kulture su postavljene na preduzgoj u mineralni medij tijekom 24 sata prije postavljanje pokusa biorazgradnje MP-a. Preduzgoj se provodio u svrhu postizanja logaritamske faze rasta bakterija i prilagodbe bakterija na uvjete mineralnog medija. Optička gustoća bakterijskih suspenzija mjerena je spektrofotometrom pri $\lambda = 600$ nm uz određivanje CFU pripremom decimalnih razrijeđenja.

Pokusi (i preliminarni i glavni (slika 26)) provedeni su u Erlenmeyerovim tikvicama od 250 mL radnog volumena 100 mL tijekom 30 dana na termostatiranim rotacijskim tresilicama. Temperature i brzine okretaja postavljene su na rotacijskim tresilicama prema planu pokusa. Tikvice su sadržavale mineralni medij (sastav prema [36]), suspenziju bakterija (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* ili *Delftia acidovorans*) i čestice MP-a. Kontrolne tikvice postavljene su u svrhu praćenja rasta bakterija i sadržavale su mineralni medij i suspenziju bakterija bez čestica MP-a.



Slika 26. Shematski prikaz provedbe pokusa biorazgradnje MP-a primjenom bakterija.

Tijekom provedbe glavnoga pokusa, osim što je određivan CFU, rađene su i dodatne analize kako bi se dobio bolji uvid u proces biorazgradnje. U filtratu je određivana TOC/TIC koncentracija, procjenjivali su se otpušteni aditivi s površine MP čestica LC-MS analizom, te je proveden test toksičnosti primjenom *Vibrio fischeri*. Izdvojene MP čestice su okarakterizirane FTIR-ATR spektroskopijom.

Preliminarni (screening) pokusi biorazgradnje

Preliminarni pokusi biorazgradnje MP-a primjenom bakterija, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovarans*, provodili su se kako bi se vidjelo da li navedene bakterije mogu razgraditi MP (eng. *screening*) te kako bi se odredili značajni čimbenici koji utječu na proces biorazgradnje. MP-e koje su korištene u ovim pokusima su PS i PVC.

Preliminarni eksperimenti (navedeni u općenitom zapisu PX-1-8 u tablici 15) su provedeni prema L_8 ortogonalnom sukladnom Taguchi dizajnu (ispitivano je 7 čimbenika na 2 razine). Ispitani su sljedeći čimbenici: pH, temperatura, T , veličina MP, koncentracija MP, γ_{MP} , brzina okretaja rotacijske tresilice, optička gustoća bakterijske suspenzije, OG i dodatak (koncentracija) glukoze, γ_{GLU} .

Tablica 15. Taguchi L₈ ortogonalni niz za svaki ispitivani čimbenik na 2 razine.

Pokus#	pH / -	T / °C	veličina MP / µm	γ _{MP} / mg/L	brzina okretaja / o/min	OG / -	γ _{GLU} / mg/L
PX-1	8	15	600	1000	100	0,5	0
PX-2	6	15	200	50	100	0,1	0
PX-3	8	15	200	50	200	0,1	100
PX-4	6	15	200	1000	200	0,5	100
PX-5	6	25	600	50	100	0,1	100
PX-6	8	25	200	1000	100	0,1	100
PX-7	6	25	600	1000	200	0,1	0
PX-8	8	25	200	50	200	0,5	0

Analize ključnih procesnih parametara, prema doprinosu izraženom u postotku, za biorazgradnju MP-a (PS i PVC) primjenom *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovarans* određene su korištenjem logaritamske vrijednosti CFU (log CFU) kao odziva. Utjecaj svakog od navedenih čimbenika procijenjen je metodom L₈ ortogonalnog niza, a analizom varijance (ANOVA) određeni su čimbenici s najvećim doprinosom. Statistička značajnost učinaka čimbenika razmatrana je na razini pouzdanosti od 95,0 %. Izračuni i statističke analize provedene su korištenjem Design-Expert 10.0, StatEase, SAD.

Glavni pokusi biorazgradnje

Prema rezultatima preliminarnih pokusa, u glavnom pokusu ispitivana su tri čimbenika s najvećim doprinosom, kako bi se odredili optimalni uvjete za biorazgradnju MP-a, PS-a i PVC-a, primjenom *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovarans*. Eksperimenti su provedeni prema punom faktorskom planu za 3 čimbenika na 3 razine, što predstavlja ukupno 27 eksperimenata (tablica 16). Vrijednosti čimbenika iznosile su: koncentracija MP: 50 mg/L, 500 mg/L i 1000 mg/L, veličina MP čestica: 100 – 300 µm, 300 – 500 µm i 500 – 700 µm, broj okretaja: 100 o/min, 150 o/min i 200 o/min, OG: 0,1, 0,3 i 0,5 te pH-vrijednost: 6,0, 7,0 i 8,0. U tu svrhu ispitani su optimalni uvjeti pri sljedećim čimbenicima:

- koncentraciji MP (γ_{MP}), veličini čestica MP-a (PS) i broj okretaja rotacijske tresilice u pokusu biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus cereus*. pH mineralnog medija (7,3 ± 0,1), temperatura (25 ± 0,2 °C) i optička gustoća (OG = 0,30) bile su konstantne.

- γ_{MP} , veličina čestica MP-a (PVC) i OG u pokusu biorazgradnje PVC-a primjenom *Bacillus cereus*: pH ($7,3 \pm 0,1$), temperatura ($25 \pm 0,2$ °C) i broj okretaja rotacijske tresilice (150 o/min) bile su konstatne.
- Veličina čestica MP, broj okretaja rotacijske tresilice te OG pokusu biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus subtilis*. Koncentracija PS-a bila je konstantna te je iznosila 500 mg/L, temperatura je bila $25 \pm 0,2$ °C, dok je pH mineralnoga medija iznosio $7,3 \pm 0,1$.
- pH-vrijednost mineralnoga medija, broj okretaja rotacijske tresilice i OG u pokusu biorazgradnje PVC-a primjenom *Bacillus subtilis*. Veličina čestica PVC-a je iznosila 300 – 500 μm , a 500 mg/L je bila koncentracija PVC-a uz konstatnu temperaturu od $25 \pm 0,2$ °C.
- OG, broj okretaja rotacijske tresilice i veličina MP čestica u pokusu biorazgradnje PS-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes*. pH mineralnog medija ($7,3 \pm 0,1$), temperatura ($25 \pm 0,2$ °C) i γ_{MP} (500 mg/L) bile su konstantne.
- pH, γ_{MP} i OG u pokusu biorazgradnje PVC-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes*. Veličina čestica PVC-a (300 – 500 μm), broj okretaja rotacijske tresilice (150 o/min) te sobna temperatura ($25 \pm 0,2$ °C) bile su konstatne.
- pH, broj okretaja rotacijske tresilice i OG u pokusu biorazgradnje i PS-a i PVC-a primjenom *Delftia acidovorans*. Temperatura ($25 \pm 0,2$ °C), γ_{MP} (500 mg/L) i veličina čestica MP-a (300 – 500 μm) imale su konstantne vrijednosti.

U svim ovim pokusima, glukoza nije dodana u mineralni medij. Pokusi su dani u tablici 16. u općenitom zapisu GX–1–27. Pokusi su označeni oznakama G1, G2, G3 i G4 (za svaki od 1 do 27) za pokuse biorazgradnje s PS česticama redom za bakterije *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Za pokuse biorazgradnje s PVC česticama, pokusi imaju sljedeće oznake: G11, G22, G33 i G44, redom za bakterije *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Izračuni i statističke analize provedene su korištenjem Design-Expert 10.0, StatEase, SAD.

Tablica 16. Kombinacija pokusa iskazana u kodiranim vrijednostima prema potpunom faktorskom planu za ispitivana tri čimbenika (Čimbenik1, Čimbenik 2, Čimbenik 3) za proces biorazgradnje MP-a, PS-a i PVC-a, primjenom bakterija *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovarans* na 3 razine (1, 2 i 3).

Pokus#	Čimbenik 1	Čimbenik 2	Čimbenik 3
GX-1	3	2	1
GX-2	1	2	3
GX-3	3	1	2
GX-4	1	1	1
GX-5	2	2	1
GX-6	1	3	2
GX-7	1	3	1
GX-8	2	1	1
GX-9	2	3	1
GX-10	3	1	3
GX-11	3	1	1
GX-12	1	1	2
GX-13	2	2	3
GX-14	2	2	2
GX-15	3	3	2
GX-16	1	3	3
GX-17	1	1	3
GX-18	3	3	3
GX-19	3	3	1
GX-20	2	3	2
GX-21	2	3	3
GX-22	3	2	3
GX-23	3	2	2
GX-24	1	2	1
GX-25	1	2	2
GX-26	2	1	2
GX-27	2	1	3

Tijekom ovih eksperimenata mjeren je CFU kako bi se pratio rast bakterija. Nakon 30 dana procesa biorazgradnje, pomoću log CFU kao odziva određeni su optimalni uvjeti za biorazgradnju MP-a primjenom *Bacillus cereus* i *Pseudomonas alcaligenes*. Provedene su i dodatne analize vodene faze dobivene nakon provedenog pokusa biorazgradnje kako bi se dobio bolji uvid u cijeli proces. Određen je TC, TOC, TIC. Otpušteni aditivi s površine čestica MP-a u vodenu fazu procijenjeni su LC/MS analizom. Ispitana je i ekotoksičnost vodene faze primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* prema standardnoj metodi HRN EN ISO 11348-3:2010 [354]. Na kraju pokusa, čestice MP-a su odvojene od vodene faze membranskom filtracijom (i dodatno isprane sterilnom deioniziranom vodom). Čestice MP-a (PS i PVC) analizirane su prije i nakon pokusa biorazgradnje FTIR-ATR spektroskopijom.

Provedba testova toksičnosti filtrata dobivenih nakon provedbe pokusa biorazgradnje primjenom Vibrio fischeri

Provedbom testova toksičnosti za filtrate dobivene nakon provedbe pokusa biorazgradnje primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*, dobivene su vrijednosti luminiscencija za početne uvjete (0 minuta) i nakon 30 minuta. Za svako su se razrjeđenje, po linearnom nizu, radile dvije paralele te su se rezultati računali upotrebljavajući srednje vrijednosti luminiscencija. Inhibicija, izražena u postotku, računa se prema formuli 3 [359]:

$$INH = \frac{LU_{SP} - LU_{UZ}}{LU_{SP}} \cdot 100 \% \quad (3)$$

LU_{SP} je luminiscencija kontrole nakon inkubacijskog vremena, $t = 30$ min, a LU_{UZ} luminiscencija uzorka nakon inkubacijskog vremena, $t = 30$ min. Ove vrijednosti luminiscencija predstavljaju srednje vrijednosti luminiscencija kontrola i uzoraka nakon inkubacijskog vremena. EC_{20} i EC_{50} vrijednosti izražene u % i dobivene su preko uređaja Lumistox nakon provedbe testa pomoću bakterije *Vibrio fischeri*.

3.3.5 Modeliranje odzivnih površina

Modeliranje odzivnih površina za testove toksičnosti

RSM je primijenjena kako bi se definirao utjecaj odabranih parametara: koncentracije (X_1) i veličine (X_2) MP čestica, na inhibiciju rasta *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Pseudomonas putida* i *Saccharomyces cerevisiae* (INH). U tu su svrhu intervali veličina MP zamijenjeni povezanim prosječnim vrijednostima: 200, 400 i 600 μm . Ispitana su tri polinoma različite složenosti za opis površine odziva. Modeli korišteni za testove toksičnosti primjenom *Chlorella* sp. opisani su jednadžbama (4)–(6):

$$INH = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 \quad (4)$$

$$INH = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_1X_2 \quad (5)$$

$$INH = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_1X_2 + a_4X_1^2 + a_5X_2^2 \quad (6)$$

Za preostala tri testna organitma, korišteni su modeli opisani jednadžbama (7)–(9) gdje slovo a predstavlja koeficijente modela.

$$INH = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 \quad (7)$$

$$INH = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_1^2 + a_4X_2^2 \quad (8)$$

$$INH = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_1^2 + a_4X_2^2 + a_5X_1X_2 \quad (9)$$

MODEL I (jednadžbe 4 i 7) je polinom prvog reda koji sadrži linearne doprinose koncentracije i veličine čestica. MODEL II je polinom prvog reda nadograđen članom interakcije ($X_1 \cdot X_2$) (jednadžba 5), odnosno polinom prvoga reda nadograđen kvadratnim članovima (jednadžba 8). MODEL III (jednadžbe 6 i 9) je zapravo MODEL II uz nadopunu kvadratnih članova (X_1^2 i X_2^2) i interacijskog člana ($X_1 \cdot X_2$). Međutim, polinom prvog ili drugog reda prikladan je u većini slučajeva kada se radi o dvjema neovisnim varijablama [360]. Izračuni i analize provedeni su pomoću softvera MATLAB R2010b (MathWorks®, Natick, MA, SAD).

Modeliranje odzivnih površina za pokuse biorazgradnje

RSM je primijenjena za definiranje utjecaja veličine čestica (X_1), koncentracije MP čestica (X_2) i broja okretaja za PS, te veličinu čestica MP-a (X_1), koncentracije MP čestica (X_2) i OG (X_3) za PVC, na logaritamski broj živih stanica (log CFU) *Bacillus cereus* u G1 i G11 pokusima. Za G2/G22 pokuse bilo je potrebno definirati utjecaj veličine čestica (X_1), broja okretaja (X_2) i OG (X_3) za pokus s PS-om, te pH (X_1), broja okretaja (X_2) i OG (X_3) za pokus s PVC-om, na logaritamski broj živih stanica (log CFU) *Bacillus subtilis*. Za G3 pokuse s PS-om, bilo je potrebno definirati utjecaj broja okretaja (X_1), veličine čestica (X_2) i OG (X_3), dok su se definirali pH (X_1), koncentracija MP (X_2) i OG (X_3) za pokuse s PVC-om, na logaritamski broj živih stanica (log CFU) *Pseudomonas alcaligenes*. Za G4/G44 pokuse i s PS-om i PVC-om modelirao se utjecaj pH (X_1), broja okretaja (X_2) i OG (X_3) na logaritamski broj živih stanica (log CFU) *Delftia acidovorans*. U tu su svrhu rasponi veličina čestica MP zamijenjeni povezanim prosječnim vrijednostima: 200, 400 i 600 μm . Za opis plohe odziva primijenjena su dva polinoma različite složenosti. Modeli su opisani jednadžbama (10) i (11), gdje a predstavlja koeficijente modela.

$$\log CFU = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 \quad (10)$$

$$\log CFU = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_1 \cdot X_2 + a_5X_1 \cdot X_3 + a_6X_2 \cdot X_3 + a_7X_1^2 + a_8X_2^2 + a_9X_3^2 \quad (11)$$

MODEL I (jednadžba 10) sadrži linearne članove za ispitivane čimbenike ovisno o pokusu. MODEL II (jednadžba 11) je zapravo MODEL I nadograđen interakcijskim članovima ($X_1 \cdot X_2$, $X_1 \cdot X_3$ i $X_2 \cdot X_3$), kao i kvadratnim članovima (X_1^2 , X_2^2 i X_3^2). Izračuni i analize provedeni su korištenjem Design-Expert 10.0, StatEase, SAD.

3.3.6 Modeliranje bakterijskoga rasta pomoću Gompertz modela

Na temelju eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri Gompertzovog modela. Pomoću eksperimentalnih podataka, vrijednost μ_{\max} je procijenjena prema nagibu pravca na krivulju tijekom eksponencijalne faze rasta. Asimptotski porast predstavlja najvišu postignutu vrijednost broja živih stanica izraženih preko omjera $\ln(N/N_0)$. Procijenjene su vrijednosti b i c konstanti prema jednadžbama (12) i (13):

$$b = \frac{\mu_{\max} \cdot e}{a} \cdot \lambda + 1 \quad (12)$$

$$c = \frac{\mu_{\max} \cdot e}{a} \quad (13)$$

gdje je μ_{\max} maksimalna specifična brzina rasta (d^{-1}), e Eulerov broj, a asimptotski porast broja živih stanica, a λ trajanje lag faze rasta (d). Trajanje lag faze, λ , za sva tri sustava procijenjeno je pomoću jednadžbe (14):

$$\lambda = \frac{b - 1}{c} \quad (14)$$

Parametri modela procijenjeni su nelinearnom regresijom prema simpleks metodi u programskom paketu Scientist. Rezultati dobiveni simulacijom pomoću matematičkog modela uspoređeni su s eksperimentalnim podacima, ponovno proračunati u optimizacijskom potprogramu sve dok nije postignuta minimalno odstupanje između eksperimentalnih podataka i

vrijednosti izračunatih pomoću modela. Skup optimalnih parametara modela upotrijebljen je za simulacije koje su uspoređene s eksperimentalnim podacima.

Za usporedbu je provedeno testiranje hipoteze o jednakosti varijanci F -testom, uz razinu značajnosti od 0,05. Fischer-Snedecorov F -test je statistički test koji omogućuje usporedbu eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih matematičkim modeliranjem. Nulta hipoteza testa uzima u obzir da su varijance dvaju setova podataka jednake, dok kontrapoteza uzima u obzir da su različite. Test se provodi stavljanjem varijanci u omjer prema jednadžbi (15):

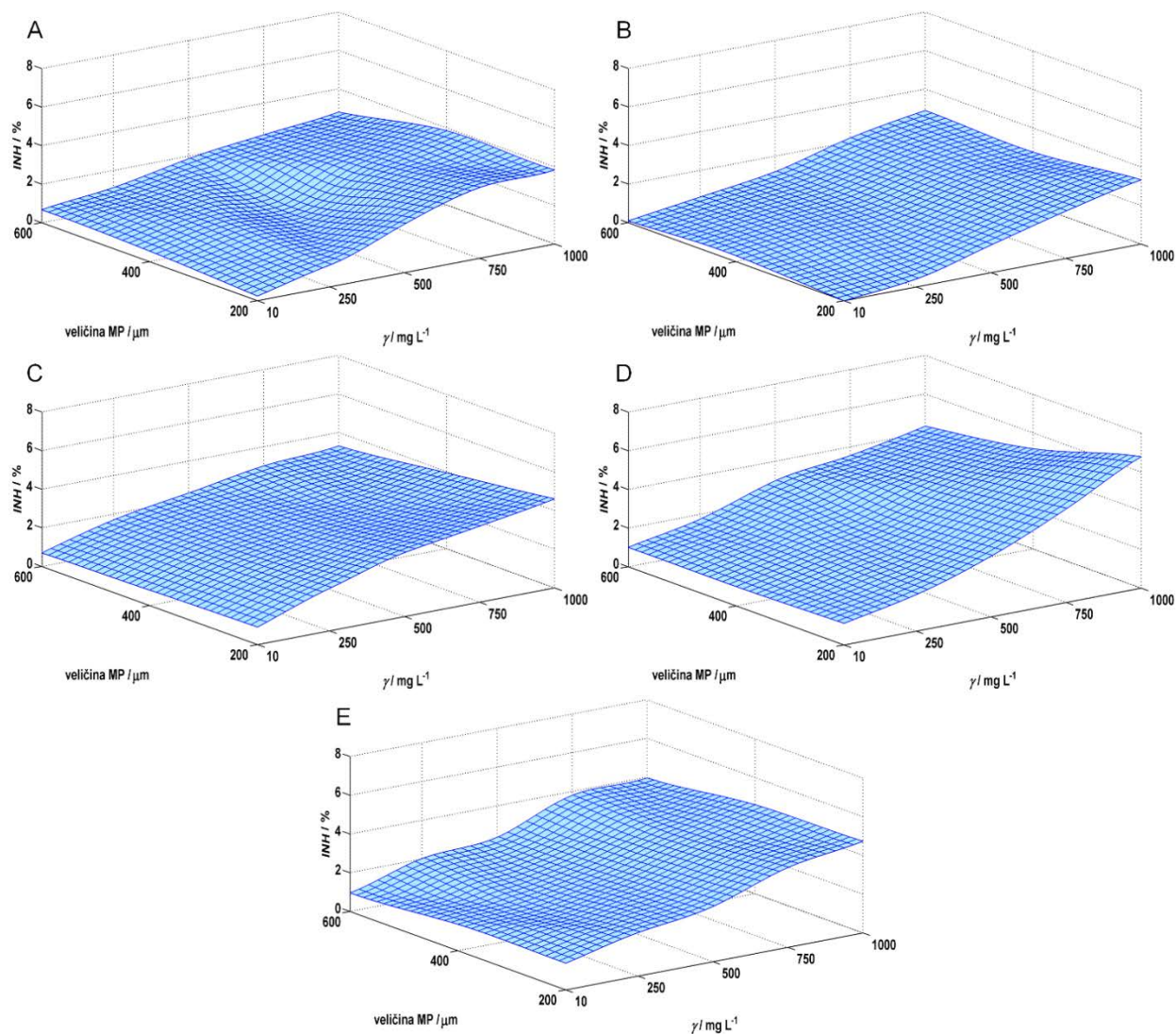
$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (15)$$

gdje su s_1^2 i s_2^2 varijance koje se uspoređuju. Test se provodi uz pretpostavku da je s_1^2 manje od s_2^2 , čime se dobiva vrijednost F -testa u rasponu između 0 i 1. Približno ista vrijednost varijanci rezultira vrijednostima F bližim 1 i ukazuje na valjanost nulte hipoteze.

4 REZULTATI

4.1 Testovi toksičnosti za mikroplastiku primjenom mikroalgi, bakterije i kvasca

Na slikama 27 – 30 te u tablicama 17 – 20 prikazani su rezultati testova toksičnosti za PE, PP, PS, PET i PVC MP primjenom mikroalgi *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp., bakterije *Pseudomonas putida* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.



Slika 27. Eksperimentalno dobivene vrijednosti inhibicije rasta *Chlorella* sp. tijekom izloženosti A) polietilenu, B) polipropilenu, C) polistirenu, D) poli(vinil-kloridu) i E) poli(etilen-tereftalatu).

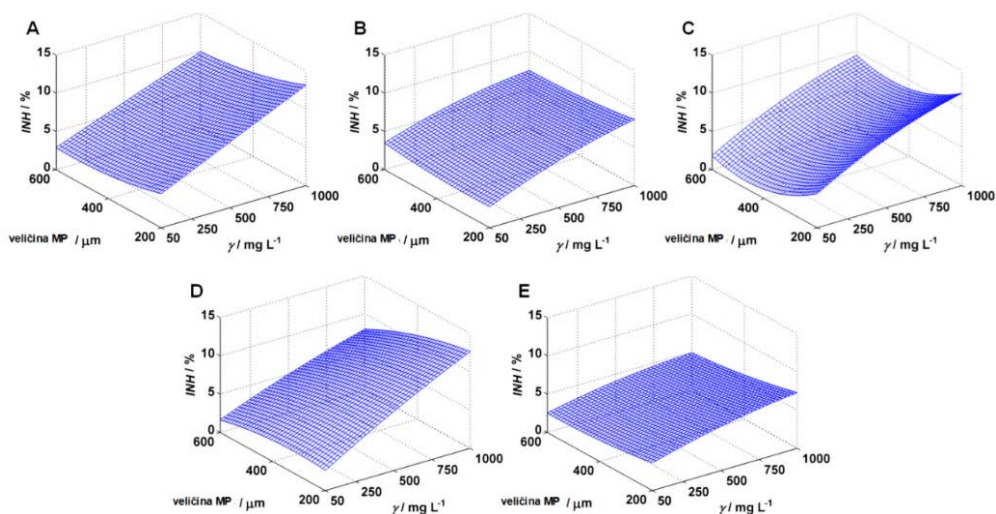
Površine su dobivene interpolacijom eksperimentalno dobivenih vrijednosti inhibicija.

Tablica 17. Analiza primijenjenih RSM modela za mikroalgu *Chlorella* sp. tijekom izloženosti česticama mikroplastike (MP): polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), poli(vinil-klorid) (PVC) i poli(etilen-tereftalat) (PET). Analizirani čimbenici bili su koncentracija i veličina čestica.

MP	Model					Koeficijenti				
	Br.	R^2	R^2_{adj}	F	p	Koeficijent	Vrijednost	p	Značajni faktor modela	Značajni čimbenik
PE	MODEL I	0,9011	0,8846	54,65	0,00	a_0	0,94	0,01		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	3,15	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-1,28	0,07		
	MODEL II	0,9436	0,9282	61,29	0,00	a_0	0,09	0,82		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	4,83	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-4})$	8,31	0,37		
	MODEL III	0,9439	0,9127	30,29	0,00	$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-4,21	0,02	$X_1 \cdot X_2$	γ_{MP} i veličina MP-a
						a_0	0,24	0,77		
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	4,85	0,00	X_1	
$a_2 (\cdot 10^{-3})$						-9,67	0,98			
$a_3 (\cdot 10^{-6})$						-4,21	0,03	$X_1 \cdot X_2$		
PP	MODEL I	0,9675	0,9622	178,96	0,00	a_0	0,11	0,53		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	2,98	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-4})$	-3,22	0,36		
	MODEL II	0,9747	0,9678	141,33	0,00	a_0	-0,21	0,02		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	3,61	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-4})$	4,58	0,44		
	MODEL III	0,9797	0,9684	86,80	0,00	$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-1,55	0,20		γ_{MP}
						a_0	-0,22	0,61		
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	2,88	0,00	X_1	
$a_2 (\cdot 10^{-3})$						1,13	0,62			
$a_3 (\cdot 10^{-6})$						-1,55	0,11			
PS	MODEL I	0,9509	0,9427	116,21	0,00	a_0	1,78	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	3,09	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-1,93	0,00	X_2	
	MODEL II	0,9680	0,9593	111,07	0,00	a_0	1,25	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	4,14	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-4})$	-6,16	0,37	X_2	
	MODEL III	0,9907	0,9855	191,54	0,00	$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-2,61	0,03	$X_1 \cdot X_2$	γ_{MP} i veličina MP-a
						a_0	1,54	0,00		
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	5,71	0,00	X_1	
$a_2 (\cdot 10^{-3})$						-3,56	0,05	X_2		
$a_3 (\cdot 10^{-6})$						-2,61	0,00	$X_1 \cdot X_2$		
$a_4 (\cdot 10^{-6})$	-1,56	0,00	X_1^2							
$a_5 (\cdot 10^{-6})$	3,65	0,09								

Tablica 17. Nastavak

MP	Model					Koefijenti			Značajni faktor modela	Značajni čimbenik
	Br.	R^2	R^2_{adj}	F	p	Koefijent	Vrijednost	p		
PVC	MODEL I	0,9386	0,9283	91,69	0,00	a_0	1,66	0,00	X_1 X_2	γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	4,49	0,00		
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-2,10	0,02		
	MODEL II	0,9797	0,9742	176,95	0,00	a_0	0,48	0,17	X_1 $X_1 \cdot X_2$	γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	6,83	0,00		
						$a_2 (\cdot 10^{-4})$	8,69	0,27		
	MODEL III	0,9862	0,9786	128,83	0,00	a_0	1,15	0,07	X_1 $X_1 \cdot X_2$	γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	5,73	0,00		
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-2,26	0,44		
$a_3 (\cdot 10^{-6})$						-5,82	0,00			
$a_4 (\cdot 10^{-6})$						1,09	0,12			
PET	MODEL I	0,9677	0,9623	179,71	0,00	a_0	1,58	0,00	X_1 X_2	γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	3,33	0,00		
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-1,09	0,01		
	MODEL II					a_0	1,41	0,00	X_1	γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	3,66	0,00		
						$a_2 (\cdot 10^{-4})$	-6,81	0,33		
	MODEL III	0,9713	0,9553	60,83	0,00	a_0	1,75	0,01	X_1	γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	3,34	0,00		
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-2,46	0,42		
						$a_3 (\cdot 10^{-7})$	-8,24	0,50		
						$a_4 (\cdot 10^{-7})$	3,16	0,65		
	$a_5 (\cdot 10^{-6})$	2,21	0,54							



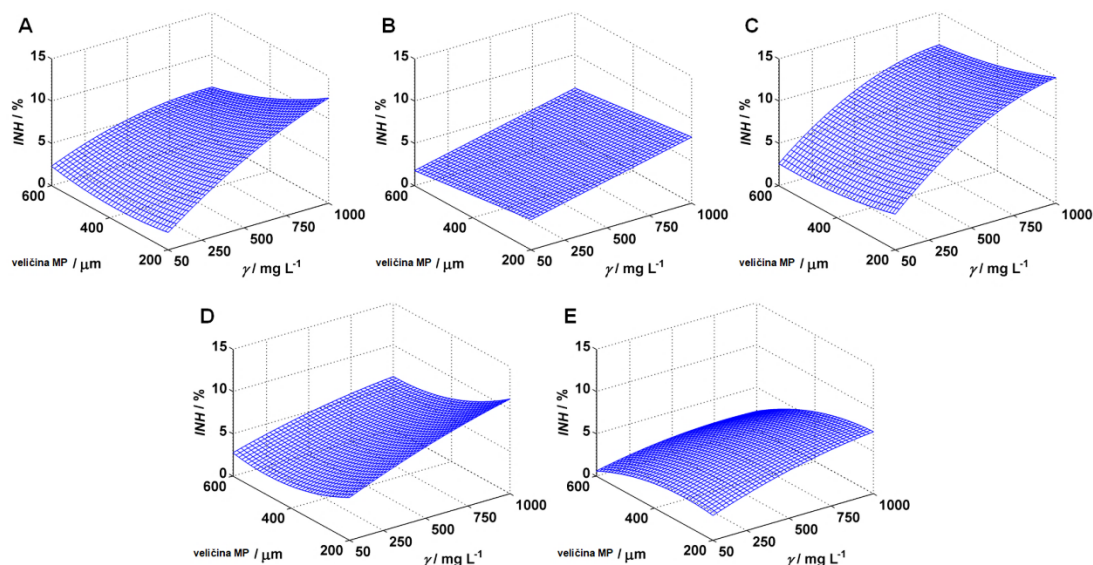
Slika 28. Procijenjene površine inhibicije za *Scenedesmus* sp. po najboljem regresijskom modelu (MODEL III) za A) polietilen, B) polipropilen, C) polistiren, D) poli(vinil-klorid) i E) poli(etilen-tereftalat).

Tablica 18. Analiza primijenjenih RSM modela za mikroalgu *Scenedesmus* sp. tijekom izloženosti česticama mikroplastike (MP): polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), poli(vinil-klorid) (PVC) i poli(etilen-tereftalat) (PET). Analizirani čimbenici bili su koncentracija i veličina čestica.

MP	Model					Koeficijenti				
	Br.	R^2	R^2_{adj}	F	p	Koeficijent	Vrijednost	p	Značajni faktor modela	Značajni čimbenik
PE	MODEL I	0,9535	0,9458	123,17	0,00	a_0	5,45	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	8,26	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-5,93	0,00	X_2	
	MODEL II	0,9618	0,9465	62,95	0,00	a_0	7,37	0,00		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	0,84	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-1,76	0,94		
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-0,14	0,17		
	MODEL III	0,9680	0,9502	54,40	0,00	a_0	6,50	0,00		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	1,01	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-1,54	0,08		
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-0,14	0,22		
						$a_4 (\cdot 10^{-3})$	1,46	0,94		
PP	MODEL I	0,8824	0,8628	45,01	0,00	a_0	3,25	0,00		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	5,19	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-0,48	0,68		
	MODEL II	0,9055	0,8677	23,96	0,00	a_0	3,79	0,02		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	0,80	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-0,63	0,44		
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-2,70	0,20		
	MODEL III	0,9279	0,8878	23,15	0,00	a_0	2,76	0,09		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	1,00	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-0,37	0,63		
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-2,70	0,17		
						$a_4 (\cdot 10^{-3})$	0,72	0,44		
PS	MODEL I	0,8570	0,8332	35,95	0,00	a_0	5,12	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	0,80	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-0,66	0,01	X_2	
	MODEL II	0,9525	0,9335	50,11	0,00	a_0	1,10	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	1,20	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-4,53	0,00	X_2	
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-3,78	0,14		
	MODEL III	0,9565	0,9323	39,54	0,00	$a_0 (\cdot 10)$	1,17	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	1,06	0,01	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-4,72	0,00	X_2	
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-3,78	0,14		
						$a_4 (\cdot 10^{-3})$	4,85	0,00	X_2^2	
					$a_5 (\cdot 10^{-3})$	0,36	0,39			

Tablica 18. Nastavak

MP	Model					Koeffijenti				
	Br.	R^2	R^2_{adj}	F	p	Koeffijent	Vrijednost	p	Značajni faktor modela	Značajni čimbenik
PVC	MODEL I	0,9331	0,9219	83,67	0,00	a_0	4,87	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	0,86	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-0,69	0,00	X_2	
	MODEL II	0,9435	0,9208	41,71	0,00	a_0	2,53	0,22		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	1,03	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	0,55	0,61		
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-1,62	0,55		
	MODEL III	0,9705	0,9541	59,18	0,00	a_0	0,57	0,73		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	1,42	0,00	X_1	
$a_2 (\cdot 10^{-3})$						1,04	0,23			
$a_3 (\cdot 10^{-6})$						-1,62	0,44			
$a_4 (\cdot 10^{-3})$						-1,56	0,15			
PET	MODEL I	0,8845	0,8653	45,95	0,00	a_0	4,75	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	3,17	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-4,30	0,00	X_2	
	MODEL II	0,9136	0,8790	26,42	0,00	a_0	5,46	0,00		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	5,23	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-1,05	0,08		
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-1,96	0,18		
	MODEL III	0,9335	0,8965	25,25	0,00	a_0	4,75	0,00		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	0,66	0,00	X_1	
$a_2 (\cdot 10^{-2})$						-0,87	0,13			
$a_3 (\cdot 10^{-6})$						-1,96	0,15			
$a_4 (\cdot 10^{-3})$						0,77	0,25			
$a_5 (\cdot 10^{-6})$	-3,48	0,13								



Slika 29. Procijenjene površine inhibicije za *Pseudomonas putida* po najboljem regresijskom modelu (MODEL III) za A) polietilen, B) polipropilen, C) polistiren, D) poli(vinil-klorid) i E) poli(etilen-tereftalat).

Tablica 19. Analiza primijenjenih RSM modela za bakteriju *Pseudomonas putida* tijekom izloženosti česticama mikroplastike (MP): polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), poli(vinil-klorid) (PVC) i poli(etilen-tereftalat) (PET). Analizirani čimbenici bili su koncentracija i veličina čestica.

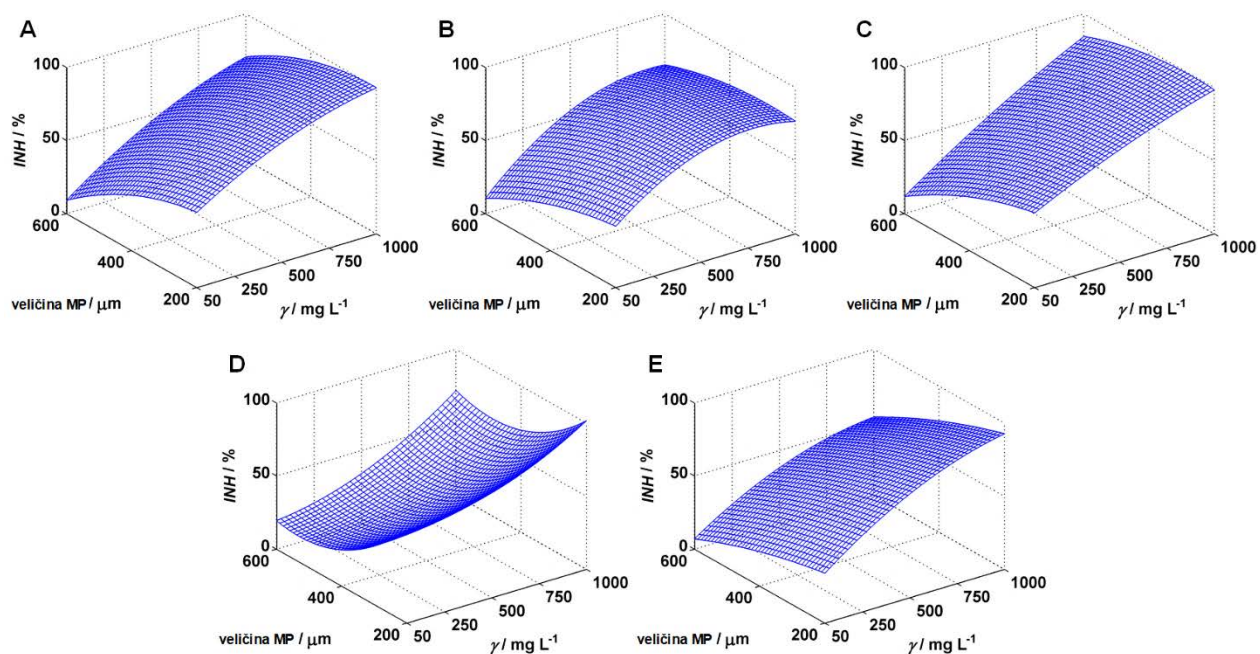
MP	Model					Koeficijenti				
	Br.	R^2	R^2_{adj}	F	p	Koeficijent	Vrijednost	p	Značajni faktor modela	Značajni čimbenik
	MODEL I	0,8002	0,7669	24,03	0,00	a_0	5,01	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 \cdot (10^{-2})$	0,75	0,00	X_1	
						$a_2 \cdot (10^{-2})$	-0,73	0,01	X_2	
PE	MODEL II	0,8306	0,7628	12,26	0,00	$a_0 \cdot (10)$	0,65	0,07		γ_{MP}
						$a_1 \cdot (10^{-2})$	1,25	0,03	X_1	
						$a_2 \cdot (10^{-2})$	-2,11	0,26		
						$a_3 \cdot (10^{-3})$	-0,47	0,31		
	MODEL III	0,9228	0,8799	21,52	0,00	$a_4 \cdot (10^{-3})$	1,72	0,45		γ_{MP} i veličina MP-a
						a_0	3,04	0,26		
						$a_1 \cdot (10^{-2})$	1,93	0,00	X_1	
						$a_2 \cdot (10^{-2})$	-1,23	0,36		
						$a_3 \cdot (10^{-3})$	-0,47	0,16		
					$a_4 \cdot (10^{-3})$	1,72	0,23			
					$a_5 \cdot (10^{-5})$	-1,72	0,01	$X_1 \cdot X_2$		

Tablica 19. Nasatavak 1

MP	Model					Koeffijenti				
	Br.	R^2	R^2_{adj}	F	p	Koeffijent	Vrijednost	p	Značajni faktor modela	Značajni čimbenik
PP	MODEL I	0,9176	0,9039	66,83	0,00	a_0	4,25	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	4,47	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-3})$	-4,49	0,00	X_2	
	MODEL II	0,9192	0,8869	28,44	0,00	a_0	3,84	0,01		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	5,08	0,02	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-0,26	0,71		
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-0,59	0,74		
	MODEL III	0,9379	0,9035	27,20	0,00	$a_4 (\cdot 10^{-5})$	-0,23	0,78		γ_{MP}
						a_0	2,95	0,04		
$a_1 (\cdot 10^{-2})$						0,68	0,01	X_1		
$a_2 (\cdot 10^{-2})$						-0,04	0,95			
$a_3 (\cdot 10^{-6})$						-0,59	0,72			
PS	MODEL I	0,9159	0,9019	65,37	0,00	$a_4 (\cdot 10^{-5})$	-0,23	0,77		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_5 (\cdot 10^{-5})$	-0,43	0,13		
						a_0	6,30	0,00		
	MODEL II	0,9656	0,9519	70,26	0,00	$a_1 (\cdot 10^{-2})$	1,01	0,00	X_1	γ_{MP}
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-0,66	0,00	X_2	
						$a_0 (\cdot 10)$	0,68	0,00		
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	1,91	0,00	X_1	
	MODEL III	0,9723	0,9570	63,29	0,00	$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-1,75	0,09		γ_{MP}
						$a_3 (\cdot 10^{-5})$	-0,86	0,00	X_1^2	
$a_4 (\cdot 10^{-5})$						1,36	0,27			
a_0						5,62	0,01			
$a_1 (\cdot 10^{-2})$						2,13	0,00	X_1		
PVC	MODEL I	0,8626	0,8397	37,66	0,00	$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-1,47	0,14		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_3 (\cdot 10^{-5})$	-0,86	0,00	X_1^2	
						$a_4 (\cdot 10^{-5})$	1,36	0,25		
	MODEL II	0,9340	0,9076	35,37	0,00	$a_5 (\cdot 10^{-5})$	-0,55	0,17		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_0 (\cdot 10)$	7,02	0,00		
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	0,72	0,01	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-3,53	0,00	X_2	
	MODEL III	0,9589	0,9360	41,97	0,00	$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-2,05	0,36		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_4 (\cdot 10^{-5})$	3,29	0,01	X_2^2	
$a_0 (\cdot 10)$						0,97	0,00			
$a_1 (\cdot 10^{-2})$						1,00	0,00	X_1		
$a_2 (\cdot 10^{-2})$						-3,18	0,00	X_2		
					$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-2,05	0,28			
					$a_4 (\cdot 10^{-5})$	3,29	0,00	X_2^2		
					$a_5 (\cdot 10^{-5})$	-0,69	0,04	$X_1 \cdot X_2$		

Tablica 19. Nastavak 2

MP	Model					Koeffijenti				
	Br.	R^2	R^2_{adj}	F	p	Koeffijent	Vrijednost	p	Značajni faktor modela	Značajni čimbenik
PET	MODEL I	0,8016	0,7686	24,25	0,00	a_0	6,00	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-3})$	3,13	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-0,92	0,00	X_2	
	MODEL II	0,8850	0,8389	19,23	0,00	a_0	1,77	0,33		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	0,61	0,04	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	1,34	0,19		
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-2,83	0,26		
	MODEL III	0,9246	0,8827	22,07	0,00	$a_4 (\cdot 10^{-3})$	-2,83	0,04	X_2^2	γ_{MP} i veličina MP-a
						a_0	0,26	0,88		
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	0,91	0,01	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	1,72	0,07		
						$a_3 (\cdot 10^{-6})$	-2,83	0,20		
						$a_4 (\cdot 10^{-3})$	-2,83	0,02	X_2^2	
						$a_5 (\cdot 10^{-3})$	-0,74	0,06		



Slika 30. Procijenjene površine inhibicije za *Saccharomyces cerevisiae* po najboljem regresijskom modelu (MODEL III) za A) polietilen, B) polipropilen, C) polistiren, D) poli(vinilklorid) i E) poli(etilen-tereftalat).

Tablica 20. Analiza primijenjenih RSM modela za kvasac *Saccharomyces cerevisiae* tijekom izloženosti česticama mikroplastike (MP): polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), poli(vinil-klorid) (PVC) i poli(etilen-tereftalat) (PET). Analizirani čimbenici bili su koncentracija i veličina čestica.

MP	Model					Koeficijent				
	Br.	R^2	R^2_{adj}	F	p	Koeficijent	Vrijednost	p	Značajni faktor modela	Značajni čimbenik
PE	MODEL I	0,9449	0,9358	102,97	0,00	$a_0 (\cdot 10)$	6,97	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	5,78	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-1})$	-0,90	0,00	X_2	
	MODEL II	0,9804	0,9725	124,86	0,00	$a_0 (\cdot 10)$	3,90	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-1})$	0,93	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-1})$	0,62	0,22		
						$a_3 (\cdot 10^{-3})$	-3,35	0,02	X_1^2	
	MODEL III	0,9860	0,9782	126,77	0,00	$a_4 (\cdot 10^{-4})$	-1,90	0,01	X_2^2	γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_0 (\cdot 10)$	4,59	0,00		
$a_1 (\cdot 10^{-1})$						0,79	0,00	X_1		
$a_2 (\cdot 10^{-1})$						0,45	0,33			
$a_3 (\cdot 10^{-3})$						-3,35	0,01	X_1^2		
PP	MODEL I	0,8100	0,7784	25,58	0,00	$a_0 (\cdot 10)$	5,57	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	4,72	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-5,50	0,00	X_2	
	MODEL II	0,9387	0,9142	28,28	0,00	$a_0 (\cdot 10)$	2,65	0,06		γ_{MP}
						$a_1 (\cdot 10^{-1})$	1,25	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-1})$	0,49	0,49		
						$a_3 (\cdot 10^{-4})$	-0,74	0,00	X_1^2	
	MODEL III	0,9580	0,9347	41,05	0,00	$a_4 (\cdot 10^{-4})$	-1,30	0,15		γ_{MP}
						$a_0 (\cdot 10)$	3,69	0,01		
$a_1 (\cdot 10^{-1})$						1,05	0,00	X_1		
$a_2 (\cdot 10^{-1})$						0,23	0,71			
$a_3 (\cdot 10^{-4})$						-0,74	0,00	X_1^2		
PS	MODEL I	0,9334	0,9223	84,09	0,00	$a_4 (\cdot 10^{-4})$	-1,30	0,11		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_0 (\cdot 10)$	5,88	0,00		
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	6,32	0,00	X_1	
	MODEL II	0,9468	0,9255	44,50	0,00	$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-6,79	0,00	X_2	γ_{MP}
						$a_0 (\cdot 10)$	3,86	0,02		
						$a_1 (\cdot 10^{-1})$	0,79	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-1})$	0,39	0,63		
	MODEL III	0,9687	0,9514	55,76	0,00	$a_3 (\cdot 10^{-3})$	-1,55	0,45		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_4 (\cdot 10^{-4})$	-1,33	0,20		
$a_0 (\cdot 10)$						5,22	0,00			
$a_1 (\cdot 10^{-2})$						5,28	0,03	X_1		
$a_2 (\cdot 10^{-1})$						0,05	0,94			
$a_3 (\cdot 10^{-3})$	-1,55	0,35								
$a_4 (\cdot 10^{-4})$	-1,33	0,12								
$a_5 (\cdot 10^{-4})$	0,67	0,03	$X_1 \cdot X_2$							

Tablica 20. Nastavak

MP	Model					Koefficient				
	Br.	R^2	R^2_{adj}	F	p	Koefficient	Vrijednost	p	Značajni faktor modela	Značajni čimbenik
PVC	MODEL I	0,8314	0,8033	29,59	0,00	$a_0 (\cdot 10)$	6,61	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	4,74	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-1})$	-0,93	0,00	X_2	
	MODEL II	0,9672	0,9541	73,75	0,00	$a_0 (\cdot 10^2)$	1,29	0,00		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_1 (\cdot 10^{-2})$	0,10	0,95		
						$a_2 (\cdot 10^{-1})$	-4,31	0,00	X_2	
						$a_3 (\cdot 10^{-3})$	4,42	0,01	X_1^2	
	MODEL III	0,9746	0,9605	69,01	0,00	$a_4 (\cdot 10^{-4})$	4,22	0,00	X_2^2	γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_0 (\cdot 10^2)$	1,37	0,00		
$a_1 (\cdot 10^{-2})$						-1,40	0,45	X_2		
$a_2 (\cdot 10^{-1})$						-4,50	0,00	X_2		
$a_3 (\cdot 10^{-3})$						4,42	0,01	X_1^2		
PET	MODEL I	0,9596	0,9528	142,33	0,00	$a_4 (\cdot 10^{-4})$	4,22	0,00	X_2^2	γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_5 (\cdot 10^{-5})$	3,76	0,14		
						$a_0 (\cdot 10)$	5,61	0,00		
	MODEL II	0,9889	0,9844	222,23	0,00	$a_1 (\cdot 10^{-2})$	5,54	0,00	X_1	γ_{MP}
						$a_2 (\cdot 10^{-1})$	-0,82	0,00	X_2	
						$a_0 (\cdot 10)$	3,98	0,00	X_1	
						$a_1 (\cdot 10^{-1})$	0,98	0,00	X_1	
	MODEL III	0,9944	0,9913	318,85	0,00	$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-2,29	0,51		γ_{MP} i veličina MP-a
						$a_3 (\cdot 10^{-3})$	-4,08	0,00	X_1^2	
						$a_4 (\cdot 10^{-4})$	-0,74	0,11		
						$a_0 (\cdot 10)$	3,33	0,00		
						$a_1 (\cdot 10^{-1})$	1,11	0,00	X_1	
						$a_2 (\cdot 10^{-2})$	-0,68	0,80		
						$a_3 (\cdot 10^{-3})$	-4,08	0,00	X_1^2	
						$a_4 (\cdot 10^{-4})$	-0,74	0,04	X_2^2	
$a_5 (\cdot 10^{-5})$	-3,16	0,02	$X_1 \cdot X_2$							

4.2 Izolacija i identifikacija bakterija i gljiva iz okolišnih uzoraka obogaćenih mikroplastikom

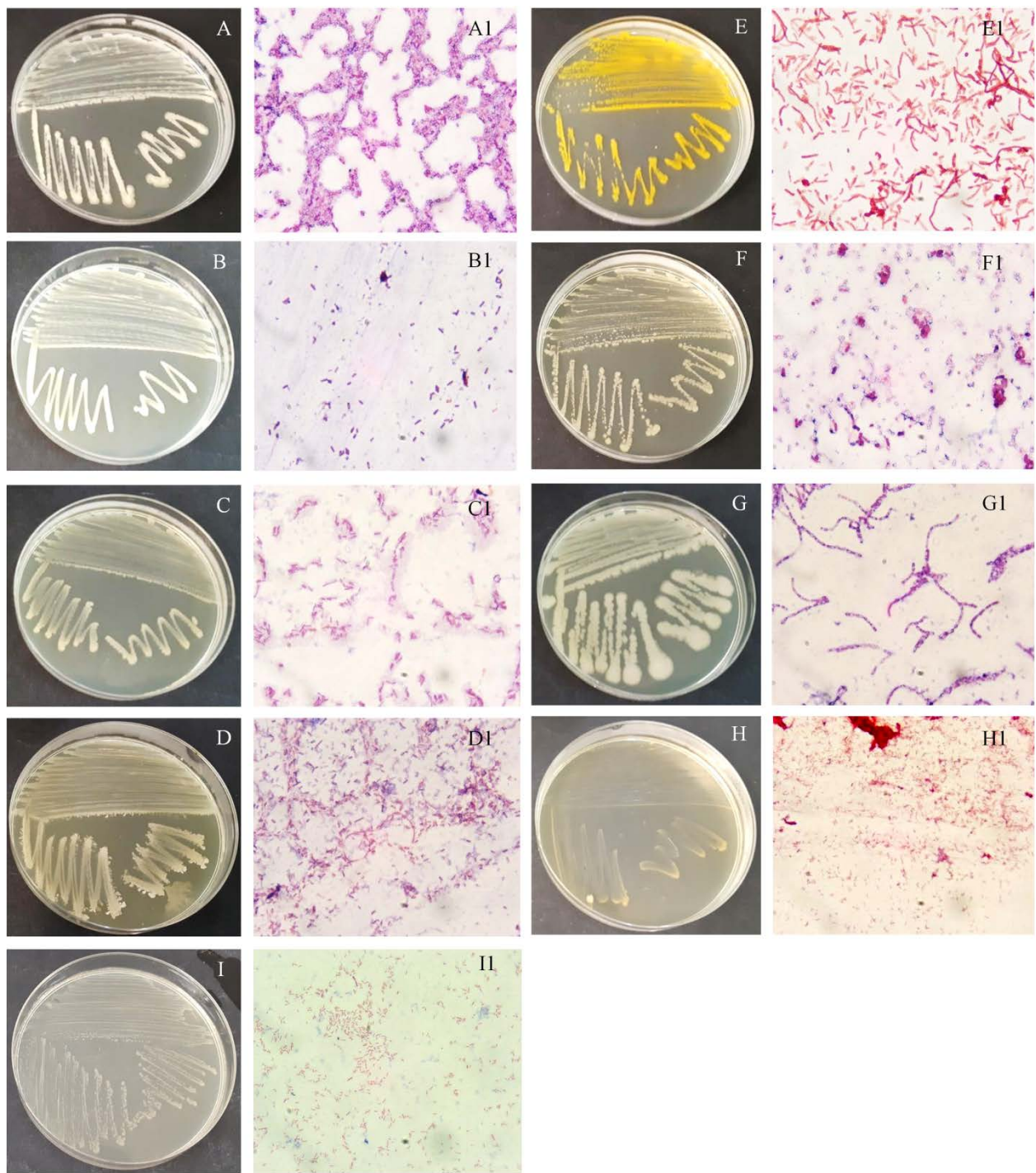
Na slikama 31 i 32 te tablicama 21 i 22 prikazani su rezultati izolacije i identifikacije bakterija i gljiva iz tri okolišna uzorka obogaćena MP-om. Bakterije i gljive (plijesni i kvasci) su izolirani iz uzoraka aktivnoga mulja, komposta i riječnog sedimenta.

Tablica 21. Popis izoliranih i identificiranih mikroorganizama (bakterija i gljiva) iz tri okolišna uzorka obogaćenih MP-om.

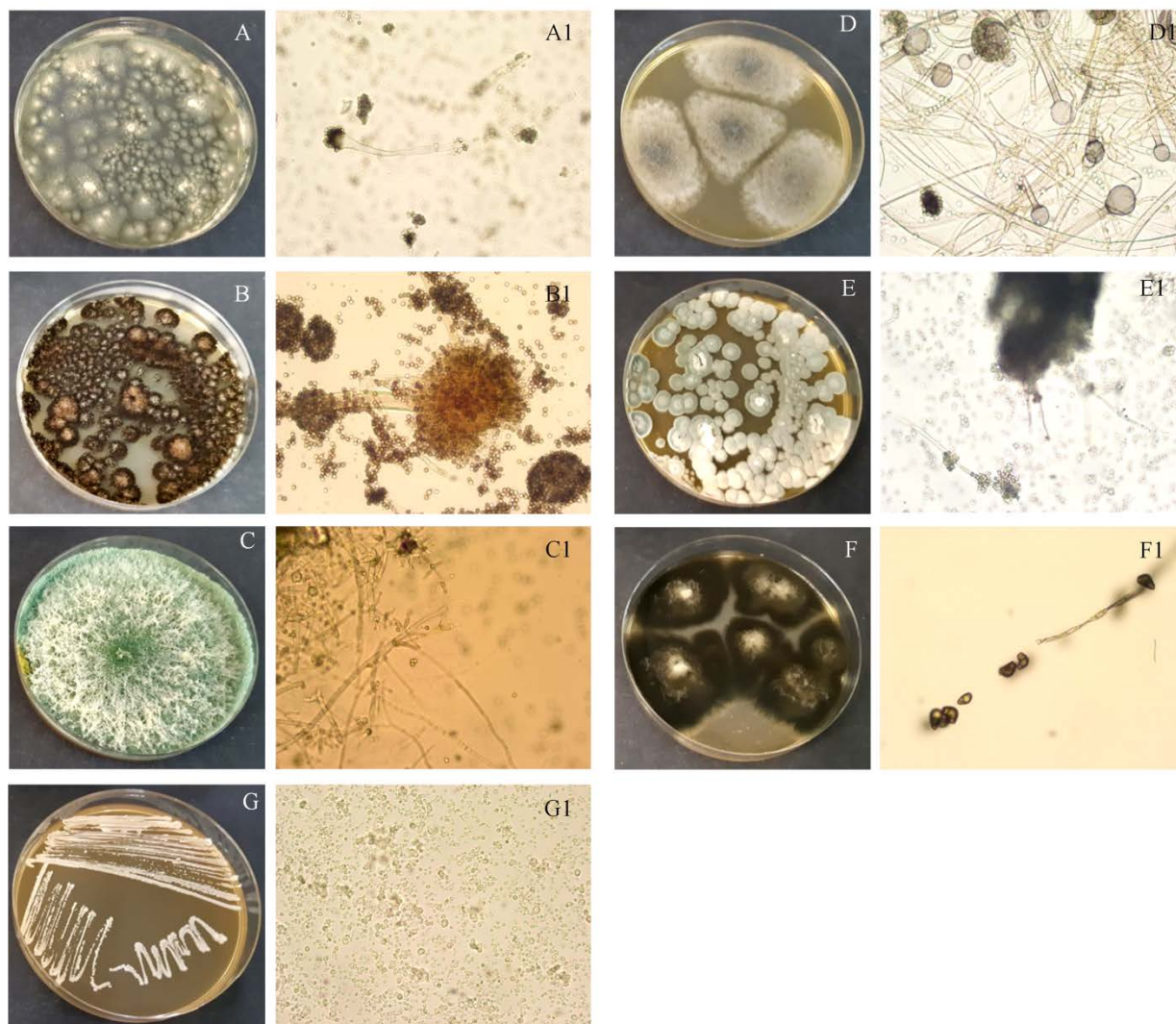
Izolat	Grupa mikroorganizma	Uzorak	Identificirani mikroorganizam
I1	bakterija	kompost	<i>Bacillus sonorensis</i>
I2			<i>Bacillus subtilis</i>
I3		aktivni mulj	<i>Lysinibacillus massiliensis</i>
I4		sediment	<i>Bacillus licheniformis</i>
I5			<i>Bacillus indicus</i>
I6			<i>Bacillus megaterium</i>
I7			<i>Bacillus cereus</i>
I8		sediment	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
I9			<i>Delftia acidovorans</i>
I10		plijesan	sediment
I11	kompost		<i>Aspergillus niger</i>
I12			<i>Trichoderma</i> sp.
I13	<i>Rhizopus</i> sp.		
I14	sediment		<i>Penicillium</i> sp.
I15	aktivni mulj		<i>Alternaria</i> sp.
I16	kvasac	sediment	<i>Candida parapsilosis</i>

Tablica 22. Rezultati bojanja, KOH testa, testa pokretljivosti i biokemijskih testova za svaki izolat bakterija.

Izolat	bojanje po Gramu	Ziehl-Nielson bojanje	Schaffer-Fulton bojanje	Negativno bojanje	KOH test	Pokretljivost	Oksidaza	Katalaza	Nitrat reduktaza
I1	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+
I2	+	-	+	+/-	-	+	+	+	+
I3	+	+	+	+/-	-	+	+	+	-
I4	+	+/-	+	+/-	-	+	+	+	+
I5	+	+	+	+/-	-	+	-	+/-	-
I6	+	+	+	+/-	-	+	+	+	-
I7	+	+/-	+	-	-	+	+	-	+
I8	-	-	-	-	+	+	+	+	+
I9	-	-	-	-	+	+	+	+	+



Slika 31. Fotografije dobivenih čistih kultura tehnikom iscrpljivanja i mikrofotografije izolata bakterija obojanih po Gramu: I1 (A i A1), I2 (B i B1), I3 (C i C1), I4 (D i D1), I5 (E i E1), I6 (F i F1), I7 (G i G1), I8 (H i H1), te I9 (I i I1), snimljene svjetlosnim mikroskopom pri povećanju, P = 1000×.



Slika 32. Fotografije dobivenih čistih kultura tehnikom iscrpljivanja i mikrografije izolata gljiva: I10 (A i A1), I11 (B i B1), I12 (C i C1), I13 (D i D1), I14 (E i E1), I15 (F i F1), te I16 (G i G1), snimljene svjetlosnim mikroskopom pri povećanju, P = 400×.

4.3 Pokusi biorazgradnje mikroplastika primjenom bakterija

4.3.1 Preliminarni (*screening*) pokus biorazgradnje

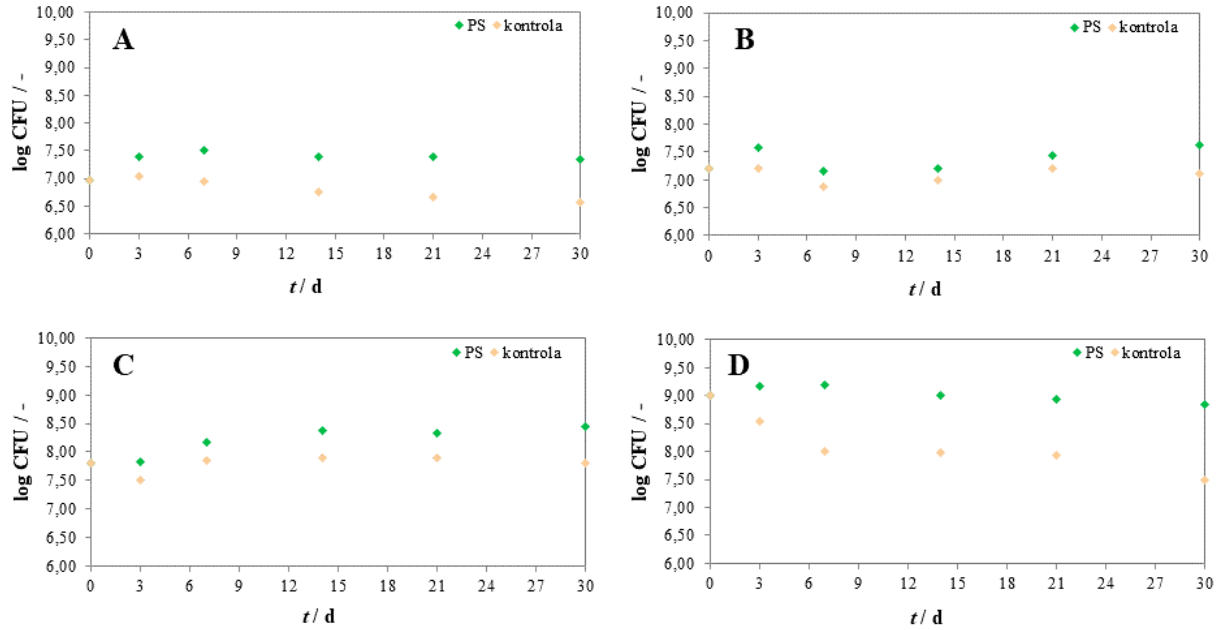
U tablici 23 prikazani su rezultati preliminarnih pokusa (određivanje značajnih čimbenika) biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterija *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Pokusi su provedeni prema Taguchi dizajnu.

Tablica 23. Analiza doprinosa čimbenika za biorazgradnju PS i PVC mikroplastike na temelju rezultata preliminarnih pokusa.

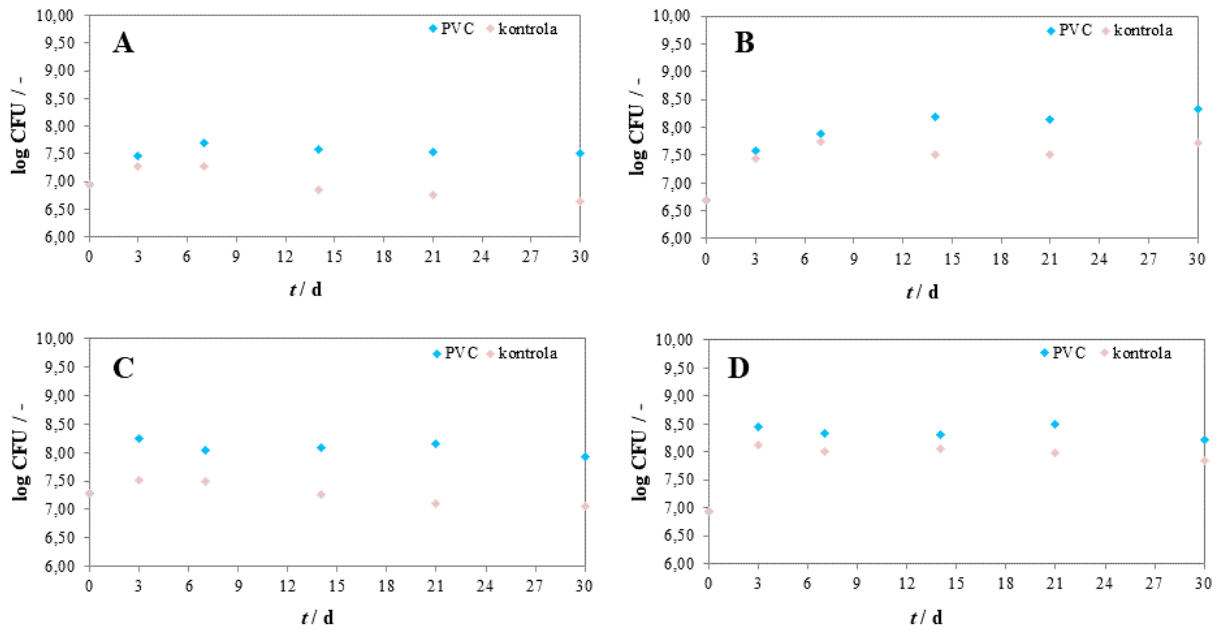
Bakterija	MP	Čimbenik	F-vrijednost	p-vrijednost	Doprinos / %
<i>Bacillus cereus</i>	PS	veličina MP	1243,26	0,0000	48,52
		γ_{MP}	128,82	0,0015	5,03
		broj okretaja	1058,59	0,0000	41,31
	PVC	veličina MP	136,30	0,0014	43,45
		γ_{MP}	110,88	0,0018	35,34
		OG	45,60	0,0066	14,54
<i>Bacillus subtilis</i>	PS	veličina MP	529,00	0,0019	5,20
		broj okretaja	413,44	0,0024	4,06
		OG	8281,00	0,0001	81,41
	PVC	pH	26,24	0,0069	4,20
		broj okretaja	16,29	0,0157	2,60
		OG	578,92	0,0000	92,56
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	PS	veličina MP	12,72	0,0376	14,48
		broj okretaja	46,93	0,0064	53,42
		OG	12,22	0,0396	13,91
	PVC	pH	17,89	0,0134	22,20
		γ_{MP}	23,11	0,0086	28,69
		OG	35,56	0,0040	44,14
<i>Delftia acidovorans</i>	PS	pH	22,65	0,0414	9,44
		broj okretaja	95,56	0,0102	40,24
		OG	35,09	0,0273	14,62
	PVC	pH	10,61	0,0312	10,45
		broj okretaja	69,12	0,0011	68,11
		OG	17,76	0,0135	17,50

4.3.2. Glavni pokusi biorazgradnje

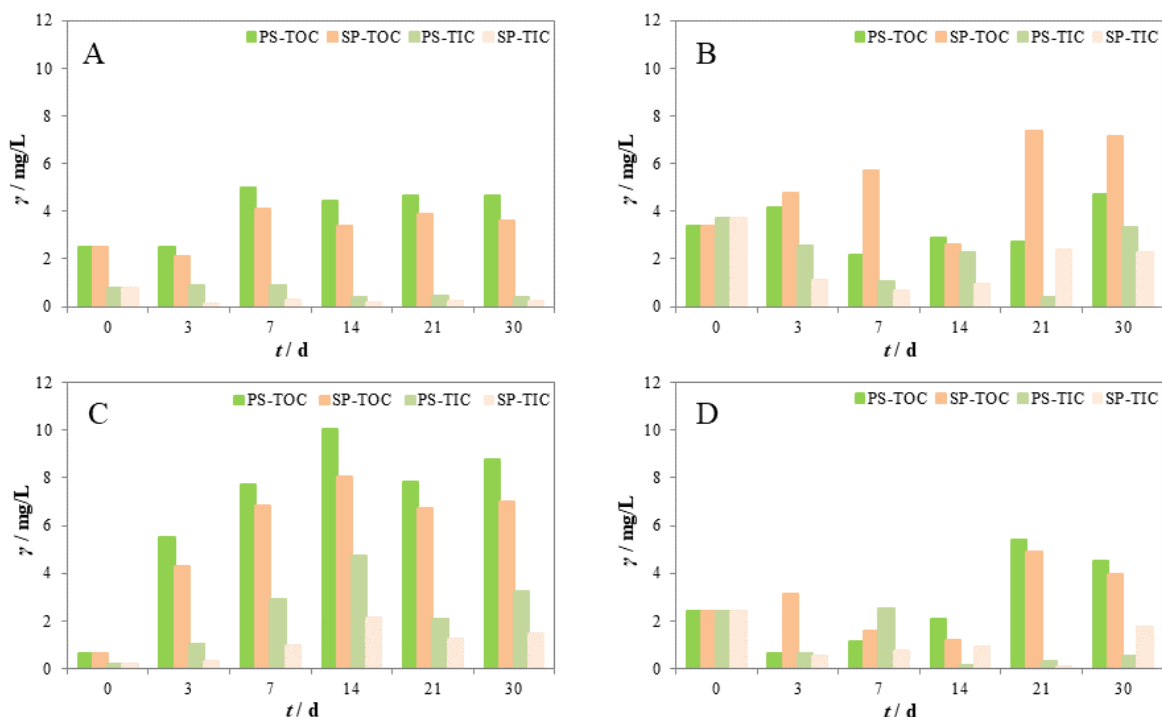
Na slikama 33 – 44 prikazani su rezultati glavnog pokusa (određivanje optimalnih uvjeta) biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterija *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Osim praćenja CFU vrijednosti tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje, za vodenu fazu određivane su i TC/TOC/TIC koncentracije, otpušteni aditivi s površine čestica MP-a primjenom LC/MS analize te ekotoksičnost vodene faze primjenom *Vibrio fischeri*. Navedeni su rezultati prikazani za one pokuse koji odgovaraju optimalnim uvjetima biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom bakterija *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Dakle, rezultati će biti objašnjeni s obzirom na pokuse biorazgradnje PS čestica: G1–8, G2–13, G3–13 i G4–10 redom primjenom *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Pokusi G11–13, G22–18, G33–10 i G44–18 bit će objašnjeni za slučaj biorazgradnje PVC čestica primjenom *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*.



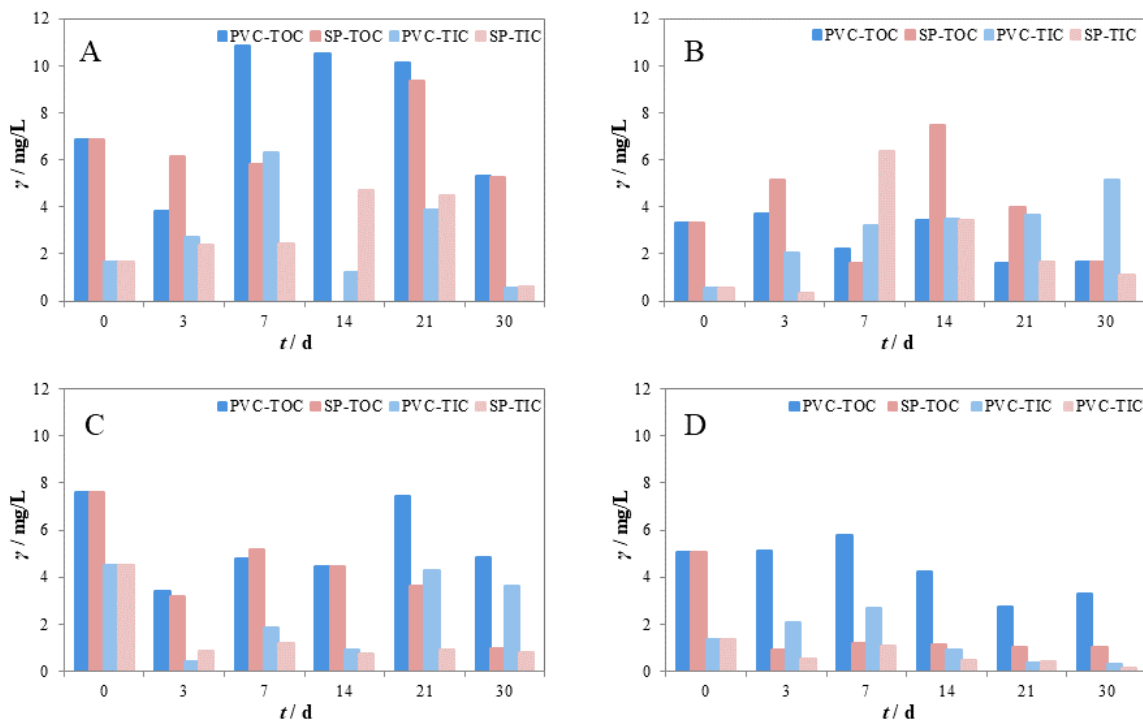
Slika 33. Promjene log CFU tijekom 30 dana biorazgradnje PS-a primjenom: *Bacillus cereus* u pokusu G1–8 (A), *Bacillus subtilis* u pokusu G2–13 (B), *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu G3–13 (C) i *Delftia acidovorans* u pokusu G4–10 (D).



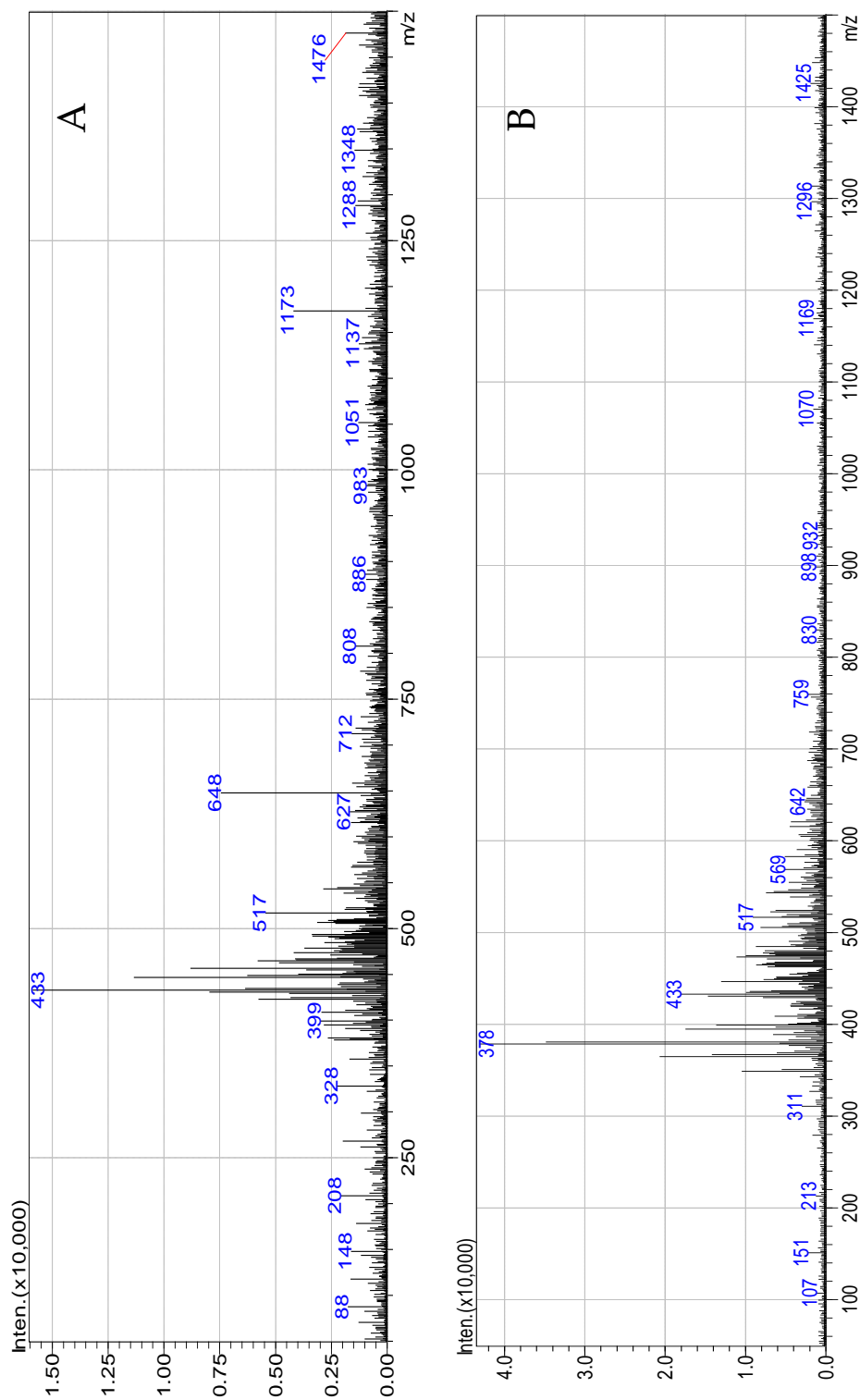
Slika 34. Promjene log CFU tijekom 30 dana biorazgradnje PVC-a primjenom: *Bacillus cereus* u pokusu G11–13 (A), *Bacillus subtilis* u pokusu G22–18 (B), *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu G33–10 (C) i *Delftia acidovorans* u pokusu G44–18 (D).



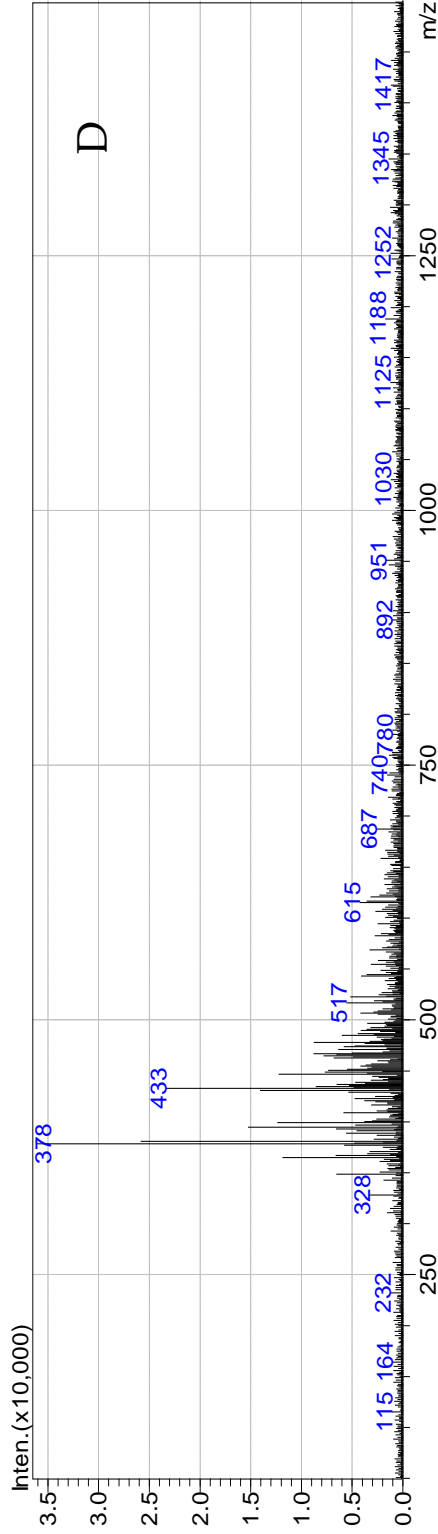
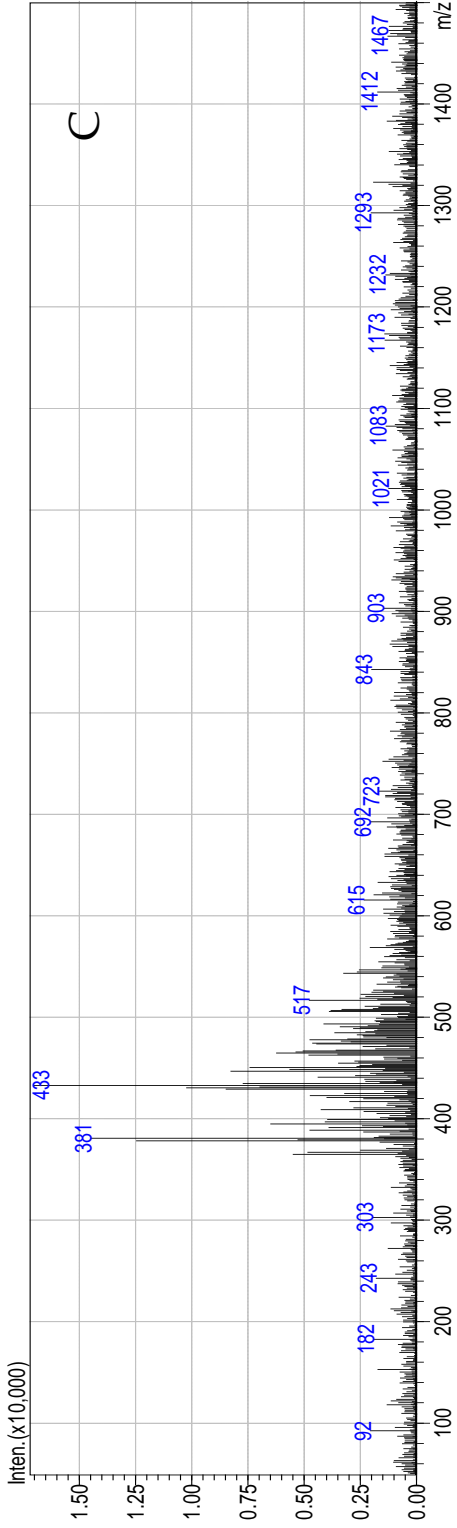
Slika 35. Promjene TOC i TIC vrijednosti (mg/L) za slijepu probu (SP) i uzorak (PS) tijekom 30 dana izlaganja: (A) *Bacillus cereus* (pokus G1–8), (B) *Bacillus subtilis* (pokus G2–13), (C) *Pseudomonas alcaligenes* (pokus G3–13) i (D) *Delftia acidovorans* (pokus G4–10).



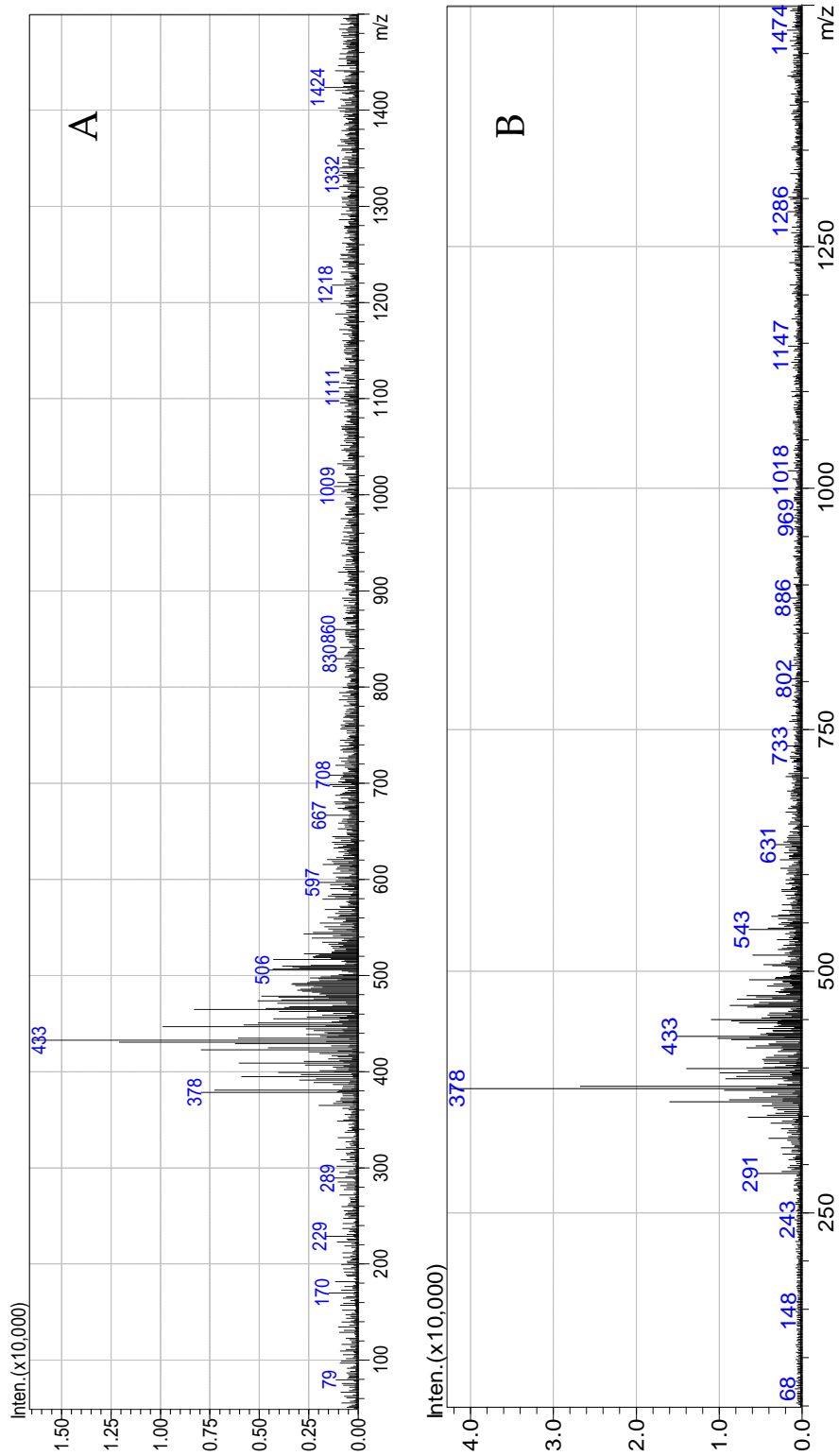
Slika 36. Promjene TOC i TIC vrijednosti (mg/L) za slijepu probu (SP) i uzorak (PVC) tijekom 30 dana izlaganja: (A) *Bacillus cereus* (pokus G11–13), (B) *Bacillus subtilis* (pokus G22–18), (C) *Pseudomonas alcaligenes* (pokus G33–10) i (D) *Delftia acidovorans* (pokus G44–18).



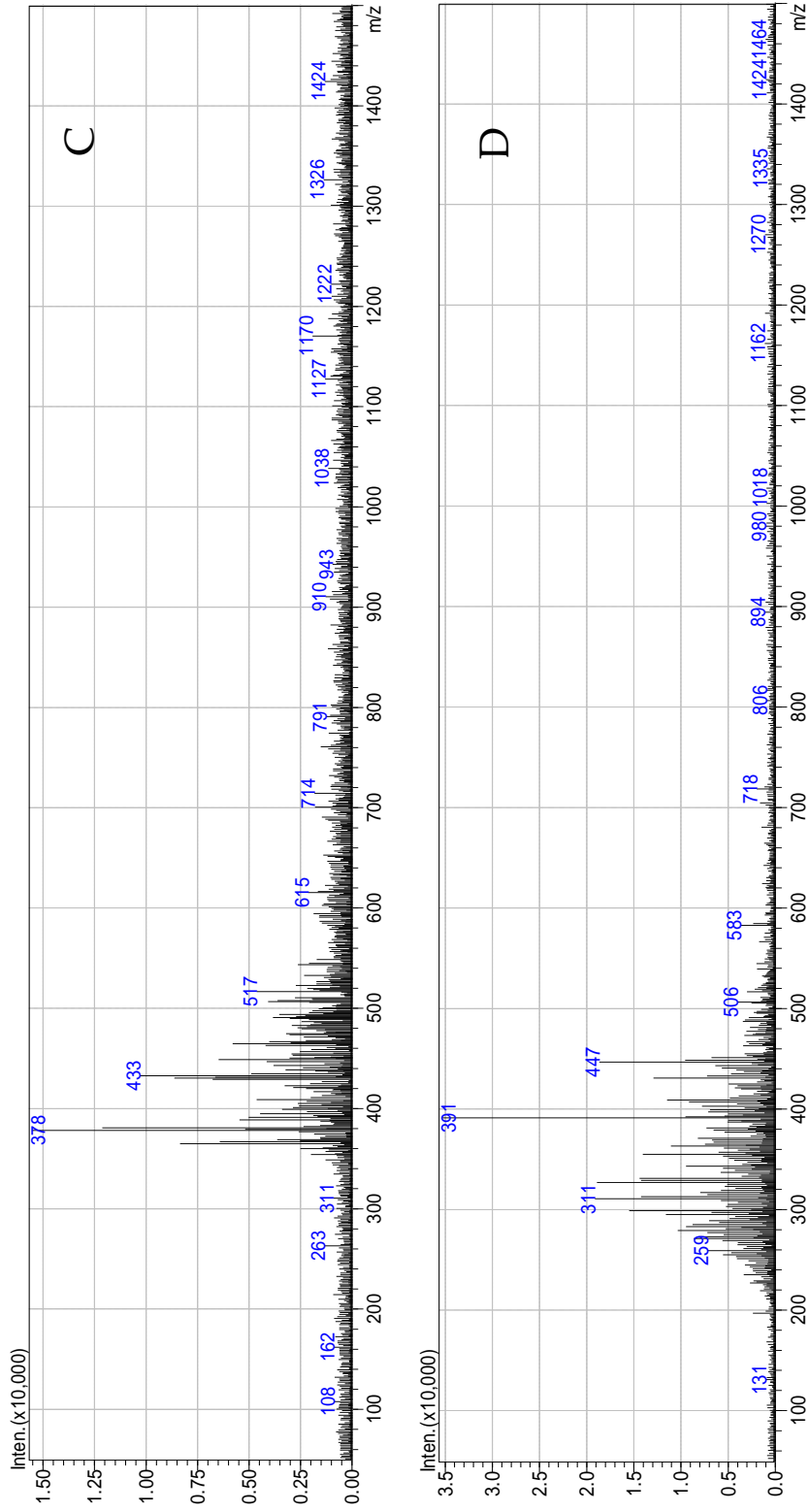
Slika 37. LC/MS analiza vodene faze za proces biorazgradnje **PS** primjenom (A) *Bacillus cereus* u pokusu G1–8 u 7. danu, (B) *Bacillus subtilis* u pokusu G2–13 u 3. danu, (C) *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu G3–13 u 14. danu i (D) *Delftia acidovorans* u pokusu G4–10 u 7. danu.



Slika 37. Nastavak



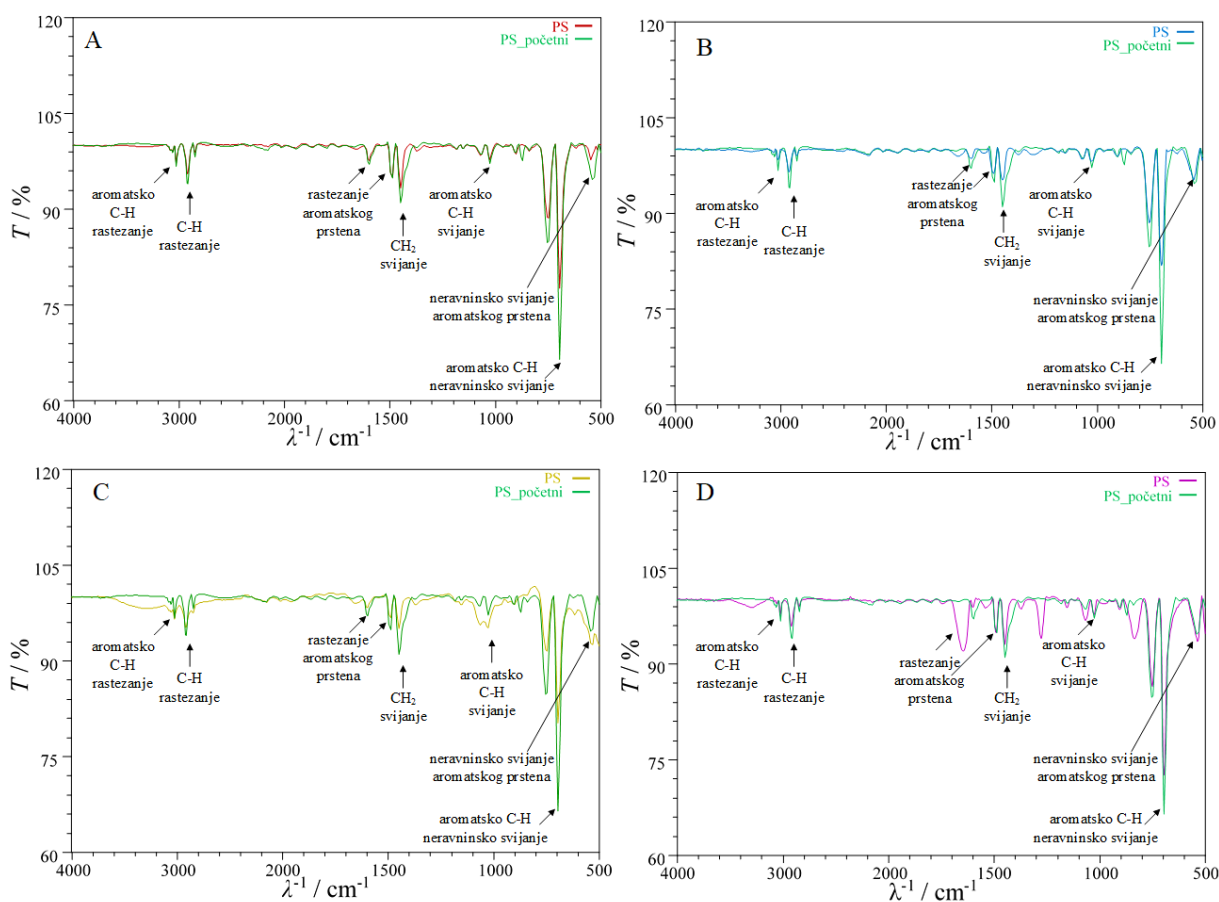
Slika 38. LC/MS analiza vodene faze za proces biorazgradnje PVC primjenom (A) *Bacillus cereus* u pokusu G11–13 u 7. danu, (B) *Bacillus subtilis* u pokusu G22–18 u 14. danu, (C) *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu G33–10 u 3. danu i (D) *Delftia acidovorans* u pokusu G44–18 u 3. danu.



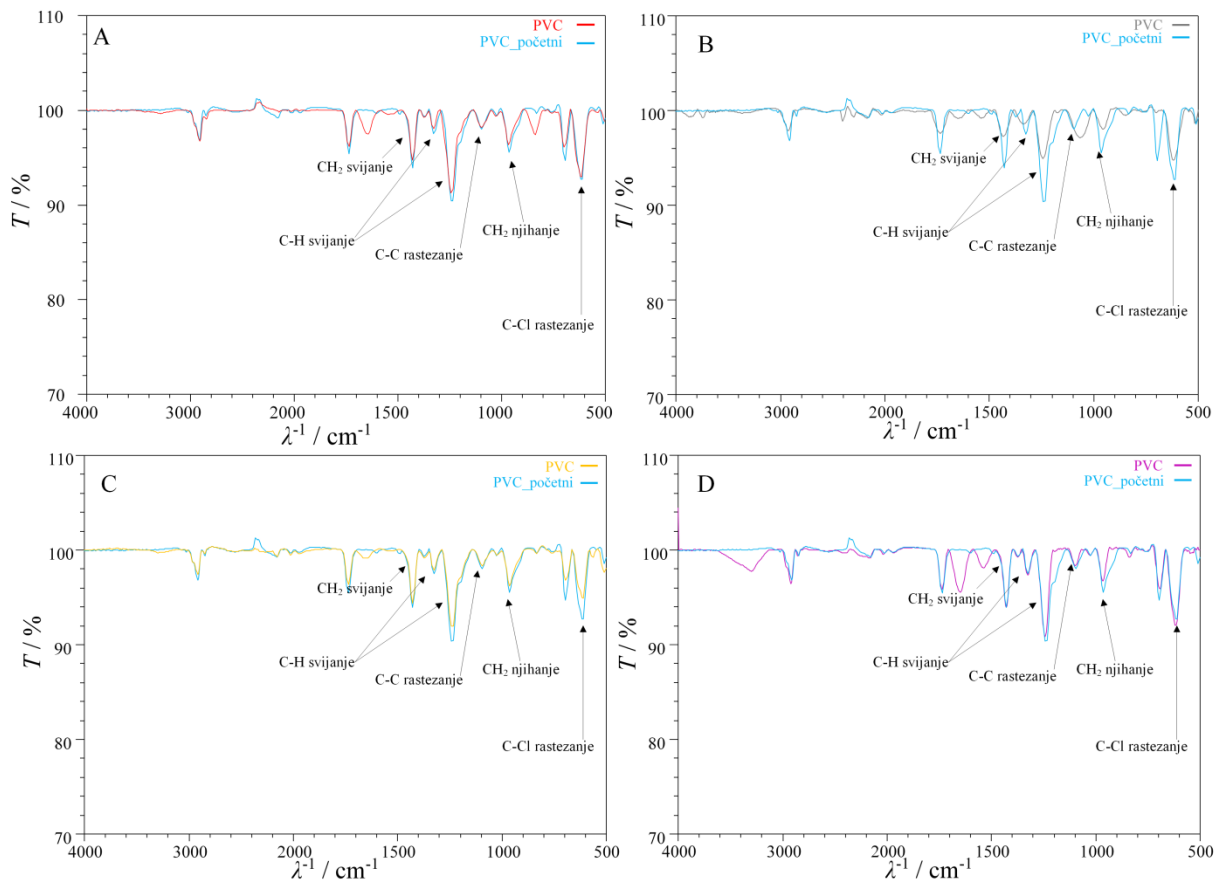
Slika 38. Nastavak

Tablica 24. Inhibicija (INH) i EC vrijednosti (EC₂₀ i EC₅₀) dobivene testovima toksičnosti pomoću *Vibrio fischeri* za vodenu fazu nakon provedbe pokusa biorazgradnje PS i PVC primjenom *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*.

Bakterija	Vrsta MP	Pokus #	INH / %	EC ₂₀ / %	EC ₅₀ / %
<i>Bacillus cereus</i>	PS	G1–8	36,60	13,37	/
	PVC	G11–13	47,15	19,93	/
<i>Bacillus subtilis</i>	PS	G2–13	38,66	8,17	/
	PVC	G22–18	53,54	/	16,28
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	PS	G3–13	46,79	27,40	/
	PVC	G33–10	46,75	32,83	/
<i>Delftia acidovorans</i>	PS	G4–10	35,20	51,20	/
	PVC	G44–18	36,22	18,17	/



Slika 39. FTIR-ATR spektroskopija PS čestica prije (PS_početni) i nakon (PS) biorazgradnje primjenom (A) *Bacillus cereus* u pokusu G1–8, (C) *Bacillus subtilis* u pokusu G2–13, (B) *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu G3–13 i (D) *Delftia acidovorans* u pokusu G4–10.

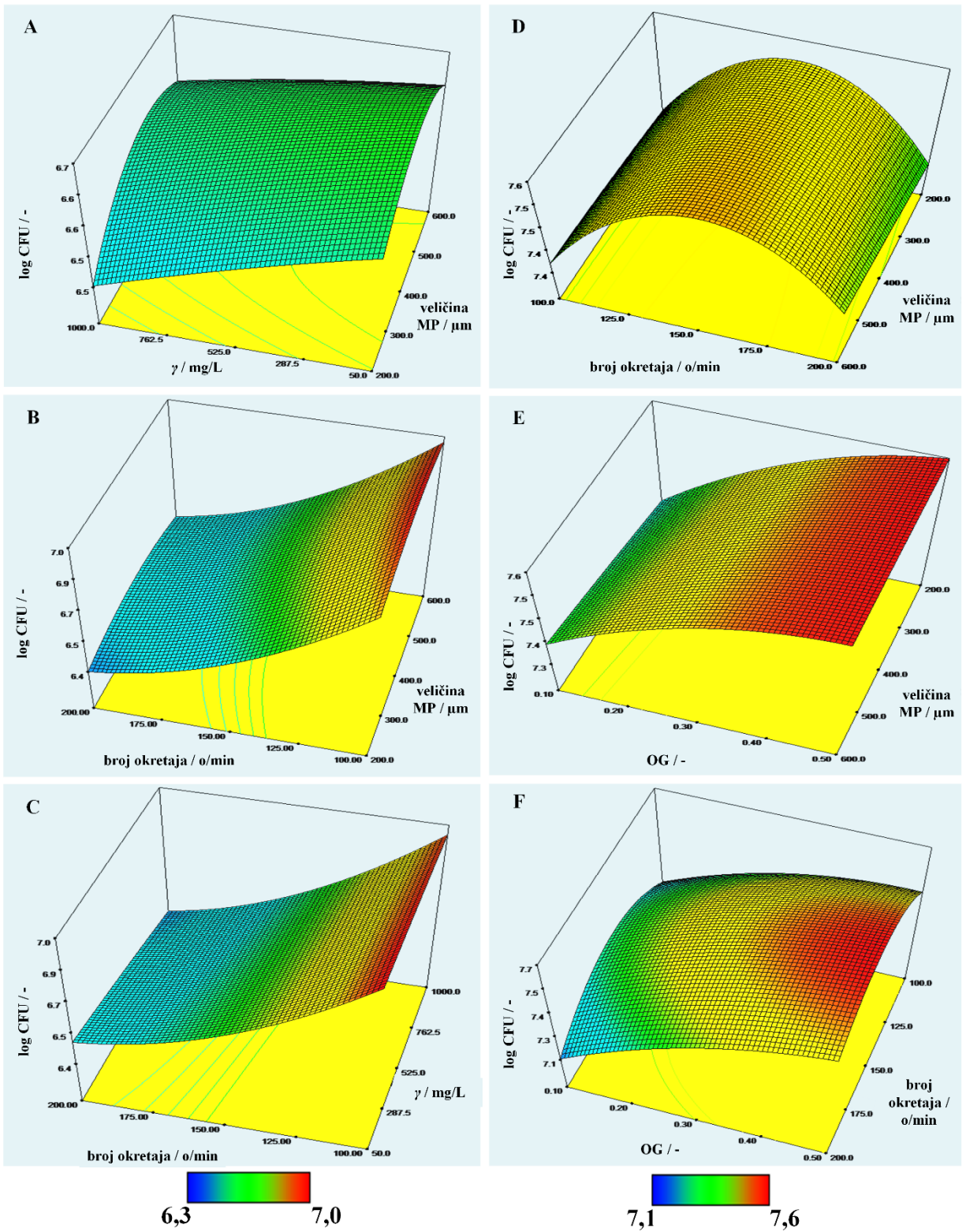


Slika 40. FTIR-ATR spektroskopija PVC čestica prije (PVC_početni) i nakon (PVC) biorazgradnje primjenom (A) *Bacillus cereus* u pokusu G11–13, (C) *Bacillus subtilis* u pokusu G22–18, (B) *Pseudomonas alcaligenes* u pokusu G33–10 i (D) *Delftia acidovorans* u pokusu G44–18.

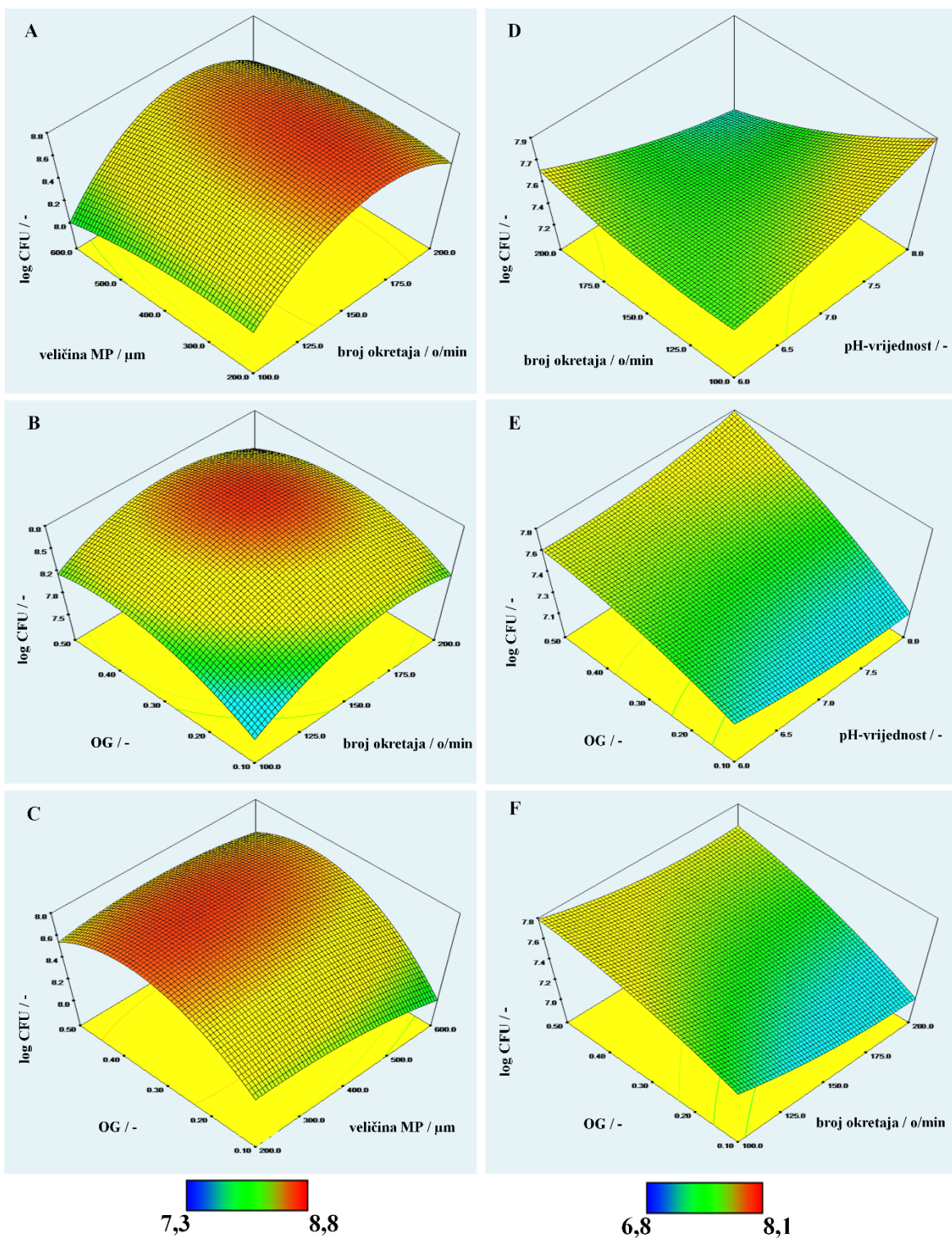
Nakon svih provedenih analiza, na temelju log CFU kao odzivnog parametra, dobiveni su optimalni uvjeti za pokuse biorazgradnje PS i PVC čestica primjenom *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Dobiveni optimalni uvjeti su dani u tablici 25. Na slikama 41 – 44 prikazane su odzivne površine dobivene matematičkim modeliranjem rezultata prema kvadratičnom modelu uz statističku analizu danu u tablicama 26 i 27.

Tablica 25. Optimalni uvjeti za biorazgradnju **PS** i **PVC** MP-a primjenom bakterija *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*.

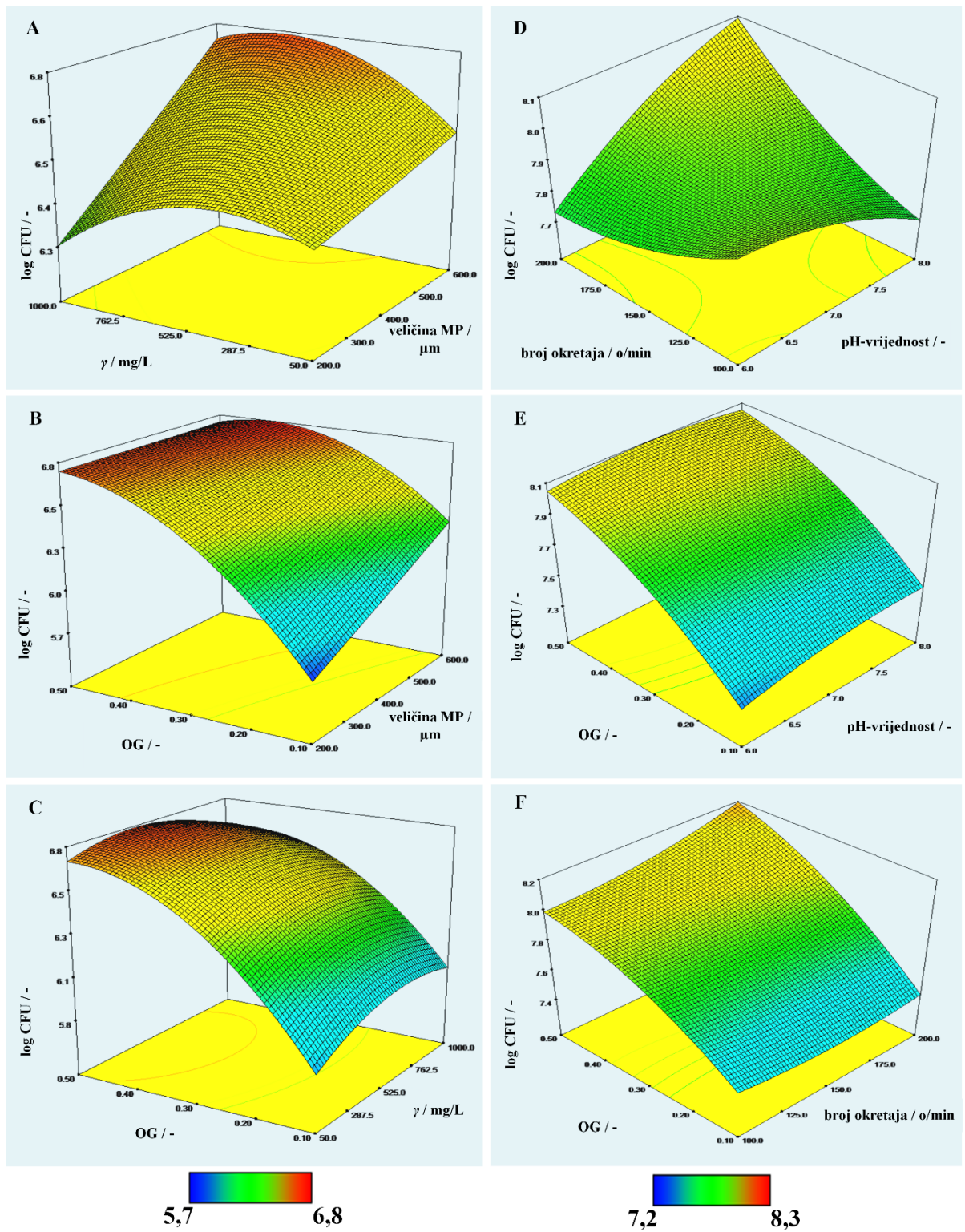
Bakterija	Vrsta MP	Čimbenik	Vrijednost
<i>Bacillus cereus</i>	PS	veličina MP	413,29 μm
		γ_{MP}	66,20 mg/L
		broj okretaja	100,45 o/min
	PVC	veličina MP	400,00 μm
		γ_{MP}	658,40 mg/L
		OG	0,40
<i>Bacillus subtilis</i>	PS	veličina MP	440,65 μm
		broj okretaja	162,12 o/min
		OG	0,50
	PVC	pH	8,00
		broj okretaja	200,00 o/min
		OG	0,50
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	PS	veličina MP	334,73 μm
		broj okretaja	161,08 o/min
		OG	0,35
	PVC	pH	8,00
		γ_{MP}	50,00 mg/L
		OG	0,50
<i>Delftia acidovorans</i>	PS	pH	7,99
		broj okretaja	104,93 o/min
		OG	0,46
	PVC	pH	8,00
		broj okretaja	200,00 o/min
		OG	0,50



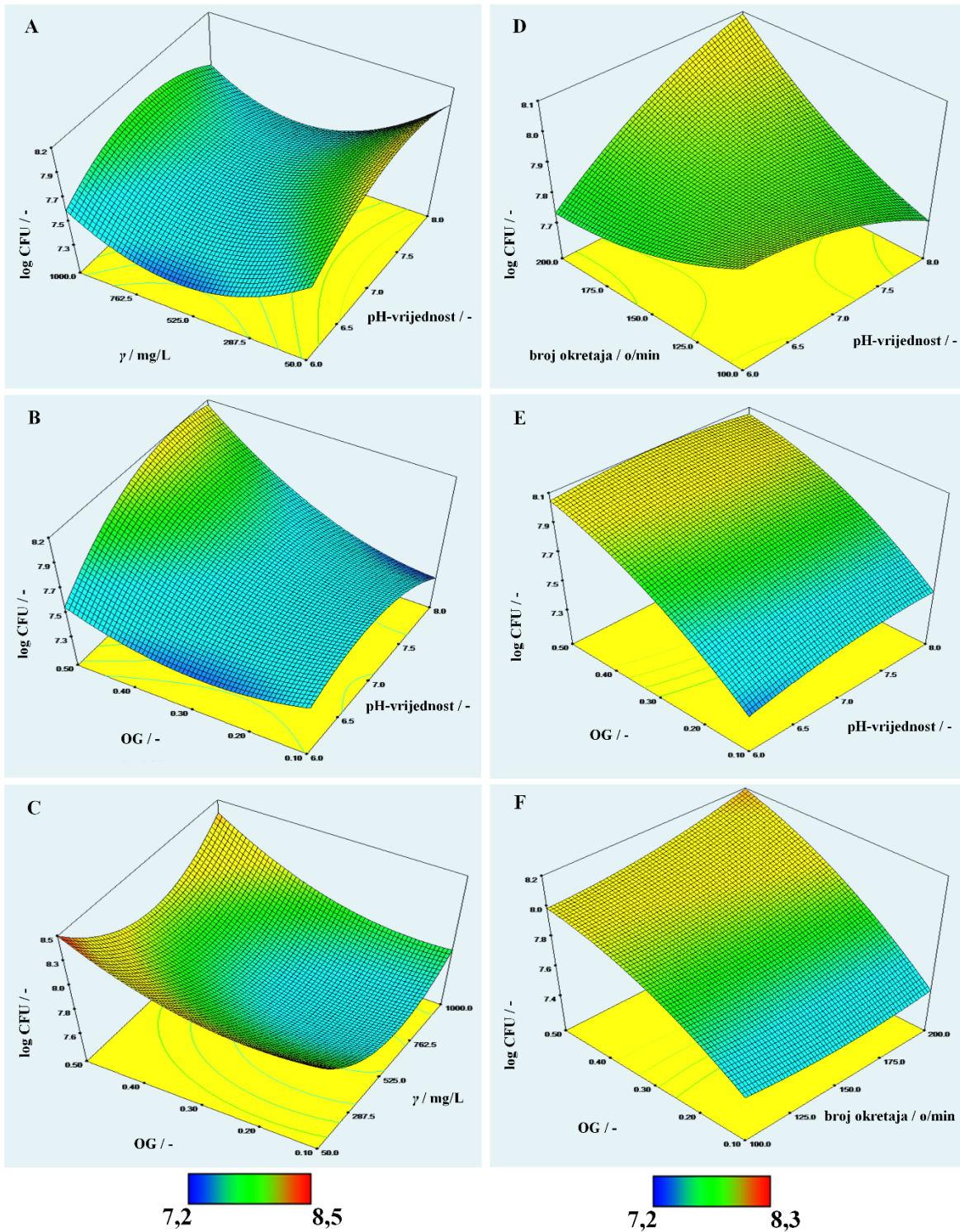
Slika 41. Odzivne površine dobivene na temelju rezultata glavnih eksperimenata biorazgradnje PS MP-a primjenom *Bacillus cereus* (A, B i C) i *Bacillus subtilis* (D, E i F).



Slika 42. Odzivne površine dobivene na temelju rezultata glavnih eksperimenata biorazgradnje PS MP-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes* (A, B i C) i *Delftia acidovorans* (D, E i F).



Slika 43. Odzivne površine dobivene na temelju rezultata glavnih eksperimenata biorazgradnje PVC MP-a primjenom *Bacillus cereus* (A, B i C) i *Bacillus subtilis* (D, E i F).



Slika 44. Odzivne površine dobivene na temelju rezultata glavnih eksperimenata biorazgradnje PVC MP-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes* (A, B i C) i *Delftia acidovorans* (D, E i F).

Tablica 26. Rezultati ANOVA analize za modele biorazgradnje PS MP-a dobivene na temelju rezultata glavnih eksperimenata.

Bakterija	Korišteni model	Statistička analiza				Značajni faktori modela	Značajni čimbenici		
		Model		Koeficijenti					
		R^2	R^2_{adj}	F	p			Vrijednost koeficijenta	p
<i>Bacillus cereus</i>	MODEL I	0,8616	0,8435	47,71	0,000	$a_0 = 7,55$	0,000	broj okretaja	
						$a_1 = 1,34 \cdot 10^{-4}$	0,304		
						$a_2 = -9,02 \cdot 10^{-5}$	0,107		
						$a_3 = -6,03 \cdot 10^{-3}$	0,000		X_3
	MODEL II	0,9108	0,8636	19,29	0,000	$a_0 = 8,16$	0,000	broj okretaja	
						$a_1 = 1,30 \cdot 10^{-3}$	0,271		
						$a_2 = -1,57 \cdot 10^{-5}$	0,091		
						$a_3 = -0,02$	0,000		X_3
						$a_4 = 1,87 \cdot 10^{-7}$	0,550		
						$a_5 = -1,02 \cdot 10^{-6}$	0,732		
						$a_6 = -8,38 \cdot 10^{-7}$	0,504		
						$a_7 = -1,38 \cdot 10^{-6}$	0,198		
						$a_8 = -2,23 \cdot 10^{-8}$	0,905		
						$a_9 = 4,25 \cdot 10^{-5}$	0,020		X_3^2
<i>Bacillus subtilis</i>	MODEL I	0,6728	0,6301	15,76	0,000	$a_0 = 7,08$	0,000	OG	
						$a_1 = 9,28 \cdot 10^{-5}$	0,444		
						$a_2 = 2,05 \cdot 10^{-4}$	0,671		
						$a_3 = 0,81$	0,000		X_3
	MODEL II	0,9503	0,9240	36,14	0,000	$a_0 = 5,82$	0,000	broj okretaja i OG	
						$a_1 = 1,69 \cdot 10^{-4}$	0,104		
						$a_2 = 0,02$	0,356		
						$a_3 = 1,50$	0,000		X_3
						$a_4 = 9,63 \cdot 10^{-7}$	0,477		
						$a_5 = -5,63 \cdot 10^{-4}$	0,107		
$a_6 = 3,78 \cdot 10^{-3}$	0,011	$X_2 \cdot X_3$							
$a_7 = -6,47 \cdot 10^{-8}$	0,892								
$a_8 = -6,26 \cdot 10^{-5}$	0,000	X_2^2							
$a_9 = -1,72$	0,002	X_3^2							
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	MODEL I	0,4287	0,3542	5,75	0,004	$a_0 = 7,44$	0,000	broj okretaja i OG	
						$a_1 = 3,87 \cdot 10^{-3}$	0,011		X_1
						$a_2 = -3,67 \cdot 10^{-4}$	0,304		
						$a_3 = 1,10$	0,008		X_3
	MODEL II	0,9076	0,8587	18,55	0,000	$a_0 = 3,49$	0,000	broj okretaja, veličina MP i OG	
						$a_1 = 4,98 \cdot 10^{-2}$	0,000		X_1
						$a_2 = 4,37 \cdot 10^{-4}$	0,038		X_2
						$a_3 = 6,93$	0,000		X_3
						$a_4 = 2,25 \cdot 10^{-6}$	0,581		
						$a_5 = -1,04 \cdot 10^{-2}$	0,018		$X_1 \cdot X_3$
						$a_6 = 1,60 \cdot 10^{-3}$	0,127		
						$a_7 = -1,46 \cdot 10^{-4}$	0,000		X_1^2
						$a_8 = -2,03 \cdot 10^{-6}$	0,169		
						$a_9 = -8,32$	0,000		X_3^2

Tablica 26. Nastavak

Bakterija	Korišteni model	Statistička analiza					Značajni faktori modela	Značajni čimbenici	
		Model				Koeficijenti			
		R^2	R^2_{adj}	F	p	Vrijednost koeficijenta			p
<i>Delftia acidovorans</i>	MODEL I	0,6362	0,5887	13,41	0,000	$a_0 = 7,52$	0,000	broj okretaja i OG	
						$a_1 = -6,11 \cdot 10^{-3}$	0,892		
						$a_2 = -2,43 \cdot 10^{-3}$	0,012		X_2
						$a_3 = 1,27$	0,000		X_3
	MODEL II	0,9548	0,9309	39,93	0,000	$a_0 = 6,81$	0,000	pH, broj okretaja i OG	
						$a_1 = -0,16$	0,741		
						$a_2 = 0,02$	0,000		X_2
						$a_3 = -1,10$	0,000		X_3
						$a_4 = -4,30 \cdot 10^{-3}$	0,000		$X_1 \cdot X_2$
						$a_5 = 0,40$	0,003		$X_1 \cdot X_3$
						$a_6 = 3,83 \cdot 10^{-3}$	0,104		
						$a_7 = 0,05$	0,144		
						$a_8 = 2,73 \cdot 10^{-5}$	0,045		X_2^2
						$a_9 = -1,63$	0,055		

Tablica 27. Rezultati ANOVA analize za modele biorazgradnje PVC MP-a dobivene na temelju rezultata glavnih eksperimenata.

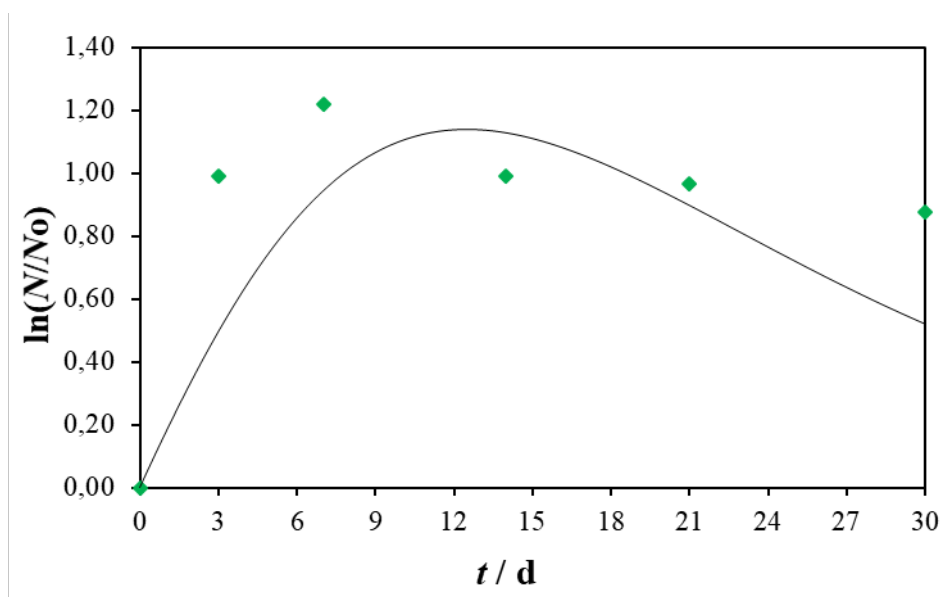
Bakterija	Korišteni model	Statistička analiza					Značajni faktori modela	Značajni čimbenici	
		Model				Koeficijenti			
		R^2	R^2_{adj}	F	p	Vrijednost koeficijenta			p
<i>Bacillus cereus</i>	MODEL I	0,7812	0,7526	27,37	0,000	$a_0 = 4,97$	0,000	veličina MP i OG	
						$a_1 = 5,95 \cdot 10^{-4}$	0,014		X_1
						$a_2 = 2,71 \cdot 10^{-5}$	0,793		
						$a_3 = 7,67 \cdot 10^{-3}$	0,000		X_3
	MODEL II	0,9514	0,9257	36,97	0,000	$a_0 = 2,26$	0,000	X_1	
						$a_1 = 2,21 \cdot 10^{-3}$	0,000		
						$a_2 = 5,71 \cdot 10^{-4}$	0,666		
						$a_3 = 0,04$	0,000	X_3	
						$a_4 = 8,32 \cdot 10^{-7}$	0,031	$X_1 \cdot X_2$	
						$a_5 = -1,35 \cdot 10^{-5}$	0,001	$X_1 \cdot X_3$	
	$a_6 = -2,46 \cdot 10^{-6}$	0,108							
	$a_7 = 7,67 \cdot 10^{-8}$	0,944							
	$a_8 = -4,85 \cdot 10^{-7}$	0,025	X_2^2						
	$a_9 = -8,77 \cdot 10^{-5}$	0,000	X_3^2						

Tablica 27. Nastavak

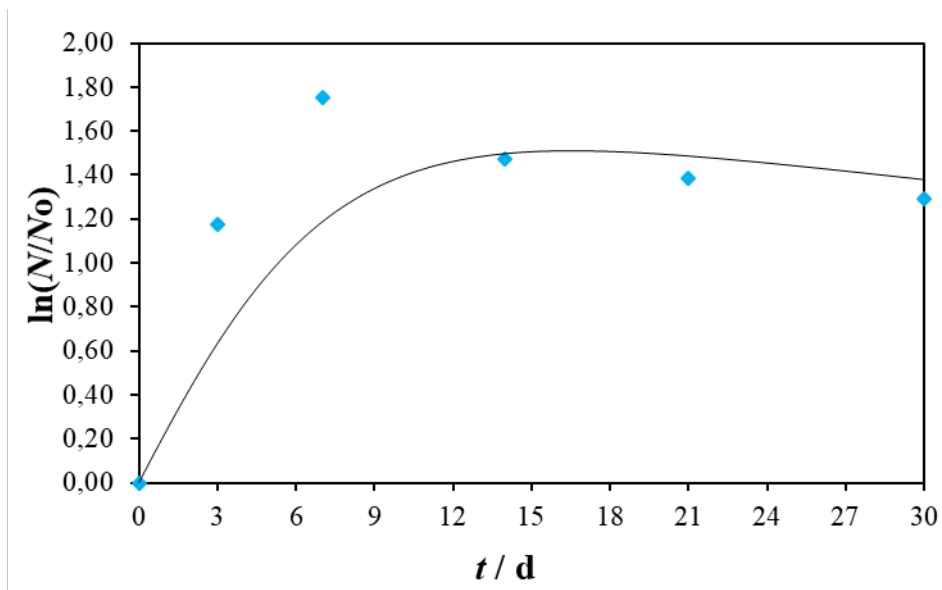
Bakterija	Korišteni model	Statistička analiza				Značajni faktori modela	Značajni čimbenici		
		Model		Koefficienti					
		R^2	R^2_{adj}	F	p			Vrijednost koefficienta	p
<i>Bacillus subtilis</i>	MODEL I	0,8219	0,7987	35,38	0,000	$a_0 = 6,97$	0,000	OG	
						$a_1 = 0,03$	0,329		
						$a_2 = 8,60 \cdot 10^{-4}$	0,181		
						$a_3 = 1,58$	0,000		X_3
	MODEL II	0,9571	0,9343	42,11	0,000	$a_0 = 7,79$	0,000	pH, broj okretaja i OG	
						$a_1 = 0,26$	0,099		
						$a_2 = -0,02$	0,027		X_2
						$a_3 = 3,20$	0,000		X_3
						$a_4 = 2,51 \cdot 10^{-3}$	0,000		$X_1 \cdot X_2$
						$a_5 = -0,14$	0,202		
						$a_6 = 5,27 \cdot 10^{-3}$	0,027		$X_2 \cdot X_3$
						$a_7 = -0,04$	0,207		
						$a_8 = 1,64 \cdot 10^{-5}$	0,202		
						$a_9 = -2,32$	0,008		X_3^2
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	MODEL I	0,3747	0,2932	4,60	0,000	$a_0 = 7,10$	0,000	OG	
						$a_1 = 0,07$	0,320		
						$a_2 = -2,02 \cdot 10^{-4}$	0,192		
						$a_3 = 1,19$	0,003		X_3
	MODEL II	0,9591	0,9375	44,31	0,000	$a_0 = -2,26$	0,000	pH, γ_{MP} i OG	
						$a_1 = 3,20$	0,001		X_1
						$a_2 = -1,62 \cdot 10^{-3}$	0,000		X_2
						$a_3 = -8,63$	0,000		X_3
						$a_4 = -7,84 \cdot 10^{-5}$	0,201		
						$a_5 = 0,96$	0,000		$X_1 \cdot X_3$
						$a_6 = 5,53 \cdot 10^{-4}$	0,065		
						$a_7 = -0,24$	0,000		X_1^2
						$a_8 = 1,69 \cdot 10^{-6}$	0,000		X_2^2
						$a_9 = 4,66$	0,000		X_3^2
<i>Delftia acidovorans</i>	MODEL I	0,8219	0,7987	35,38	0,000	$a_0 = 6,97$	0,000	OG	
						$a_1 = 0,03$	0,329		
						$a_2 = 8,60 \cdot 10^{-4}$	0,181		
						$a_3 = 1,58$	0,000		X_3
	MODEL II	0,9571	0,9343	42,11	0,000	$a_0 = 7,78$	0,000	pH, broj okretaja i OG	
						$a_1 = 0,26$	0,099		
						$a_2 = -0,02$	0,027		X_2
						$a_3 = 3,20$	0,000		X_3
						$a_4 = 2,52 \cdot 10^{-3}$	0,000		$X_1 \cdot X_2$
						$a_5 = -0,14$	0,202		$X_1 \cdot X_3$
						$a_6 = 5,27 \cdot 10^{-3}$	0,027		
						$a_7 = -0,04$	0,207		
						$a_8 = 1,63 \cdot 10^{-5}$	0,202		
						$a_9 = -2,32$	0,008		X_3^2

4.3.2 Modeliranje bakterijskoga rasta pomoću Gompertz modela

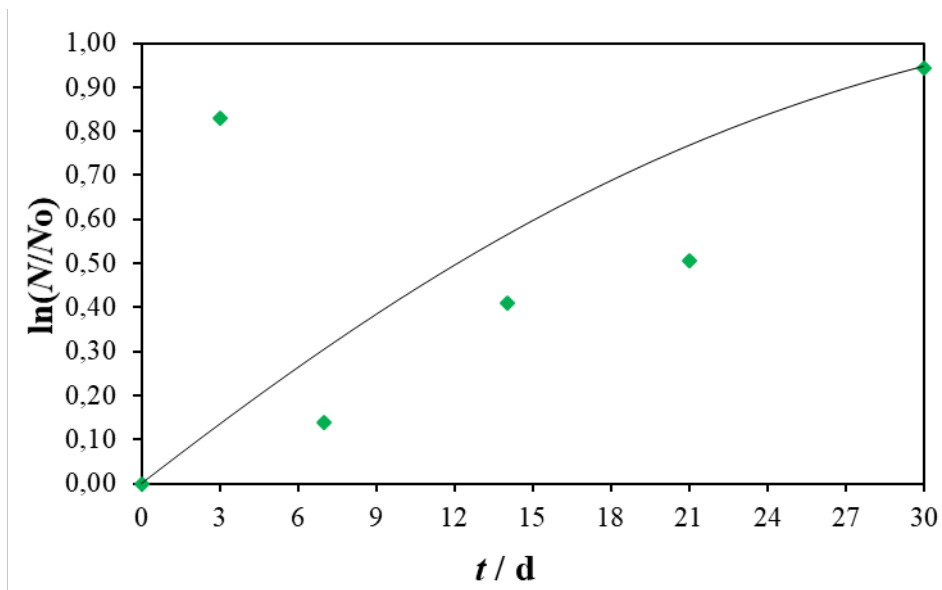
Modeliran je rast bakterija *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* korištenih za biorazgradnju PS i PVC čestica. Na slikama 45 – 52 prikazani su modeli bakterijskog rasta *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* prema Gompertz modelu. Rast svake bakterije je prikazan promjenom log CFU vrijednosti u odnosu na 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PS i PVC mikročestica (slike 33 i 34). Upravo ti su podaci korišteni za modeliranje rasta svih četiriju bakterija. U tablici 28 dane su vrijednosti parametara Gompertz modela korištenoga za modeliranje bakterijskoga rasta.



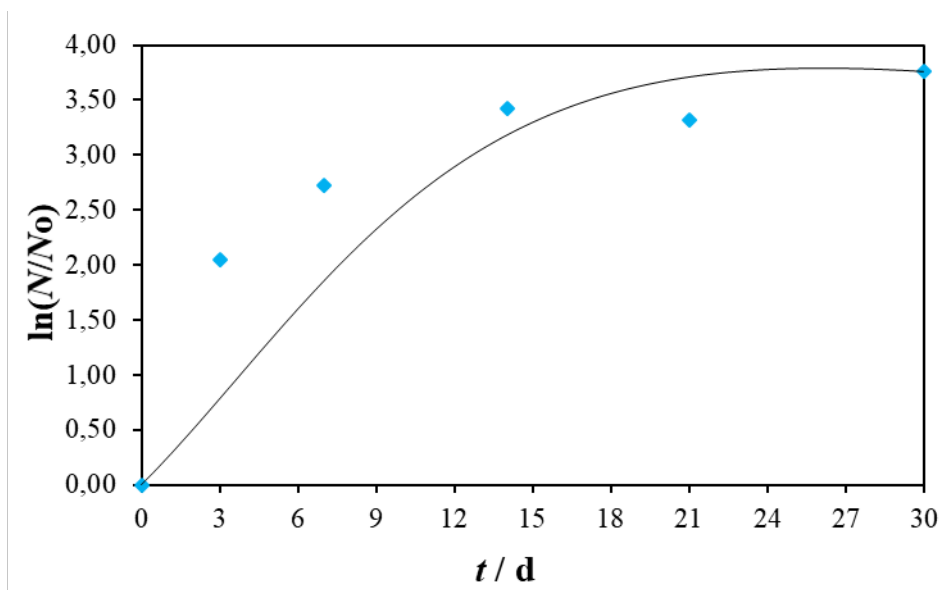
Slika 45. Promjena logaritamskog broja živih stanica *Bacillus cereus* tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PS-a. Usporedba rezultata pokusa (rombovi) i modela (linija).



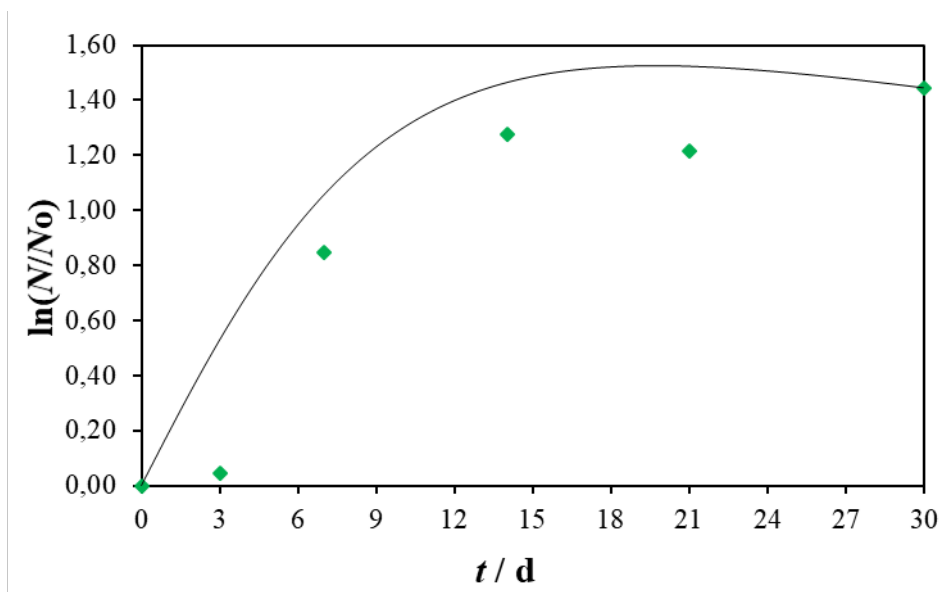
Slika 46. Promjena logaritamskog broja živih stanica *Bacillus cereus* tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PVC-a. Usporedba rezultata pokusa (rombovi) i modela (linija).



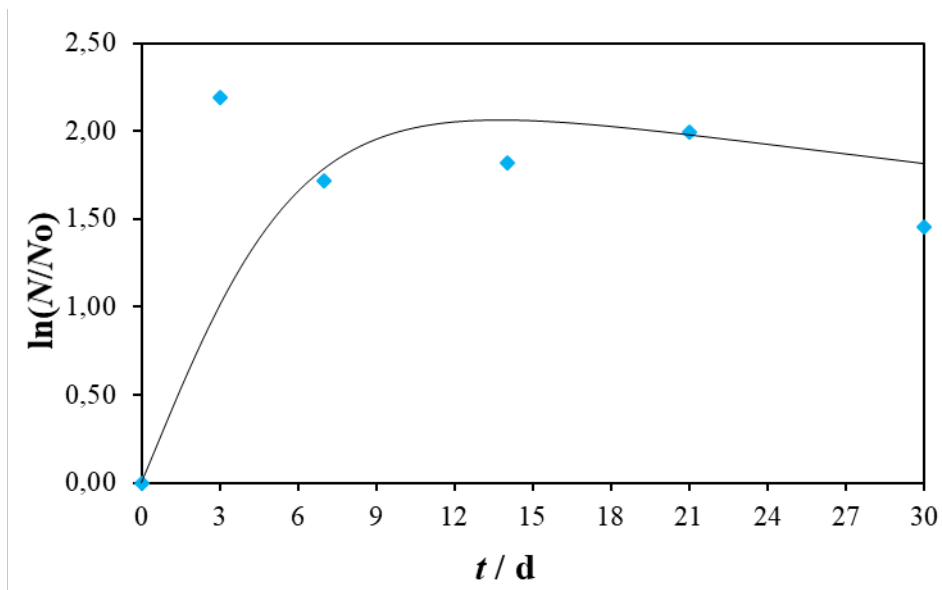
Slika 47. Promjena logaritamskog broja živih stanica *Bacillus subtilis* tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PS-a. Usporedba rezultata pokusa (rombovi) i modela (linija).



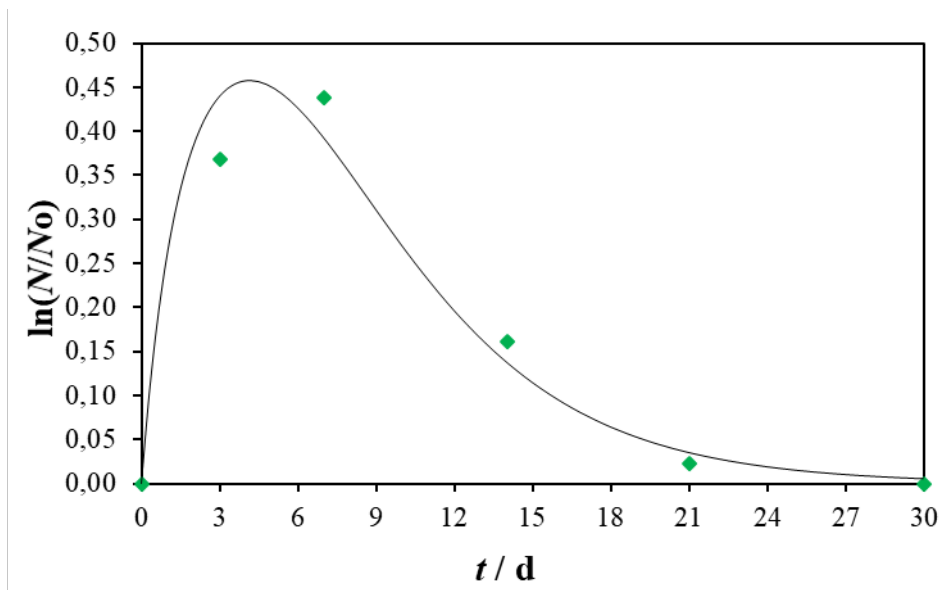
Slika 48. Promjena logaritamskog broja živih stanica *Bacillus subtilis* tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PVC-a. Usporedba rezultata pokusa (rombovi) i modela (linija).



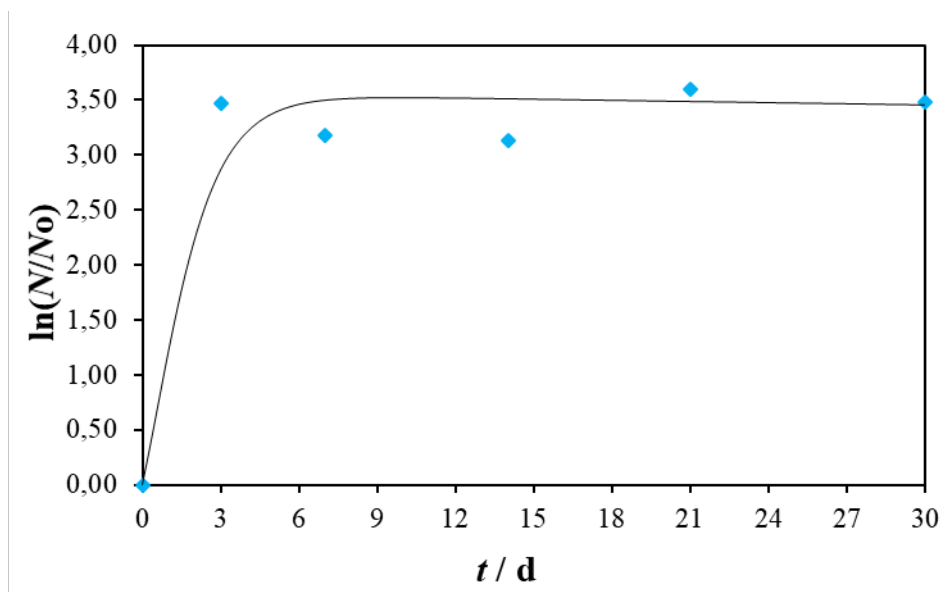
Slika 49. Promjena logaritamskog broja živih stanica *Pseudomonas alcaligenes* tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PS-a. Usporedba rezultata pokusa (rombovi) i modela (linija).



Slika 50. Promjena logaritamskog broja živih stanica *Pseudomonas alcaligenes* tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PVC-a. Usporedba rezultata pokusa (rombovi) i modela (linija).



Slika 51. Promjena logaritamskog broja živih stanica *Delftia acidovorans* tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PS-a. Usporedba rezultata pokusa (rombovi) i modela (linija).



Slika 52. Promjena logaritamskog broja živih stanica *Delftia acidovorans* tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PVC-a. Usporedba rezultata pokusa (rombovi) i modela (linija).

Tablica 28. Parametri Gompertz modela za bakterijski rast nakon izlaganja MP-u.

Bakterija	MP	$\mu_{\max} / \text{d}^{-1}$	$b / -$	c / d^{-1}	k_d / d^{-1}	F -vrijednost / -
<i>Bacillus cereus</i>	PS	0,5760	0,3500	0,1280	0,1000	0,91
	PVC	0,1439	0,0155	0,2235	0,0100	0,96
<i>Bacillus subtilis</i>	PS	0,1313	0,0050	0,0455	0,0100	0,99
	PVC	0,3705	0,5599	0,1351	0,0100	0,85
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	PS	0,2000	0,0390	0,1775	0,0100	0,94
	PVC	0,1610	0,1889	0,2925	0,0100	0,97
<i>Delftia acidovorans</i>	PS	0,1730	0,5956	0,2096	1,0000	0,96
	PVC	0,6719	0,4160	0,7430	0,0010	0,99

5 RASPRAVA

Sve veće nakupljanje plastičnog otpada jedan je od glavnih ekoloških izazova s kojima se moderna društva trenutno suočavaju. Sintetička plastika se smatra materijalom od najveće važnosti u svim suvremenim društvima. Tome u prilog idu njezina izvanredna svojstva koja se razvijaju kroz vrijeme, kao što su niska cijena, stabilnost i otpornost. Zbog svojih karakteristika, plastika čini nezamjenjiv dio u svakom aspektu svakodnevnog života. Međutim, upravo ta svojstva čine većinu plastike otpornom za biorazgradnju, što rezultira nakupljanjem plastike u okolišu, a ne razgradnjom, na odlagalištima otpada i ekosustavima kao što su oceani i obale [44]. To zahtijeva hitnu potrebu za razvojem novih strategija za učinkovitu razgradnju plastike. Mikroorganizmi posjeduju potencijal razgradnje plastičnih materijala, koji se dalje mogu pretvoriti u upotrebljive proizvode i imati dobrobit za ekosustav [361]. Tijekom razgradnje polimera, mikroorganizmi prvo prijanjaju na površinu polimera, čime se izlažu mikrobnoj kolonizaciji. Nakon kolonizacije polimera slijedi lučenje izvanstaničnih enzima, koji se vežu na polimer i uzrokuju hidrolitičko cijepanje. Polimer se zatim razgrađuje na monomere, koje mikroorganizmi koriste kao izvor energije, što dovodi do mineralizacije do ugljikovog dioksida (CO_2) i vode (H_2O). MP čestice u organizmu prolaze kroz staničnu membranu, gdje se unutar stanica organizma razgrađuju staničnim enzimima [34]. Međutim, trenutno znanje o mehanizmima i učinkovitosti biorazgradnje sintetičke plastike i dalje se čini ograničenim [44]. U morskom okolišu potencijalni mikroorganizmi koji se nalaze u izobilju pokazali su sposobnost razgradnje složene organske tvari i plastičnog otpada. Stoga se postavlja pitanje je li biološka razgradnja PS-a i PVC-a nakupljenih u oceanu moguća i može li se suprotstaviti postojanom nakupljanju plastike u morskom okolišu. Provedene su ograničene studije o biorazgradnji polimera korištenjem morskih bakterija (*Bacillus* sp., *Kocuria* sp., *Achromobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp.) [361]. Korištenje mikroorganizama za razgradnju MP-a poboljšat će biorazgradnju bez nanošenja štete okolišu. Stoga je prepoznavanje mikroorganizama koji mogu biorazgraditi MP obećavajuća i ekološki sigurna strategija za olakšavanje prirodne bioremedijacije i utjecaja na obnovu prirodnih ekosustava bez nametanja štetnih utjecaja [34, 362]. Uglavnom se pri PS i PVC formulacijama koriste različiti plastifikatori, aditivi i modifikatori za oblikovanje potrebnih fizičkih svojstava krajnjih proizvoda, kao što su poboljšana fleksibilnost, elastičnost, otpornost na udarce, sprečavanje rasta mikroba i brojni

drugi. Potencijalna šteta koju MP nanosi ekosustavima varira od izravnih učinaka na vodene organizme (gutanja, gušenja i/ili bioakumulacije) pa do sposobnosti MP-a da sorbira različite onečišćujuće tvari u okolišu (npr. teški metali, postojani organski spojevi ili farmaceutici). Stoga je ekotoksikološka procjena kombiniranih učinaka MP-a i sorbiranih onečišćujućih tvari koje mogu proizvesti u bioti, jedna od gorućih tema u području toksikologije okoliša [317].

U ovom radu ispitala se biorazgradnja PS-a i PVC-a primjenom bakterijskih kultura *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* pri uvjetima prikazanim u tablicama 15 i 16. Prije provedbe pokusa biorazgradnje provedeni su testovi toksičnosti za MP čestice primjenom četiri testna organizma. Prema rezultatima ekotoksičnosti, izabrane su dvije vrste MP za pokuse biorazgradnje. Ispitivanje biorazgradnje bilo je podijeljeno na preliminarne pokuse (*screening*) te glavne pokuse biorazgradnje. Preliminarni pokusi biorazgradnje osmišljeni su prema Taguchi dizajnu, a glavni pokusi prema punom faktorskom planu. Na temelju preliminarnih pokusa određeni su značajni čimbenici za biorazgradnju PS i PVC MP-a, dok su se glavnim pokusima odredili optimalni uvjeti biorazgradnje primjenom bakterija *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*.

5.1 Testovi toksičnosti za mikroplastiku primjenom mikroalgi, bakterije i kvasca

Oblik MP čestica utječe na njihovu distribuciju i bioraspoloživost u okolišu [363]. Sukladno tome, oblik MP čestica može utjecati na njihovu interakciju s mikroalgama [207,364]. Prema D'Mellu [365] MP čestice nepravilnih oblika mnogo su češće u okolišu nego pravilne. Stoga su u ovome radu korištene MP čestice nepravilnog oblika kako bi se postigla što vjernija simulacija stvarnih okolišnih uvjeta. Takve čestice dobivene su usitnjavanjem plastike u kriomlinu, a oblik čestica je prikazan na slici 21.

Testovi toksičnosti mikroplastike primjenom mikroalge Chlorella sp.

Slika 27 prikazuje površine eksperimentalno dobivenih inhibicija unutar eksperimentalne domene. Podaci između eksperimentalno određenih točaka dobiveni su kubičnom interpolacijom u softveru MATLAB. Nadalje, razvijena su tri matematička modela (RSM modeli; prema jednadžbama (4) – (6)) za svaku od ispitivanih MP-a kako bi se definirao utjecaj ispitivanih parametara: veličine MP čestica i njihove koncentracije. To je rezultiralo s ukupno 15 RSM modela. Modeli su statistički analizirani, a rezultati prikazani u tablici 17. Analiza je provedena

uz značajnost od 0,05, što znači da je pouzdanost analize iznosila 95 %. Za sve primijenjene modele utvrđeno je da su statistički značajni (visoke F -vrijednosti uz $p < 0,05$).

Slika 27A ukazuje na povećanje inhibicije s povećanjem koncentracije PE MP-a. Tako je maksimalna vrijednost inhibicije od 3,85 % određena pri najvišoj primijenjenoj koncentraciji (1000 mg/L) i za čestice od 400 μm . Unatoč činjenici da je utvrđena vrijednost inhibicije za čestice od 200 μm pri 1000 mg/L bila nešto niža (3,84 %), opći je dojam da u području visokih koncentracija smanjenje veličine MP-a nepovoljno utječe na rast *Chlorella* sp. Međutim, kod nižih koncentracija PE, smanjenje veličine čestica rezultiralo je neočekivanim korisnim učinkom, tj. stimulacijom rasta. To je posebno vidljivo pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji PE (10 mg/L). Za to treba spomenuti da su eksperimenti vezani uz 10 mg/L i 200 μm PE rezultirali vrlo niskim inhibicijama, a za neka mjerenja uočena je hormeza. Pretpostavlja se da je takvo ponašanje povezano s jednostavnošću PE strukture. Naime, PE ima najjednostavniju strukturu od svih pet proučavanih tipova MP, koja se sastoji samo od $-\text{CH}_2-$ monomernih jedinica (slika 2). Takva struktura omogućuje *Chlorella* sp. da pri niskim koncentracijama MP-a koristi PE kao supstrat. Treba spomenuti da su El-Sheekh i suradnici [366] izvijestili o sposobnosti *Chlorella vulgaris* da razgradi sirovu naftu koja se koristi u proizvodnji plastike kao glavna sirovina. Nadalje, sposobnost korištenja PE kao supstrata primijećena je u slučajevima nekih drugih slatkovodnih algi, kao što su zelene alge *Scenedesmus dimorphus* [367] i *Raphidocelis subcapitata* [25]. Analiza korištenih matematičkih modela ukazala je na značajne čimbenike za ekotoksični utjecaj na *Chlorella* sp. MODEL I naznačio je koncentraciju PE (X_1) kao utjecajni čimbenik za inhibiciju rasta *Chlorella* sp. (p -vrijednost bila je niža od granice značajnosti 0,05, tablica 17). Ipak, povezani koeficijent determinacije imao je relativno nisku vrijednost ($R^2 = 0,9011$), što pokazuje da je velika količina pogreške uključena u model. Dakle, 9,89 % varijance zavisne varijable nije se moglo objasniti promjenama nezavisnih varijabli. Primjena složenijih polinoma poput MODEL II i MODEL III rezultirala je puno višim R^2 vrijednostima (0,9436, odnosno 0,9439). Međutim, treba napomenuti da dodavanje svakog novog člana u polinom neizbježno povećava njegovu snagu prilagodbe, što znači da to uvijek rezultira višim vrijednostima R^2 . Nažalost, ovo potvrđuje da model bolje odgovara odabranim podacima (uzorku), a ne nužno cijeloj populaciji. Takva lažna poboljšanja nazivaju se pretjeranom prilagodbom modela (engl. *overfitting*). Kako bi se takvo što izbjeglo, za slučajeve koji sadrže više od jedne nezavisne varijable uobičajeno se kao kriterij vrednovanja koristi R^2_{adj} . R^2_{adj} povećava vrijednost samo

kada član dodan modelu poboljšava prilagodbu modela za dovoljan iznos [368]. Sukladno tome, MODEL III je ukazao na pretjerano prilagođavanje eksperimentalnih podataka (R^2_{adj} niži nego u slučaju MODELA II) i isključen je iz daljnjeg razmatranja pa je MODEL II odabran kao najbolji opis inhibicije rasta mikroalgi. Statistička analiza MODELA II pokazala je kako koncentracija PE nije jedini utjecajni čimbenik. Utjecaj veličine PE čestica iskazuje se preko interakcijskoga člana ($X_1 \cdot X_2$). Algebarski predznak ispred povezanih koeficijenata modela otkriva opći utjecaj koncentracije i veličine PE na inhibiciju. Dakle, veće vrijednosti koncentracije PE i manje veličine čestica doprinijele su većoj inhibiciji rasta *Chlorella* sp.

Odzivne površine dobivene interpolacijom podataka o inhibiciji PP-a (slika 27B) ravnija je nego u PE slučaju (slika 27A). Osim toga, ove dvije površine imaju mnogo toga zajedničkog. Vrlo niske inhibicije utvrđene su pri niskim koncentracijama PP-a uz hormezu uočenu za 200 μm pri 10 mg/L. Nadalje, vidljivo je povećanje inhibicije s većom PP koncentracijom. Štoviše, maksimalna inhibicija PP (3,33 %) je relativno blizu PE. Potencijalni razlog za takve sličnosti u promatranim učincima može biti posljedica sličnosti između PE i PP struktura (slika 2). Statistička analiza razvijenih RSM modela nije otkrila pretjeranu prilagodbu modela. Veća složenost primijenjenih modela dovela je do boljeg uklapanja eksperimentalnih podataka, ukazujući na MODEL III kao najbolje rješenje za opis inhibicije rasta u slučaju PP-a (tablica 17). Unatoč tome, bilo je zanimljivo primijetiti da su povećanja vrijednosti R^2 i R^2_{adj} bila vrlo niska što znači da je vrlo malo korisnih informacija ostalo nepokriveno osnovnim modelom (MODEL I). Analiza je ukazala na koncentraciju MP-a kao jedini utjecajni čimbenik u slučaju PP-a. To je bilo donekle neočekivano unatoč činjenici da utjecaj veličine MP na inhibiciju nije bio jasno vidljiv na slici 27B. Naime, zbog veće specifične površine, mikroorganizmima su biodostupnije manje čestice te pokazuju veću brzinu translokacije unutar organizma. Stoga se može zaključiti da manje čestice imaju veću bioraspoloživost za mikroorganizme [363]. Stoga bi smanjenje veličine čestica trebalo dovesti do veće ekotoksičnosti prema izloženom organizmu. Očito je odabrani raspon veličina čestica bio nedovoljan da bi se otkrio eventualni utjecaj veličine PP-a na inhibiciju rasta bakterije *Chlorella* sp.

Eksperimentalno utvrđene vrijednosti inhibicije za PS (slika 27C) bile su nešto više od onih za PE i PP (maksimalna dobivena inhibicija kod PS-a dosegla je 4,61 %) što se vjerojatno može povezati s benzenskim prstenom unutar strukture PS-a. Aromatski ugljikovodici općenito

su više reaktivni od nearomatskih i imaju veći ekotoksični potencijal [369,370]. PS MP-a je jedina među primijenjenim MP-ima pokazala značajan utjecaj veličine čestica unutar cijele eksperimentalne domene (slika 27C). Dakle, manje veličine čestica uzrokovale su veću inhibiciju rasta mikroalgi. Statistička analiza je to i potvrdila. Sva tri testirana RSM modela razvijena za PS pokazala su se značajnima (tablica 17) i nije otkrivena pretjerana prilagodba modela. Najveće vrijednosti R^2 i R^2_{adj} dobivene za MODEL III predstavljaju ovaj model kao najprikladniji za opis eksperimentalnih podataka. Prema najboljem modelu, oba parametra i koncentracija PS i veličina čestica imaju značajan utjecaj na inhibiciju *Chlorella* sp. Značaj koncentracije MP ogleda se u niskim p -vrijednostima dobivenim za članove X_1 i X_2 , dok veličina čestice utječe na inhibiciju kroz interakciju s učinkom koncentracije ($X_1 \cdot X_2$). Koeficijenti a_1 i a_2 imali su suprotne algebarske predznake. Njihove vrijednosti pokazuju da unutar odabrane eksperimentalne domene (10 – 1000 mg/L) više koncentracije PS uzrokuju veću inhibiciju rasta *Chlorella* sp. Nadalje, veću inhibiciju rasta uzrokovale su i niže PS čestice. Li i suradnici [6] izvijestili su o ovakvome trendu, ali za slatkovodne mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* i unutar mnogo kraćeg raspona veličina od 0,3 – 0,6 μm .

Do sada su vrste iz roda *Chlorella* rijetko korištene kao testirani organizmi u istraživanjima ekotoksičnosti povezanim s PVC-om, no Wu i suradnici [203] su proveli testove toksičnosti na *Chlorella pyrenoidosa* i ukazali na veću ekotoksičnost PVC-a u usporedbi s PP-om. Nadalje, Zhu i suradnici [371] uočili su da povećanje koncentracije PVC-a negativno utječe na rast morske mikroalge *Skeletonema costatum*. Osim toga, primijetili su i veću ekotoksičnost PVC čestica u usporedbi s PE i PS česticama. Ekotoksičnost primjenom *Vibrio fischeri* odredili su Zimmermann i suradnici [372] za svih pet polimernih materijala: PE, PP, PS, PVC i PET. Uočili su da je PVC uzrokovao najveći ekotoksični utjecaj. Prema ovome radu, izloženost *Chlorella* sp. na mikročestice PVC-a rezultiralo je najvišom inhibicijom (6,79 %) usporedno za svih pet ispitanih MP vrsta. Treba spomenuti da je PVC organoklorni spoj (slika 2), a ovakvi spojevi su poznati po svojim ekotoksičnim svojstvima [373]. Na primjer, mnogi organoklorni spojevi korišteni su kao pesticidi zbog visoke ekotoksičnosti [374], te su organoklorni spojevi ekotoksičniji od svojih nekloriranih analoga [375]. Povezanost između povećanja inhibicije i povećanja koncentracije PVC-a uočena je u cijeloj eksperimentalnoj domeni. O povećanju inhibicije rasta mikroalgi s povećanjem koncentracije PVC-a izvijestili su i Zhang i suradnici [208]. Ovo ukazuje na učinak ovisan o koncentraciji. Naime, sorpcija MP čestica na površinu

stanica mikroalgi može biti veća pri višim MP koncentracijama i moguće je ograničenje prijenosa mase i energije, što rezultira većom inhibicijom rasta. Štetni učinci povezani s veličinama čestica bili su jasno vidljivi samo pri višim ispitivanim koncentracijama (slika 27D), gdje su veće inhibicije dobivene za manje veličine čestica. Unatoč činjenici da je MODEL III pokazao najbolje opisivanje eksperimentalnih podataka (tablica 17), niti jedan od uvedenih kvadratnih članova nije se pokazao značajnim. Analiza je pokazala koncentraciju PVC-a (X_1) kao utjecajnu na rast mikroalgi. Međutim, ključni korak u poboljšanju prilagodbe primijenjenih RSM modela bilo je uvođenje interakcijskog člana ($X_1 \cdot X_2$). Važnost ovog izraza je vidljiva iz poboljšanja vrijednosti R^2 ili R^2_{adj} nakon primjene MODELA II, a njegova značajnost je statistički potvrđena ($p < 0,05$). Ovime je dokazano kako veličina PVC mikročestica ima značajan utjecaj na inhibiciju rasta ne samo pri višim ispitivanim koncentracijama, kao što je vidljivo na slici 27D, već unutar cijele eksperimentalne domene. Dakle, povećanje inhibicije uslijedilo je smanjenjem veličine PVC čestica.

Do danas je objavljeno samo nekoliko istraživanja u kojima se istraživala ekotoksičnost PET-a na mikroalge i to uz testni organizam *Spirulina* sp. Khoironi i suradnici [376] izvijestili su da povećanje koncentracije PET-a ima negativan utjecaj na rast *Spirulina* sp. Capolupo i suradnici [377] koristili su mikroalge *Raphidocelis subcapitata* i *Skeletonema costatum*, a testirali su ekotoksični utjecaj procjednih voda dobivenih od PS, PP, PVC i PET MP-a. Uočili su inhibiciju rasta obiju mikroalgi za sve procjedne vode osim za PET. Prema eksperimentalno utvrđenim vrijednostima inhibicije dobivenim za mikroalgu *Chlorella* sp. (slika 27E), uočena je ekotoksičnost za PET. Dobiveni rezultati pokazuju da je PET manje ekotoksičan od PVC-a, ali ekotoksičniji od preostale tri vrste MP-a, posebice u usporedbi s PE i PP čije strukture ne sadrže aromatski benzenov prsten (slika 2). Utjecaj koncentracije MP-a bio je očit unutar cijele eksperimentalne domene, gdje su više koncentracije PET-a uzrokovale veće inhibicije. Također je primijećen negativan učinak manjih veličina PET čestica (slika 27E). Sva tri RSM modela pokazala su se značajnima. Međutim, uspoređujući vrijednosti R^2_{adj} za MODEL II i MODEL III u odnosu na MODEL I (tablica 17), uočeno je pretjerano prilagođavanje eksperimentalnih podataka za MODEL II i MODEL III. Stoga je MODEL I odabran kao najbolja opcija za opis odzivnih površina. Analizom modela potvrđen je značajan utjecaj oba parametra, i koncentracije PET-a i veličine čestica. Inhibicija je rasla s višim vrijednostima koncentracije PET MP-a

(pozitivan predznak koeficijenta a_1) i manjim veličinama čestica (negativan predznak koeficijenta a_2).

Testovi toksičnosti primjenom Scenedesmus sp., Pseudomonas putida i Saccharomyces cerevisiae

Kako bi se statistički utvrdilo je li koncentracija ili veličina imala značajan utjecaj na ekotoksičnost MP unutar eksperimentalnog raspona, podaci o inhibiciji prilagođeni su jednim linearnim modelom (jednadžba (7)) i dva polinomna regresijska modela (jednadžbe (8) i (9)). Za svaki primijenjeni model provedena je statistička analiza, a rezultati su prikazani u tablicama 18 – 20. Izračuni su napravljeni s 95 % pouzdanosti, tj. razina značajnosti bila je 0,05. Primijenjeni regresijski modeli uspoređeni su na temelju R^2_{adj} vrijednosti, kao i najbolji model za svaku kombinaciju primijenjenog testnog organizma. R^2_{adj} je imao važniji utjecaj u odnosu na R^2 jer se smatra superiorniji u slučajevima kada je potrebno usporediti modele s različitim brojem članova [378]. Najbolji su modeli prikazani na slikama 28 – 30. Zaključci o ekotoksičnosti (o utjecaju MP veličine i koncentracije MP) prema *Scenedesmus sp.*, *Pseudomonas putida* i *Saccharomyces cerevisiae* donešeni su na temelju najboljih modela.

Testovi toksičnosti primjenom Scenedesmus sp.

Ekperimentalno utvrđene vrijednosti inhibicije rasta *Scenedesmus sp.* pokazale su opći trend za svih pet proučavanih MP. Dakle, više su koncentracije rezultirale većim inhibicijama (slika 28). Nije bilo vidljivog trenda za veličinu MP čestica, osim za PS (slika 28C). Međutim, najveće vrijednosti inhibicije za svih pet vrsta MP (slika 28 i tablica 18) uočene su pri najnižoj veličini čestica (200 μm) i najvišoj koncentraciji (1000 mg/L), što sugerira da veličina čestica ima utjecaj na rast mikroalgi, barem pri višim koncentracijama MP. Kako bi se provjerila ova opažanja, podatci inhibicije su se opisala primjenom tri regresijska modela (jednadžbe (7) – (9)) uz provedene statističke analize. Rezultati su prikazani u tablici 18. Svi primijenjeni modeli pokazali su se značajnima u opisivanju varijabilnosti zavisne varijable (tj. inhibicije rasta mikroalgi). Naime, visoke F -vrijednosti i p -vrijednosti ispod značajnosti od 0,05 dobivene su za sve primijenjene modele (tablica 18).

Linearni model (MODEL I), primijenjen za pokuse s PE MP-om, uspješno opisuje 95,35 % varijance inhibicije ($R^2 = 0,9535$), što ukazuje na postojanje visokog utjecaja barem jednog od

ispitivanih čimbenika na rast mikroalgi (tablica 18). Proračunate p -vrijednosti koeficijenata modela bile su ispod primijenjene značajnosti od 0,05. To je impliciralo da oba čimbenika, koncentracija i veličina čestica, imaju značajan utjecaj na rast mikroalgi. Uvođenje kvadratnih članova u MODEL II rezultiralo je boljim opisivanjem (više R^2_{adj} vrijednosti) i pokazalo je superiornost modela nad MODELOM I. ANOVA provedena za MODEL II opovrgnula je zaključak izveden iz MODELA I i ukazalo na koncentraciju PE MP-a kao jedini utjecajni čimbenik, pri čemu je kvadratni član za veličinu čestica imao p -vrijednost na granici definirane značajnosti od 0,05 no ipak ne ispod nje. Prema MODELU III, koji je najbolje opisivao eksperimentalne podatke ($R^2_{adj} = 0,9502$), ovo je i potvrđeno. Površina inhibicije opisana MODELOM III (slika 28A) jasno pokazuje da su više koncentracije PE bile ekotoksičnije za *Scenedesmus* sp. Za najnižu testiranu koncentraciju (50 mg/L), dobivene su inhibicije od 3,61 % ili niže (slika 28A). Sukladno tome, može se pretpostaviti da niže koncentracije PE MP-a nemaju značajnijeg utjecaja. Ovo je u skladu s istraživanjem koju su proveli Garrido i suradnici [379]. Oni su proveli sličan eksperiment, ali uz mikroalgu *Isochrysis galbana* kao testni organizam. Ispitali su PE čestice manje veličine (do 22 μ m) i niže koncentracije (do 25 mg/L) u odnosu na eksperimente provedene u sklopu ovog doktorskog rada i tijekom tri dana izloženosti nisu uočili štetne učinke na mikroalge.

Nadalje, nešto niže vrijednosti koeficijenata determinacije (R^2 , R^2_{adj}) uočeni su tijekom modeliranja odzivnih površina inhibicije za PP MP-a (tablica 18, slika 28B). Iako je najbolji model za opisivanje eksperimentalnih podataka MODEL III, sva tri modela upućuju na identičan zaključak. Dakle, unutar eksperimentalnog raspona, koncentracija PP mikročestica je imala značajan utjecaj na rast mikroalgi, dok promjene u veličina čestica nisu imale statistički značajan učinak. Uočen je utjecaj koncentracije PP-a, koji je bio veći pri višim koncentracijama MP-a (slika 28B).

Primjena MODELA I u slučaju PS MP-a, rezultirala je općenito najnižim postotkom objašnjene varijance inhibicije ($R^2 = 0,8570$; tablica 18). Međutim, uvođenje kvadratnih članova (MODEL II) uvelike je poboljšalo opisivanje inhibicije s obzirom na povećanje R^2_{adj} na vrijednost od 0,1003. Oba ova modela ukazuju da su koncentracija i veličina PS mikročestica utjecajni čimbenici na inhibiciju rasta *Scenedesmus* sp. Uključivanje interakcijskog člana u regresijski model (MODEL III) nije pridonijelo, što ukazuje na izostanak zajedničkog utjecaja koncentracije i veličine PS mikročestica. Odzivna površina opisana MODELOM II prikazana je

na slici 28C. Površina jasno pokazuje da su više koncentracije PS povezane s višim vrijednostima inhibicije. Za veličinu PS čestica od 400 μm , površina pokazuje najnižu inhibiciju. Razlog zašto su i veće i manje čestice imale veći utjecaj na inhibiciju može biti s obzirom na različite inhibicijske mehanizme. Naime, Bhattacharya i suradnici [204] su iznijeli da jedan od razloga za inhibiciju rasta mikroalgi može biti sorpcija PS-a na stanicu mikroalgi, što ometa fotosintezu mikroalgi. Postoje dvije vrlo vjerojatne vrste utjecaja MP čestica na mikroalge. Prvi je fizičko blokiranje prijenosa plina kroz stanicu membrana (smanjeni unos CO_2) koji bi kod manjih čestica trebao biti izraženiji zbog potpunijeg prekrivanja površine stanice. Druga vrsta utjecaja se očituje kroz efekt zasjenjenja [204]. Važno je spomenuti da su od pet testiranih vrsta MP čestica, tri vrste bile prozirne, dok su čestice PP-a i PS-a bile bijele boje i neprozirne. Sorpcija takvih čestica na površinu stanice mikroalgi smanjuje količinu svjetlosti koja je neophodna za normalno funkcioniranje fotosinteze kod mikroalgi. Efekt zasjenjenja je očitiji kada se na mikroalge sorbiraju veće MP čestice [204]. Nadalje, Besseling i suradnici [213] izveli su eksperiment vrlo sličan opisanom u ovom poglavlju, ali za PE nanočestice veličine 0,070 μm . Testni organizam bila je mikroalga *Scenedesmus obliquus*, a ispitivanja su se provodila tijekom tri dana pri koncentracijama od 44 – 1100 mg/L. Zaključili su da povećanje koncentracije MP rezultira povećanom inhibicijom rasta mikroalgi. Primjerice, pri koncentraciji od 1000 mg/L, postigli su inhibiciju od oko 2,5 %, dok je u ovome radu inhibicija iznosila 11,34 %, koliko je eksperimentalno dobiveno pri istoj koncentraciji za čestice veličine 200 μm . Tijekom eksperimenta, pratili su ne samo inhibiciju rasta mikroalgi, već i razinu klorofila *a* u stanicama mikroalgi. Uočili su promjene u razini klorofila *a*, a zaključili su da u slučaju čestica nano veličine dodatni mehanizam PS čestica mora biti uključen u smanjenje fotosintetske aktivnosti *Scenedesmus* sp., osim prethodno spomenute blokade prijenosa CO_2 kroz staničnu membranu.

Zanimljivi rezultati dobiveni su regresijskom analizom u slučaju PVC MP-a (tablica 18). Naime, MODEL I i III ukazuju da su koncentracija i veličina PVC mikročestice statistički značajni čimbenici, dok je to prema MODELU II to samo koncentracija. Usporedba R^2_{adj} vrijednosti pokazala je razlog ove nedosljednosti. R^2_{adj} vrijednost MODELA II bila je niža od one MODELA I. To je ukazalo kako je uvođenje kvadratnih članova bilo beznačajno za opisivanje inhibicije, te je MODEL II inferiorniji od MODELA I. Nasuprot tome, uvođenje interakcijskih članova u regresijski model (MODEL III) bilo je vrlo korisno za opisivanje inhibicije i učinilo je MODEL III najboljim modelom. Prema MODELU III (slika 28D), za

najnižu ispitivanu koncentraciju (50 mg/L) primijećena je vrlo mala varijacija u vrijednostima inhibicije unutar ispitivanog raspona veličine čestica 200 – 600 µm. Međutim, s povećanjem koncentracije PVC MP-a, učinak veličine čestica postaje izraženiji, uz veću ekotoksičnost manjih čestica PVC MP-a. Ovaj trend odgovara nekim sličnim istraživanjima [208,380] prema kojima je, u slučaju mikroalgi, potvrđena veća ekotoksičnost sitnijih PVC čestica.

MODEL I upućuje na značajan utjecaj koncentracije i veličine čestica u slučaju PET mikročestica. Prema MODELU II i MODELU III značajan utjecaj je uočen za koncentracije PET-a. Najprikladniji model za opisivanje eksperimentalnih podataka se pokazao MODEL III, budući da je dao najbolje podudaranje podataka ($R^2_{adj} = 0,8965$). Usporedbom cjelokupnog skupa podataka za *Scenedesmus* sp. (slika 28E) vidljivo je da je unutar ispitivanog područja *Scenedesmus* sp. bila najmanje osjetljiva na PET s obzirom na najniže vrijednosti inhibicija. Također, porast inhibicija s porastom koncentracije MP bio je najmanje izražen za čestice PET-a. Nedavna istraživanja [381-383] potvrdila su da se neke mikroalge mogu prilagoditi na izloženost PET-a. Navedeno svojstvo im omogućavaju enzimi za hidrolizu PET-a, zvane PETaze, te tako mikroalge mogu koristiti PET kao supstrat. Nadalje, Moog i suradnici [381] izložili su fotosintetsku mikroalgu *Phaeodactylum tricornutum* PET-u i uočili progresivno povećanje koncentracija mono(2-hidroksietil) tereftalne kiseline i tereftalne kiseline, koji su glavni produkti hidrolize PET-a, nakon samo 3 dana izlaganja.

Testovi toksičnosti primjenom Pseudomonas putida

Izloženost bakterije *Pseudomonas putida* MP česticama u unaprijed definiranim rasponima koncentracija i veličina čestica rezultiralo je sličnim vrijednostima inhibicije (slika 29) onima dobivenim za *Scenedesmus* sp. Veće vrijednosti inhibicija uočene su za PE, PS i PVC mikročestice (redom 12,35 %, 14,74 % i 11,89 %) u odnosu na PP i PET (8,48 % i 7,42 %). Nadalje, ove najviše inhibicije su određene pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji MP-a (1000 mg/L) i najmanjoj veličini čestica (200 µm), što ukazuje na potencijalni utjecaj koncentracije i veličina MP čestica na rast *Pseudomonas putida*. Utjecaj koncentracije MP-a postao je još očitiji nakon analize svih eksperimentalnih podataka, što je ukazalo na povećanje inhibicije s porastom koncentracije i to za svih pet ispitivanih MP. Utjecaj veličine čestica nije bio toliko očit (slično kao i za *Scenedesmus* sp.), osim za PVC i PET. U slučaju PVC i PET mikročestica uočen je porast inhibicije sa smanjenjem veličine čestica. Inhibicija je opisana modelima prikazanim

jednadžbama (7) – (9) te je provedena statistička analiza modela. Rezultati analize prikazani su u tablici 19.

Izlaganje *Pseudomonas putida* česticama PE-a rezultiralo je relativno visokim inhibicijama (slika 29A). Sva tri regresijska modela primijenjena za opisivanje odzivnih površina inhibicija, bila su statistički značajna jer su p -vrijednosti modela bile manje od 0,05 (tablica 19). Unatoč tome, MODEL I pokazao je prilično slabu korelaciju. Nadalje, prema MODELU I i MODELU III oba ispitivana čimbenika, koncentracija i veličina PE čestica, su se pokazala statistički značajnima, dok je prema MODELU II to bila samo koncentracija čestica. Međutim, MODEL II je imao najniži R^2_{adj} vrijednosti, što ukazuje na njegovu inferiornost u odnosu na MODEL I i posebice MODEL III. Prema tome, uključivanje kvadratnih članova u slučaju MODEL II nije bilo korisno za opisivanje odzivnih površina. No uključivanju interakcijskog člana u MODELU III prevladalo je nedostatke MODEL II i rezultiralo velikim poboljšanjem R^2_{adj} vrijednosti. Stoga se MODEL III pokazao kao najbolji za opisivanje eksperimentalnih podataka. Nadalje, značajnost interakcijskoga člana (člana koji upućuje na zajednički utjecaj koncentracije i veličine čestica), potvrđena je p -vrijednošću uz koeficijent a_5 koja je bila daleko ispod 0,05. Odzivna površina dobivena pomoću MODEL III (slika 29A) pokazuje zanimljiv trend promjene inhibicije. Naime, za najnižu koncentraciju (50 mg/L), vrijednosti inhibicije se smanjuju sa smanjenjem veličine čestica do 400 μm uz daljnju stagnaciju vrijednosti. Međutim, pri višim koncentracijama, inhibicija se povećava sa smanjenjem veličine čestica. Povećanje koncentracije rezultiralo je povećanjem inhibicije, kao što je prethodno uočeno.

MODEL I je najbolje opisao eksperimentalne podatke u slučaju izloženosti *Pseudomonas putida* PP mikročesticama (tablica 19). Analiza modela ukazala je da su značajni čimbenici, koji su utjecali na rast bakterije, koncentracija i veličina PP čestica. Uvođenje kvadratnog člana (MODEL II) i interakcijskog člana (MODEL III) smanjilo je prikladnost ovih modela za opisivanje odzivnih površina inhibicija. Grafički prikaz najprikladnijeg modela (slika 29B) upućuje da se ekotoksični utjecaj PP čestica na *Pseudomonas putida* povećavao s višim koncentracijama i manjim veličinama čestica.

Statistički gledano, koncentracija mikročestica bila je jedini čimbenik koji je utjecao na rast *Pseudomonas putida* tijekom izloženosti PS česticama (tablica 19). MODEL I također je naznačio na utjecaj veličine čestica, no ovaj je model bio inferioran u odnosu na MODEL II i MODEL III. MODEL III se pokazao kao najbolji izbor za opis odzivnih površina inhibicija.

Uvrštavanje interakcijskoga člana u MODEL III poboljšalo je R^2 vrijednosti za 0,0051, no značajnost ovoga člana nije utvrđena ($p = 0,17$). MODEL III je potvrđen trend da povećanje inhibicije slijedi povećanje koncentracije PS-a (slika 29C). Izlaganje *Pseudomonas putida* PS česticama rezultirala je najvećim inhibicijama (slika 29) s obzirom na ispitivanih pet vrsta MP-a. To je najvjerojatnije povezano sa stirenom sadržanim u PS strukturi (slika 2). Naime, stiren je aromatski hidrofobni spoj, poznat kao štetna onečišćujuća tvar koja može izazvati negativne učinke na bakterijske stanice [384].

Sva tri modela primijenjena u slučaju PVC-a ukazuju na koncentraciju i veličinu čestica kao značajne faktore za ekotoksičnost PVC čestica. Prema MODELU II, uvođenje kvadratnoga člana povezanog s veličinom čestica, bilo je korisno za opisivanje vrijednosti inhibicije. Ovo je u skladu s parabolničnim trendom promjene između inhibicije i veličine čestice, kako je prikazano na slici 29D. Utvrđeno je da je kvadratni član povezan s koncentracijom neznatno. Najbolji model za ponašanja inhibicije bio je MODEL III, čiji je analiza ukazala na značajan utjecaj interakcijskog člana (p -vrijednost za a_5 je manja od 0,05) i sukladno tome zajedničkog štetnog djelovanja koncentracije i veličine čestica. Giacomucci i suradnici [37] izvijestili su da je bakterija *Pseudomonas citronellolis* sposobna razgraditi PVC. Na temelju CFU vrijednosti jasno je da je biorazgradnja započela vrlo rano, praktički u 3. danu izlaganja. Prema tome se može objasniti nešto niža inhibicija *Pseudomonas putida*, koja je uočena tijekom izlaganja PVC česticama.

Nadalje, vrlo sličan zaključak vrijedi i za PET, za koji su sva tri modela istaknula i koncentraciju i veličinu čestica kao utjecajne čimbenike za ekotoksični utjecaj na *Pseudomonas putida*. Uvrštavanje kvadratnog člana bilo je značajno za veličinu čestica, ali ne i za koncentraciju. Dakle, MODEL III se pokazao kao najbolji izbor za opisivanje odzivnih površina, iako nije potvrđen značajni utjecaj interakcijskoga člana. Na temelju strukture PET-a, koji sadrži benzenov prsten (slika 2), očekivane su veće vrijednosti inhibicija od dobivenih (slika 29E). Ovo se može objasniti s obzirom na prilagodbu *Pseudomonas putida* na izloženost različitim onečišćujućim tvarima. Naime, poznato je da *Pseudomonas putida* može metabolizirati etilen glikol [385], koji je jedan od produkata depolimerizacije PET-a [280]. Iako je nekoliko drugih bakterija iz roda *Pseudomonas* sposobno proizvoditi enzim PETazu [386-388], zasad nema istraživanja koja potvrđuju ovu sposobnost za *Pseudomonas putida*.

Testovi toksičnosti primjenom Saccharomyces cerevisiae

Pokusi toksičnosti provedeni s kvascem *Saccharomyces cerevisiae* rezultirali su mnogo višim vrijednostima inhibicija u usporedbi s pokusima sa *Scenedesmus* sp. i *Pseudomonas putida* (tablica 20). Dobivene su potpune ili gotovo potpune inhibicije za četiri od pet ispitivanih vrsta MP-a: PE, PS, PVC i PET. Navedeno ukazuje na visoku osjetljivost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na prisutnost ispitivane MP. Najviše vrijednosti inhibicija dobivene su pri najvišoj koncentraciji MP-a (1000 mg/L) i najnižoj veličini MP čestica (200 µm). Stoga nije iznenađujuće da je trend promjena inhibicija dobivenih za *Saccharomyces cerevisiae*, isti kao i trend promjena inhibicija za *Scenedesmus* sp. i *Pseudomonas putida*. Više vrijednosti inhibicija uočene su pri višim ispitivanim koncentracijama MP-a. Međutim, za razliku od pokusa izvedenih sa *Scenedesmus* sp. i *Pseudomonas putida*, također je uočeno da postoji korelacija inhibicija s obzirom na ispitivane veličine čestica MP-a. Dakle, veće inhibicije primijećene su za manje veličine MP čestica. U svrhu konkretnije analize ponašanja, inhibicija je opisana trima modelima (jednadžbe (7) – (9)).

Što se tiče pokusa s PE česticama, sva tri primijenjena modela imala su visoke R^2_{adj} i F -vrijednosti (tablica 20, slika 30A), što potvrđuje dobar odabir regresijskih modela. Na primjer, MODEL I, najjednostavniji od korištenih modela, opisao je 94,49 % varijance inhibicije. To znači da je samo 5,51 % varijance ostalo neobjašnjeno modelom. MODEL III, koji je imao najveći R^2_{adj} vrijednost te tako najbolje opisuje inhibiciju fermentacije saharoze od strane kvasca. Također implicira da su i koncentracije i veličina PE čestica značajni čimbenici za ekotoksični utjecaj na *Saccharomyces cerevisiae*. Druga dva modela su također uputila na iste značajne čimbenike. Nadalje, zajednički utjecaj koncentracije i veličine čestica se nije pokazao značajnim s obzirom da je p -vrijednost za interakcijski član (MODEL III, koeficijent a_5) iznosila 0,09 (tablica 20). Najbolji model za ovaj sustav je prikazan na slici 30A. Model je potvrdio da koncentracija i veličina čestica slijede trendove pretpostavljene usporedbom podataka o inhibiciji. Dakle, više koncentracije i manje veličine PE mikročestica pogodovale su povećanju inhibicije.

Unutar eksperimentalnog raspona, izlaganje PP mikročesticama nije rezultiralo potpunom inhibicijom fermentacije kvasca. Najviša vrijednost inhibicije od 80,95 % postignuta je za čestice od 200 µm pri koncentraciji od 1000 mg/L. Primjena regresijskih modela za PP (tablica 20)

rezultirala je najnižim vrijednostima koeficijenta determinacije (R^2 , R^2_{adj}), što implicira nešto lošije opisivanje eksperimentalnih podataka. MODEL I je bio prilično inferioran u odnosu na MODEL II, a posebno u odnosu na MODEL III. Stoga je zanemareno ono što proizlazi iz MODELA I, da oba ispitivana čimbenika imaju značajan utjecaj i zaključeno je da je samo koncentracija značajna unutar odabranog eksperimentalnog raspona prema MODELU II i MODELU III. Iako je MODEL III pružio najbolji opis eksperimentalnih podataka, statistički nije potvrđen značajan utjecaj interakcijskog člana (p -vrijednost za a_5 iznosila je 0,07; tablica 20). Odzivna površina dobivena najboljim modelom (slika 30B) pokazuje da iznad koncentracije od 500 mg/L, površina gubi nagib i gotovo je paralelna s xy -ravninom. Stoga se pretpostavlja da koncentracije PP-a veće od 1000 mg/L ne utječu dodatno na inhibiciju fermentacije saharoze od strane kvasca.

Kvaliteta opisivanja eksperimentalnih podataka za čestice PS-a rasla je sa složenošću primijenjenog modela (tablica 20). Međutim, poboljšanje u slučaju MODELA II u usporedbi s MODELOM I bilo je prilično malo (povećanje R^2_{adj} iznosilo je samo 0,0032) i nijedan od kvadratnih članova uključenih u model nije se pokazao statistički značajnim, dovodeći u pitanje superiornost MODELA II. MODEL III, koji je imao najvišu vrijednost R^2_{adj} , također je utvrdio da su kvadratni članovi beznačajni. Na temelju analize MODELA III utvrđeno je da koncentracija i veličina PS mikročestica imaju utjecaj u eksperimentalnom rasponu. Utjecaj veličine čestica očitovao se kroz interakcijski član, odnosno kroz zajednički utjecaj koncentracije i veličine čestica. Odzivna površina (slika 30C) potvrdila je prethodno spomenuto opažanje da se inhibicija povećava s višim koncentracijama PS-a.

Analiza regresijskih modela korištenih za pokus s PVC mikročesticama dovela je do zaključka da su oba ispitana čimbenika značajno utjecala na fermentaciju saharoze od strane kvasca. Najbolji model za opisivanje ovoga sustava je MODEL III prema kojemu interakcijski član nije pokazao značajni utjecaj PVC čestica. Analiza odzivne površine (slika 30D), prema najboljem regresijskom modelu, ukazuje na smanjenje (pri visokim koncentracijama) ili na stagnaciju (pri niskim koncentracijama) inhibicije fermentacije saharoze od strane kvasca, smanjenjem veličine čestica sa 600 na 400 μm . Za veličine čestica ispod 400 μm , došlo je do većeg povećanja inhibicije.

U slučaju PET-a, uvrštavanje kvadratnih članova (MODEL II) poboljšalo je opisivanje eksperimentalnih podataka. Ovo se odnosi na kvadratni član koncentracije, budući da nije uočena značajnost kvadratnog člana veličine čestica. Međutim, MODEL III, kao najbolji model za pokus s PET česticama, ukazuje na značajnost oba kvadratna člana. Osim toga, analiza modela implicira značajnost interakcijskog člana. Odzivna površina opisana MODELOM III prikazana je na slici 30E.

5.2 Izolacija i identifikacija bakterija i gljiva iz okolišnih uzoraka obogaćenih mikroplastikom

Mikroorganizmi (bakterije i gljive) su izolirani iz uzoraka aktivnog mulja, komposta i sedimenta obogaćenih s MP-om te su i identificirani. Iz ispitivanih uzoraka izolirane su bakterije, plijesni i kvasci. U usporedbi s tri ispitivana medija, najveći broj mikroorganizama bio je u uzorku komposta. Najbrojniji mikroorganizmi u sva tri uzorka bile su bakterije i plijesni. U tablici 21 su mikroorganizmi koji su izolirani iz komposta, aktivnog mulja i riječnog sedimenta.

Nakon dobivanja čistih kultura, sljedeći je korak bio identificirati svaki izolirani mikroorganizam. Čiste bakterijske kulture uspoređivane su tehnikom iscrpljivanja na Petrijevim zdjelicama s hranjivim agarom radi proučavanja njihovih morfoloških karakteristika. Bakterije izolirane iz navedena tri uzorka bile su označene I1-I9 (tablica 21). Kolonije I1 bile su žućkaste s ravnim uzvišenjem i nepravilnim rubovima; I2 bile su bijele do blago žute, sluzave i ravne s pravilnom okruglom konfiguracijom; I3 bile su bijele kolonije sa žućkastim rubovima, sluzave, sjajne i okrugle konfiguracije; I4 bile su bijele žućkaste kolonije, okrugle i ravne s neravnim rubovima; I5 bile su žućkasto-narančaste kolonije pravilne okrugle konfiguracije, sluzave i sjajne; I6 bile su žućkaste do blago smeđe kolonije okrugle konfiguracije; I7 bile su velike bijele do blago sive, neprozirne kolonije s neravnim rubovima; I8 bile su blijedo-žućkaste kolonije, sluzave pravilne okrugle konfiguracije; i I9 bile su blijedo-žućkaste kolonije, sluzave pravilne okrugle konfiguracije. Bakterije uzgojene na Petrijevim zdjelicama s hranjivim agarom, kao i mikrofotografije bakterija obojenih po Gramu dane su na slici 31A-I. Prema morfologiji stanica koja je promatrana svjetlosnim mikroskopom, sve bakterije, I1-I9, bile su štapićastog oblika. Izolati I1-I7 (tablica 22) bili su Gram-pozitivni, a I8 i I9 Gram-negativni zbog crveno obojenih stanica nakon bojenja (slika 31H i I). Ovi rezultati su potvrđeni jednostavnim i brzim KOH testom, kojim su uočena bakterijska vlakna za Gram-negativnu bakteriju. Naime, KOH prodire

kroz stanicu, a stanični materijal (DNK) formira vlakanca podizanjem mikrobiološke ušice od površine predmetnice [389]. Dodatna potvrda za određivanje strukture stanične stijenke postigla se bojanjem po Ziehl-Neelsonu. Ovo bojanje je korisna metoda za karakterizaciju strukture stanične stijenke bakterija, a odnosi se na sadržaj lipida, posebno na visok sadržaj mikolne kiseline. Nakon bojenja, kiselinski otporni bacili se oboje svijetlo crveno na plavoj pozadini. Izolati I1, I3, I5 i I6 bili su otporni na kiselinu, što ukazuje da je sadržaj lipida dio stanične stijenke [389]. I2, I8 i I9 nisu bili otporni na kiseline; I4 i I7 bili su varijabilni jer su neke stanice bile blago plave, a druge obojene crveno/ružičasto. Deblja stanična stijenka omogućuje bakterijama da se prilagode i prežive ekstremne ili nepovoljne uvjete [390]. Bakterije postoje na kiselinu su one Gram-pozitivne bakterije čije stanične stijenke sadrže visok sadržaj lipida koji je lipoidna kapsula velike molekulske mase i voskasta je na sobnoj temperaturi [391]. Nadalje, bojanje po Schaffer-Fulton omogućuje vizualizaciju spora koje bakterijama omogućavaju otpornost na različite onečišćujuće tvari i uvjete [392]. Endospore se od crvenih vegetativnih stanica (prema uporabi kontrastnog bojila safranina) razlikuju po zelenoj boji. Bakterije izolirane iz aktivnog mulja i komposta formiraju endospore prema bojanju po Schaeffer-Fulton. Svi ispitivani izolati (I1-I7) imali su sposobnost stvaranja endospora, osim izolata I8 i I9. Bakterijske endospore su višeslojna struktura koja omogućava bakterijama prilagodbu i preživljavanje u različitim uvjetima, kao što su izloženost povišenim temperaturama, nedostatak hranjivih tvari, zračenje, UV svjetlo, prisutnost toksičnih onečišćujućih tvari za stanice, isušivanje i drugo [393]. Sposobnost stvaranja spora za bakterije je izuzetno značajna, posebice u okolišnim uvjetima, zbog mogućnosti dugog preživljavanja u ekstremnim uvjetima. Međutim, posljednje bojenje koje je korišteno, bilo je negativno bojanje. Ovo je bojanje indikator da li bakterije mogu stvarati kapsulu koja predstavlja obrambenu barijeru [389]. One bakterije koje formiraju kapsulu poprimaju plavu boju na crnoj pozadini. Prema negativnom bojenju, izolati I1-I6 bili su varijabilni za određivanje kapsule jer su nakon bojenja uočene plave i bezbojne stanice. Izolati I7, I8 i I9 ne tvore kapsulu. Važno je napomenuti da na formiranje kapsule uvjeti rasta imaju značajan utjecaj [394]. Prema ispitivanju pokretljivosti polučvrstim agarom i tehnikom uboda, izolati I1-I9 su pokretljivi (tablica 22). Pokretljivost je važno svojstvo za bakterije koje im je omogućeno zahvaljujući bičevima (flagelama). Omogućuje bakterijama prelazak iz nepovoljnog u povoljno okruženje [437]. Daljnji testovi korišteni u svrhu identifikacije bakterija, bili su biokemijski testovi koji su korisni za istraživanje enzimatskog sastava bakterija. Rezultati ovih

testova navedeni su u tablici 22. Katalaza je enzim koji bakterijama omogućuje otpornost na H₂O₂, enzim oksidaza brani stanicu od oksidativnog stresa, a nitrat-reduktaza ukazuje na redukciju nitrata do nitrita. Enzimi su ključni čimbenici biokemijskih reakcija i omogućuju mikroorganizmima razgradnju onečišćujućih tvari. Završni korak identifikacije bakterija bila je MALDI-TOF/MS analiza (tablica 21) koja se temelji na identifikaciji proteina pulsirajućih pojedinačnih ionskih analita (čista mikrobna kultura), zajedno s TOF mjernim analizatorom mase i utvrđuje se točna masa proteina [395]. Najviše bakterija bile su roda *Bacillus* koje su Gram-pozitivne, štapićaste, pokretljive bakterije koje se mogu povezivati u parovima ili lancima, stvaraju spore i zahvaljujući tome te bakterije mogu preživjeti i prilagoditi se različitim uvjetima [396]. Kružna kolonija s hrapavim, neprozirnim, mutno bijelim ili blago žutim i neravnim rubovima uočena je uzgojem *Bacillus-a* na Petrijevim zdjelicama s hranjivim agarom, što je u skladu s rezultatima u ovome doktorskom radu [397]. Bakterije roda *Bacillus* primjenjive su u razne svrhe, kao što su proizvodnja industrijskih enzima, bioinsekticida, antibiotika i drugih s primjenom u industriji, poljoprivredi i medicini [397]. Bakterije mogu biti izolirane iz različitih uzoraka, a Park i Kim [306] su izolirali *Bacillus* sp. i *Paenibacillus* sp. iz sedimenta gradskog odlagališta. Rodovi bakterija *Lysinibacillus* i *Bacillus cereus* izolirani su iz otpadne vode i aktivnog mulja, što je u skladu s ovim radom [398]. Međutim, iz miješanog komunalnog otpada izolirani su rodovi bakterija *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum* i *Lactobacillus* [399].

Rezultati identifikacije plijesni prikazani su na slici 33. Identifikacija plijesni, izolata I9-I14 (tablica 22), provedena je proučavanjem morfoloških karakteristika stanica pod svjetlosnim mikroskopom primjenom postupaka definiranih u literaturi [358]. Plijesni su uzgajane na sladnom (malt) agaru pri čemu su kolonije I10 bile sivkasto zelene, hrapave s bijelim središtem; I11 su bile crne kolonije s arahnoidnom strukturom; I12 su bile zelenkaste s bijelom arahnoidnom strukturom i široko rasprostranjenom kolonijom; za I13 uočene su sivkaste kolonije sa crnim središtem; I14 kolonije bile su sivkasto zelene, okrugle konfiguracije s bijelim središtem; a za I15 crne kolonije uočena je arahnoidna struktura s bijelim središtem. Mikroskopiranjem nativnih preparata uočena je sljedeća morfologija stanica: I10 ili *Aspergillus fumigatus* karakteriziran je septiranim hifama i crnom glavicom; I11 ili *Aspergillus niger* imao je neseptirane hife, crne spore i zrakastu glavicu iz koje se zrakasto šire spore; I12 ili *Trichoderma* sp. ima septirane hife i glavicu u obliku cvijeta; za I13 ili *Rhizopus* sp. uočeni su lažni korjenčići,

neseptirane hife i glavica u obliku luka; I14 je identificiran kao *Penicillium* sp. zbog septiranih hifa i glavice u obliku metlice; i I15 je imao specifične konidije i septirane hife za *Alternaria* sp. Prema Parku i Kimu [306], pet sojeva gljiva izolirano je iz tla u kojem su bili dodani LDPE filmovi. Četiri od njih bili su *Aspergillus* sp., a jedan je bio *Fusarium* sp. Nadalje, iz komunalnog krutog otpada izolirani su *Aspergillus* sp., *Frankia* sp., *Streptomyces* sp., *Trichoderma* sp. i *Penicillium* sp. [399]. Nadalje, iz sedimenta je i izoliran kvasac, izolat I16 (tablica 22). Na sladnom (malt) agaru kolonije kvasca bile su bijele, kremaste, sjajne i vrlo male s okruglom konfiguracijom, slika 33G. Nativni je preparat proučavan svjetlosnim mikroskopom u svrhu određivanja stanične morfologije kvasca; stanice su bile ovalne ili okrugle s pseudohifama. Druga vrsta API-ja korištena u ovome doktorskome radu bila je API 20 C aux za identifikaciju kvasca. Nakon pripreme suspenzije, inokulira se ista u jažice i inkubira 72 h pri 28 °C. Rezultati su očitani prema zamućenju inokulirane suspenzije. *Candida parapsilosis* identificirana je s 99,7 % vjerojatnosti, a identifikacija je potvrđena MALDI-TOF/MS analizom. Ovaj patogeni kvasac može se izolirati iz ljudske kože, tla i morskog okoliša [400]. Ova vrsta *Candide* bogata je raznim izvanstaničnim enzimima pomoću kojih je sposobna razgraditi velike makromolekule na manje [401], što *Candidu parapsilosis* čini pogodnom za biorazgradnju polimernih materijala.

5.3 Pokusi biorazgradnje mikroplastika primjenom bakterija

5.3.1 Preliminarni pokus biorazgradnje

U preliminarnim pokusima ispitano je 7 čimbenika (pH, T , veličina MP-a, γ_{MP} , brzina okretaja, OG i γ_{GLU}) na dvije razine osmišljene prema Taguchi dizajnu (tablica 15). Prema parametru odziva, log CFU, (tablica 23), statistički značajni čimbenici za biorazgradnju PS-a primjenom *Bacillus cereus* bili su veličina MP (48,52 %), γ_{MP} (5,03 %) i broj okretaja (41,31 %). Za biorazgradnju PVC-a primjenom iste Gram-pozitivne bakterije, kao značajni čimbenici su ispali veličina MP (43,45 %), γ_{MP} (35,34 %) i OG (14,54 %) (tablica 23). Dakle, prema postotku značajnosti najveći utjecaj na biorazgradnju PS-a primjenom *Bacillus cereus* imale su veličina PS čestica i brzina okretaja rotacijske tresilice. U slučaju PVC-a, postotak značajnosti bio je viši za veličinu PVC čestica i γ_{MP} uz nešto niži postotak za OG. Nadalje, veličina MP (5,20 %), brzina okretaja (4,06 %) i OG (81,41 %) su se pokazali značajnim čimbenicima za biorazgradnju PS čestica primjenom *Bacillus subtilis*, dok su za PVC to bili pH (4,20 %), brzina okretaja (2,60 %) i OG (92,56 %) (tablica 23). S obzirom na navedeno, može se istaknuti da je OG bila

najznačajniji čimbenik za biorazgradnju i PS i PVC čestica primjenom *Bacillus subtilis*. Prema tablici 23, značajni čimbenici za biorazgradnju PS-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes* bili su broj okretaja (53,42 %), veličina PS čestica (14,48 %) i OG (13,91 %). Međutim, brzina okretaja i veličina PS-a imali su veći utjecaj na proces biorazgradnje zbog viših postotaka značajnosti. Što se tiče biorazgradnje PVC-a primjenom ove Gram-negativne bakterije, značajni su ispali sljedeći čimbenici: pH (22,20 %), γ_{MP} (28,69 %) i OG (44,14 %). Dakle, prema najvišem postotku značajnosti, OG je najviše utjecala na biorazgradnju PVC-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes*. Konačno, pH (9,44 %), brzina okretaja (40,24 %) i OG (14,62 %) bili su značajni za biorazgradnju PS-a, ali i za biorazgradnju PVC-a: pH (10,45 %), brzina okretaja (68,11 %) i OG (17,50 %), primjenom *Delftia acidovorans* (tablica 23). U oba se slučaja može uočiti da je najviši postotak značajnosti ispao za broj okretaja, čime je najviše utjecao na proces biorazgradnje.

Da je veličina MP-a bila značajni čimbenik za proces biorazgradnje MP-a primjenom bakterija, nije iznenađujuće jer čestice manje veličine imaju veću aktivnu površinu. Navedeno pridonosi kolonizaciji bakterija na površinu MP čestica, a kolonizacija (stvaranje biofilma) se smatra prvim nužnim korakom za biorazgradnju [44]. Da bi se kolonizacija bakterija na površinu MP čestica dogodila, potrebno je osigurati kontakt između supstrata (u ovome slučaju MP čestica) i bakterija. Navedno je moguće ostvariti dinamičnim uvjetima provedbe pokusa. Naime, broj okretaja rotacijske tresilice je važno za osiguranje koncentracije otopljenog kisika u sustavu, ali također omogućuje i homogenizaciju suspenzije i poboljšava biorasplošnost (dostupnost) MP čestica bakterijama. Dakle, brojem okretaja održava se koncentracija otopljenog kisika u sustavu, koja je neophodna za odvijanje biokemijskih reakcija [402], a istovremeno doprinosi kontaktu između supstrata i bakterija. Dodatno, povišena koncentracija kisika ubrzava razgradnju polimera s obzirom da se oksidacijom narušava stabilnost njegove strukture [403]. Prema potrebi za kisikom, *Bacillus cereus* je fakultativni anaerob, što znači da se može prilagoditi na uvjeta sa i bez prisutnosti kisika te čak rasti i u anoksičnim uvjetima [404]. Za razliku od ove Gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* su striktno aerobne bakterije, što označava da je koncentracija otopljenog kisika nužna za njihov rast [334,405,406]. U takvim uvjetima, bakterije mogu lučiti izvanstanične enzime koji su ključni za biorazgradnju, odnosno odvijanje biokemijskih reakcija. Na ove reakcije utječe i pH medija, koja inače ima utjecaj na rast i razmnožavanje mikroorganizama. Generalno, bakterijama za rast pogoduje neutralno pH područje, dok plijesnima i kvascima slabo kiselo područje. Naime, kiseli

uvjeti nisu pogodni za bakterije jer mogu uzrokovati oštećenje bakterijskih stanica [407]. Nadalje, promjene pH utječu na električni naboj kemijskih grupa u enzimima, odnosno uvjeti visoke kiselosti i lužnatosti mogu poremetiti ravnotežu električnog naboja enzima [407]. Dakle, da bi se ostvarila visoka učinkovitost biorazgradnje potrebno je da se enzim veže na supstrat i ubrza reakciju, što je moguće unutar optimalnog pH područja ovisno o mikroorganizmu. Međutim, prisutnost viših koncentracija MP-a može negativno utjecati na proces biorazgradnje zbog njihovog mogućeg ekotoksičnog učinka [408]. Prema rezultatima testova toksičnosti, povišenjem MP koncentracije, rastao je i ekotoksični utjecaj na testne organizme (slike 27 – 30). No Gram-pozitivne bakterije (*Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis*) imaju sposobnost stvaranja endospora koje ih čine otpornima na ekstremne uvjete i omogućuju im rast, prilagodljivost i preživljavanje na različite uvjete okoliša [404,405]. *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* su bakterije koje imaju vrlo bogat enzimatski sustav što ih čini, također, prilagodljivima na različite uvjete, ali i prikladnima za primjenu u bioremedijacijske svrhe [409,410]. Osim toga, OG je čimbenik pomoću kojeg se prati broj mikroorganizama. Predstavlja broj živih i mrtvih bakterijskih stanica te je koristan i tehnički jednostavno izvediv parametar. Veća vrijednost OG označava veći broj bakterijskih stanica, međutim bolji pokazatelj rasta bakterija se dobiva preko određivanja CFU vrijednosti. Viša OG upućuje na višu CFU vrijednost, što upućuje na veću „koncentraciju“ bakterija u ispitivanome sustavu. Ovako se posljedično povećava i učinkovitost procesa biorazgradnje.

5.3.2 Glavni pokus biorazgradnje

S obzirom na rezultate preliminarnih pokusa, dobivena su tri značajna čimbenika za svaku vrstu MP-a i za svaku bakteriju. Optimalni uvjeti za biorazgradnju PS-a određeni su iz glavnih pokusa G1–8, G2–13, G3–13 i G4–10, te za biorazgradnju PVC-a iz pokusa G11–13, G22–18, G33–10 i G44–18, redom za *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Svi rezultati koji slijede bit će dani za prethodno navedene glavne pokuse biorazgradnje koji odgovaraju određenim optimalnim uvjetima biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom navedenih bakterija.

Praćenje ukupnog broja živih stanica bakterija tijekom pokusa biorazgradnje

Za praćenje rasta bakterija, CFU je određivan tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PS-a primjenom bakterija (slika 33). Na slici 33A se uočava da je CFU, kao broj živih bakterijskih stanica, rastao do 7. dana za *Bacillus cereus* nakon čega se vrijednosti nisu značajno mijenjale. CFU za *Bacillus cereus* (pokus G1–8) porastao je s početne vrijednosti $9,3 \cdot 10^6$ st/mL na $3,2 \cdot 10^7$ st/mL u 7. danu. Nadalje, CFU vrijednosti za *Bacillus subtilis* (slika 33B) su rasle do 3. dana, a zatim se nisu značajno mijenjale (iako se blagi pad može uočiti u 7. danu uz daljni rast vrijednosti). Početni CFU u pokusu G2–13 je iznosio $1,6 \cdot 10^7$ st/mL, a u trećem danu je vrijednost CFU porasla na $3,7 \cdot 10^7$ st/mL. Veći porast CFU u odnosu na CFU vrijednosti za *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis* (čak za jednu potenciju) primijećen je u pokusu G3–13 (slika 33C) za *Pseudomonas alcaligenes* (od početnog CFU od $6,5 \cdot 10^7$ st/mL do $2,3 \cdot 10^8$ st/mL postignutog u 14. danu). U pokusu G4–10 s *Delftia acidovorans* početni CFU iznosio je $1,0 \cdot 10^9$ st/mL, nakon čega se uočava porast CFU vrijednosti na $1,6 \cdot 10^9$ st/mL u 7. danu (slika 33D). Daljnje su CFU vrijednosti stagnirale. Dakle, nakon eksponencijalne faze rasta bakterija nastupila je stacionarna faza (slika 33) u kojoj je broj živih i mrtvih bakterijskih stanica jednak. Eksponencijalna faza rasta za *Bacillus cereus* i *Delftia acidovorans* je trajala do 7. dana. Najkraće je trajala u pokusu s *Bacillus subtilis* (do 3. dana), dok je za *Pseudomonas alcaligenes* ova faza rasta uočena do 14. dana (slika 33C). Posljednjeg dana (30. dana) pokusa, CFU je bio $2,2 \cdot 10^7$ st/mL, $4,2 \cdot 10^7$ st/mL, $2,8 \cdot 10^8$ st/mL i $6,9 \cdot 10^8$ st/mL redom za *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Prema navedenome, uočava se porast CFU vrijednosti, što upućuje da su ispitivani uvjeti bili povoljni za rast i razmnožavanje bakterija. Usporedbom CFU vrijednosti za kontrolu s onima koji su sadržavali PS može se uočiti da su vrijednosti kontrole bile niže, dok je najveća razlika primijećena za pokus s *Delftia acidovorans*. U ovome je pokusu CFU za kontrolu u 30. danu iznosio $3,2 \cdot 10^7$ st/mL, što je u odnosu na CFU u istome danu postignutom za PS pad za jedan red veličine. Ovo označava da je u kontroli došlo do odumiranja bakterije s obzirom na nedostatak hranjivih tvari i izvora ugljika. Dakle, bakterije su se prilagodile uvjetima s PS-om i koristile su PS kao izvor ugljika i energije. Ovu sposobnost bakterija iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* istraživali su i drugi znanstvenici [34,140,291,309].

CFU je određivan tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PVC-a primjenom bakterija (slika 34). Na slici 34A uočava se da je CFU porastao s početne vrijednosti $8,7 \cdot 10^6$ st/mL na $5,0 \cdot 10^7$ st/mL u 7. danu za *Bacillus cereus* (pokus G11–13). Daljnje se vrijednosti nisu

značajno mijenjale, a CFU u uzorcima s PVC-om su za sve dane bile više u odnosu na CFU u kontroli. CFU vrijednosti za *Bacillus subtilis* rasle su do 14. dana (slika 34B). Početni CFU u ovome je pokusu (G22–18) iznosio $5,0 \cdot 10^6$ st/mL, dok je u 14. danu uočen porast za dvije potenciju na $1,5 \cdot 10^8$ st/mL. Veće razlike između CFU za PVC i kontrolu mogu se uočiti u 14., 21. i 30. danu. Slika 34C prikazuje promjene CFU za *Pseudomonas alcaligenes* tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PVC-a. Početni CFU u ovome pokusu (G33–10) bio je $2,0 \cdot 10^7$ st/mL, a već je u 3. danu porastao na $1,8 \cdot 10^8$ st/mL. Vrijednosti za ostale dane se nisu značajno mijenjale. U pokusu G44–18 s *Delftia acidovorans* početni CFU je iznosio $8,7 \cdot 10^6$ st/mL, a porast se također uočava u 3. danu kada je iznosio $2,8 \cdot 10^8$ st/mL (slika 34D). S obzirom na opisano, uočene su promjene u rastu ukupnog broja stanica bakterija, odnosno faze rasta bakterija. Prvotna faza rasta u kojoj je uočen rast CFU je eksponencijalna faza rasta nakon koje je nastupila stacionarna faza (slika 34) u kojoj broj živih i mrtvih stanica bakterija je jednak. Dakle, eksponencijalna faza rasta za *Bacillus cereus* je trajala do 7. dana, za *Bacillus subtilis* do 14. dana, a do 3. dana za pokuse s *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* (slika 34). S obzirom da je najveći rast bakterija karakterističan za eksponencijalnu fazu rasta, poželjno je dulje trajanje ove faze. Time se i potvrđuje da su ispitivane bakterije bile prilagođene na izloženost PVC česticama, kao i da su iskorištavale PVC kao supstrat. Visoke vrijednosti CFU uočene su i u 30. danu ($3,2 \cdot 10^7$ st/mL, $2,1 \cdot 10^8$ st/mL, $8,4 \cdot 10^7$ st/mL i $1,6 \cdot 10^8$ st/mL redom za *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*). Ovo potvrđuje da se liziranje (raspad) bakterijskih stanica nije dogodio. Dodatna potvrda ovoj tvrdnji su i niže CFU vrijednosti za kontrole u odnosu na CFU vrijednosti za uzorke s PVC česticama. Najveća razlika između ovih CFU vrijednosti se može uočiti za pokus s *Pseudomonas alcaligenes*.

Općenito, tijekom procesa biorazgradnje moguća je izmjena četiri faze rasta bakterija, tj. lag faza ili faza prilagodbe, log faza ili eksponencijalna faza rasta, stacionarna faza i faza odumiranja. U lag fazi organizmi se ne povećavaju značajnije u broju, ali su metabolički aktivni. Tijekom ove faze, pojedinačni organizmi se povećavaju u veličini i proizvode velike količine energije u obliku adenzin trifosfata, ATP [389]. Duljina lag faze određena je karakteristikama bakterije, vrstom i koncentracijom onečišćujuće tvari te uvjetima u sustavu. Dosadašnja praksa za pokuse biorazgradnje je preduzgoj bakterija sa svrhom ubrzanja faze prilagodbe i postizanja eksponencijalne faze rasta [309]. Log faza rasta je najvažnija faza u procesu biorazgradnje zato

što ukazuje da li mikroorganizmi koriste onečišćujuću tvar (u ovome slučaju MP) kao izvor ugljika i energije. Tijekom log faze, mikroorganizmi se najbrže dijele, ovisno o generacijskom vremenu (koje je za većinu bakterija kraće od 1 h). Kako se broj mikroorganizama povećava, koncentracija supstrata se smanjuje i nastaje sve više produkata metabolizma. Kako se dostupnost supstrata smanjuje, stanice postaju sve manje sposobne stvarati ATP, pa se njihova stopa rasta smanjuje. Budući da MP nije lako dostupan izvor ugljika za mikroorganizme, log faza rasta neće biti izrazito primjetna. Broj stanica će se najvjerojatnije povećati samo za jedan red veličine. Nadalje, stacionarna faza rasta bakterija je postignuta kada nove stanice nastaju istom brzinom kao što stare stanice umiru, i tada je broj živih stanica bakterija konstantan. U ovoj fazi rasta je ograničena količina hranjivih tvari, mogu nastati nusprodukti koji mogu djelovati inhibicijski, opskrba kisikom može postati nedovoljna za aerobne organizme te može doći do značajnih promjena pH. Može se pretpostaviti da će stacionarna faza rasta tijekom biorazgradnje MP primjenom bakterija trajati najdulje od spomenute četiri faze rasta. Nakon stacionarne faze rasta nastupa faza odumiranja, koja nije poželjna faza rasta tijekom biorazgradnje. U ovoj fazi rasta, broj živih stanica opada logaritamskom brzinom, a njeno trajanje ovisi prvenstveno o genetskim karakteristikama mikroorganizma. Sukladno navedenome, ispitivani su uvjeti bili povoljni za rast i razmnožavanje bakterija zbog nastajanja mogućih produkata biorazgradnje i/ili otpuštenih aditiva s površine MP čestica. Osim toga, vrijednosti CFU za kontrolu bile su niže u usporedbi s onima koji su sadržavali PS i PVC, što upućuje da su se bakterije prilagodile uvjetima s PS-om i PVC-om, da nije došlo do liziranja stanica u tim sustavima i da su bakterije iskorištavale PS i PVC kao izvor ugljika i energije.

Praćenje ukupne koncentracije ugljika tijekom pokusa biorazgradnje

Isti trend kao i za CFU primijećen je i za promjene TOC i TIC vrijednosti za vodene faze u pokusima s PS česticama (slika 35). Vrijednosti TOC/TIC rasle su do 7. dana, a nakon 7. dana do kraja pokusa vrijednosti TOC/TIC nisu se značajnije mijenjale za pokus G1–8 s *Bacillus cereus* (slika 35A). Ovo je u skladu s fazama rasta *Bacillus cereus* prikazanim na slici 33A. Za pokus G2–13 s *Bacillus subtilis* su visoke TOC vrijednosti uočene upravo u danima (21. i 30. danu) kada su postignute i više CFU vrijednosti (slike 33B i 35B). Ove promjene slijede i TIC vrijednosti, koje su također porasle u tim danima. Ovo upućuje da je biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus subtilis* bila najintenzivnija upravo u 21. i 30. danu. U eksperimentu G3–13,

vrijednosti TOC i TIC rasle su do 14. dana (slika 35C). Navedene promjene su u skladu s promjenama u CFU kod *Pseudomonas alcaligenes* tijekom 30 dana biorazgradnje PS-a (slika 33C). S obzirom na povišene TOC i TIC vrijednosti u 21. i 30. danu za pokus biorazgradnje PS MP-a primjenom bakterije *Delftia acidovorans* (G4–10) može se zaključiti da je u tim danima biorazgradnja bila najintenzivnija (slika 35D).

Isti trend kao i za CFU primijećen je i za promjene TOC i TIC vrijednosti za vodene faze u pokusima s PVC-om (slika 36). Vrijednosti TOC/TIC za pokus G11–13 s *Bacillus cereus* rasle su do 7. dana, a nakon toga se nisu značajnije mijenjale (slika 36A). Navedeno se slaže s fazama rasta *Bacillus cereus* prikazanim na slici 34A. Za pokus G22–18 s *Bacillus subtilis* postignute su najviše TOC i TIC vrijednosti u 14. danu, što se podudara s CFU vrijednosti (slike 34B i 36B). Dakle, biorazgradnja PVC-a primjenom *Bacillus subtilis* bila je najintenzivnija u 14. danu. U eksperimentu G33–10, vrijednosti TOC i TIC porasle su u 21. danu (slika 36C), kada se može primijetiti i porast CFU *Pseudomonas alcaligenes* (slika 34C). Naime, što je viši CFU, veći je i broj živih stanica bakterija te je intenzivnija biorazgradnja PVC čestica jer je prisutno više bakterija u sustavu koje mogu biorazgraditi PVC čestice. S obzirom na povišenje TOC i TIC vrijednosti u 21. danu za pokus biorazgradnje PVC-a (G44–18) primjenom *Delftia acidovorans*, može se uočiti da je u tom danu biorazgradnja bila najintenzivnija (slika 36D).

Međutim, uspoređujući TOC/TIC koncentracije za kontrolne uzorke, uočava se porast koncentracija u tim uzorcima. Ovo ukazuje na liziranje bakterijskih stanica [411]. Nadalje, u odnosu na kontrolu, TOC i TIC vrijednosti bile su više u uzorcima s PS i PVC česticama, što potvrđuje da su bakterije iskorištavale PS i PVC kao supstrat. Dakle, uslijed biorazgradnje se povećava CFU vrijednost, smanjuje se koncentracija supstrata (MP) i rastu TOC i TIC vrijednosti. Povećanje koncentracije TOC-a u uzorku može ukazivati na nastajanje produkata biorazgradnje i/ili oslobađanje aditiva s površine MP čestica. Povećanje koncentracije TOC-a u uzorku je u korelaciji s povećanjem koncentracije TIC-a, što potvrđuje da se biorazgradnja zbila [411]. Općenito, koncentracija TOC-a u onečišćenoj vodi se smanjuje tijekom biorazgradnje [412] uz porast TIC koncentracije. TIC upućuje na anorganski ugljik, odnosno na nastanak CO₂, koji je inače produkt mineralizacije [413]. Međutim, tijekom biorazgradnje vode koja sadrži MP čestice u čvrstom obliku, koncentracija TOC-a se ipak neće smanjiti uslijed otpuštanja aditiva i/ili sintetičkih polimernih aditiva iz plastičnih čestica. Ti se spojevi mogu mineralizirati u CO₂, što se odražava na povećanje vrijednosti TIC-a. Konačno, najviše TOC/TIC vrijednosti

primijećene su za pokuse *Delftia acidovorans* za PS i s *Pseudomonas alcaligenes* za PVC, što je u korelaciji s višim vrijednostima CFU za ove bakterije.

Procjena otpuštenih aditiva s površine MP čestica

Tijekom izlaganja *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* PS česticama, aditivi koji su dodani materijalu tijekom proizvodnje mogu se osloboditi u vodenu fazu i to je praćeno LC/MS analizom. Nakon provedbe pokusa biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus cereus* izdvojena je vodena faza (filtrat) za koju je provedena analiza u svrhu procjene otpuštenih aditiva s površine MP-a te potvrde da se iz istog razloga TOC vrijednosti povećavaju tijekom biorazgradnje. LC/MS analize vodene faze za pokus G1–8 (slika 37A) ukazuju na prisutnost $[M+H]^+$ iona na m/z omjeru od 328 koji može predstavljati trifetil fosfat, koji je usporivač plamena za plastiku [414]. Trifenil fosfat je uobičajeno korišteni komercijalni kemijski aditiv koji je klasificiran kao organofosfatni usporivač plamena i predstavlja potencijalni ekotoksični rizik za vodene organizme [415]. Nadalje, na m/z omjerima od 808, 983 i 1173 procijenjeni su deterdženti. Naime, oni nisu aditivi, ali se dodaju u PS emulzije radi mehaničke stabilnosti, na koju izravno utječe priroda i površinska koncentracija adsorbiranih ionskih deterdženata [416]. Sami po sebi deterdženti nisu štetni, no u svom kemijskom sastavu sadrže toksične kemikalije poput natrijeva lauril sulfata ili natrijeva lauret sulfata, koji su neurotoksični, izazivaju biokemijske i stanične promjene, mutacije, karcinom te ubrajaju se u skupinu tvari koji uzrokuju poremećaj endokrinog sustava [417]. Za vodenu fazu dobivenu nakon provedbe pokusa G2–13 biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis* uočeni su m/z omjeri na 107 i 151 koji imaju oblik iona $[A_2B+H]^+$ i $[A_3B+H]^+$, a upućuje na polietilen glikol [418] (slika 37B). On predstavlja mješavinu polimera koji su međusobno povezani. PE je najčešći oblik plastike, a u kombinaciji s glikolom postaje gusta i ljepljiva tekućina. Polietilen glikol se smatra sigurnim za korištenje za ljude i okoliš, no često izaziva alergijske reakcije kod ljudi, jer je prisutan u brojnim naizgled nepovezanim proizvodima poput prerađene hrane, kozmetike, lijekova i slično [419]. U pokusu G3–13, antioksidativni aditiv, butilirani hidroksitoluen, je procijenjen na m/z omjeru od 243 (slika 37C) u obliku $[M+Na]^+$ [414]. Butilirani hidroksitoluen, kao fenolni spoj, jedan je od čestih antioksidansa koji se koristi u svrhu zaštite plastike od oksidacije (tijekom njezine izloženosti toplini i svjetlu) [420]. Na slici 37D, za pokus G4–10, uočen je pik pri istom m/z omjeru, kao što je bio slučaj u slučaju pokusa

G1–8 primjenom *Bacillus cereus*. Dakle, na 328 je procijenjen usporivač plamena trifetil fosfat. Općenito, razni aditivi, kao što su antioksidansi, UV stabilizatori, procesna maziva, antistatici i usporivači plamena, mogu se dodati PS-u tijekom proizvodnje [63,421]. Ovi spojevi poboljšavaju svojstva PS-a, no uzrokuju veliku ekotoksikološku zabrinutost za okoliš.

Tijekom izlaganja kultura *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* PVC mikročesticama, moguće je da je došlo do otpuštanja aditiva s površine PVC čestica u vodenu fazu. Na slici 38A uočen je sljedeći m/z omjer na 170. Pik na m/z omjeru 170 ima strukturu iona $[f+Na]^+$ te pripada skupini ftalatnih estera, odnosno predstavlja ftalni anhidrid i identificiran je kao plastifikator [414]. Primarna upotreba ftalnog anhidrida je prekursor ftalatnih estera, koji se koriste kao plastifikatori u vinil kloridu. Nadalje, važna je organska kemijska sirovina, a u industriji sintetičkih smola koristi se za proizvodnju poliesterske smole, amino smole, nezasićene poliesterske smole, alkidne smole, i brojnim drugim primjenama. Na slici 38B (pokus G22–18) primijećen je m/z omjer na 243 u obliku $[M+Na]^+$, koji upućuje na antioksidans butilirani hidroksitoluen [414]. U pokusu G33–10, (slika 38C), procijenjen je m/z omjer na 311, koji ukazuje na di(2-etoksietil) ftalat [422]. Zbog svojih odgovarajućih svojstava i niske cijene, ovaj se ftalat naširoko koristi kao plastifikator u proizvodnji PVC proizvoda. Za pokus G44–18, m/z omjeri su bili na 259, 391 i 447. U istom obliku iona $[M+H]^+$, na 259 je procijenjen dibutil adipat, na 391 di(2-etilheksil) ftalat, dok na 447 diizodecil ftalat [423]. Dibutil adipat se koristiti kao plastifikator za proizvodnju smjese s PVC-om, koji tvori elektroaktivne materijale tipa mekog gela za meke robotske aktuatora i adaptivne leće. Također se može koristiti za plastificiranje poliuretanskih gelova za potencijalnu upotrebu u biomedicinske svrhe. Di(2-etilheksil) ftalat vrlo je koristan ftalat koji djeluje kao plastifikator za poboljšanje fleksibilnosti i obradivosti medicinske opreme na bazi PVC, kao što su cijevi i vrećice koje se koriste za prikupljanje krvi i transfuziju [424]. Diizodecil ftalat je često korišteni plastifikator u proizvodnji plastike i plastičnih premaza za povećanje fleksibilnosti [423]. Predstavlja mješavinu spojeva dobivenih esterifikacijom ftalne kiseline i izomernih decilnih alkohola. Premazi na namještaju, posuđe za kuhanje, farmaceutske tablete, omoti za hranu i mnogi drugi proizvodi, mogu sadržavati ovaj ftalat. Nedavno se u SAD-u i Europskoj uniji pojavila zabrinutost zbog njegove bioakumulacije i ekotoksičnosti.

Ekotoksičnost vodene faze dobivene nakon pokusa biorazgradnje

Ispitivanje ekotoksičnosti vodenih faza (filtrata) dobivenih nakon provedbe pokusa biorazgradnje primjenom *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* provedeno je prema testu toksičnosti s *Vibrio fischeri*. Rezultati za pokuse G1–G4 te G11–G44 prikazani su u tablici 24. Za pokus G1–8, koji je obuhvaćao provedbu biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus cereus*, dobivena je INH od 36,60 %. Uspoređujući vrijednosti inhibicije za pokuse s PS-om i PVC-om nakon biorazgradnje primjenom bakterije *Bacillus cereus*, uočava se 1,29 puta veća vrijednost (47,15 %) za pokus s PVC-om. Ovo upućuje da su u vodenoj fazi bili prisutni otpušteni aditivi s površine PVC čestica, što se podudara s rezultatima TOC vrijednosti, koje su za ovaj pokus s PVC-om bile visoke (odnosno, više u odnosu na TOC vrijednosti za pokus s PS-om). Naime, posljednjih godina upotreba fosfatnih usporivača plamena značajno se povećala s postupnim ukidanjem bromiranih usporivača plamena [425]. Trifenil fosfat, organofosfatni usporivač plamena, koristi se u raznim potrošačkim proizvodima, uključujući elektroničke uređaje, plastiku, građevinske materijale i PUR pjene. Kao aditiv, ovaj usporivač plamena ne stvara kemijske veze s polimernim materijalima, te stoga može lako difundirati u okolna okruženja [425]. S obzirom na utvrđeni ekotoksični utjecaj ovoga aditiva na vodene organizme, čak i ljude, proučava se i njegova biorazgradnja. Do sada je izolirano samo nekoliko sojeva bakterija koji mogu razgraditi trifenil fosfat, uključujući *Roseobacter*, *Rhodococcus*, *Sphingopyxis*, *Sphingomonas*, *Sphingobium* [426]. Prema Wei i suradnici [425] Gram-pozitivna bakterija *Brevibacillus brevis*, koja je taksonomski slična *Bacillus* sp., ima sposobnost biorazgradnje trifenil fosfata. Dakle, ekotoksični utjecaj u pokusu s PS-om je niži zbog mogućnosti *Bacillus cereus*, također Gram-pozitivne bakterije, da se prilagodbi i/ili razgradi ovaj aditiv. Nadalje, putovi biorazgradnje plastifikatora estera ftalne kiseline u određenoj su mjeri karakterizirani za kopnene mikroorganizme. Predloženo je da prvi korak biorazgradnje plastifikatora estera ftalne kiseline provode enzimi esteraze hidrolizom bočnih lanaca uz nastajanje ftalata i kratkolančanih alkohola i masnih kiselina [427]. *Bacillus cereus* ima unutarstanični enzim esterazu [428], što ovu bakteriju čini prikladnom za biorazgradnju ovih plastifikatora. Dakle, veća ekotoksičnost koja je prema inhibiciji uočena za pokus s PVC-om moguća je uslijed biorazgradnje plastifikatora estera ftalne kiseline bakterijom *Bacillus cereus* te nastankom ekotoksičnijih nusprodukata od početne strukture.

Za pokus biorazgradnje MP-a primjenom *Bacillus subtilis* uočena je veća inhibicija za pokus s PVC-om (G22–18) u odnosu na pokus s PS-om (G2–13). Prema tablici 24, najviša

vrijednost inhibicije (53,54 %) bila je upravo za ovaj pokus s PVC-om. Naime, polietilen glikol, koji je procijenjen u pokusu s PS-om, se u najvećoj mjeri koristi za proizvodnju neionskih površinskih tvari. Polietilen glikol raznih molekulskih masa je povezan s fenilnom ili drugim aromatskim vezama u svrhu proizvodnje površinski aktivnih tvari. Od svih proizvedenih površinski aktivnih tvari, između 20 do 25 % sadrže neki oblik polietilen glikola [429]. S obzirom na procjenu ovoga spoja u vodenoj fazi dobivenu nakon provedbe biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus subtilis*, ne čude više TOC vrijednosti u ovome pokusu u odnosu na pokus s PVC mikročesticama. Naime, prema dosadašnjoj literaturi nije izvješteno da *Bacillus subtilis* ima sposobnost biorazgradnje polietilen glikola [429,430], no ovaj je spoj klasificiran kao netoksičan [431], što se slaže s niže dobivenom inhibicijom za ovu vodenu fazu; 1,38 puta je niža inhibicija vodene faze za pokus s PS-om u odnosu na pokus s PVC-om (tablica 24). Da je inhibicija vodene faze dobivene nakon pokusa biorazgradnje PVC-a primjenom bakterije *Bacillus subtilis* bila viša, nije začuđujuće jer je u istoj procijenjen butilirani hidroksitoluen, koji ima izrazitu ekotoksičnost, odnosno kancerogen je, teratogen i mutagen [432]. Najčešće je korišteni i preferirani sintetski fenolni antioksidans, koji obično čini 27 % plastike, zbog svojih odličnih antioksidacijskih svojstava [432].

Antioksidansi usporavaju ciklus oksidacije i sprječavaju gubitak čvrstoće, razgradnju ili promjenu boje plastike, no unatoč tome moguća je biorazgradnja antioksidansa primjenom bakterija. Medić i suradnici [433] proučavali su biorazgradnju antioksidansa 2,6-di-tert-butilfenola primjenom *Pseudomonas aeruginosa* i ustanovili visoku učinkovitost njegove biorazgradnje. Uzimajući u obzir da se bakterije roda *Pseudomonas* koriste u brojne bioremedijacijske svrhe za razne aromatske ugljikovodike, između ostalih i fenole [434], ne čudi da se *Pseudomonas alcaligenes* prilagodila na uvjete izloženosti aromatskim spojevima. Navedeno potvrđuju visoke TOC vrijednosti u pokusu G3–13 s PS-om, što se slaže s otpuštanjem aditiva s površine MP čestica, uz inhibiciju vodene faze od 46,79 %, prema testu toksičnosti s *Vibrio fischeri*. Naime, prisutnost aromatskih spojeva rezultira pojačanom regulacijom enzima za cijepanje aromatskog prstena kod *Pseudomonas* sp. Stoga se može zaključiti da bi se 2,6-di-tert-butilfenol, kao i butilirani hidroksitoluen tj. 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol, mogao razgraditi cijepanjem orto-prstena [433]. Dakle, TOC vrijednosti su se povećavale s obzirom na biorazgradnju otpuštenih aditiva s površine MP čestica uz nastanak raznih produkata razgradnje, koji su utjecali na ekotoksičnost vodene faze. Nadalje, dobivena je

skoro ista vrijednost inhibicije za vodene faze dobivenu nakon provedene biorazgradnje PVC čestica primjenom *Pseudomonas alcaligenes*, u odnosu na inhibiciju za pokus s PS-om. Bakterije roda *Pseudomonas* imaju sposobnost prilagodbe i biorazgradnje raznih ftalata [435], čime nastaju nusprodukti zaostali u vodenoj fazi, što se podudara s porastom TOC koncentracija.

Slične su vrijednosti inhibicija dobivene i za pokus primjenom *Delftia acidovorans*, 35,20 % za pokus s PS i 36,22 % za pokus PVC. Procijenjen aditiv za pokus s PS-om bio je trifenil fosfat, kojeg *Delftia* sp. može biorazgraditi [436]. U pokusu s PVC česticama, procijenjeni su ftalati. Di(2-etilheksil) ftalat može poboljšati fleksibilnost PVC proizvodima te se na široko koristi kao plastifikator za poboljšanje plastičnosti i čvrstoće plastike [437]. Budući da se di(2-etilheksil) ftalat ne veže kovalentno na polimer PVC-a i vrlo je hidrofoban, otpustit će iz plastike kada dođe u dodir s lipofilnim tekućinama, uzrokujući tako štetu okolišu i vodenim organizmima [437]. Nadalje, di(2-etilheksil) ftalat se također može bioakumulirati kroz hranidbeni lanac te na kraju dospjeti i do čovjeka, što može dovesti do zdravstvenih problema kod ljudi [481]. Prema tome je potrebno istraživati njihovu razgradnju, a bakterije roda *Delftia* (prethodno *Comamonas* ili *Pseudomonas*) su prikladan izbor [438].

Dakle, nakon otpuštanja aditiva s površine MP čestica, oni zaostaju u vodenoj fazi te su u kontaktu s bakterijama. Tako dolazi do biorazgradnje otpuštenih aditiva u vodenoj fazi i moguće je da nastanu i neki ekotoksični međuprodukti te biorazgradnje [37,438], što je posljedično uzrokovalo veći ekotoksični utjecaj na *Vibrio fischeri*. Općenito, što je niža inhibicija vodene faze, to označava da se odvila učinkovitija biorazgradnja [439]. Nadalje, uspoređujući sve vrijednosti inhibicija, više su vrijednosti dobivene za pokuse s PVC česticama za sve četiri bakterije, u odnosu na vrijednosti dobivene za pokuse s PS-om. Vrijednosti inhibicija za sve pokuse s PS česticama su bile približno jednake (tablica 24). Ovo je moguće objasniti s obzirom na strukturu PS-a i PVC-a. PS sadrži aromatski prsten te tako može biti manje biodostupan bakterijama, dok struktura PVC-a ne sadrži aromatski prsten. Nadalje, više vrijednosti inhibicija ukazuje na višu ekotoksičnost ispitivanoga uzorka, dok niže EC_{20}/EC_{50} vrijednosti upućuju na veću ekotoksičnost uzorka. Međutim, dobivene vrijednosti ekotoksičnosti su relativno niske te iz toga razloga nije bilo moguće procijeniti EC_{50} vrijednosti, osim za pokus s PVC uz *Bacillus subtilis*.

Analiza MP čestica FTIR-ATR spektroskopijom

U svrhu potvrde biorazgradnje PS i PVC čestica, čestice su nakon provedenih pokusa okarakterizirane FTIR-ATR spektroskopijom. Karakteristični vrhovi za PS su na valnim brojevima: 3024 cm^{-1} , 2847 cm^{-1} , 1601 cm^{-1} , 1492 cm^{-1} , 1451 cm^{-1} , 1027 cm^{-1} i 694 cm^{-1} [147], kao što je prikazano na slici 39. Valni broj od 3024 cm^{-1} specifičan je za rastezanje aromatskih C–H skupina, a 2847 cm^{-1} za rastezanje ostalih C–H skupina. Rastezanje aromatskog prstena uočava se na 1601 cm^{-1} i 1492 cm^{-1} . Svijanje CH_2 skupine karakteristično je na 1451 cm^{-1} , a svijanje aromatskih C–H skupina na 1027 cm^{-1} i 694 cm^{-1} . Zadnji vrh na 537 cm^{-1} pripada izvanravnom svijanju aromatskog prstena [147]. Intenziteti navedenih karakterističnih vrhova za PS nakon postupka biorazgradnje bakterijom *Bacillus cereus* (G1–8; crvena linija na slici 39A) bili su niži u usporedbi s intenzitetima vrhova netretiranog PS-a (zelena linija na slici 39A). Štoviše, može se uočiti značajnije smanjenje intenziteta vrhova koji odgovaraju aromatskom C–H izvanravnom svijanju i izvanravnom svijanju aromatskog prstena. Uočen je vrh vrlo slabog intenziteta u području od 3500 do 3000 cm^{-1} , koji odgovara rastezanju C–H skupine [440]. Primijećeno je smanjenje vrha za PS (crvena linija, slika 39A) u rasponu valnih brojeva $2500 - 2000\text{ cm}^{-1}$ u odnosu na početni PS, koji odgovara rastezanju C–H skupine [440]. Potpuni nestanak vrha vidljiv je u području od 1000 do 750 cm^{-1} , koji predstavlja rastezanje C–H skupine. Nadalje, u slučaju biorazgradnje PS čestica primjenom *Bacillus subtilis* (G2–13), prema slici 39B se također može uočiti smanjenje intenziteta za karakteristične vrhove PS-a usporedno s početnim PS spektrom. Primijećeno je i povećanje vrha u rasponu $1500 - 1700\text{ cm}^{-1}$ (otprilike na oko 1640 cm^{-1}), koji upućuje na rastezanje C=C skupine. Novi je vrh uočen oko 1500 cm^{-1} (na oko 1542 cm^{-1}) koji pripada C–C skupini [440]. Kao što je spomenuto za FTIR spektar za *Bacillus cereus*, novi vrh vrlo slabog intenziteta je vidljiv u području od 3500 do 3000 cm^{-1} te je vrh od 1000 do 750 cm^{-1} nestao. Na slici 39C za PS čestice nakon biorazgradnje primjenom *Pseudomonas alcaligenes* (G3–13), intenzitet karakterističnih vrhova PS-a bio je niži nego za početni PS. Novi vrh jačeg intenziteta, koji odgovara rastezanju C–H skupine, vidljiv je od 3500 do 3000 cm^{-1} . Karakteristični vrh slabijeg intenziteta uočen je na oko 1715 cm^{-1} , što ukazuje na stvaranje karbonilnih skupina ($-\text{C}=\text{O}$) tijekom PS razgradnje, te je pokazatelj biorazgradnje PS [382]. U slučaju biorazgradnje PS čestica primjenom *Delftia acidovorans* (G4–10) uočene su najviše promjena u PS strukturi (slika 39D). Naime, novi vrh jačeg intenziteta je uočen od 3500 do 3000 cm^{-1} , te je vrh u rasponu $2500 - 2000\text{ cm}^{-1}$ nestao. Vrh na oko 1715 cm^{-1}

¹ se može uočiti, ali je slabijeg intenziteta. Novi pik vrlo jakog intenziteta je vidljiv na oko 1636 ili 1643 cm^{-1} i upućuje na rastezanje C=C skupine. Također, novi je vrh vidljiv na oko 1542 cm^{-1} , koji odgovara C–C skupini. Nadalje, primijećeno je povećanje vrha pri 1448 – 1445 cm^{-1} , koji ukazuje na rastezanje CH₂ i C=C skupina [440]. Još jedan novi pik se može uočiti na oko 1395 cm^{-1} i to jakog intenziteta. Navedeni pik upućuje na rastezanje C–H skupine. U rasponu od 1396 do 1027 cm^{-1} , uočeno je povećanje za dva vrha u odnosu na PS početni, koja najvjerojatnije ukazuju na rastezanje C–H skupine. Na istu skupinu upućuje i pik na oko 877 cm^{-1} , za koji se također može uočiti jaki intenzitet. Kao i za ostale bakterije, potpuni nestanak vrha vidljiv je u području od 1000 do 877 (750) cm^{-1} . Za pik (pri 537 cm^{-1}), koji predstavlja izvanravniško svijanje aromatskog prstena, je uočeno vrlo slabo povećanje u odnosu na intenzitet vrha za početni PS spektar. S obzirom na navedeno, može se zaključiti da se biorazgradnja PS čestica primjenom bakterija odvila, odnosno da je došlo do narušavanja PS strukture.

Karakteristični vrhovi za PVC su na 1427, 1331, 1255, 1099, 966 i 616 cm^{-1} [147]; slika 40. Dolazi do svijanja CH₂ skupine pri 1427 cm^{-1} , a pri valnim brojevima od 1331 cm^{-1} dolazi do svijanja CH skupina od 1255 cm^{-1} . C–C rastezanje događa se na 1099 cm^{-1} , a C–Cl rastezanje na 616 cm^{-1} . Njihanje CH₂ odvija se na 966 cm^{-1} [70,147]. Prema FTIR spektru na slici 40A, uočava se da su karakteristični vrhovi PVC-a smanjeni u odnosu na početni PVC. Primijećen je široki vrh u rasponu od 2500 – 3300 cm^{-1} , što odgovara rastezanju OH skupine. Pojava ovog vrha može značiti da je došlo do biorazgradnje. Osim toga, pojavio se novi vrh na 1645 cm^{-1} . Vrhovi u ovom rasponu uglavnom se odnose na C=C rastezanje alkena, što je potvrda da se odvijalo narušavanje PVC strukture biorazgradnjom primjenom *Bacillus cereus*. U slučaju biorazgradnje PVC čestica primjenom *Bacillus subtilis*, uočeno je više promjena u FTIR spektrima (slika 40B). Naime, novi vrh, iako slabijeg intenziteta, je nastao u rasponu valnih brojeva 3500 – 3300 cm^{-1} , koji upućuje na nastanak hidroksilne skupine [311,441]. U području od 2500 do 2000 cm^{-1} primijećena su nova dva vrha. Dodatna dva vrha su nastala u rasponu od 1550 do 1650 cm^{-1} , što upućuje na C=C skupinu, kao i na mogućnost ove bakterije da biorazgrađuje PVC oksidacijskim putem [311]. Nadalje, dva vrha u područjima redom od 1500 do 1300 cm^{-1} te od 1300 do 1000 cm^{-1} su nestala, dok je značajno smanjenje primijećeno za vrh u području od 750 do 500 cm^{-1} . Na slici 40C se može uočiti nastanak novog vrha slabog intenziteta u rasponu 3500 – 3100 cm^{-1} , što upućuje na nastanak karboksilne skupine [441]. Smanjenje vrha je primijećeno u području od 2500 do 2000 cm^{-1} . Dodatno, novi vrh na oko

1735/1731 cm^{-1} je uočen, a ukazuje na nastanak karboksilne skupine, C=O [441]. Razlog nastanku ovih vrhova je oksidacijska reakcija, za koju je utvrđeno da se odvija pri procesu biorazgradnje, koja uvodi kisik u lanac polimera te se stvaraju slabe točke (tzv. *hot spots*) u polimernom lancu gdje će se lakše odviti reakcije, tj. nastaju nusprodukti razgradnje s kisikom [442]. Dakako, pojava karboksilnih i hidroksilnih skupina smatra se preliminarnim i neizostavnim korakom tijekom oksidacije i depolimerizacije plastike [441]. Navedeno potvrđuje mogućnost primjene *Pseudomonas alcaligenes* za biorazgradnju PVC-a. Nadalje, usporedba FTIR spektara za PVC početni i nakon biorazgradnje primjenom *Delftia acidovorans* prikazana je na slici 40D. Novi vrh jakog intenziteta vidljiv je u rasponu između 3100 i 3600 cm^{-1} te ukazuje na nastanak hidroksilne skupine (O–H skupine). Također je primjećeno smanjenje vrha od 2500 do 2000 cm^{-1} , kao što je spomenuto i za spektar PVC uz *Pseudomonas alcaligenes*. U području od 1500 do 1650 cm^{-1} nastala su nova dva vrha jakog intenziteta, koja upućuju na C=C skupinu. Ovo ističe da tijekom biorazgradnje dolazi do oksidacije PVC-a. Dakle, za sve PVC spektre se može uočiti smanjenje karakterističnih vrhova za PVC nakon biorazgradnje u odnosu na početni PVC (slika 40). Smanjenje intenziteta karakterističnih vrhova PVC-a na 616 cm^{-1} (C–Cl istezanje), 966 cm^{-1} (CH_2 njihanje), 1255 cm^{-1} (CH svijanje) i 1427 cm^{-1} (CH_2 svijanje) odvija se uslijed procesa deklorinacije PVC-a.

Primjena RSM modeliranja za pokuse biorazgradnje MP

RSM modeliranje je primijenjeno za opisivanje rezultata pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a primjenom *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Na temelju provedenog glavnog pokusa biorazgradnje PS i PVC čestica primjenom četiri bakterije prema punom faktorskom planu, određeni su optimalni uvjeti biorazgradnje. U tablici 25 prikazani su optimalni uvjeti biorazgradnje PS i PVC čestica primjenom bakterija. Optimalni uvjeti biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus cereus* postigli su se pri niskoj koncentraciji PS od 66,20 mg/L, prosječnoj veličini PS čestica od 413,29 μm te pri najnižoj ispitivanoj vrijednosti broja okretaja rotacijske tresilice od 100,45 o/min. Nasuprot tome, optimalni uvjeti biorazgradnje PVC čestica primjenom ove bakterije ispali su pri veličini MP čestica od 400,00 μm , $\gamma_{\text{MP}} = 658,40$ mg/L i OG = 0,40. Optimalni uvjeti za biorazgradnju PS čestica primjenom *Bacillus subtilis* su bili pri srednjoj ispitivanoj veličini MP čestica (440,65 μm) i broju okretaja (162,12 mg/L) te OG od 0,50. Pri pH od 8,00, broju okretaja od 200 o/min i

OG od 0,50 postignuti su optimalni uvjeti biorazgradnje PVC-a primjenom *Bacillus subtilis*. Nadalje, srednja vrijednost veličine PS čestica, broja okretaja i OG najviše su pogodovale *Pseudomonas alcaligenes* prilikom biorazgradnje PS-a. Za biorazgradnju PVC-a primjenom iste bakterije, optimalni uvjeti iznosili su pH = 8,00, $\gamma_{MP} = 50,00$ mg/L i OG = 0,5. U slučaju biorazgradnje MP primjenom bakterije *Delftia acidovorans*, optimalni su uvjeti postignuti pri pH od 7,99, broju okretaja od 104,93 o/min i OG = 0,46 za PS te pri pH = 8,00, broju okretaja = 200,00 o/min i OG = 0,50 za PVC.

Dakle, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans* su bakterije kojima je za rast i razmnožavanje potrebna koncentracija otopljenoga kisika, a koja se osigurava brojem okretaja rotacijske tresilice. No broj okretaja ne bi trebao biti previsok zato što pri velikom broju okretaja može doći do oštećenja bakterijskih stanica [443]. Unatoč tome, najveći ispitivani broj okretaja je ispao optimalan za *Bacillus subtilis* i *Delftia acidovorans* u uvjetima s PVC česticama, što ukazuje da pri 200,00 o/min ipak ne dolazi do oštećenja bakterijskih stanica, što je u skladu s literaturom [443]. Kako je već prije spomenuto, na odvijanje biokemijskih reakcija, osim kisika, ulogu ima i pH. Naime, *Bacillus subtilis* može rasti u pH području od 5 do 10, no optimalni pH za ovu bakteriju iznosi 8 [444], što se slaže s dobivenim optimalnim uvjetima (tablica 25). S literaturom se podudaraju i rezultati za *Pseudomonas alcaligenes*, čije je optimalno pH područje u rasponu od 7 do 8. No ovisi o supstratu koje će pH područje bolje pogodovati za biorazgradnju primjenom ove bakterije [409,445]. Za pokuse biorazgradnje primjenom *Delftia acidovorans*, optimalni pH je ispao 8, što se slaže s literaturom s obzirom da *Delftia* sp. može rasti u pH rasponu od 5 do 9, a optimalni je 8 [446]. Što se tiče veličine MP čestica, optimalni uvjeti postignuti su pri srednjoj ispitivanoj vrijednosti MP čestica jer manje MP čestice mogu djelovati ekotoksično, dok veće mogu biti nedovoljno bioraspoložive bakterijama. Naime, smanjenjem veličine MP čestica, ekotoksični utjecaj na organizme raste, što je i potvrđeno provedenim testovima toksičnosti. Veće MP čestice nisu, zbog svoje veličine, biodostupne bakterijama. Stoga nema dovoljno kontakta između MP čestica i bakterija, što posljedično smanjuje učinkovitost i kolonizacije čestica i njihove biorazgradnje. Nadalje, općenito vrijedi da su ugljikovodici s aromatskom strukturom teže biorazgradljivi [61]. Prema tome, niža koncentracija MP pogoduje bakterijama upravo zbog strukture PS-a, koja je složenija u odnosu na strukturu PVC-a. Naime, prisutnost benzenskog prstena utječe na ograničenu rotaciju oko jednostrukih veza u polimernom lancu PS-a, zbog čega

navedena vrsta MP-a ima ukrućenu nesavitljivu konformaciju. Nadalje, *Bacillus cereus* može biti izložena višim PVC koncentracijama s obzirom da tvori endospore koje mu omogućavaju prilagodbu i preživljavanje, pa čak i u uvjetima izloženosti kloru koji može djelovati ekotoksično. OG je u korelaciji sa CFU te dakle veći broj bakterijskih stanica u sustavu pogoduje biorazgradnji.

Prema značajnim parametrima (tablica 23), optimalni uvjeti za biorazgradnju PS-a i PVC-a istraženi su prema punom faktorskom planu. Tri su čimbenika ispitana na tri razine (tablica 16) te su dobivene odzivne površine (slike 41 – 44), kako bi se odredio učinak čimbenika s promjenama log CFU vrijednosti. Kao što se može vidjeti na slici 41A, koncentracija i veličina PS nemaju značajan učinak na CFU bakterije *Bacillus cereus* s obzirom na izostanak crvenoga područja na odzivnoj površini. Dakle, crveno područje označava najvišu vrijednost CFU, koja je poželjna. Uočava se da se povećanjem PS koncentracije, smanjuje CFU, te se isto događa pri najnižoj i najvišoj ispitivanoj veličini PS čestica (slika 41A). Nasuprot tome, CFU bakterije *Bacillus cereus* se povećavao sa smanjenjem broja okretaja i pri srednjoj ispitivanoj vrijednosti (400 μm) veličine PS čestica (crveni dijelovi odzivne površine na slika 41B). Prema slici 41C, smanjenjem broja okretaja i PS koncentracije, može se uočiti porast CFU bakterije *Bacillus cereus*. Ovi rezultati ukazuju na veći utjecaj broja okretaja na biorazgradnju PS-a primjenom *Bacillus cereus*. Odzivna površina na slici 41D je ispučena oblika te se može uočiti da se pri srednjim ispitivanim vrijednostima broja okretaja (150 o/min) i veličine PS čestica (400 μm), postiže najviša CFU vrijednost *Bacillus subtilis*. Crvena područja odzivnih površina na slikama 42E i 42F upućuju na najviše CFU vrijednosti *Bacillus subtilis* postignute porastom OG i srednjoj ispitivanoj vrijednosti broja okretaja (150 o/min). U slučaju biorazgradnje PS-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes*, CFU je bio najviši pri srednjim ispitivanim vrijednostima broja okretaja (150 o/min) i veličini PS čestica od 400 μm (slika 42A). Slika 42B pokazuje povećanje CFU pri srednjem broju okretaja i srednjoj OG vrijednosti. Prema crvenom području na slici 42C, najveći log CFU primijećen je pri srednjoj vrijednosti OG i srednjoj ispitivanoj veličini PS čestica (400 μm). Prema odzivnim površinama na slikama 42D-F, uočava se da su najviše CFU vrijednosti *Delftia acidovorans* postignute povećanjem pH, smanjenjem broja okretaja te povećanjem OG bakterijske suspenzije.

Nadalje, na slici 43A može se uočiti crveno područje koje ukazuje na najviši CFU *Bacillus cereus* pri srednjim vrijednostima koncentracije (500 mg/L) i veličine PVC čestica (400

μm). Povećanjem OG vrijednosti *Bacillus cereus* pri srednjoj veličini PVC čestica postiže se najviši CFU (slika 43B), dok se prema slici 43C najviši CFU postiže isto pri najvišoj ispitivanoj OG (0,5) i srednjoj ispitivanoj vrijednosti koncentracije PVC čestica (500 mg/L). Prema odzivnim površinama na slikama 43D-F, najviše log CFU vrijednosti *Bacillus subtilis* postignute su povećanjem pH, povećanjem broja okretaja i povećanjem OG. Najviše log CFU vrijednosti *Pseudomonas alcaligenes* mogu se uočiti pri srednjoj ispitivanoj pH i smanjenjem koncentracije PVC čestica (slika 44A). Nadalje, porastom OG i pH, porastao je i CFU (slika 44B), dok je crveno područje na slici 44C uočljivo porastom OG i smanjenjem koncentracije PVC čestica. Povećanjem pH i broja okretaja te povećanjem OG suspenzije *Delftia acidovorans*, postignute su najviše CFU vrijednosti prema odzivnim površinama prikazanim na slici 44D, E i F. To ukazuje na visok učinak sva tri istraživana čimbenika na vrijednosti CFU, što je potvrđeno ANOVA analizom.

Analiza korištenih matematičkih modela otkrila je podatke o biorazgradnji PS čestica pomoću *Bacillus cereus*, tablica 26. I prema linearnom (MODEL I) i prema kvadratičnom modelu (MODEL II), broj okretaja rotacijske tresilice (X_3) se pokazao značajnim čimbenikom za biorazgradnju PS-a primjenom *Bacillus cereus*. Odgovarajući koeficijent determinacije imao je relativno visoku vrijednost ($R^2 = 0,9108$) po kojoj je ovaj model bio statistički najznačajniji u opisivanju biorazgradnje PS čestica. Statistička analiza kvadratičnog modela (MODEL II) pokazala je da je broj okretaja rotacijske tresilice (X_3 i X_3^2) jedini čimbenik koji utječe na biorazgradnju PS-a primjenom *Bacillus cereus*. Nadalje, linearni model primijenjen za sustav biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus subtilis* ukazao je na OG kao jedini značajni čimbenik. S obzirom na puno višu vrijednost $R^2 = 0,9503$ za kvadratični model u odnosu na linearni (MODEL I), kvadratični se model (MODEL II) pokazao bolji za opisivanje ovoga sustava. Značajni čimbenici prema ovome modelu su OG (X_3), ali i broj okretaja što je sadržano preko interakcijskog člana ($X_2 \cdot X_3$) i kvadratnih članova (X_2^2 , X_3^2) (tablica 26). Prema MODELU I korištenoga za opisivanje biorazgradnje PS čestica primjenom *Pseudomonas alcaligenes*, značajno su utjecali na taj proces sljedeći čimbenici: broj okretaja i OG. Vrijednost koeficijenta determinacije je vrlo niska ($R^2 = 0,4287$), što ovaj model čini neprikladnim za opisivanje ovoga sustava. Dakako, kvadratični model je imao visoku vrijednost koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,9076$) te se pokazalo da su sva tri ispitivana čimbenika značajno utjecala na biorazgradnju PS čestica primjenom *Pseudomonas alcaligenes*. Sva tri pojedinačna čimbenika su imala utjecaj

(X_1 , X_2 i X_3), ali dodatni utjecaj se pokazao i kroz interakcijski član ($X_1 \cdot X_3$) i kvadratične članove (X_1^2 i X_3^2) broja okretaja i OG. Štoviše, statistička analiza eksperimenata biorazgradnje PS-a primjenom *Delftia acidovorans* upućuje da se kvadratični model pokazao kao najbolji model za opisivanje ovog sustava (tablica 26). Više vrijednosti R^2 i R^2_{adj} ($R^2 = 0,9548$; $R^2_{adj} = 0,9309$) za primijenjeni model sugeriraju da je statistička analiza mnogo bliža eksperimentalnim podacima, što ukazuje na veći značaj MODELA II u odnosu na MODEL I. U ovom slučaju, značajni čimbenici bili su broj okretaja (X_2), OG (X_3), međudjelovanje pH i broja okretaja ($X_1 \cdot X_2$), kao i međudjelovanje pH i OG ($X_1 \cdot X_3$) te kvadratični član broja okretaja (X_2^2).

U tablici 27 su prikazani modeli korišteni za opisivanje biorazgradnje PVC čestica. Za pokus uz *Bacillus cereus*, MODEL II (kvadratični model) se pokazao prikladnijim s obzirom na višu vrijednost koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,9514$) u odnosu na MODEL I ($R^2 = 0,7812$). Čimbenici koji su značajno utjecali na biorazgradnju PVC-a primjenom *Bacillus cereus* su veličina PVC čestica, γ_{MP} i OG. Navedeno je uočeno preko pojedinačnih članova veličine MP (X_1) i OG (X_3), ali i interakcijskih članova veličine MP i γ_{MP} ($X_1 \cdot X_2$), ali i veličine MP i OG ($X_1 \cdot X_3$). γ_{MP} i OG dodatno su imale utjecaj preko kvadratičnih članova (X_2^2 i X_3^2). Nadalje, OG se pokazala značajnim čimbenikom za biorazgradnju PVC-a primjenom *Bacillus subtilis* prema MODELU I ili linearnom modelu, koji je imao visoku vrijednost $R^2 = 0,8219$. No ipak s obzirom na $R^2 = 0,9571$ i $R^2_{adj} = 0,9343$, MODEL II ili kvadratični model se pokazao prikladnijim za opis eksperimentalnih podataka. Dakle, značajni čimbenici za ovaj sustav su se pokazali broj okretaja i OG. Utjecaj pH se očitovao preko interakcijskog člana, odnosno međudjelovanja pH i broja okretaja. Značajno se pokazalo i međudjelovanje broja okretaja i OG te kvadratični član za OG. Vrlo niska vrijednost koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,3747$) je dobivena za linearni model (MODEL I) (tablica 27), što označava da se primjenom ovoga modela ne mogu opisati eksperimentalni podaci za biorazgradnju PVC-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes*. Prema kvadratičnome modelu (MODEL II), značajno su na ovu biorazgradnju utjecali pH, γ_{MP} i OG. Utjecaj je vidljiv preko pojedinačnih članova sva tri čimbenika, međudjelovanja pH i OG te kvadratičnih članova za sva tri čimbenika. Uspoređujući R^2 vrijednosti za MODEL I i MODEL II prema tablici 27 za bakteriju *Delftia acidovorans*, može se uočiti da su više vrijednosti postignute za MODEL II ($R^2 = 0,9571$). Dakle, prema ovome modelu značajno su utjecala sva tri ispitivana čimbenika na biorazgradnju PVC čestica primjenom bakterije *Delftia acidovorans*. Utjecaj OG se očituje preko pojedinačnoga i kvadratičnoga člana, ali i interakcijskoga člana,

odnosno međudjelovanja s pH. Broj okretaja, također, je imao utjecaj preko interakcijskog člana s pH.

5.3.3. Modeliranje bakterijskoga rasta pomoću Gompertz modela

Proučavanje dinamike promjena broja živih stanica u sustavima postiže se matematičkim modeliranjem. U svrhu lakšeg prikazivanja i razumijevanja bioloških promjena, koji su rezultat međusobnih djelovanja različitih čimbenika, koriste se kinetički modeli [447,448]. Korišteni kinetički model za prikaz rasta broja živih stanica je Gompertz model, prikazan jednadžbom (16) [449]:

$$N = N_0 \cdot e^{(e^{b-e^{(b-c)t}})} \quad (16)$$

N je broj živih stanica u vremenu t , N_0 početna vrijednost broja živih stanica, b konstanta procijenjena prema jednadžbi (12), a c konstanta izražena u d^{-1} za čiju je procjenu korištena jednadžba (13).

Promjena broja živih stanica, r_N ($g L^{-1} d^{-1}$), u vremenu t (d) izražena je jednadžbom (17):

$$r_N = \frac{dN}{dt} = \left(c \cdot e^{(e^{b-e^{(b-c)t}})} \cdot e^{(b-c)t} \right) - (k_d \cdot N) \quad (17)$$

Optimiranjem dobivene vrijednosti parametara μ_{max} , b , c i k_d (tablica 28) su potom korištene, zajedno s pretpostavljenim modelom (jednadžbe (13) i (14)), za simulaciju promjene broja živih stanica bakterija u šaržnom reaktoru. S obzirom na promjenu broja živih stanica bakterija, u ovisnosti se prikazuje logaritamski omjer broja živih stanica bakterija $\ln(N/N_0)$ i vrijeme. Model obuhvaća četiri faze rasta bakterije koje su opisane parametrima: lag faza preko λ koje označava vrijeme trajanja lag faze, μ_{max} koji je definiran kao nagib tangente u točku infleksije eksponencijalnog dijela krivulje, odnosno log fazu rasta, a je najviša postignuta vrijednost broja živih stanica, što ukazuje na stacionarni rast, i k_d koja podrazumijeva zadnju fazu, odnosno smanjenje broja živih stanica [449,450].

Vrijednosti parametara prema Gompertz modelu korištenom za modeliranje bakterijskoga rasta su prikazane u tablici 28. Za pokus biorazgradnje PS-a primjenom bakterije *Bacillus*

cereus, μ_{\max} je iznosio $0,5760 \text{ d}^{-1}$ što je viša vrijednost u odnosu na pokus s PVC-om ($0,1439 \text{ d}^{-1}$). Navedeno upućuje da je *Bacillus cereus* brže rastao u uvjetima izloženosti s PS-om. To i ne čudi jer se *Bacillus cereus* inače koristi u istraživanjima za biorazgradnju MP [311], a stvaranje endospore ovoj bakteriji omogućava prilagodbu na različite uvjete. S druge strane, bolji rast bakterije *Bacillus subtilis* uočen je za pokus s PVC-om, $\mu_{\max} = 0,3705 \text{ d}^{-1}$, u odnosu na pokus s PS-om, $\mu_{\max} = 0,1313 \text{ d}^{-1}$ (tablica 28). Naime, navedeno se može objasniti prema strukturi PS-a zbog koje je PS manje biodostupan u odnosu na PVC. Nadalje, u pokusima s *Pseudomonas alcaligenes*, viša vrijednost μ_{\max} dobivena je za pokus s PS-om ($0,2000 \text{ d}^{-1}$), u odnosu na pokus s PVC-om ($0,1610 \text{ d}^{-1}$). Navedeno označava da se bakterija *Pseudomonas alcaligenes* bolja prilagodila na uvjete izloženosti PS-a, što joj je omogućilo iskorištavanje PS-a kao izvor ugljika i energije. Generalno, bakterije roda *Pseudomonas* imaju brojne primjene u bioremedijacijske svrhe, a između ostaloga i za MP [36]. Stoga je za očekivati i preživljavanje i rast bakterije *Pseudomonas* sp. tijekom izlaganja MP-a. Viša μ_{\max} vrijednost za pokus s *Delftia acidovorans* uočava se za pokus s PVC česticama ($0,6719 \text{ d}^{-1}$) u odnosu na μ_{\max} vrijednost za pokus s PS-om ($0,1730 \text{ d}^{-1}$). Bolji rast *Delftia acidovorans* tijekom izloženosti PVC česticama ne čudi s obzirom da se bolje prilagodila na ove uvjete, što je i prethodnim analizama potvrđeno. Dakle, rast CFU vrijednosti za pokus s PVC-om vidljiv je na slici 34D, a i FTIR spektroskopijom je narušavanje PVC strukture potvrđeno (slika 40D). Vrijednosti konstanti b i c za sve navedene sustave se značajno ne razlikuju. Vrijednost konstante c ovisi o μ_{\max} i a , dok za razliku od konstante c , na vrijednost konstante b utječe i λ . Treba napomenuti da vrijednosti parametara ovise o vrsti mikroorganizma, trajanju lag faze, modifikaciji Gompertz modela, kao i eksperimentalnim podacima (optička gustoća ili broj živih stanica) koji se koriste za procjenu parametara. Da se broj živih stanica bakterija brže smanjuje u sustavima uz dodatak MP-a, ukazuju više vrijednosti konstante odumiranja, k_d , što ujedno i indicira na bržu izmjenu faza rasta mikroorganizama [451]. Najviše vrijednosti k_d su primijećene u sustavu s *Bacillus cereus* te za *Delftia acidovorans* u uvjetima izloženosti na PS čestice (tablica 28). Vrijednosti k_d u ovim sustavima su iznosile redom $0,1000 \text{ d}^{-1}$ i $1,0000 \text{ d}^{-1}$, što su znatno više vrijednosti k_d usporedno s ostalim sustavima (tablica 28). Navedeno potvrđuje inhibicijski utjecaj PS-a na bakteriju *Bacillus cereus* te na bakteriju *Delftia acidovorans*. Najniža vrijednost k_d se može uočiti za pokus s PVC-om uz primjenu *Delftia acidovorans*, što ističe ovu bakteriju prikladnom za biorazgradnju PVC čestica (tablica 28).

Uspoređujući μ_{\max} vrijednosti za pokuse s PS MP-om i sve korištene bakterije, najviša μ_{\max} vrijednost primijećena za *Bacillus cereus*, što upućuje na najviši rast te bakterije u uvjetima izloženosti PS MP-u. Također, *Bacillus cereus* pokazuje time veći potencijal za biorazgradnju PS-a. No uzimajući u obzir k_d vrijednosti, bolji izbor za bioremedijaciju PS MP-a bila bi bakterija *Pseudomonas alcaligenes*. Prema visokoj μ_{\max} vrijednosti ($0,2000 \text{ d}^{-1}$) uz deset puta nižu k_d dolazi do promjene faza tijekom bakterijskog rasta, ali ne dolazi do brzog odumiranja bakterijske kulture, već do stacionarne faze rasta bakterije koja i je poželjna faza rasta tijekom biorazgradnje. Nadalje, prema μ_{\max} vrijednosti za sve korištene bakterije, najviša μ_{\max} vrijednost se uočava za *Delftia acidovorans* u pokusu s PVC mikročesticama ($0,6719 \text{ d}^{-1}$). Vrijednost k_d je najniža ($0,0010 \text{ d}^{-1}$), što dodatno potvrđuje potencijal bakterije *Delftia acidovorans* za biorazgradnju PVC MP-a.

Na slikama 45 – 52 vidljivo je kako su eksperimentalni podatci dobro opisani Gompertzovim modelom. Visoke vrijednosti F -testa (jednadžba 15) prikazane su u tablici 28. Vidljivo je kako su rezultati testa blizu vrijednosti 1. Iako za jedan sustav je nešto niže slaganje od 0,90, ipak se može ustanoviti kako modeli adekvatno opisuje promjenu broja živih stanica bakterija u svim pokusima.

6 ZAKLJUČAK

MP se ubraja u prioritetne onečišćujuće tvari te izaziva zabrinutost znanstvene zajednice zbog ekotoksičnog utjecaja, bioakumulacije, biomagnifikacije te mogućeg negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Iako još uvijek postoji nedostatak znanja o koncentracijama MP koja ulazi u okoliš i odgovarajućih ulaznih putova, brojni su izvori kojima MP dopijeva u okolišne sastavnice. Industrije (posebice industrijska proizvodnja plastike), kućanstva (preko pranja sintetske odjeće, korištenjem sredstava za osobnu higijenu), komunalne i industrijske otpadne vode, poljoprivreda, abrazija guma prilikom transporta, samo su neki od mogućih izvora MP-a. Preko sustava za obradu otpadnih voda, MP dopijeva u rijeke, odnosno površinske vode te se dalje distribuira do mora. Dakle, preko površinskih sustava MP dopijeva u morske sustave, u kojima se akumulira. Biorazgradnja predstavlja ekonomičan i učinkovit način razgradnje MP čestica. Mnogo je mehanizama predloženo za biorazgradnju MP-a, ali točan mehanizam nije u potpunosti razjašnjen. Jedan od nedostatak biorazgradnje je što je spora. Također, poželjno je izolirati mikroorganizme i enzime kako bi se ovaj proces ubrzao. U svrhu povećanja učinkovitosti biorazgradnje, bilo bi potrebno kombinirati biorazgradnju s drugim tehnikama za uklanjanje MP-a.

Shodno provedenim ispitivanjima, možemo zaključiti sljedeće:

Ekotoksični utjecaj za 5 vrsta MP je ispitan primjenom mikroalgi *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp., bakterije *Pseudomonas putida* i kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Za sve testne organizme uočen je sljedeći trend promjene: smanjenjem veličine MP čestica i povećanjem koncentracije MP-a, ekotoksičnost se povećavala. Redoslijed djelovanja na *Chlorella* sp. je bio sljedeći: PVC > PET > PS > PE > PP, za *Scenedesmus* sp. PE > PVC > PS > PP > PET, za *Pseudomonas putida* PS > PE > PVC > PP > PET, te za *Saccharomyces cerevisiae* PS = PVC > PE > PET > PP. Najosjetljiviji testni organizam je bio kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.

Izolacija bakterija korištenih u ovome radu provedena je iz okolišnih uzoraka koji su bili obogaćeni MP-om. Bakterije i gljive (plijesni i kvasci) izolirani su iz aktivnoga mulja, komposta i riječnoga sedimenta. Iz uzorka komposta su izolirani *Bacillus sonorensis*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. i *Rhizopus* sp. *Lysinibacillus massiliensis*, *Bacillus cereus* te *Alternaria* sp. izolirani su iz uzorka aktivnoga mulja. Preostali su mikroorganizmi izolirani iz

uzorka riječnoga sedimenta: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus indicus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Delftia acidovorans*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp. i *Candida parapsilosis*. S obzirom da su uzorci bili obogaćeni MP-om, izolirani mikroorganizmi imaju sposobnost prilagodbe i preživljavanje u uvjetima izloženosti MP-u.

Provedeni su preliminarni pokusi biorazgradnje PS i PVC čestica prema Taguchi dizajnu u svrhu određivanja značajnih čimbenika za proces biorazgradnje MP-a primjenom četiri bakterije *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*. Statistički značajni čimbenici za biorazgradnju PS-a primjenom *Bacillus cereus* bili su veličina MP (48,52 %), γ_{MP} (5,03 %) i broj okretaja (41,31 %), a za biorazgradnju PVC-a, veličina MP (43,45 %), γ_{MP} (35,34 %) i OG (14,54 %). Nadalje, veličina MP (5,20 %), broj okretaja (4,06 %) i OG (81,41 %) su se pokazali značajnim čimbenicima za biorazgradnju PS čestica primjenom *Bacillus subtilis*, dok su za PVC to bili pH-vrijednost (4,20 %), broj okretaja (2,60 %) i OG (92,56 %). Značajni čimbenici za biorazgradnju PS-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes* bili su broj okretaja (53,42 %), veličina PS čestica (14,48 %) i OG (13,91 %), dok su za biorazgradnju PVC-a, značajni ispali pH-vrijednost (22,20 %), γ_{MP} (28,69 %) i OG (44,14 %). Konačno, pH-vrijednost (9,44 %), broj okretaja (40,24 %) i OG (14,62 %) bili su značajni za biorazgradnju PS-a i za biorazgradnju PVC-a, pH-vrijednost (10,45 %), broj okretaja (68,11 %) i OG (17,50 %), primjenom *Delftia acidovorans*.

Prema promjeni CFU vrijednosti unutar 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a uočene su faze rasta bakterija. Primijećen je eksponencijalni porast CFU i stacionarna faza rasta. Promjena CFU vrijednosti je u korelaciji s promjenom TOC i TIC vrijednosti. Naime, pri najvišim CFU vrijednostima uočava se rast TOC vrijednosti koje upućuju na nastanak razgradnih produkata i/ili otpuštanja aditiva s površine PS/PVC čestica, dok TIC vrijednosti ukazuju na nastanak CO₂ kao produkta biorazgradnje. Usporedbom CFU za uzorke i za kontrolu, CFU u uzorcima su bile više što označava da su bakterije koristile PS/PVC čestice kao izvor ugljika i energije, dok smanjenje CFU za kontrolu označava liziranje (raspad) bakterijskih stanica. Navedeno se slaže s promjenama TOC/TIC vrijednosti.

Otpuštanje aditiva s površine čestica PS/PVC je procijenjeno LC-MS analizom, kojom je uočeno otpuštanje usporivača plamena trifenil fosfata, deterdženata, polietilen glikola, antioksidansa butiliranog hidroksitoluena, ftalatih estera, plastifikatora di(2-etoksietil) ftalata, dibutil adipata i diizodecil ftalata. S obzirom na prisutnost navedenih aditiva u vodenoj fazi,

provedeno je i ispitivanje ekotoksičnosti vodene faze primjenom *Vibrio fischeri*. Nakon otpuštanja aditiva s površine MP čestica, oni zaostaju u vodenoj fazi te su u kontaktu s bakterijama te tako dolazi do njihove biorazgradnje, što posljedično može uzrokovati veći ekotoksični utjecaj na *Vibrio fischeri*.

Da je došlo do narušavanja PS/PVC strukture, potvrđeno je FTIR–ATR spektroskopijom. Usporedbom spektara PS/PVC prije biorazgradnje i nakon, uočeno je smanjenje intenziteta za sve karakteristične pikove, uz nastanak ili potpuni nestanak određenih pikova. Uočen je nastanak karbonilnih i hidrokslnih skupina, što upućuje na biorazgradnju PS/PVC oksidacijom. Primijećeni pikovi za dvostruke veze ukazuju na narušavanje strukture aromatskog prstena kod PS-a, te dehidrokloriranja u strukturi PVC-a.

U svrhu određivanja optimalnih uvjeta biorazgradnje PS i PVC, provedeni su pokusi biorazgradnje prema punom faktorskom planu. Optimalni uvjeti biorazgradnje PS-a primjenom *Bacillus cereus* postigli su se pri $\gamma_{MP} = 66,20$ mg/L, veličini PS čestica od 413,29 μm te pri broju okretaja rotacijske tresilice od 100,45 o/min, a u slučaju PVC-a pri veličini MP čestica od 400,00 μm , $\gamma_{MP} = 658,40$ mg/L i OG = 0,40. Optimalni uvjeti za biorazgradnju PS čestica primjenom *Bacillus subtilis* su bili pri veličini MP čestica od 440,65 μm , broju okretaja od 162,12 o/min te OG od 0,50. Pri pH-vrijednosti od 8,00, broju okretaja od 200 o/min i OG od 0,50 postignuti su optimalni uvjeti biorazgradnje PVC-a primjenom *Bacillus subtilis*. Pri veličini PS čestica od 334,73 μm , broja okretaja od 161,08 o/min i OG = 0,35 postigli su se optimalni uvjeti za biorazgradnje PS-a primjenom *Pseudomonas alcaligenes*, dok su za PVC optimalni uvjeti iznosili: pH = 8,00, $\gamma_{MP} = 50,00$ mg/L i OG = 0,5. U slučaju biorazgradnje MP primjenom bakterije *Delftia acidovorans*, optimalni su uvjeti postignuti pri pH-vrijednosti od 7,99, broju okretaja od 104,93 o/min i OG = 0,46 za PS te pri pH = 8,00, broju okretaja = 200,00 o/min i OG = 0,50 za PVC.

Bakterijski rast je modeliran pomoću Gompertz modela, koji dobro opisuje eksperimentalne podatke. Prema vrijednostima procijenjenih parametara modela, istaknule su se dvije bakterije za biorazgradnju MP-a. Dakle, *Pseudomonas alcaligenes* je sposobna biorazgraditi PS čestice tijekom izloženosti od 30 dana, dok se za biorazgradnju PVC čestica istaknula Gram-negativna bakterija *Delftia acidovorans*.

Nakon svih provedenih pokusa, PS i PVC čestice su izazvale najveći ekotoksični utjecaj na testne organizme (mikroalgu *Chlorella* sp., bakteriju *Pseudomonas putida* i kvasac

Saccharomyces cerevisiae) te je zbog toga potrebno istraživati način uklanjanja istih iz okoliša. Prema provedenim pokusima biorazgradnje može se uočiti da su se Gram-negativne bakterije, *Pseudomonas alcaligenes* i *Delftia acidovorans*, u odnosu na Gram-pozitivne bakterije pokazale učinkovitije za biorazgradnju PS i PVC čestica unutar 30 dana izlaganja. Ostaje mogućnost da je potreban dulji vremenski period za biorazgradnju, no na to se potrebno usmjeriti u budućim istraživanjima.

7 LITERATURA

- [1] L. Cutroneo, A. Reboa, G. Besio, F. Borgogno, L. Canesi, S. Canuto, M. Dara, F. Enrile, I. Forioso, G. Greco, V. Lenoble, A. Malatesta, S. Mounier, M. Petrillo, R. Rovetta, A. Stocchino, J. Tesan, G. Vagge, M. Capello, Microplastics in seawater: sampling strategies, laboratory methodologies, and identification techniques applied to port environment, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (2020) 8938–8952.
- [2] R. Geyer, J. R. Jambeck, K. L. Law, Production, use, and fate of all plastic ever made, *Sci. Adv.* 3 (2017) 1–6.
- [3] PlasticsEurope (2022) Plastics – the Facts 2022. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/> (pristup 18.2.2023.)
- [4] ECHA (2019). ECHA proposes to restrict intentionally added microplastics. <https://echa.europa.eu/hr/-/echa-proposes-to-restrict-intentionally-added-microplastics>. (pristup 15.6.2022.)
- [5] J. Shan, J. Zhao, L. Liu, Y. Zhang, X. Wang, F. Wu, A novel way to rapidly monitor microplastics in soil by hyperspectral imaging technology and chemometrics, *Environ. Pollut.* 238 (2018) 121–129.
- [6] Y. Li, Z. Lu, H. Zheng, J. Wang, C. Chen, Microplastics in surface water and sediments of Chongming Island in the Yangtze Estuary, China, *Environ. Sci. Eur.* 32 (2020) 1–12.
- [7] S. S. Sadri, R. C. Thompson, On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England, *Mar. Pollut. Bull.* 81 (2014) 55–60.
- [8] M. Liu, S. Lu, Y. Song, L. Lei, J. Hu, W. Lv, W. Zhou, C. Cao, H. Shi, X. Yang, D. He, Microplastic and mesoplastic pollution in farmland soils in suburbs of Shanghai, China, *Environ. Pollut.* 242 (2018) 855–862.
- [9] M. Bergmann, V. Wirzberger, T. Krumpfen, C. Lorenz, S. Primpke, M. B. Tekman, G. Gerds, High quantities of microplastic in Arctic deep-sea sediments from the HAUSGARTEN observatory, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 11000–11010.

- [10] M. Pivokonsky, L. Cermakova, K. Novotna, P. Peer, T. Cajthaml, V. Janda, Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water, *Sci. Total Environ.* 643 (2018) 1–8.
- [11] M. Kosuth, S. A. Mason, E. V. Wattenberg, Anthropogenic contamination of tap water, beer, and sea salt, *PLoS ONE* 13 (2018) e0194970.
- [12] B. E. Oßmann, G. Sarau, H. Holtmannspötter, M. Pischetsrieder, S. H. Christiansen, W. Dicke, Small-sized microplastics and pigmented particles in bottled mineral water, *Water Res.* 141 (2018) 1–43.
- [13] G. Liebezeit, E. Liebezeit, Non-pollen particulates in honey and sugar, *Food Addit. Contam. Part A* 30 (2013) 2136–2140.
- [14] M. Smith, D. C. Love, C. M. Rochman, R. A. Neff, Microplastics in seafood and the implications for human health, *Curr. Environ. Health Rep.* 5 (2018) 375–386.
- [15] X. Liu, W. Yuan, M. Di, Z. Li, J. Wang, Transfer and fate of microplastics during the conventional activated sludge process in one wastewater treatment plant of China, *Chem. Eng. J.* 362 (2019) 176–182.
- [16] J. Talvitie, A. Mikola, O. Setälä, M. Heinonen, A. Koistinen, How well is microlitter purified from wastewater? – A detailed study on the stepwise removal of microlitter in a tertiary level wastewater treatment plant, *Water Res.* 109 (2017a) 167–172.
- [17] C. Henkel, T. Huffer, T. Hofmann, The leaching of phthalates from PVC can be determined with an infinite sink approach, *MethodsX* 6 (2019) 2729–2734.
- [18] K. Fikarová, D. J. Cocovi-Solberg, M. Rosende, B. Horstkotte, H. Sklenářová, M. Miró, A flow-based platform hyphenated to on-line liquid chromatography for automatic leaching tests of chemical additives from microplastics into seawater, *J. Chromatogr. A* 1602 (2019) 160–167.
- [19] A. Turner, L. A. Holmes, Adsorption of trace metals by microplastic pellets in fresh water, *Environ. Chem.* 12 (2015) 1–11.
- [20] A. Puckowski, W. Cwiek, K. Mioduszevska, P. Stepnowski, A. Bialk-Bielinska, Sorption of pharmaceuticals on the surface of microplastics, *Chemosphere* 263 (2021) 127976.

- [21] P. Farrell, K. Nelson, Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.), *Environ. Pollut.* 177 (2013) 1–3.
- [22] Q. T. Birch, P. M. Potter, P. X. Pinto, D. D. Dionysiou, S. R. Al-Abed, Sources, transport, measurement and impact of nano and microplastics in urban watersheds, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 19 (2020) 275–336.
- [23] M. Miloloža, D. Kučić Grgić, T. Bolanča, Š. Ukić, M. Cvetnić, V. Ocelić Bulatović, D. D. Dionysiou, H. Kušić, Ecotoxicological assessment of microplastics in freshwater sources—a review, *Water* 13 (2021) 1–26.
- [24] J. Bhagat, L. Zang, N. Nishimura, Y. Shimada, Zebrafish: an emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity, *Sci. Total Environ.* 728 (2020) 138707.
- [25] P. M. Canniff, T. C. Hoang, Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth, *Sci. Total Environ.* 633 (2018) 500–507.
- [26] A. L. Lusher, M. McHugh, R. C. Thompson, Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel, *Mar. Pollut. Bull.* 67 (2013) 94–99.
- [27] Y. Mao, H. Ai, Y. Chen, Z. Zhang, P. Zeng, L. Kang, W. Li, W. Gu, Q. He, H. Li, Phytoplankton response to polystyrene microplastics: Perspective from an entire growth period, *Chemosphere* 208 (2018) 59–68.
- [28] F. Yuan, L. Yue, H. Zhao, H. Wu, Study on the adsorption of polystyrene microplastics by three-dimensional reduced graphene oxide, *Water Sci. Technol.* 81 (2020) 2163–2175.
- [29] F. Liu, N. B. Nord, K. Bester, J. Vollertsen, Microplastics removal from treated wastewater by a biofilter, *Water* 12 (2020) 1085.
- [30] B. Ma, W. Xue, C. Hu, H. Liu, J. Qu, L. Li, Characteristics of microplastic removal via coagulation and ultrafiltration during drinking water treatment, *Chem. Eng. J.* 359 (2019) 159–167.

- [31] I. Nabi, A.-U.-R. Bacha, K. Li, H. Cheng, T. Wang, Y. Liu, S. Ajmal, Y. Yang, Y. Feng, L. Zhang, Complete photocatalytic mineralization of microplastic in TiO₂ nanoparticle film, *iScience* 23 (2020) 1–40.
- [32] M. Lares, M. C. Ncibi, M. Sillanpää, M. Sillanpää, Occurrence, identification and removal of microplastic particles and fibers in conventional activated sludge process and advanced MBR technology, *Water Res.* 133 (2018) 236–246.
- [33] J. Bayo, J. López-Castellanos, S. Olmos, Membrane bioreactor and rapid sand filtration for the removal of microplastics in an urban wastewater treatment plant, *Mar. Pollut. Bull.* 156 (2020) 1–9.
- [34] H. S. Auta, C. U. Emenike, S. H. Fauziah, Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation, *Environ. Pollut.* 231 (2017a) 1552–1559.
- [35] A. Sivan, M. Szanto, V. Pavlov, Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 346–352.
- [36] B. M. Kyaw, R. Champakalakshmi, M. K. Sakharkar, C. S. Lim, K. R. Sakharkar, Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by *Pseudomonas* species, *Indian J. Microbiol.* 52 (2012) 411–419.
- [37] L. Giacomucci, N. Raddadi, M. Soccio, N. Lotti, F. Fava, Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*, *N. Biotechnol.* 52 (2019) 35–41.
- [38] J. Vlachopoulos, D. Strutt, Polymer processing, *Mater. Sci. Technol.* 19 (2003) 1161–1169.
- [39] J. Brandsch, O. Piringer, Characteristics of plastic materials, Plastic packaging, u O.-G. Piringer i A. L. Baner (ur.), *Plastic Packaging Materials for Food: Barrier Function, Mass Transport, Quality Assurance, and Legislation. Vol. 1*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2000, str. 15–61.
- [40] S. Lambert, Biopolymers and their application as biodegradable plastics, *Microbial factories: biodiversity, biopolymers, bioactive molecules*, u V. C. Kalia (ur.), *Microbial Factories. Vol. 1*, Springer India, New Delhi, 2015, str. 1–9.

- [41] R. C. Thompson, C. J. Moore, F. S. vom Saal, S. H. Swan, Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends, *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364 (2009) 2153–2166.
- [42] PlasticsEurope (2021) Plastics – the Facts 2021. An analysis of European plastics production, demand and waste data. <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/12/Plastics-the-Facts-2021-web-final.pdf> (pristup 15.6.2022.)
- [43] M. Cole, P. Lindeque, C. Halsband, T. S. Galloway, Microplastics as contaminants in the marine environment: a review, *Mar. Pollut. Bull.* 62 (2011) 2588–2597.
- [44] S. S. Ali, T. Elsamahy, R. Al-Tohamy, D. Zhu, Y. A.-G. Mamoud, E. Koutra, M. A. Metwally, M. Kornaros, J. Sun, Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects, *Sci. Total Environ.* 780 (2021) 146590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146590>
- [45] C. Gutiérrez, J. C. de Haro, M. T. García, I. Gracia, A. de Lucas, J. F. Rodríguez, Polystyrene Wastes: Threat or Opportunity?, u J. E. Cabañas, B. G. Lefebvre (ur.), *Environment, Energy and Climate Change I: Environmental Chemistry of Pollutants and Wastes*. Vol. 32, Springer, New York, 2015, str. 261–286.
- [46] J. N. Hahladakis, C. A. Velis, R. Weber, E. Iacovvidou, P. Purnell, An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling, *J. Hazard. Mat.* 344 (2018) 179–199.
- [47] T. Bond, V. Ferrandiz-Mas, M. Felipe-Sotelo, E. van Sebille, The occurrence and degradation of aquatic plastic litter based on polymer physicochemical properties: A review, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 48 (2018) 685–722.
- [48] Y. Teck Kim, B. Min, K. Won Kim, General characteristics of packaging materials for food system, u J. H. Han (ur.), *Innovations in Food Packaging*. Vol. 2, Academic Press, London, 2014, str. 13–35.

- [49] S. Lambert, M. Wagner, Microplastics are contaminants of emerging concern in freshwater environments: an overview, u M. Wagner, S. Lambert (ur.), *Freshwater Microplastics*. Vol. 1, Springer Open, Cham, Switzerland, 2018, str. 1–24.
- [50] J. A. Glaser, Biological degradation of polymers in the environment, u A. Gomiero (ur.), *Plastics in the environment*. Vol. 1, IntechOpen, 2019, 1–106.
- [51] V. C. McLain, Final report on the safety assessment of polyethylene, *Int. J. Toxicol.* 26 (2007) 115–127.
- [52] J. W. Summers, The melting temperature (or not melting) of poly(vinyl chloride), *J. Vinyl. Addit. Techn.* 14 (2008) 105–109.
- [53] C. L. Beyler, M. M. Hirschler, Thermal decomposition of polymers, u P. J. DiNenno (ur.), *SFPE handbook of fire protection engineering*. Vol. 4, National Fire Protection Association, Quincy, 2002, str. 112–143.
- [54] G. W. Ehrenstein, *Polymeric materials: structure, properties, applications*. Vol. 1, Hanser Gardner Publications, München, 2012, str. 1–278.
- [55] R. Sangeetha Devi, V. Rajesh Kannan, K. Natarajan, D. Nivas, K. Kannan, S. Chandru, A. Robert Anthony, The role of microbes in plastic degradation, u R. Chandra (ur.), *Environmental Waste Management*. Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, 2015, str. 341–370.
- [56] S. Dutta Laha, K. Dutta, P. Paban Kundu, Biodegradation of low density polyethylene films, u V. M. Pathak i Navneet (ur.), *Handbook of Research on Microbial Tools for Environmental Waste Management*. Vol. 1, IGI Global, Hershey, 2018, str. 282–318.
- [57] Z. Hrnjak-Murgić, A. Rešček, A. Ptiček Siročić, Lj. Kratofil Krehula, Z. Katančić, *Nanoparticles in active polymer food packaing*. Vol. 1, Smithers Pira, United Kingdom, 2015, str. 1–260.
- [58] A. J. Peacock, A. Calhoun, *Polymer chemistry*. Vol. 1, Hanser publisher, Munich, 2006, str. 267–363.

- [59] H. S. Auta, C. U. Emenike, S. H. Fauziah, Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions, *Environ. Int.* 102 (2017b) 165–176.
- [60] M. C. Krueger, H. Harms, D. Schlosser, Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 8857–8874.
- [61] T. Artham, M. Doble, Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates, *Macromol. Biosci.* 8 (2008) 14–24.
- [62] S. C. Iheanacho, G. E. Odo, Neurotoxicity, oxidative stress biomarkers and haematological responses in African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to polyvinyl chloride microparticles, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 232 (2020) 108741.
- [63] B. T. Ho, T. K. Roberts, S. Lucas, An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach, *Crit. Rev. Biotechnol.* 38 (2018) 308–320.
- [64] K. Kik, B. Bukowska, P. Sicinska, Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms, *Environ. Poll.* 262 (2020) 114297.
- [65] R. Mor, A. Sivan, Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*: Biodegradation of polystyrene, *Biodegradation* 19 (2008) 851–858.
- [66] J. Gong, T. Kong, Y. Li, Q. Li, Z. Li, J. Zhang, Biodegradation of microplastic derived from poly(ethylene terephthalate) with bacterial whole-cell biocatalysts, *Polymers* 10 (2018) 1326.
- [67] H. K. Webb, J. Arnott, R. J. Crawford, E. P. Ivanova, Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate), *Polymers* 5 (2013) 1–18.
- [68] Silva, G.G., da Costa Valente, M.L., Bachmann, L., Cândido dos Reis, A., Use of polyethylene terephthalate as a prosthetic component in the prosthesis on an overdenture implant, *Mater. Sci. Eng. C.* (2019) 99, 1341–1349.

- [69] R.-J. Müller, I. Kleeberg, W.-D. Deckwer, Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents, *J. Biotechnol.* 86 (2001) 87–95.
- [70] B.-Y. Peng, Z. Chen, J. Chen, H. Yu, X. Zhou, C. S. Criddle, W.-M. Wu, Y. Zhang, Biodegradation of polyvinyl chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: *Tenebrionidae*) larvae, *Environ. Int.* 145 (2020) 106106.
- [71] G. Ferrara, M. Bertoldo, M. Scoponi, F. Ciardelli, Diffusion coefficient and activation energy of Irganox 1010 in poly(propylene-co-ethylene) copolymers, *Polym. Degrad. Stab.* 73 (2001) 411–416.
- [72] L. Lebreton, B. Slat, F. Ferrari, B. Sainte-Rose, J. Aitken, R. Marthouse, S. Hajbane, S. Cunsolo, A. Schwarz, A. Levivier, K. Noble, P. Debeljak, H. Maral, R. Schoeneich-Argent, R. Brambini, J. Reisser, Evidence that the Great Pacific garbage Patch is rapidly accumulating plastic, *Sci. Rep.* 8 (2018) 4666.
- [73] Y. M. Lozano, T. Lehnert, L. T. Linck, A. Lehmann, M. C. Rillig, Microplastic shape, polymer type, and concentration affect soil properties and plant biomass, *Frontiers in plant science* 12 (2021) 616645.
- [74] M. Kooi, E. Besseling, C. Kroeze, A. P. van Wezel, A. A. Koelmans, Modeling the fate and transport of plastic debris in freshwaters: review and guidance, u M. Wagner i S. Lambert (ur.), *Freshwater Microplastics: Emerging Environmental Contaminants?*. Vol. 58, Springer Open, Cham, 2018, str. 125–152.
- [75] K. Duis, A. Coors, Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects, *Environ. Sci. Eur.* 28 (2016) 2.
- [76] S. M. Praveena, S. N. M. Shaifuddin, S. Akizuki, Exploration of microplastics from personal care and cosmetic products and its estimated emissions to marine environment: An evidence from Malaysia, *Mar. Pollut. Bull.* 136 (2018) 135–140.
- [77] K. Lei, F. Qiao, Q. Liu, Z. Wei, H. Qi, S. Cui, X. Yue, Y. Deng, L. An, Microplastics releasing from personal care and cosmetic products in China, *Mar. Pollut. Bull.* 1–2 (2017) 1–5.

- [78] T. Gouin, J. Avalos, I. Brunning, K. Brzuska, J. de Graaf, T. Kaumanns, T. Koning, M. Meyberg, K. Rettinger, H. Schlatter, J. Thomas, R. van Welie, T. Wolf, Use of micro-plastic beads in cosmetic products in Europe and their estimated emissions to the North Sea environment, *Int. J. Appl. Sci. SOFW-Journal* 141 (2015) 40–46.
- [79] J. Li, H. Liu, J. Paul Chen, Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection, *Water Res.* 137 (2018) 362–374.
- [80] F. Lagarde, O. Olivier, M. Zanella, P. Daniel, S. Hiard, Microplastic interactions with freshwater microalgae: Heteroaggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type, *Environ. Pollut.* 215 (2016) 331–339.
- [81] S. L. Wright, R. C. Thompson, T. S. Galloway, The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review, *Environ. Pollut.* 178 (2013) 483–492.
- [82] S. Rezaia, J. Park, M. F. M. Din, S. M. Taib, A. Talaiekhosani, K. K. Yadav, H. Kamyab, Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies, *Mar. Pollut. Bull.* 133 (2018) 191–208.
- [83] M. D. Prokić, T. B. Radovanović, J. P. Gavrić, C. Faggio, Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives, *TrAC - Trend. Anal. Chem.* 111 (2019) 37–46.
- [84] F. Murphy, C. Ewins, F. Carbonnier, B. Quinn, Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 5800–5808.
- [85] P. Wu, J. Huang, Y. Zheng, Y. Yang, Y. Zhang, F. He, H. Chen, G. Quan, J. Yan, T. Li, B. Gao, Environmental occurrences, fate and impacts of microplastics, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 184 (2019a) 1–16.
- [86] L. Nizzetto, M. Futter, S. Langaas, Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin?, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 10777–10779.
- [87] C. Pironti, M. Ricciardi, O. Motta, Y. Miele, A. Proto, L. Montano, Microplastics in the environment: intake through the food web, human exposure and toxicological effects, *Toxics* 9 (2021) 224.

- [88] S. Lambert, C. J. Sinclair, A. B. Boxall, Occurrence, degradation and effect of polymer-based materials in the environment, *Rev. Environ. Contamin. Toxicol.* 227 (2014) 1–53.
- [89] M. O. Rodrigues, A. M. M. Gonçalves, F. J. M. Gonçalves, H. Nogueira, J. C. Marques, N. Abrantes, Effectiveness of a methodology of microplastics isolation for environmental monitoring in freshwater systems, *Ecol. Indic.* 89 (2017) 488–495.
- [90] A. M. Elert, R. Becker, E. Duemichen, P. Eisentraut, J. Falkenhagen, H. Sturm, U. Braun, Comparison of different methods for MP detection: What can we learn from them, and why asking the right question before measurements matters?, *Environ. Pollut.* 231 (2017) 1256–1264.
- [91] Industrievereinigung Chemiefaser e.V (2015) Production since 1975. https://www.ivc-ev.de/live/index.php?page_id=87 (pristup 20.6.2022.)
- [92] M. A. Browne, P. Crump, S. J. Niven, E. Teuten, A. Tonkin, T. Galloway, R. Thompson, Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 9175–9179.
- [93] J. Mateo-Sagasta, L. Raschid-Sally, A. Thebo, Global wastewater and sludge production: Treatment and use, u P. Drechsel, M. Qadir, D. Wichelns (ur.), *Wastewater: Economic asset in an urbanizing world*. Vol. 1, Springer Netherlands, Dordrecht, 2015, str. 15–38.
- [94] S. Raju, M. Carbery, A. Kuttykattil, K. Senathirajah, S. R. Subashchandrabose, G. Evans, P. Thavamani, Transport and fate of microplastics in wastewater treatment plants: implications to environmental health, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 17 (2018) 637–653.
- [95] A. Horton, A. Walton, D. J. Spurgeon, E. Lahive, C. Svendsen, Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities, *Sci. Total Environ.* 586 (2017) 127–141.
- [96] EU, Council Directive of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment (91/271/EEC). *Official Journal of the European Communities* L135, 1991, str. 40–91.
- [97] DIRECTIVE (EU) 2019/904 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 5 June 2019 on the reduction of the impact of certain plastic products on the environment, *Official Journal of the European Union*, L 155/1-19. <https://eur->

lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019L0904&from=EN (pristup 15.7.2022.)

- [98] J.-Q. Jiang, Occurrence of microplastics and its pollution in the environment: A review, *Sustain. Prod. Consum.* 13 (2018) 16–23.
- [99] J. R. Jambeck, R. Geyer, C. Wilcox, T. R. Siegler, M. Perryman, A. Andrady, R. Narayan, K. L. Law, Plastic waste inputs from land into the ocean, *Sci.* 347 (2015) 768–771.
- [100] P. G. Ryan, The incidence and characteristics of plastic particles ingested by seabirds, *Mar. Environ. Res.* 23 (1987) 175–206.
- [101] A. L. Lusher, A. Burke, I. O'Connor, R. Officer, Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling, *Mar. Pollut. Bull.* 88 (2014) 325–333.
- [102] C. J. Moore, S. L. Moore, M. K. Leecaster, S. B. Weisberg, A comparison of plastic and plankton in the north Pacific central gyre, *Mar. Pollut. Bull.* 42 (2001) 1297–1300.
- [103] M. Allsopp, A. Walters, D. Santillo, P. Johnsto, *Plastic Debris in the World's Oceans*, Greenpeace. Vol. 1, International, Amsterdam, 2006, str. 1–44.
- [104] K. V. Gilardi, D. Carlson-Bremer, J. A. June, K. Antonelis, G. Broadhurst, T. Cowan, Marine species mortality in derelict fishing nets in Puget Sound, WA and the cost/benefits of derelict net removal, *Mar. Pollut. Bull.* 60 (2010) 376–382.
- [105] S. Zhao, L. Zhu, T. Wang, D. Li, Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distribution, *Mar. Pollut. Bull.* 86 (2014) 562–568.
- [106] G. Kalčíkova, B. Alič, T. Skalar, M. Bundschuh, A. Ž. Gotvajn, Wastewater treatment plant effluents as source of cosmetic polyethylene microbeads to freshwater, *Chemosphere* 188 (Supplement C), 188 (2017) 25–31.
- [107] T. Romeo, B. Pietro, C. Peda, P. Consoli, F. Andaloro, M. C. Fossi, First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea, *Mar. Pollut. Bull.* 95 (2015) 358–361.

- [108] M. Cole, P. Lindeque, E. Fileman, C. Halsband, R. Goodhead, J. Moger, T. S. Galloway, Microplastic ingestion by zooplankton, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 6646–6655.
- [109] N. von Moos, P. Burkhardt-Holm, A. Kohler, Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 11327–11335.
- [110] S. O'Brien, C. Rauert, F. Ribeiro, E. D. Okoffo, S. D. Burrows, J. W. O'Brien, X. Wang, S. L. Wright, K. V. Thomas, There's something in the air: A review of sources, prevalence and behaviour of microplastics in the atmosphere, *Sci. Total Environ.* 874 (2023) 162193.
- [111] J. B. Colton, F. D. Knapp, B. R. Burns, Plastic particles in surface waters of the Northwestern Atlantic, *Science* 185 (1974) 491–497.
- [112] J.-P. W. Desforges, M. Galbraith, N. Dangerfield, P. S. Ross, Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean, *Mar. Pollut. Bull.* 79 (2014) 94–99.
- [113] F. Faure, C. Saini, G. Potter, F. Galgani, F. L. de Alencastro, P. Hagmann, An evaluation of surface micro- and mesoplastic pollution in pelagic ecosystems of the Western Mediterranean Sea, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 12190–12197.
- [114] T. Gajšt, T. Bizjak, A. Palatinus, S. Liubartseva, A. Kržan, Sea surface microplastics in Slovenian part of the Northern Adriatic, *Mar. Pollut. Bull.* 113 (2016) 392–399.
- [115] R. W. Obbard, S. Sadri, Y. Q. Wong, A. A. Khitun, I. Baker, R. C. Thompson, Global warming releases microplastic legacy frozen in Arctic Sea ice, *Earths Future* 2 (2014) 2014EF000240.
- [116] A. Lechner, H. Keckeis, F. Lumesberger-Loisl, B. Zens, R. Krusch, M. Tritthart, M. Glas, E. Schludermann, The Danube so colourful: a potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river, *Environ. Pollut.* 188 (2014) 177–181.
- [117] T. Mani, A. Hauk, U. Walter, P. Burkhardt-Holm, Microplastics profile along the Rhine River, *Sci. Rep.* 5 (2015) 17988.

- [118] D. Alencastro, Pollution due to plastics and microplastics in Lake Geneva and in the Mediterranean Sea, *Arch. Sci.* 65 (2012) 157–164.
- [119] C. M. Free, O. P. Jensen, S. A. Mason, M. Eriksen, N. J. Williamson, B. Boldgiv, High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake, *Mar. Pollut. Bull.* 85 (2014) 156–163.
- [120] P. J. Anderson, S. Warrack, V. Langen, J. K. Challis, M. L. Hanson, M. D. Rennie, Microplastic contamination in Lake Winnipeg, Canada, *Environ. Pollut.* 225 (2017) 223–231.
- [121] M. Eriksen, S. Mason, S. Wilson, C. Box, A. Zellers, W. Edwards, H. Farley, S. Amato, Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian great lakes, *Mar. Pollut. Bull.* 77 (2013) 177–182.
- [122] W. Wang, A. W. Ndungu, Z. Li, J. Wang, Microplastics pollution in inland freshwaters of China: A case study in urban surface waters of Wuhan, China, *Sci. Total Environ.* 575 (2017) 1369–1374.
- [123] S. A. Mason, D. Garneau, R. Sutton, Y. Chu, K. Ehmann, J. Barnes, P. Fink, D. Papazissimos, D. L. Rogers, Microplastic pollution is widely detected in US municipal wastewater treatment plant effluent, *Environ. Pollut.* 218 (2016) 1045–1054.
- [124] J. H. M. Talvitie, Preliminary study on synthetic microfibers and particles at a municipal waste water treatment plant. Vol. 1, HELCOM, Helsinki, 2014, str. 1–17.
- [125] H. A. Leslie, S. H. Brandsma, M. J. M. van Velzen, A. D. Vethaak, Microplastics en route: field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota, *Environ. Int.* 101 (2017) 133e142.
- [126] H. K. Imhof, N. P. Ivleva, J. Schmid, R. Niessner, C. Laforsch, Contamination of beach sediments of a subalpine lake with microplastic particles, *Curr. Biol.* 23 (2013) R867–R868.
- [126] A. Turner, L. Holmes, Occurrence, distribution and characteristics of beached plastic production pellets on the island of Malta (central Mediterranean), *Mar. Pollut. Bull.* 62 (2011) 377–381.

- [127] M. Aljaradin, Biodegradation of microplastics in drinking water, a review, *SRMJ* 5 (2020) 1–17.
- [128] N. P. Ivleva, A. C. Wiesheu, R. Niessner, Microplastic in aquatic ecosystems, *Angew. Chem. Int. Engl.* 56 (2017) 1720–1739.
- [129] A. B. Silva, A. S. Bastos, C. I. L. Justino, J. P. da Costa, A. C. Duarte, T. A. P. Rocha-Santos, Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry - A review, *Anal. Chim. Acta.* 1017 (2018) 1–19.
- [130] Q. Qiu, Z. Tan, J. Wang, J. Peng, M. Li, Z. Zhan, Extraction, enumeration and identification methods for monitoring microplastics in the environment, *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 176 (2016) 102–109.
- [131] J. Lee, S. Hong, Y. K. Song, S. H. Hong, Y. C. Jang, M. Jang, N. W. Heo, G. M. Han, M. J. Lee, D. Kang, W. J. Shim, Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea, *Mar. Pollut. Bull.* 77 (2013) 349–354.
- [132] I. Sierra, M. Rodríguez Chialanza, R. Faccio, D. Carrizo, L. Fornaro, A. Pérez-Parada, Identification of microplastics in wastewater samples by means of polarized light optical microscopy, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (2020) 7409–7419.
- [133] V. Hidalgo-Ruz, L. Gutow, R. C. Thompson, M. Thiel, Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 3060–3075.
- [134] J. Zhu, C. Wang, Recent advance in the analysis methodologies for microplastics in aquatic organisms: current knowledge and research challenges, *Anal. Methods.* 12 (2020) 1–37.
- [135] S. Klein, I. K. Dimzon, J. Eubeler, T. P. Knepper, Analysis, occurrence, and degradation of microplastics in the aqueous environment, u M. Wagner i S. Lambert (ur.), *Freshwater microplastics: emerging environmental contaminants*. Vol. 1, Springer Open, Cham, 2018, str. 51–68.

- [136] A. Mehdinia, R. Dehbandi, A. Hamzhepour, R. Rahnama, Identification of microplastics in the sediments of southern coasts of the Caspian Sea, north of Iran, *Environ. Pollut.* 258 (2020) 1–34.
- [137] C. F. Araujo, M. M. Nolasco, A. M. P. Ribeiro, P. J. A. Ribeiro-Claro, Identification of microplastics using Raman spectroscopy: Latest developments and future prospects, *Water Res.* 142 (2018) 426–440.
- [138] M. Bergmann, L. Gutow, M. Klages, *Marine Anthropogenic Litter. Vol. 2*, Springer Open, New York, 2015, str. 1–456.
- [139] PAPER WP53077, Guide to the identification of microplastics by FTIR and Raman spectroscopy, Thermofisher Scientific. 2018. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Application-Notes/WP53077-microplastics-identification-ftir-raman-guide.pdf> (pristup 26.6.2022.)
- [140] J. Mohan, V. C. Sekhar, T. Bhaskar, K. M. Nampoothiri, Microbial assisted high impact polystyrene (HIPS) degradation, *Bioresour. Technol.* 213 (2016) 204–207.
- [143] A. Käßler, M. Fischer, B. M. Scholz-Böttcher, S. Oberbeckmann, M. Labrenz, D. Fischer, K.-J. Eichhorn, B. Voit, Comparison of μ -ATR-FTIR spectroscopy and py-GCMS as identification tools for microplastic particles and fibers isolated from river sediments, *Anal. Bioanal. Chem.* (2018) 410 (2018) 5313–5327.
- [144] J. C. J. Bart, *Plastics additives: advanced industrial analysis. Vol. 1*, IOS Press, Washington, 2006, str. 1–808.
- [145] EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Statement on the presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA J.* 14 (2016) 4501.
- [146] A. S. Tagg, M. Sapp, J. P. Harrison, J. J. Ojeda, Identification and quantification of microplastics in wastewater using focal plane array-based reflectance micro-FT-IR imaging, *Anal. Chem.* 87 (2015) 6032–6040.

- [147] M. R. Jung, F. D. Horgen, S. V. Orski, V. Rodriguez, K. L. Beers, G. H. Balazs, T. T. Jones, T. M. Work, K. C. Brignac, S.-J. Royer, K. D. Hyrenbach, B. A. Jensen, J. M. Lynch, Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms, *Mar. Pollut. Bull.* 127 (2018) 704–716. 10.1016/j.marpolbul.2017.12.061
- [148] I. Noda, A. E. Dowrey, J. L. Haynes, C. Marcott, Group frequency assignments for major infrared bands observed in common synthetic polymers, u J. E. Mark (ur.), *Physical properties of polymers handbook*. Vol. 1, Springer, New York, 2007, str. 395–406.
- [149] J. V. Glumine, P. R. Janissek, H. M. Heise, L. Akcelrud, Polyethylene characterization by FTIR, *Polym. Test.* 21 (2002) 557–563.
- [150] M. Mecozzi, L. Nisini, The differentiation of biodegradable and non-biodegradable polyethylene terephthalate (PET) samples by FTIR spectroscopy: A potential support for the structural differentiation of PET in environmental analysis, *Infrared Phys. Technol.* 101 (2019) 119–126.
- [151] P. Ribeiro Claro, M. M. Nolasco, C. Araujo, Characterization of microplastics by Raman spectroscopy, *Compr. Anal. Chem.* 75 (2017) 119–151.
- [152] L. Zada, H. A. Leslie, A. D. Vethaak, G. Tinnevelt, J. Janssen, J. F. Boer, F. de, Ariese, Fast microplastics identification with stimulated Raman scattering microscopy, *J. Raman Spectrosc.* 49 (2018) 1136–1144.
- [153] C. A. De Tender, L. I. Devriese, A. Haegeman, S. Maes, T. Ruttink, P. Dawyndt, Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 9629–9638.
- [154] X. Xiong, K. Zhang, X. Chen, H. Shi, Z. Luo, C. Wu, Sources and distribution of microplastics in China's largest inland lake - Qinghai Lake, *Environ. Pollut.* 235 (2018) 899–906.
- [155] C. Zhang, K.-C. Huang, B. Rajwa, J. Li, S. Yang, H. Lin, C. Liao, G. Eakins, S. Kuang, V. Patsekin, J. P. Robinson, J.-X. Cheng, Stimulated Raman scattering flow cytometry for label-free single-particle analysis, *Optica* 4 (2017a) 103–109.

- [156] S. Ghosal, M. Chen, J. Wagner, Z.-M. Wang, S. Wall, Molecular identification of polymers and anthropogenic particles extracted from oceanic water and fish stomach - a Raman micro-spectroscopy study, *Environ. Pollut.* 233 (2018) 1113–1124.
- [157] E. Duemichen, P. Eisentraut, M. Celina, U. Braun, Automated thermal extraction-desorption gas chromatography mass spectrometry: A multifunctional tool for comprehensive characterization of polymers and their degradation products, *J. Chromatogr. A* 1592 (2019) 133–142.
- [158] G. Biale, J. La Nasa, M. Mattonai, A. Corti, V. Vinciguerra, V. Castelvetro, F. Modugno, A systematic study on the degradation products generated from artificially aged microplastics, *Polymers* 13 (2021) 1997.
- [159] A. Fleurine, C. Chaza, M. Sébastien, P.-P. Ika, D. Périne, D. Alexandre, D. Guillaume, Identification and quantification of plastic additives using Pyrolysis-GC/MS: a review, *Sci. Total Environ.* 773 (2021) 145073.
- [160] B. Habchi, A. Kassouf, Y. Padellec, E. Rathahao-Paris, S. Alves, D. N. Rutledge, J. Maalouly, V. Ducruet, An untargeted evaluation of food contact materials by flow injection analysis-mass spectrometry (FIA-MS) combined with independent components analysis (ICA), *Anal. Chim. Acta* 1022 (2018) 1–32.
- [161] B. Sarvin, S. Lagziel, N. Sarvin, D. Mukha, P. Kumar, E. Aizenshtein, T. Shlomi, Fast and sensitive flow-injection mass spectrometry metabolomics by analyzing samplespecific ion distributions, *Nat. Commun.* 11 (2020) 3186.
- [162] S. C. Nanita, L. G. Kaldon, Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2015) 1–11.
- [163] D. P. Elpa, G. R. D. Prabhu, S.-P. Wu, K. S. Tay, P. L. Urban, Automation of mass spectrometric detection of analytes and related workflows: A review, *Talanta* 207 (2019) 1–32.
- [164] C. B. Ranger, Flow injection analysis, principles, techniques, applications and design, *Anal. Chem.* 53 (1981) 20A–32A.

- [165] M. McCooeye, Z. Mester, Comparison of flow injection analysis electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry and electrospray high-field asymmetric waveform ion mobility mass spectrometry and tandem mass spectrometry for the determination of underivatized amino acids, *RCM* 20 (2006) 1801–1808.
- [166] D. Yang, H. Shi, L. Li, J. Li, K. Jabeen, P. Kolandhasamy, Microplastic pollution in table salts from China, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015a) 13622–13627.
- [167] M. Long, B. Moriceau, M. Gallinari, C. Lambert, A. Huvet, J. Raffray, P. Soudant, Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: impact on their respective fates, *Mar. Chem.* 175 (2015) 39–46.
- [168] I. E. Napper, A. Bakir, S. J. Rowland, R. C. Thompson, Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics, *Mar. Pollut. Bull.* 99 (2015) 178–185.
- [169] L. C. de Sá, M. Oliveira, F. Ribeiro, T. L. Rochad, M. N. Futtera, Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: what do we know and where should we focus our efforts in the future?, *Sci. Total Environ.* 645 (2018) 1029–1039.
- [170] J. Ding, S. Zhang, H. Zou, Y. Zhang, R. Zhu, Occurrence, source and ecotoxicological effect of microplastics in freshwater environment, *Ecol. Environ. Sci.* 26 (2017) 1619–1626.
- [171] M. Cole, P. Lindeque, E. Fileman, C. Halsband, T. S. Galloway, The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 1130–1137.
- [172] L. C. de Sá, L. G. Luís, L. Guilhermino, Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions, *Environ. Pollut.* 196 (2015) 359–362.
- [173] C. Gambardella, V. Piazza, M. Albentosa, M. Joao Bebianno, C. Cardoso, M. Faimali, Microplastics do not affect standard ecotoxicological endpoints in marine unicellular organisms, *Mar. Pollut. Bull.* 143 (2019) 140–143.

- [174] C. Krogh Frydkjær, N. Iversen, P. Roslev, Ingestion and egestion of microplastics by the cladoceran *Daphnia magna*: effects of regular and irregular shaped plastic and sorbed phenanthrene, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 99 (2017) 655–661.
- [175] F. Gagné, Toxicity and disruption of quorum sensing in *Aliivibrio fischeri* by environmental chemicals: Impacts of selected contaminants and microplastics, *J. Xenobiotics* 7 (2017) 15–20.
- [176] M. P. Casado, A. Macken, H. J. Byrne, Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery, *Environ. Int.* 51 (2013) 97–105.
- [177] P. Bhattacharya, S. Lin, J. P. Turner, P. C. Ke, Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis, *J. Phys. Chem. C* 114 (2016) 16556–16561.
- [178] Y. Mao, H. Ai, Y. Chen, Z. Zhang, P. Zeng, L. Kang, W. Li, W. Gu, Q. He, H. Li, Phytoplankton response to polystyrene microplastics: Perspective from an entire growth period, *Chemosphere* 208 (2018) 1–40.
- [179] Y. Wu, P. Guo, X. Zhang, Y. Zhang, S. Xie, J. Deng, Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater alga, *J. Hazard. Mater.* 374 (2019b) 219–227.
- [180] D. An, J. Na, J. Song, J. Jung, Size-dependent chronic toxicity of fragmented polyethylene microplastics to *Daphnia magna*, *Chemosphere* 271 (2021) 129591.
- [181] P. Zhang, Z. Yan, G. Lu, Y. Ji, Single and combined effects of microplastics and roxithromycin on *Daphnia magna*, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26 (2019) 17010–17020.
- [182] M. Renzi, E. Grazioli, A. Blašković, Effects of different microplastic types and surfactant-microplastic mixtures under fasting and feeding conditions: a case study on *Daphnia magna*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 103 (2019) 367–373.
- [183] A. Jemec Kokalj, A. Dolar, D. Drobne, M. Marinšek, M. Dolenc, L. Škrlep, G. Strmljan, B. Mušič, A. Sever Škapin, Environmental hazard of polypropylene microplastics from disposable medical masks: acute toxicity towards *Daphnia magna* and current knowledge on other polypropylene microplastics, *Microplast. Nanoplast.* 2 (2022) 1–15.

- [184] Y. S. Eltemsah, T. Bøhn, Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*, *Environ. Pollut.* 254 (2019) 112919.
- [185] R. Al-Jaibachi, W. B. Laird, F. Stevens, A. Callaghan, Impacts of polystyrene microplastics on *Daphnia magna*: a laboratory and a mesocosm study, *Sci. Total Environ.* 705 (2020) 135800.
- [186] A. Jemec Kokalj, U. Kunej, T. Skalar, Screening study of four environmentally relevant microplastic pollutants: Uptake and effects on *Daphnia magna* and *Artemia franciscana*, *Chemosphere* 208 (2018) 522–529.
- [187] L. Zimmermann, S. Göttlich, J. Oehlmann, M. Wagner, C. Völker, What are the drivers of microplastic toxicity? Comparing the toxicity of plastic chemicals and particles to *Daphnia magna*, *Environ. Pollut.* 267 (2020) 115392.
- [188] I. Schrank, B. Trotter, J. Dummert, B. M. Scholz-Böttcher, M. G. J. Löder, C. Laforsch, Effects of microplastic particles and leaching additive on the life history and morphology of *Daphnia magna*, *Environ. Pollut.* 255 (2019) 113233.
- [189] Q. Chen, M. Gundlach, S. Yang, J. Jiang, M. Velki, D. Yin, H. Hollert, Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. *Sci. Total Environ.* 584 (2017) 1022–1031.
- [190] K. Xu, Y. Zhang, Y. Huang, J. Wang, Toxicological effects of microplastics and phenanthrene to zebrafish (*Danio rerio*), *Sci. Total Environ.* 757 (2021) 143730.
- [191] R. Zhang, M. Wang, X. Chen, C. Yang, L. Wu, Combined toxicity of microplastics and cadmium on the zebrafish embryos (*Danio rerio*), *Sci. Total Environ.* 743 (2020a) 140638.
- [192] I. Martínez-Álvarez, K. Le Menach, M.-H. Devier, M. P. Cajaraville, H. Budzinski, A. Orbea, Screening of the toxicity of polystyrene nano- and microplastics alone and in combination with benzo(a)pyrene in brine shrimp larvae and zebrafish embryos, *Nanomaterials* 12 (2022) 941.
- [193] K. Jabeen, L. Su, J. Li, D. Yang, C. Tong, J. Mu, H. Shi, Microplastics and mesoplastics in fish from coastal and fresh waters of China, *Environ. Pollut.* 221 (2017) 141–149.

- [194] T. S. S. Pegado, K. Schmid, K. O. Winemiller, D. Chelazzi, A. Cincinelli, L. Dei, T. Giarrizzo, First evidence of microplastic ingestion by fishes from the Amazon River estuary, *Mar. Pollut. Bull.* 133 (2018) 814–821.
- [195] S. Yao, H. Cao, H. P. H. Arp, J. Li, Y. Bian, Z. Xie, F. Cherubini, X. Jiang, Y. Song, The role of crystallinity and particle morphology on the sorption of dibutyl phthalate on polyethylene microplastics: Implications for the behavior of phthalate plastic additives, *Environ. Pollut.* 283 (2021) 117393.
- [196] M. Rossi, T. Lent, Creating safe & healthy spaces: Selecting materials that support healing. Paper presented at the 2006 Robert Wood Johnson Foundation Conference, 2006. <https://www.healthdesign.org/chd/research/designing-21st-century-hospitalenvironmental-leadership-healthier-patients-and-familli> (pristup 1.7.2023.)
- [197] M. Miloloža, K. Bule, Š. Ukić, M. Cvetnić, T. Bolanča, H. Kušić, V. Ocelić Bulatović, D. Kučić Grgić, Ecotoxicological determination of microplastics toxicity on algae *Chlorella* sp.; response surface modeling approach. *Water Air Soil Pollut.* 232 (2021) 327, 16.
- [198] M. Sigurnjak, Š. Ukić, M. Cvetnić, M. Markić, M. Novak Stankov, B. Rasulev, H. Kušić, A. Lončarić Božić, M. Rogošić, T. Bolanča, Combined toxicities of binary mixtures of alachlor, chlorfenvinphos, diuron and isoproturon, *Chemosphere* 240 (2020) 124973.
- [199] F. Gagné, Toxicity and disruption of quorum sensing in *Aliivibrio fischeri* by environmental chemicals: Impacts of selected contaminants and microplastics, *J. Xenobiotics* 7 (2017) 15–20.
- [200] M. Abbas, M. Adil, S. Ehtisham-ul-Haque, B. Munir, M. Yameen, A. Ghaffar, G. Abbas Shar, M. Asif Tahir, M. Iqbal, *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review, *Sci. Total Environ.* 626 (2018) 1295–1309.
- [201] M. Piccardo, F. Provenza, E. Grazioli, A. Cavallo, A. Terlizzi, M. Renzi, PET microplastics toxicity on marine key species is influenced by pH, particle size and food variations, *Sci. Total Environ.* 715 (2020) 136947.

- [202] Y. Mao, H. Ai, Y. Chen, Z. Zhang, P. Zeng, L. Kang, W. Li, W. Gu, Q. He, H. Li, Phytoplankton response to polystyrene microplastics: Perspective from an entire growth period, *Chemosphere* 208 (2018) 1–40.
- [203] Y. Wu, P. Guo, X. Zhang, Y. Zhang, S. Xie, J. Deng, Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater alga, *J. Hazard. Mater.* 374 (2019b) 219–227.
- [204] P. Bhattacharya, S. Lin, J. P. Turner, P. C. Ke, Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis, *J. Phys. Chem. C* 114 (2016) 16556–16561.
- [205] P. R. Leroueil, S. A. Berry, K. Duthie, G. Han, V. M. Rotello, D. Q. McNerny, J. R. Baker, B. G. Orr, M. M. Banaszak Holl, Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers, *Nano Lett.* 8 (2008) 420–424.
- [206] J. C. Prata, J.P. da Costa, I. Lopes, A. C. Duarte, T. Rocha-Santos, Effects of microplastics on microalgae populations: a critical review, *Sci. Total Environ.* 665 (2019) 400–405.
- [207] S. B. Sjollem, P. Redondo-Hasselerharm, H. A. Leslie, M. H. S. Kraak, A. D. Vethaak, Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth?, *Aquat. Toxicol.* 170 (2016) 259–261.
- [208] C. Zhang, X. Chen, J. Wang, L. Tan, Toxic effects of microplastics on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastics and algae, *Environ. Pollut.* 220 (2017) 1282–1288.
- [209] A. Jemec Kokalj, P. Horvat, U. Kunej, M. Bele, A. Kržan, Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*, *Environ. Pollut.* 219 (2016) 201–209.
- [210] Y. Ma, A. Huang, S. Cao, F. Sun, L. Wang, H. Guo, R. Ji, Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water, *Environ. Pollut.* 219 (2016) 66–173.
- [211] M. Ogonowski, C. Schür, Å. Jarsén, E. Gorokhova, The effects of natural and anthropogenic microparticles on individual fitness in *Daphnia magna*, *PLoS One* 11 (2016) 1–20.

- [212] L. Guilhermino, A. Martins, S. Cunha, J. O. Fernandes, Long-term adverse effects of microplastics on *Daphnia magna* reproduction and population growth rate at increased water temperature and light intensity: Combined effects of stressors and interactions, *Sci. Total Environ.* 784 (2021) 147082.
- [213] E. Besseling, B. Wang, M. Lüring, A. A. Koelmans, Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 12336–12343.
- [214] S. Rehse, W. Kloas, C. Zarfl, Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*, *Chemosphere* 153 (2016) 91–99.
- [215] S. Rist, A. Baun, N. B. Hartmann, Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction, *Environ. Pollut.* 228 (2017) 398–407.
- [216] P. Rosenkranz, Q. Chaudhry, V. Stone, T. F. Fernandes, A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *Daphnia magna*, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 2142–2149.
- [217] G. Jaikumar, J. Baas, N. R. Brun, M. G. Vijver, T. Bosker, Acute sensitivity of three *Cladoceran* species to different types of microplastics in combination with thermal stress, *Environ. Pollut.* 239 (2018) 733–740.
- [218] K. Jabeen, L. Su, J. Li, D. Yang, C. Tong, J. Mu, H. Shi, Microplastics and mesoplastics in fish from coastal and fresh waters of China, *Environ. Pollut.* 221 (2017) 141–149.
- [219] W. Sanchez, C. Bender, J. M. Porcher, Wild gudgeons (*Gobio gobio*) from French rivers are contaminated by microplastics: Pre-liminary study and first evidence, *Environ. Res.* 128 (2014) 98–100.
- [220] S. H. Campbell, P. R. Williamson, B. D. Hall, Microplastics in the gastrointestinal tracts of fish and the water from an urban prairie creek, *Facet* 2 (2017) 395–409.
- [221] L. G. A. Barboza, S. C. Cunha, C. Monteiro, J. O. Fernandes, L. Guilhermino, Bisphenol A and its analogs in muscle and liver of fish from the north east Atlantic ocean in relation to

microplastic contamination. Exposure and risk to human consumers, *J. Hazard. Mater.* 393 (2020) 122419.

[222] J. Ramos, M. Barletta, M. Costa, Ingestion of nylon threads by *Gerreidae* while using a tropical estuary as foraging grounds, *Aquat. Biol.* 17 (2012) 29–34.

[223] M. C. L. Oliveira, A. L. P. Ribeiro, K. Hylland, L. Guilhermino, Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae), *Ecol. Indic.* 34 (2013) 641–647.

[224] D. Mazurais, B. Ernande, P. Quazuguel, A. Severe, C. Huelvan, L. Madec, O. Mouchel, P. Soudant, J. Robbens, A. Huvet, J. Zambonino-Infante, Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae, *Mar. Environ. Res.* 112 (2015) 78–85.

[225] O. M. Lönnstedt, P. Eklöv, Environmentally relevant concentrations of microplastic particles influence larval fish ecology, *Sci.* 352 (2016) 1213–1216.

[226] C. M. Rochman, E. Hoh, T. Kurobe, S. J. Teh, Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress, *Sci. Rep.* 3 (2013) 3263.

[227] A. Saley, A. Smart, M. Bezerra, T. Burnham, L. Capece, L. Lima, A. Carsh, S. Williams, S. Morgan, Microplastic accumulation and biomagnification in a coastal marine reserve situated in a sparsely populated area, *Mar. Pollut. Bull.* 146 (2019) 54–59.

[228] Y. Lu, Y. Zhang, Y. Deng, W. Jiang, Y. Zhao, J. Geng, L. Ding, H.-Q. Ren, Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 4054–4060.

[229] Q. Chen, M. Gundlach, S. Yang, J. Jiang, M. Velki, D. Yin, H. Hollert, Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. *Sci. Total Environ.* 584 (2017) 1022–1031.

[230] W. J. Veneman, H. P. Spaink, N. R. Brun, T. Bosker, M. G. Vijver, Pathway analysis of systemic transcriptome responses to injected polystyrene particles in zebrafish larvae, *Aquat. Toxicol.* 190 (2017) 112–120.

- [231] L. Lei, S. Wu, S. Lu, M. Liu, Y. Song, Z. Fu, H. Shi, K. M. Raley-Susman, D. He, Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*, *Sci. Total Environ.* 15 (2018) 1–8.
- [232] Y. Zhao, Z. Bao, Z. Wan, Z. Fu, Y. Jin, Polystyrene microplastic exposure disturbs hepatic glycolipid metabolism at the physio-logical, biochemical, and transcriptomic levels in adult zebrafish, *Sci. Total Environ.* 710 (2019) 1–34.
- [233] W. S. Lee, H. J. Cho, E. Kim, Y. H. Huh, H. J. Kim, B. Kim, T. Kang, J. S. Lee, J. Jeong, Bioaccumulation of polystyrene nano-plastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos, *Nanoscale* 11 (2019) 3396.
- [234] C. C. Parenti, A. Ghilardi, C. Della Torre, S. Magni, L. Del Giacco, A. Binelli, Evaluation of the infiltration of polystyrene nano-beads in zebrafish embryo tissues after short-term exposure and the related biochemical and behavioural effects, *Environ. Pollut.* 254 (2019) 112947.
- [235] G. Malafaia, A. M. de Souza, A. C. Pereira, S. Gonçalves, A. P. da Costa Araújo, R. X. Ribeiro, T. L. Rocha, Developmental toxicity in zebrafish exposed to pristine polyethylene microplastics under static and semi-static systems, *Sci. Total Environ.* 700 (2020) 134867.
- [236] Y. Zhao, R. Qiao, S. Zhang, G. Wang, Metabolomic profiling reveals the intestinal toxicity of different length of microplastic fibers on zebrafish (*Danio rerio*), *J. Hazard. Mater.* 403 (2021) 123663.
- [237] M. S. Bhuyan, Effects of microplastics on fish and in human health, *Front. Environ. Sci.* 10 (2022) 827289.
- [238] S. Fang, W. Yu, C. Li, Y. Liu, J. Qiu, F. Kong, Adsorption behavior of three triazole fungicides on polystyrene microplastics, *Sci. Total Environ.* 691 (2019) 1119–1126.
- [239] J. C. Prata, B. R. B. O. Lavorante, B. S. M. Montenegro, L. Guilhermino, Influence of microplastics on the toxicity of the pharmaceuticals procainamide and doxycycline on the marine microalgae *Tetraselmis chuii*, *Aquat. Toxicol.* 197 (2018) 143–152.

- [240] J. Bayo, S. Olmos, J. López-Castellanos, A. Alcolea, C. A. Brebbia, H. Itoh, Microplastics and microfibers in the sludge of a municipal wastewater treatment plant, *Int. J. Sustain. Dev. Plan.* 11 (2016) 812–821.
- [241] Q. Zhang, Q. Qu, T. Lu, M. Ke, Y. Zhu, M. Zhang, Z. Zhang, B. Du, X. Pan, L. Sun, H. Qian, The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth, *Environ. Pollut.* 243 (2018) 1106–1112.
- [242] V. A. Sleight, A. Bakir, R. C. Thompson, T. B. Henry, Assessment of microplastic-sorbed contaminant bioavailability through analysis of biomarker gene expression in larval zebrafish, *Mar. Pollut. Bull.* 116 (2017) 291–297.
- [243] M. Shen, B. Song, Y. Zhu, G. Zeng, Y. Zhang, Y. Yang, X. Wen, M. Chen, H. Yi, Removal of microplastics via drinking water treatment: current knowledge and future directions, *Chemosphere* 251 (2020) 126612.
- [244] F. Yuan, L. Yue, H. Zhao, H. Wu, Study on the adsorption of polystyrene microplastics by three-dimensional reduced graphene oxide, *Water Sci. Technol.* 81 (2020) 2163–2175.
- [245] I. Nabi, A.-U.-R. Bacha, K. Li, H. Cheng, T. Wang, Y. Liu, S. Ajmal, Y. Yang, Y. Feng, L. Zhang, Complete photocatalytic mineralization of microplastic in TiO₂ nanoparticle film, *iScience* 23 (2020) 1–40.
- [246] H. Ding, J. Zhang, H. He, Y. Zhu, D. D. Dionysiou, Z. Liu, C. Zhao, Do membrane filtration systems in drinking water treatment plants release nano/microplastics?, *Sci. Total Environ.* 755 (2021) 1–3.
- [247] J. Lin, D. Yan, J. Fu, Y. Chen, H. Ou, Ultraviolet-C and vacuum ultraviolet inducing surface degradation of microplastics, *Water Res.* 186 (2020) 116360.
- [248] J. Grbic, B. Nguyen, E. Guo, J. B. You, D. Sinton, C. M. Rochman, Magnetic extraction of microplastics from environmental samples, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 6 (2019) 68–72.
- [249] M. Lares, M. C. Ncibi, M. Sillanpää, M. Sillanpää, Occurrence, identification and removal of microplastic particles and fibers in conventional activated sludge process and advanced MBR technology, *Water Res.* 133 (2018) 236–246.

- [250] M. Saleem, L. Alibardi, R. Cossu, M. C. Lavagnolo, A. Spagni, Analysis of fouling development under dynamic membrane filtration operation, *Chem. Eng. J.* 312 (2016) 136–143.
- [251] S. Raju, M. Carbery, A. Kuttykattil, K. Senathirajah, S. R. Subashchandrabose, G. Evans, P. Thavamani, Transport and fate of microplastics in wastewater treatment plants: implications to environmental health, *Rev. Environ. Sci.* 17 (2018) 637–653.
- [252] T. Maliwan, W. Pungrasmi, J. Lohwacharin, Effects of microplastic accumulation on floc characteristics and fouling behaviour in a membrane bioreactor, *J. Hazard. Mater.* 411 (2021) 124991.
- [253] Q. Wang, C. Hernández-Crespo, M. Santoni, S. Van Hulle, D. P. L. Rousseau, Horizontal subsurface flow constructed wetlands as tertiary treatment: Can they be an efficient barrier for microplastics pollution?, *Sci. Total Environ.* 721 (2020) 137785.
- [254] J. Talvitie, A. Mukola, A. Koistinen, O. Setälä, Solutions to microplastic pollution – Removal of microplastics from wastewater effluent with advanced wastewater treatment technologies, *Water Res.* 123 (2017b) 401–407.
- [255] L. Yang, K. Li, S. Cui, Y. Kang, L. An, K. Lei, Removal of microplastics in municipal sewage from China’s largest water reclamation plant, *Water Res.* 155 (2019) 175–181.
- [256] S. Das, *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Vol. 1, Elsevier, London, 2014, str. 1–614.
- [257] T. Matjašič, T. Simčič, N. Medvešček, O. Bajt, T. Dreo, N. Mori, Critical evaluation of biodegradation studies on synthetic plastics through a systematic literature review, *Sci. Total Environ.* 752 (2021) 141959.
- [258] A. M. Booth, S. Kubowicz, C. Beegle-Krause, J. Skancke, T. Nordam, E. Landsem, M. Throne-Holst, S. Jahren, Microplastic in global and norwegian marine environments: distributions, degradation mechanisms and transport. SINTEF (2017) 1–149. <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/M918/M918.pdf>
- [259] H. K. Kitamoto, Y. Shinozaki, X. Cao, T. Morita, M. Konishi, K. Tago, H. Kajiwara, M. Koitabashi, S. Yoshida, T. Watanabe, Y. Sameshima-Yamashita, T. Nakajima-Kambe, S.

Tsushima, Phyllosphere yeasts rapidly break down biodegradable plastics, *AMB Express* 1 (2011) 44.

[260] A. Pischedda, M. Tosin, F. Degli-Innocenti, Biodegradation of plastics in soil: the effect of temperature, *Polym. Degrad. Stabil.* 170 (2019) 109017.

[261] D. Price, A. R. Horrocks, Combustion processes of textile fibres, *Handbook of Fire Resistant Textiles*. University of Bolton, UK, 2013, str. 3–25.

[262] A. Hodžić, Re-use, recycling and degradation of composites, u C. Baillie (ur.), *Green Composites: Polymer Composites and the Environment*. Vol. 1, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2004, str. 252–271.

[263] B. Singh, N. Sharma, Mechanistic implications of plastic degradation, *Polym. Degrad. Stab.* 93 (2008) 561–584.

[264] Y. Tokiwa, B. P. Calabia, C. U. Ugwu, S. Aiba, Biodegradability of plastics, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (2009) 3722–3742

[265] L. Tang, Q. Wu, B. Qu, The effects of chemical structure and synthesis method on photodegradation of polypropylene, *J. Appl. Polym. Sci.* 95 (2005) 270–279.

[266] C. López de Dicastillo, E. Velásquez, A. Rojas, A. Guarda, M. J. Galotto, The use of nanoadditives within recycled polymers for food packaging: properties, recyclability, and safety, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19 (2020) 1760–1776.

[267] A. Krasowska, K. Sigler, How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs?, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4 (2014) 1–7.

[268] A. Arkatkar, A. A. Juwarkar, S. Bhaduri, P. V. Uppara, M. Doble, Growth of *Pseudomonas* and *Bacillus* biofilms on pretreated polypropylene surface, *Int. Biodeterior. Biodegr.* 64 (2010) 530–536.

[269] L. A. Amaral-Zettler, E. R. Zettler, T. J. Mincer, Ecology of the plastisphere, *Nat. Rev. Microbiol.* 18 (2020) 139–151.

- [270] R. Wei, W. Zimmermann, Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?, *Microb. Biotechnol.* 10 (2017) 1308–1322.
- [271] S. Skariyachan, V. Manjunatha, S. Sultana, C. Jois, V. Bai, K. S. Vasist, Novel bacterial consortia isolated from plastic garbage processing areas demonstrated enhanced degradation for low density polyethylene, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 18307–18319.
- [272] M. Santo, R. Weitsman, A. Sivan, The role of the copper-binding enzyme–laccase–in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*, *Int. Biodeter. Biodegr.* 84 (2013) 204–210.
- [273] J. Zhang, D. Gao, Q. Li, Y. Zhao, L. Li, H. Lin, Q. Bi, Y. Zhao, Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*, *Sci. Total Environ.* 704 (2020b) 135931.
- [274] L. D. Gomez-Mendez, D. A. Moreno-Bayona, R. A. Poutou-Pinales, J. C. Salcedo-Reyes, A. M. Pedroza Rodriguez, A. Vargas, J. M. Bogoya, Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*, *PLoS ONE* 13 (2018) e0203786.
- [275] J. Zhao, Z. Guo, X. Ma, G. Liang, J. Wang, Novel surface modification of highdensity polyethylene films by using enzymatic catalysis, *J. Appl. Polym. Sci.* 91 (2004) 3673–3678. <https://doi.org/10.1002/app.13619>
- [276] Y. Iiyoshi, Y. Tsutsumi, T. Nishida, Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase, *J. Wood Sci.* 44 (1987) 222–229.
- [277] M. G. Yoon, H. J. Jeon, M. N. Kim, Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and AlkB cloned recombinant cell, *J. Bioremed. Biodegrad.* 3 (2012) 1–8.
- [278] H. J. Jeon, M. N. Kim, Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 103 (2015) 141–146.
- [279] S. Yoshida, K. Hiraga, T. Takehana, I. Taniguchi, H. Yamaji, Y. Maeda, K. Toyohara, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate), *Sci.* 351 (2016) 1196–1199.

- [280] I. Taniguchi, S. Yoshida, K. Hiraga, K. Miyamoto, Y. Kimura, K. Oda, Biodegradation of PET: current status and application aspects, *ACS Catal.* 9 (2019) 4089–4105.
- [281] J. S. Webb, M. Nixon, I. M. Eastwood, M. Greenhalgh, G. D. Robson, P. S. Handley, Fungal colonization and biodeterioration of plasticized polyvinyl chloride, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 3194–3200.
- [282] Z. Kirbaş, N. Keskin, A. Güner, Biodegradation of polyvinylchloride (PVC) by white rot fungi, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63 (1999) 335–342.
- [283] M. Kumari, S. K. Gupta, Response surface methodological (RSM) approach for optimizing the removal of trihalomethanes (THMs) and its precursor's by surfactant modified magnetic nanoadsorbents (sMNP) - An endeavor to diminish probable cancer risk, *Sci. Rep.* 9 (2019) 18339.
- [284] A. Sah, H. Negi, A. Kapri, S. Anwar, R. Goel, Comparative shelf life and efficacy of LDPE and PVC degrading bacterial consortia under bioformulation, *Ekologija* 57 (2011) 55–61.
- [285] A. M. Brandon, S. H. Gao, R. Tian, D. Ning, S. S. Yang, J. Zhou, W. M. Wu, C. S. Criddle, Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome, *Environ. Sci. Technol.* 52 (2018) 6526–6533.
- [286] Y. Yang, J. Yang, W. M. Wu, J. Zhao, Y. Song, L. Gao, R. Yang, L. Jiang, Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015b) 12080–12086.
- [287] P. Bhatt, V. M. Pathak, A. R. Bagheri, M. Bilal, Microplastic contaminants in the aqueous environment, fate, toxicity consequences, and remediation strategies, *Environ. Res.* 200 (2021), 111762.
- [288] O. Eisaku, K. Linn, E. Takeshi, O. Taneaki, I. Yoshinobu, Isolation and characterization of polystyrene degrading microorganisms for zero emission treatment of expanded polystyrene, *Environ. Eng. Res.* 40 (2003) 373–379.

- [289] J. W. Hwang, C. Y. Choi, S. Park, E. Y. Lee, Biodegradation of gaseous styrene by *Brevibacillus* sp. using a novel agitating biotrickling filter, *Biotechnol. Lett.* 30 (2008) 1207–1212.
- [290] V. C. Sekhar, K. M. Nampoothiri, A. J. Mohan, N. R. Nair, T. Bhaskar, A. Pandey, Microbial degradation of high impact polystyrene (HIPS), an e-plastic with decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide, *J. Hazard. Mater.* 318 (2016) 347–354.
- [291] H.-K. Kim, J. H. Jo, Y.-B. Kim, T.-K. Le, C.-W. Cho, C.-H. Yun, W. S. Cji, S.-J. Yeom, Biodegradation of polystyrene by bacteria from the soil in common environments, *J. Hazard. Mater.* 416 (2021) 126239.
- [292] K. Nakamiya, T. Ooi, S. Kinoshita, Non-heme hydroquinone peroxidase from *Azotobacter beijerinckii* HM121, *J. Ferment. Bioeng.* 84 (1997) 14–21.
- [293] L. Tahir, M. I. Ali, M. Zia, N. Atiq, F. Hasan, S. Ahmed, Production and characterization of esterase in *Lantinus tigrinus* for degradation of polystyrene, *Pol. J. Microbiol.* 62 (2013) 101–108.
- [294] N. Mohanan, Z. Montazer, P. K. Sharma, D. B. Levin, Microbial and enzymatic degradation of synthetic plastics, *Front. Microbiol.* 11 (2020) 580709.
- [295] A. Amobonye, P. Bhagwat, S. Singh, S. Pillai, Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes, *Sci. Total Environ.* 759 (2021) 143536.
- [296] J. G. Speight, *Reaction mechanisms in environmental engineering: Analysis and Prediction*. Vol. 1, Elsevier, Kidlington, 2018, str. 1–442.
- [297] H. V. Sowmya, M. Ramalingappa Krishnappa, B. Thippeswamy, Biodegradation of polyethylene by *Bacillus cereus*, *Adv. Polym. Technol.* 4 (2014) 28–32.
- [298] C. N. Muhonja, H. Makonde, G. Magoma, M. Imbuga, Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya, *PLoS One* 13 (2018) 1–17.
- [299] A. A. Ibiene, H. O. Stanley, O. M. Immanuel, Biodegradation of polyethylene by *Bacillus* sp. indigenous to the Niger Delta mangrove swamp, *Niger. J. Biotechnol.* 26 (2013) 68–79.

- [300] P. P. Vimala, L. Mathew, Biodegradation of polyethylene using *Bacillus subtilis*, Proc. Technol. 24 (2016) 232–239.
- [301] D. Hadad, S. Geresh, A. Sivan, Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*, J. Appl. Microbiol. 98 (2005) 1093–1100.
- [302] M. Ariba Begum, B. Varalakshmi, K. Umamageswari, Biodegradation of polythene bag using bacteria isolated from soil, Int. J. Cur. Microbiol. Appl. Sci. 4 (2015) 674–680.
- [303] H. Rajandas, S. Parimannan, K. Sathasivam, M. Ravichandran, L. S. Yin, A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation, Polym. Test. 31 (2012) 1094–1099.
- [304] A. Paço, K. Duarte, J. P. da Costa, P. S. M. Santos, R. Pereira, M. E. Pereira, A. C. Freitas, A. C. Duarte, T. A. P. Rocha-Santos, Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*, Sci. Total Environ. 586 (2017) 10–15.
- [305] S. Skariyachan, A. A. Patil, A. Shankar, M. Manjunath, N. Bachappanavar, S. Kiran, Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants, Polym. Deg. Stab. 149 (2018) 52–68.
- [306] S. Y. Park, C. G. Kim, Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site, Chemosphere 222 (2019) 527–533.
- [307] B. Nowak, J. Pająk, M. Drozd-Bratkowicz, M. G. Rymarz, Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions, Int. Biodeter. Biodegradation 65 (2011) 757–767.
- [308] G. Singh, A. K. Singh, K. Bhatt, Biodegradation of polythene by bacteria isolated from soil, Int. J. Res. Dev. Pharm. Life Sci. 5 (2016) 2056–2062.
- [309] H. S. Auta, C. U. Emenike, B. Jayanthi, S. H. Fauziah, Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment, Mar. Pollut. Bull. 127 (2018) 15–21.

- [310] A. Kumari, D. R. Chaudhary, B. Jha, Destabilization of polyethylene and polyvinylchloride structure by marine bacterial strain, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26 (2019) 1507–1516.
- [311] Z. Zhang, H. Peng, D. Yang, G. Zhang, J. Zhang, F. Ju, Polyvinyl chloride degradation by a bacterium isolated from the gut of insect larvae, *Nat. Commun.* 13 (2022) 5360.
- [312] H.-K. Kim, J. H. Jo, Y.-B. Kim, T.-K. Le, C.-W. Cho, C.-H. Yun, W. S. Cji, S.-J. Yeom, Biodegradation of polystyrene by bacteria from the soil in common environments, *J. Hazard. Mater.* 416 (2021) 126239.
- [313] Y. Yang, J. Yang, W. M. Wu, J. Zhao, Y. Song, L. Gao, R. Yang, L. Jiang, Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015b) 12080–12086.
- [314] V. C. Sekhar, K. M. Nampoothiri, A. J. Mohan, N. R. Nair, T. Bhaskar, A. Pandey, Microbial degradation of high impact polystyrene (HIPS), an e-plastic with decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide, *J. Hazard. Mater.* 318 (2016) 347–354.
- [315] P. G. Ward, M. Goff, M. Donner, W. Kaminsky, K. E. O'Connor, A two step chemo biotechnological conversion of polystyrene to a biodegradable thermoplastic, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 2433–2437.
- [316] R. A. Wilkes, L. Aristilde, Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges, *J. Appl. Microbiol.* 123 (2017) 582–593.
- [317] L. Tian, B. Kolvenbach, N. Corvini, S. Wang, N. Tavanaie, L. Wang, Y. Ma, S. Scheu, P. F.-X. Corvini, R. Ji, Mineralisation of ¹⁴C-labelled polystyrene plastics by *Penicillium variable* after ozonation pre-treatment, *New Biotechnol* 38 (2017) 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.07.008>
- [318] A. Manzur, M. Limón-González, E. Favela-Torres, Biodegradation of physicochemically treated LDPE by a consortium of filamentous fungi, *J. Appl. Polym. Sci.* 92 (2004) 265–271.

- [319] M. S. Kuyukina, I. B. Ivshina, S. O. Makarov, L. V. Litvinenko, C. J. Cunningham, J. C. Philp, Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system, *Environ. Int.* 31 (2005) 155–161.
- [320] A. Martínez-Toledo, R. Rodríguez-Vázquez, C. A. Ilizaliturri-Hernández, Culture media formulation and growth conditions for biosurfactants production by bacteria, *Int. J. Environ. Sci. Nat. Resour.* 10 (2018) 117–125.
- [321] T. C. Hazen, Biostimulation, u K. N. Timmis, T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo (ur.), *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Vol. 1, Springer, Berlin, 2010, str. 4517–4530.
- [322] C. Matthies, H.-P. Erhard, H. L. Drake, Effects of pH on the comparative culturability of fungi and bacteria from acidic and less acidic forest soils, *J. Basic Microbiol.* 37 (1997) 335343.
- [323] S. Semrany, L. Favier, H. Djelal, S. Taha, A. Amrane, Bioaugmentation: possible solution in the treatment of bio-refractory organic compounds (Bio-ROCs), *Biochem. Eng. J.* 69 (2012) 75–86.
- [324] J. Tao, C. Qin, X. Feng, L. Ma, X. Liu, H. Yin, Y. Liang, H. Liu, C. Huang, Z. Zhang, N. Xiao, D. Meng, Traits of exogenous species and indigenous community contribute to the species colonization and community succession, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 3087.
- [325] R. Radhakrishnan, A. Hashem, E. F. Abd_Allah, *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments, *Front. Physiol.* 8 (2017) 667.
- [326] A. Wen, M. Fegan, C. Hayward, S. Chakraborty, L. Sly, Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1999) 567–576.
- [327] B. H. Iglewski, Chapter 27, *Pseudomonas*, u S. Baron (ur.), *Medical Microbiology*. Vol. 4, University of Texas Medical Branch at Galveston, Texas, 1996 str. 1–1273.

- [328] N. Tkachuk, L. Zelena, The impact of bacteria of the genus *Bacillus* upon the biodamage/biodegradation of some metals and extensively used petroleum-based plastics, *Corros. Mater.* 2 (2021) 531–553.
- [329] J. Sarwan, J. C. K. Bose, Role of isolates of *Bacillus* species for biodegradation of multiple contaminants, *J. Environ. Manage.* 1 (2022) 292–298.
- [330] P. Tribedi, A. K. Sil, Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm, *ESPR* 20 (2013) 4146–4153.
- [331] M. Cregut, M. Bedas, M. J. Durand, G. Thouand, New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1634–1647.
- [332] M. M. O'Mahony, A. D. Dobson, J. D. Barnes, I. Singleton, The use of ozone in the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil, *Chemosphere*, 63 (2006) 307–314.
- [333] A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, S. Ahmed, Biological degradation of plastics: A comprehensive review, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 246–265.
- [334] A. R. Shetty, V. de Gannes, C. C. Obi, S. Lucas, A. Lapidus, J.-F. Cheng, L. A. Goodwin, S. Pitluck, L. Peters, N. Mikhailova, H. Teshima, C. Han, R. Tapia, M. Land, L. J. Hauser, N. Kyrpides, N. Ivanova, I. Pagani, P. S. G. Chain, V. J. Deneff, T. Woyke, W. J. Hickey, Complete genome sequence of the phenanthrene-degrading soil bacterium *Delftia acidovorans* Cs1-4, *Stand. Genom. Sci.* 10 (2015) 1–10.
- [335] J. J. Dynes, T. Rema, J. R. Lawrence, G. D. W. Swerhone, A. P. Hitchcock, STXM and SR-IR analysis of *Delftia acidovorans* biofilms exposed to chlorhexidine, *Surveill. Rep. EPS (Environ. Can.)* 104 (2007) 104–105.
- [336] T. Nakajimakambe, F. Onuma, N. Kimpara, T. Nakahara, Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source, *FEMS Microbiol. Lett.* 129 (1995) 39–42.

- [337] M. Crnjac, N. Gjeldum, B. Bilić, The application of Taguchi method for choosing the optimal table construction, International conference “Mechanical Technologies and Structural Materials”, 2017, str. 1–7.
- [338] R. S. Rao, C. G. Kumar, R. S. Prakasham, P. J. Hobbs, The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: A critical appraisal, *Biotechnol. J.* 3 (2008) 510–523.
- [339] B. Roozbehani, S. A. Sakaki, M. Shishesaz, N. Abdollahkhani, S. Hamedifar, Taguchi method approach on catalytic degradation of polyethylene and polypropylene into gasoline, *Clean Techn. Environ. Policy* 17 (2015) 1873–1882.
- [340] L.-S. Chang, Optimization of biodegradability of poly(lactic acid) by Taguchi method, *Polym. Plast. Technol. Eng.* 49 (2010) 158–163.
- [341] S. Ramezani, A. A. Pourbabaee, H. Javaheri Daneshmand, Biodegradation of malachite green by *Klebsiella terrigenaptcc* 1650: the critical parameters were optimized using taguchi optimization method, *J. Bioremed. Biodeg.* 4 (2013) 1000175.
- [342] R. Batista Pentead, D. Guerra Filho, R. F. Toledo de Oliveira, M. Borges Silva, Taguchi method applied in a treatment of dairy wastewater using advanced oxidation process, *IJIREM* 2 (2015) 89–96.
- [343] V. Kozik, K. Barbusinski, M. Thomas, A. Sroda, J. Jampilek, A. Sochanik, A. Smolinski, A. Bak, Taguchi method and response surface methodology in the treatment of highly contaminated tannery wastewater using commercial potassium ferrate, *Materials* 12 (2019) 3784.
- [344] C. B. C. Raj, H. L. Quen, Advanced oxidation processes for wastewater treatment: Optimization of UV/H₂O₂ process through a statistical technique, *Chem. Eng. Sci.* 60 (2005) 5305–5311.
- [345] M. B. Silva, L. M. Carneiro, J. P. A. Silva, I. dos Santos Oliveira, H. J. I. Filho, C. R. de Oliveira Almeida, An application of the Taguchi method (robust design) to environmental engineering: evaluating advanced oxidative processes in polyester-resin wastewater treatment, *AJAC* 5 (2014) 828–837.

- [346] Y. Liu, Y. Zheng, A. Wang, Response surface methodology for optimizing adsorption process parameters for methylene blue removal by a hydrogel composite, *Adsorpt. Sci. Technol.* 28 (2010) 913–922.
- [347] S. Pfaff, B. Salopek, Primjena planiranja eksperimenata u oplemenjivanju mineralnih sirovina. *Rudarsko – geološko – naftni zbornik*, 16, 2004, str. 97–106.
- [348] M. Ukrainczyk, Planiranje pokusa u industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 5 (2010) 96-105.
- [349] J. M. Bland, D. G. Altman, Statistics notes; measurement error, *BMJ* 313 (1996) 41–42.
- [350] OECD. Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2; OECD Publishing: Paris, France, 1984.
- [351] OECD. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2; OECD Publishing: Paris, France, 2011.
- [352] ISO 10712; Water Quality—*Pseudomonas Putida* Growth Inhibition Test *Pseudomonas* Cell Multiplication Inhibition Test; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 1995.
- [353] A. Stilinović, *Saccharomyces cerevisiae* test (YTT) as the water toxicity determination method. *Acta Bot. Croat.* 40 (1981) 127–131.
- [354] HRN EN ISO 11348-3:2010, Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* bacteria (Test with luminescent bacteria) - Part 3: Method using lyophilized bacteria.
- [355] J. Hrenovic, B. Stilinović, L. Dvoraček, Use of prokaryotic and eukaryotic biotests to assess, *Acta Chim. Slov.* 52 (2005) 119–125.
- [356] F. Briški, N. Kopčić, I. Ćosić, D. Kučić, M. Vuković, Biodegradation of tobacco waste by composting: genetic identification of nicotine-degrading bacteria and kinetic analysis of transformations in leachate, *Chem. Pap.* 66 (2012) 1103–1110.

- [357] H. J. Benson, Microbiological applications, A laboratory manual in general microbiology. Vol. 8, The McGraw-Hill Companies, New York, 2001, str. 154–156, 160, 168, 169.
- [358] G. Smith, A. H. S. Onions, D. Allsopp, H. O. W. Eggins, Smith's Introduction to Industrial Mycology. Vol. 7, Edward Arnold, London, 1981, str. 1–398.
- [359] T. Backhaus, M. Scholze, L. H. Grimme, The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*, *Aquat. Toxicol.* 49 (2000) 49-61.
- [360] R. H. Myers, D. C. Montgomery, C. M. Anderson-Cook, Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. Vol. 3, John Wiley & Sons, Hoboken, 2009, str. 1–856.
- [361] S. D. Khandare, D. R. Chaudhary, B. Jha, Bioremediation of polyvinyl chloride (PVC) films by marine bacteria, *Mar. Pollut. Bull.* 169 (2021) 112566.
- [362] A. Menéndez-Pedriza, J. Jaumot, Interaction of environmental pollutants with microplastics: a critical review of sorption factors, bioaccumulation and ecotoxicological effects, *Toxics* 8 (2020) 40.
- [363] M. Hui, P. Shengyan, L. Shibin, B. Yingchen, S. Mandal, X. Baoshan, Microplastics in aquatic environments: toxicity to trigger ecological consequences, *Environ. Pollut.* 261 (2020) 114089.
- [364] M. Long, I. Paul-Pont, H. Hegaret, B. Moriceau, C. Lambert, A. Huvet, P. Soudant, Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation, *Environ. Pollut.* 228 (2017) 454-463.
- [365] J. P. F. D'Mello, A Handbook of environmental toxicology: Human disorders and ecotoxicology, CABI, Wallingford, 2020, str. 1–610.
- [366] M. M. El-Sheekh, R. A. Hamouda, A. A. Nizam, Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions, *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 82 (2013) 67–72.

- [367] R. V. Kumar, G. R. Kanna, S. Elumalai, Biodegradation of polyethylene by green photosynthetic microalgae, *J. Bioremediat. Biodegrad.* 8 (2017) 1000381.
- [368] J. Frost, Regression analysis: an intuitive guide for using and interpreting linear models. E-book, 2019. <https://statisticsbyjim.selz.com/item/regression-analysis-an-intuitive-guide> (pristup 10.6.2023.)
- [369] M. Cvetnić, D. Juretić Perišić, M. Kovačić, Š. Ukić, T. Bolanča, B. Rasulev, H. Kušić, A. Lončarić Božić, Toxicity of aromatic pollutants and photooxidative intermediates in water: A QSAR study, *Ecotox. Environ. Safe.* 169 (2019) 918–927.
- [370] J. D. Roberts, M. C. Caserio, Basic principles of organic chemistry. Vol. 2, Elsevier, California, 1977, str. 1–485.
- [371] Z.-I. Zhu, S.-c. Wang, F.-f. Zhao, S.-g. Wang, F.-f. Liu, G.-z. Liu, Joint toxicity of microplastics with triclosan to marine microalgae *Skeletonema costatum*, *Environ. Pollut.* (2019) 1–31.
- [372] L. Zimmermann, G. Dierkes, T. A. Ternes, C. Völker, M. Wagner, Benchmarking the *in vitro* toxicity and chemical composition of plastic consumer products, *Environ. Sci. Technol.* 53 (2019) 11467–11477.
- [373] K. Gourounti, K. Lykeridou, E. Protopapa, E. Lazaris, Mechanisms of actions and health effects of organochlorine substances. A review, *Health Sci. J.* 2 (2008) 89–98.
- [374] R. Jayaraj, P. Megha, P. Sreedev, Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment, *Interdiscip. Toxicol.* 9 (2016) 90–100.
- [375] D. Juretic, J. Puric, H. Kusic, A. Loncaric Bozic, V. Marin, Structural influence on photooxidative degradation of halogenated phenols, *Water Air Soil Pollut.* 225 (2014) 1–18.
- [376] A. Khoironi, S. Anggoro, S. Sudarno, Evaluation of the interaction among microalgae *Spirulina* sp., plastics polyethylene terephthalate and polypropylene in freshwater environment, *J. Ecol. Eng.* 20 (2019) 161–173.

- [377] M. Capolupo, L. Sørensen, K. D. R. Jayasena, A. M. Booth, E. Fabbri, Chemical composition and ecotoxicity of plastic and car tire rubber leachates to aquatic organisms, *Water Res.* 169 (2020) 115270.
- [378] S. Washington, M. G. Karlaftis, F. Mannering, P. Anastasopoulos, Statistical and econometric methods for transportation data analysis. Vol. 3, CRC Press, New York, 2020, str. 1–496.
- [379] S. Garrido, M. Linares, J. M. Campillo, M. Albentosa, Effect of microplastics on the toxicity of chlorpyrifos to the microalgae *Isochrysis galbana*, clone t-ISO, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 173 (2019) 103–109.
- [380] Y. Guo, W. Ma, J. Li, W. Liu, P. Qi, Y. Ye, B. Guo, J. Zhang, C. Qu, Effects of microplastics on growth, phenanthrene stress, and lipid accumulation in a diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *Environ. Pollut.* 257 (2019) 113628.
- [381] D. Moog, J. Schmitt, J. Senger, J. Zarzycki, K. H. Rexer, U. Linne, T. Erb, U. G. Maier, Using a marine microalga as a chassis for polyethylene terephthalate (PET) degradation, *Microb. Cell. Fact.* 18 (2019) 171.
- [382] J. W. Kim, S. B. Park, Q. G. Tran, D. H. Cho, D. Y. Choi, Y. J. Lee, H. S. Kim, Functional expression of polyethylene terephthalate degrading enzyme (PETase) in green microalgae, *Microb. Cell. Fact.* 19 (2020) 97.
- [383] W. Falah, F. Chen, B. S. Zeb, M. T. Hayat, Q. Mahmood, A. Ebadi, M. Toughani, E. Li, Polyethylene terephthalate degradation by microalga *Chlorella vulgaris* along with pretreatment, *Mater. Plast.* 57 (2020) 260–270.
- [384] J. Sikkema, B. Poolman, W. N. Konings, J. A. M. de Bont, Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes, *J. Bacteriol.* 174 (1992) 2986–2992.
- [385] W. J. Li, L. N. Jayakody, M. A. Franden, M. Wehrmann, T. Daun, B. Hauer, L. M. Blank, G. T. Beckham, J. Klebensberger, N. Wierckx, Laboratory evolution reveals the metabolic and

regulatory basis of ethylene glycol metabolism by *Pseudomonas putida* KT2440, Environ. Microbiol. 21 (2019) 3669–3682.

[386] C. Roberts, S. Edwards, M. Vague, R. León-Zayas, H. Scheffer, G. Chan, N. A. Swartz, J. L. Mellies, Environmental consortium containing *Pseudomonas* and *Bacillus* species synergistically degrades polyethylene terephthalate plastic, Appl. Environ. Sci. 5 (2020) e01151–20.

[387] A. Bollinger, S. Thies, E. Knieps-Grünhagen, C. Gertzen, S. Kobus, A. Höppner, M. Ferrer, H. Gohlke, S. H. J. Smits, K. E. Jaeger, A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri* – structural and functional insights, Front. Microbiol. 11 (2020) 114.

[388] S. Joo, I. J. Cho, H. Seo, H. F. Son, H. Y. Sagong, T. J. Shin, S. Y. Choi, S. Y. Lee, K. J. Kim, Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation, Nat. Commun. 9 (2018) 382.

[389] J. G. Black, Microbiology: principles and explorations. Vol. 8, John Wiley&Sons, New Jersey, 2012, str. 68–71.

[390] T. J. Silhavy, D. Kahne, S. Walker, The bacterial cell envelope, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2 (2010) a000414.

[391] M. Q. Yousif, S. A. Qasem, Tissue processing and staining for histological analyses, u M. Z. Albanna, J. H. Holmes (ur.), Skin tissue engineering and regenerative medicine. Vol. 3, Elsevier: New York, USA, 2016, str. 49–59.

[392] A. Oktari, Y. Supriatin, M. Kamal, H. Syafrullah, The bacterial endospore stain on Schaeffer Fulton using variation of methylene blue solution, J. Phys. Conf. Ser. 812 (2017) 012066.

[393] I. Pepper, C. P. Gerba, T. Gentry, Environmental Microbiology, u I. Pepper, C. P. Gerba, T. Gentry (ur.), Microorganisms found in the environment. Vol. 3, Elsevier: New York, 2015, str. 9–33.

- [394] D. Sue, A. R. Hoffmaster, T. Popovic, P. P. Wilkins, Capsule production in *Bacillus cereus* strains associated with severe pneumonia, *J. Clin. Microbiol.* 44 (2006) 3426–3428.
- [395] N. Singhal, M. Kumar, P. K. Kanaujia, J. S. Viridi, MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 791.
- [396] S. Anbu, P. Saranraj, J. Padma, Synergetic effect of microbially fermented soybean and NPK fertilizer on plant growth of grand naine banana, *J. Academia Ind. Res.* 6 (2017) 27–31.
- [397] Y. Du, Z. Xu, G. Yu, W. Liu, Q. Zhou, D. Yang, J. Li, L. Chen, Y. Zhang, C. Xue, Y. Cao, A newly isolated *Bacillus subtilis* strain named WS-1 inhibited diarrhea and death caused by pathogenic *Escherichia coli* in newborn piglets, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 1–11.
- [398] S. Garcha, N. Verma, S. K. Brar, Isolation, characterization and identification of microorganisms from unorganized dairy sector wastewater and sludge samples and evaluation of their biodegradability, *Water Res. Ind.* 16 (2016) 19–28.
- [399] S. Kalaivani, A. Kumar Sahu, K. Shanthi, Screening and isolation of effective microbes from organic wastes for faster and effective degradation of bio-degradable municipal solid waste, *International Conference on Green Technology and Environmental Conservation*. 2011, str. 162–166. doi:10.1109/gtec.2011.6167663
- [400] D. Trofa, A. Gacser, J. D. Nosanchuk, *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen, *Clin. Microbiol. Rev.* 21 (2008) 606–625.
- [401] S. Neji, I. Hadrich, H. Trabelsi, S. Abbes, F. Cheikhrouhou, H. Sellami, F. Makni, A. Ayadi, Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens, *J. Biomed. Sci.* 24 (2017) 1–16.
- [402] K. Schmidt-Rohr, Oxygen is the high-energy molecule powering complex multicellular life: Fundamental corrections to traditional bioenergetics, *ACS Omega.* 5 (2020) 2221–2233.
- [403] D. Price, A. R. Horrocks, Combustion processes of textile fibres, u F. S. Kilinc (ur.), *Handbook of Fire Resistant Textiles*. Vol. 1, Woodhead Publishing Limited, London, 2013, str. 3–25.

- [404] T. F. El-Arabi, M. W. Griffiths, Characteristics of *Bacillus cereus*, u J. G. Morris i E. Morris (ur.), Foodborne Infections and Intoxications. Vol. 4, Elsevier, London, 2013, str. 401–407.
- [405] X. Zhang, A. Al-Dossary, M. Hussain, P. Setlow, J. Lia, Applications of *Bacillus subtilis* spores in biotechnology and advanced materials. Appl. Environ. Microbiol. 86 (2020c) e01096–20.
- [406] M. Suzuki, S. Suzuki, M. Matsui, Y. Hiraki, F. Kawano, K. Shibayama, Genome sequence of a strain of the human pathogenic bacterium *Pseudomonas alcaligenes* that caused bloodstream infection, Genome Announc. 1 (2013) e00919-13.
- [407] N. A. Ismail, N. Kasmuri, N. Hamzah, J. Jaafar, A. Mojiri, T. Kindaichi, Influence of pH and concentration on the growth of bacteria-fungus and benzo[a]pyrene degradation, Environ. Technol. Innov. 29 (2023) 102995.
- [408] Z. Yuan, R. Nag, E. Cummins, Human health concerns regarding microplastics in the aquatic environment - From marine to food systems, Sci. Total Environ. 823 (2022b) 153730.
- [409] A. Elkarmi, K. Abu-Elteen, M. Khader, Modeling the biodegradation efficiency and growth of *Pseudomonas alcaligenes* utilizing 2,4-dichlorophenol as a carbon source pre- and post-exposure to UV radiation, Jordan J. Biol. Sci. 1 (2008) 7–11.
- [410] M. C. Ubalde, V. Braña, F. Sueiro, M. Morel, C. Martínez-Rosales, C. Marquez, S. Castro-Sowinski, The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies, Curr. Microbiol. 64 (2012) 597–603.
- [411] I. Bisutti, I. Hilke, M. Raessler, Determination of total organic carbon – an overview of current methods, TRAC 23 (2004) 716–726.
- [412] Z. Tian, S.-K. Kim, J.-H. Hyun, Environmental distribution of styrene oligomers (SOs) coupled with their source characteristics: tracing the origin of SOs in the environment, J. Hazard. Mater. 398 (2020) 122968.
- [413] A. Baker, S. Cumberland, N. Hudson, Dissolved and total organic and inorganic carbon in some British rivers, Area 40 (2008) 117–127.

- [414] B. O. Keller, J. Sui, A. B. Young, R. M. Whittal, Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 71–81.
- [415] S.-c. Wang, Z.-y. Gao, F.-f. Liu, S.-q. Chen, G.-z. Liu, Effects of polystyrene and triphenyl phosphate on growth, photosynthesis and oxidative stress of *Chaetoceros meülleri*. *Sci. Total Environ.* 797 (2021) 149180.
- [416] C. P. Roe, P. Brass, The effect of aliphatic detergents on the mechanical stability of polystyrene latex, *J. Colloid Sci.* 10 (1955) 194–205.
- [417] C. A. M. Bondi, J. L. Marks, L. B. Wroblewski, H. S. Raatikainen, S. R. Lenox, K. E. Gebhardt, Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLSs): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products, *Environ. Health Insights* 9 (2015) 27–32.
- [418] Merck, LC-MS Contaminants Avoid, identify, minimize. How to identify and avoid contaminants in LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry), 2020, str. 1–40. <file:///E:/Desktop/tp6453en-mk.pdf> (pristup 15.6.2023.)
- [419] E. Wenande, L. H. Garvey, Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review, *Clin. Exp. Allergy* 46 (2016) 907–922.
- [420] V. García Ibarra, R. Sendón, X.-X. García-Fonte, P. Paseiro Losada, A. Rodríguez Bernaldo de Quirós, Migration studies of butylated hydroxytoluene, tributyl acetylcitrate and dibutyl phthalate into food simulants, *J. Sci. Food Agric.* 99 (2018) 1586–1595.
- [421] G. E. De-la-Torre, D. C. Dioses-Salinas, C. I. Pizarro-Ortega, M. Saldaña-Serrano, Global distribution of two polystyrene-derived contaminants in the marine environment: A review, *Mar. Pollut. Bull.* 161 (2020) 111729.
- [422] A. Schreiber, F. Fu, O. Yang, E. Wan, L. Gu, Y. LeBlanc, Increasing selectivity and confidence in detection when analyzing phthalates by LC-MS/MS, *Food and Environment* (2011) 1–6.
- [423] T. D. Anđelković, G. M. Kocić, D. H. Anđelković, I. S. Kostić, D.S. Milojković, The signal response linearity in phthalates determination using esi-ms method with the loop injection technique, *Adv. Technol.* 4 (2015) 42–48.

- [424] A. Thelliez, A. Descat, P. Bouchot, M. Kouach, J.-F. Goossens, B. Decaudin, M. Lecoer, High-performance liquid chromatography–ultraviolet detection method to evaluate the migration of di(2-ethylhexyl) terephthalate and its metabolite from polyvinyl chloride bag in four labile blood products, *Sep. Sci. plus* 5 (2022) 65–74.
- [425] K. Wei, H. Yina, H. Peng, G. Lu, Z. Dang, Bioremediation of triphenyl phosphate in river water microcosms: Proteome alteration of *Brevibacillus brevis* and cytotoxicity assessments, *Sci. Total Environ.* 649 (2019) 563–570.
- [426] M. Feng., J. Zhou, X. Yu, W. Mao, Y. Guo, H. Wang, Insights into biodegradation mechanisms of triphenyl phosphate by a novel fungal isolate and its potential in bioremediation of contaminated river sediment, *J. Hazard. Mater. (Part B)* 424 (2022) 127545.
- [427] R. J. Wright, R. Bosch, M. I. Gibson, J. A. Christie-Oleza, Plasticizer degradation by marine bacterial isolates: a proteogenomic and metabolomic characterization, *Environ. Sci. Technol.* 54 (2020) 2244–2256.
- [428] J. Wang, C. Min, G. Zheng, An intracellular esterase from *Bacillus cereus* catalyzing hydrolysis of 1-chloro-3-(1-naphthoxy)-2-acetoxypropanol, *Ann. Microbiol.* 60 (2010) 59–64.
- [429] J. R. Haines, M. Alexander, Microbial degradation of polyethylene glycols, *Appl. Microbiol.* 29 (1975) 621–625.
- [430] G. K. Watson, N. Jones, The biodegradation of polyethylene glycols by sewage bacteria, *Water Res.* 11 (1977) 95–100.
- [431] W. Thiele, L. Kyjacova, A. Kohler, J. P. Sleeman, A cautionary note: Toxicity of polyethylene glycol 200 injected intraperitoneally into mice, *Lab. Anim.* 0 (2019) 1–6.
- [432] J. C. Achar, G. Nam, J. Jung, H. Klammler, M. M. Mohamed, Microbubble ozonation of the antioxidant butylated hydroxytoluene: degradation kinetics and toxicity reduction, *Environ. Res.* 186 (2020) 109496.
- [433] A. Medić, K. L. Stojanović, L. Izrael-Živković, V. Beškoski, B. Lončarević, S. Kazazić, I. Karadžić, A comprehensive study of conditions of the biodegradation of a plastic additive 2,6-di-

tert-butylphenol and proteomic changes in the degrader *Pseudomonas aeruginosa* san ai, RSC Adv. 9 (2019) 23696–23710.

[434] A. Krastanov, Z. Alexieva, H. Yemendzhiev, Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives, Eng. Life Sci. 13 (2013) 76–87.

[435] F. Zeng, K. Cui, X. Li, J. Fu, G. Sheng, Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescences* FS1, Process Biochem. 39 (2004) 1125–1129.

[436] K. C. Ahire, B. P. Kapadnis, G. J. Kulkarni, Y. S. Shouche, R. L. Deopurkar, Biodegradation of tributyl phosphate by novel bacteria isolated from enrichment cultures, Biodegradation 23 (2011) 165–176.

[437] X. Sun, W. Zhang, Y. Wang, X. Liu, X. Shi, S. Xu, Combined exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and polystyrene microplastics induced renal autophagy through the ROS/AMPK/ULK1 pathway, Food Chem. Toxicol. 171 (2023) 113521.

[438] D.-W. Liang, T. Zhang, H. H. P. Fang, J. He, Phthalates biodegradation in the environment, Appl. Microbiol. Biotechnol. 80 (2008) 183–198.

[439] R. Hou, X. Luo, C. Liu, L. Zhou, J. Wen, Y. Yuan, Enhanced degradation of triphenyl phosphate (TPHP) in bioelectrochemical systems: kinetics, pathway and degradation mechanisms, Environ. Pollut. 254 (2019) 113040.

[440] M. Subramani, U. Sepperumal, FTIR analysis of bacterial mediated chemical changes in polystyrene foam, Ann. Biol. Res. 7 (2016) 55–61.

[441] I. Nyamjav, Y. Jang, Y. E. Lee, S. Lee, Biodegradation of polyvinyl chloride by *Citrobacter koseri* isolated from superworms (*Zophobas atratus* larvae), Front. Microbiol. 14 (2023) 1175249.

[442] R. Gautam, A. S. Bassi, E. K. Yanful, A review of biodegradation of synthetic plastic and foams, Appl. Biochem. Biotechnol. 141 (2007) 85–108.

[443] Y. Zhou, L.-R. Han, H.-W. He, B. Sang, D.-L. Yu, J.-T. Feng, X. Zhang, Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein gp-1 by *Streptomyces*

kanasensis ZX01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient, *Molecules* 23 (2018) 125.

[444] iGEM Toulouse, Study of the optimum growth conditions of *Bacillus subtilis* (strain WT 168), and *Pseudomonas fluorescens* (strain SBW25), 2016, str. 1–6. https://static.igem.org/mediawiki/2016/e/e0/T--Imperial_College--ToulouseGrowthStudy.pdf (pristup 21.6.2023.)

[445] V. R. S. Babu, S. Patra, M. S. Thakur, N. G. Karanth, M. C. Varadaraj, Degradation of caffeine by *Pseudomonas alcaligenes* CFR 1708, *Enzyme Microb.* 37 (2005) 617–624.

[446] N. Lenchi, S. Kebbouche-Gana, P. Servais, M. L. Gana, M. Lliros, Diesel biodegradation capacities and biosurfactant production in saline-alkaline conditions by *Delftia* sp NL1, isolated from an Algerian oilfield, *Geomicrobiol. J.* 37 (2020) 456–466.

[447] F. Briški, *Zaštita okoliša*. Vol. 1, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Element, Zagreb, 2016, str. 1–296.

[448] S. Duraković, *Opća mikrobiologija*, Zagreb, Prehrambeno-tehnološki inženjering. Vol. 1, 1996, str. 1–665.

[449] K. M. C. Tjørve, E. Tjørve, The Use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: an additon to the unified-Richards family, *PLoS ONE* 12 (2017) 1–17.

[450] M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, K. Van'T Riet, Modeling of the bacterial growth curve, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1875–1881.

[451] G. Caruso, Plastic degrading microorganisms as a tool for bioremediation of plastic contamination in aquatic environments, *J. Pollut. Eff. Cont.* 3 (2015) e112.

8 POPIS POKRATA

PE – polietilen

PP – polipropilen

PVC – poli(vinil-klorid)

PET – polietilen tereftalat

PS – polistiren

PUR – poliuretan

EU – Europska unija

MP – mikroplastika

UPOV – postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda

HDPE – polietilen visoke gustoće

PHA – polihidroksialkanoati

PLA – polilaktidi

LDPE – polietilen niske gustoće

UHMWPE – polietilen ultra visoke molekulske mase

HMWPE – polietilen visoke molekulske mase

ULMWPE – polietilen ultra niske molekulske mase

HDLPE – linearni polietilen visoke gustoće

MDPE – polietilen srednje gustoće

LLDPE – polietilen linearno niske gustoće

VLDPE – polietilen vrlo niske gustoće

GPPS – polistiren opće namjere

HIPS – polistiren visokog utjecaja

EPS – ekspanzirani polistiren

PES – poliester

SEM – skenirajući elektronski mikroskop

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

SEM-EDS – skenirajući elektronski mikroskop uz spektroskopiju X-zraka s disperzijom energije

FTIR–ATR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom s totalnom refleksijom

μ -FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom spojena s mikroskopom

Pyr-GC-MS – pirolizno-plinska kromatografija uz masenu spektrometriju

FPA- μ -FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom s nizom u žarišnoj ravnini

TED–GC–MS – termička ekstrakcijsko-desorpcijska plinska kromatografija uz masenu spektrometriju

TGA – termogravimetrijski analizator

HPLC – tekuća kromatografija visoke učinkovitosti

EGA–MS – analiza razvijenog plina uz spektrometriju mase

GPC – kromatografija isključivanja po veličini

FIA–MS – protočna injekcijska analiza uz masenu spektrometriju

ESI – ionizacija elektrosprejom

NOEC – najviša koncentracija koja ne uzrokuje učinak

LOEC – najniža koncentracija kod koje je uočen utjecaj

EC - utjecajna koncentracija

TCA – trikarboksilna kiselina

RSM – modeliranje odzivnih površina

DoE – dizajn eksperimenata

ANOVA – analiza varijance

TC – ukupni ugljik

TOC – ukupni organski ugljik

TIC – ukupni anorganski ugljik

CFU – ukupni broj živih stanica

MALDI-TOF/MS – matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija uz vrijeme leta i masenu spektrometriju

OG – optička gustoća

SP – slijepa proba

ŽIVOTOPIS

Martina Miloloža [REDACTED] je završila osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje. Preddiplomski studij Ekoinženjerstvo upisuje 2013. na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu (FKIT) kojeg završava 2016. braneći završni rad *Onečišćenje bukom* pod mentorstvom prof. dr. sc. Marije Vuković Domanovac. Iste godine na FKIT-u upisuje diplomski studij Ekoinženjerstvo te 2018. diplomira s temom *Procjena utjecaja eritromicina na bakterijsku kulturu Pseudomonas putida izoliranu iz farmaceutske otpadne vode*, također pod mentorstvom prof. dr. sc. Marije Vuković Domanovac. Godine 2016. dobitnica je FKIT-ova priznanja za najbolju studenticu preddiplomskog studija Ekoinženjerstvo, a 2018. nagrade „Vjera Marjanović-Krajovan“ za najbolju studenticu diplomskog studija. Dobitnica je Rektorove nagrade za individualni znanstveni i umjetnički rad u akademskoj godini 2016./2017. s radom *Potencijal izoliranih bakterijskih kultura u stvaranju aktivnog mulja za bioremedijaciju farmaceutske otpadne vode*, izrađenim pod mentorstvom prof. dr. sc. Marije Vuković Domanovac. U veljači 2019. zapošljava se kao asistentica na FKIT-u, na Zavodu za industrijsku ekologiju, na kojem sudjeluje u izvedbi više kolegija. Iste godine na FKIT-u upisuje doktorski studij Kemijsko inženjerstvo i primijenjena kemija. Dosada je objavila 29 znanstvenih radova i sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim konferencijama s usmenim ili posterskim priopćenjima. Od svibnja do srpnja 2022. godine boravila je u sklopu Erasmus+ stručne prakse na Fakultetu za kemiju in kemijsko tehnologiju Sveučilišta u Ljubljani, Slovenija, kod izv. prof. dr. sc. Gabriele Kalčikove, u svrhu stručnog usavršavanja. Također je u sklopu stručnog usavršavanja sudjelovala na ljetnoj školi u Grazu (*Institute of Chemical Engineering and Environmental Technology University of Technology*) od 9. do 22. srpnja 2023. Članica je Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa, Hrvatskog mikrobiološkog društva te Hrvatskog toksikološkog društva.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Popis radova objavljenih u časopisima:

1. E. Čemerika, D. Milički, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, K. Žižek, V. Ocelić Bulatović, Zeleni biokompoziti na bazi otpada taloga kave, *Kem. ind.* 73 (2023) 215–226.
2. I. Blažević, K. Kos, M. Kovačević, T. Marković, L. Sović, M. Miloloža, SPF – super problematična formula? Aktivni sastojci krema za sunčanje u vodenom okolišu, *Kem. Ind.* 72 (2023) 257–267.
3. D. Bićanić, A. Čugalj, M. Jajčević, A. Lazinica, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, Ekotoksičnost nesteroidnih protuupalnih lijekova na vodene organizme, *Kem. Ind.* 72 (2023) 237–245.
4. A. Čurić, K. Muzica, I. Runjak, D. Vasiljević, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, Koja je cijena pušenja? – Opasnosti za okoliš, *Kem. ind.* 72 (2023) 227–236.
5. K. Bule Možar, M. Miloloža, V. Martinjak, M. Cvetnić, H. Kušić, T. Bolanča, D. Kučić Grgić, Š. Ukić, Potential of advanced oxidation as pretreatment for microplastics biodegradation, *Separations* 10 (2023) 132.
6. D. Kučić Grgić, M. Miloloža, V. Ocelić Bulatović, Š. Ukić, M. Slouf, V. Gajdosova, Screening the efficacy of a microbial consortium of bacteria and fungi isolated from different environmental samples for the degradation of LDPE/TPS films, *Separations* 10 (2023) 79.
7. V. Ocelić Bulatović, D. Kučić Grgić, V. Mandić, M. Miloloža, J. Dybal, V. Gajdosova, M. Slouf, Biodegradation of LDPE_TPS blends under controlled composting conditions, *Polym. Bull.* 80 (2023) 3331–3357.
8. M. Miloloža, Š. Ukić, M. Cvetnić, T. Bolanča, D. Kučić Grgić, Optimization of polystyrene biodegradation by *Bacillus cereus* and *Pseudomonas alcaligenes* using full factorial design, *Polymers* 14 (2022) 4299.
9. M. Miloloža, K. Bule, V. Prevarić, M. Cvetnić, Š. Ukić, T. Bolanča, D. Kučić Grgić, Assessment of the influence of size and concentration on the ecotoxicity of microplastics to microalgae *Scenedesmus* sp., bacterium *Pseudomonas putida* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Polymers* 14 (2022) 1246.

10. S. Čačko, E. Pančić, I. Zokić, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, Aditivi u plastici – potencijalno štetni učinci na ekosustav, *Kem. ind.* 71 (2022) 49–56.
11. M. Miloloža, M. Cvetnić, D. Kučić Grgić, V. Očelić Bulatović, Š. Ukić, M. Rogošić, D. D. Dionysiou, H. Kušić, T. Bolanča, Biotreatment strategies for the removal of microplastics from freshwater systems. A review, *Environ. Chem. Lett.* 20 (2022) 1377–1402.
12. I. Radić, M. Runje, M. Cvetnić, M. Halužan, M.-L. Jeličić, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, V. Prevarić, Š. Ukić, T. Bolanča, Validation of the ICP-MS method for determination of trace elements provided by ICH Q3D guideline in fosamprenavir calcium, *Kem. ind.* 70 (2021) 701–709.
13. M. Miloloža, K. Bule, Š. Ukić, M. Cvetnić, T. Bolanča, H. Kušić, V. Očelić Bulatović, D. Kučić Grgić, Ecotoxicological determination of microplastic toxicity on algae *Chlorella* sp.: response surface modeling approach, *Water Air Soil Pollut.* 232 (2021) 327.
14. D. Kučić Grgić, M. Miloloža, E. Lovrinčić, A. Kovačević, M. Cvetnić, V. Očelić Bulatović, V. Prevarić, K. Bule, Š. Ukić, M. Markić, T. Bolanča, Bioremediation of MP-polluted waters using bacteria *Bacillus licheniformis*, *Lysinibacillus massiliensis*, and mixed culture of *Bacillus* sp. and *Delftia acidovorans*, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 35 (2021) 205–224.
15. V. Prevarić, M. Sigurnjak Bureš, M. Cvetnić, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, M. Markić, K. Bule, M. Milković, T. Bolanča, Š. Ukić, The problem of phthalate occurrence in aquatic environment: A review, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 35 (2021) 81–104.
16. M. Miloloža, D. Kučić Grgić, T. Bolanča, Š. Ukić, M. Cvetnić, V. Očelić Bulatović, Vesna; D. D. Dionysiou, H. Kušić, Ecotoxicological assessment of microplastics in freshwater sources – a review, *Water* 13 (2021) 56.
17. M. Sigurnjak Bureš, M. Cvetnić, M. Miloloža, D. Kučić Grgić, M. Markić, H. Kušić, T. Bolanča, M. Rogošić, Š. Ukić, Modeling the toxicity of pollutants mixtures for risk assessment: a review, *Environ. Chem. Lett.* 19 (2021) 1629–1655.
18. K. Bule, K. Zadro, A. Tolić, E. Radin, M. Miloloža, V. Očelić Bulatović, D. Kučić Grgić, Mikroplastika u morskom okolišu Jadrana, *Kem. ind.* 69 (2020) 303–310.

19. D. Kučić Grgić, L. Bera, M. Miloloža, M. Cvetnić, T. Ignjatić Zokić, B. Miletić, T. Leko, V. Ocelić Bulatović, Obrada aktivnog mulja s uređaja za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda procesom kompostiranja, *Hrvatske Vode* 28 (2020) 1–8.
20. D. Kučić Grgić, F. Briški, V. Ocelić Bulatović, M. Vuković Domanovac, T. Domanovac, M. Šabić Runjavec, M. Miloloža, M. Cvetnić, Kompostiranje agroindustrijskog otpada, biootpada i biorazgradivog komunalnog otpada u adijabatskom reaktoru, *Kem. ind.* 68 (2019) 381–388.

Popis radova objavljenih u zbornicima radova sa znanstvenih skupova:

1. K. Josić, M. Miloloža, V. Ocelić Bulatović, D. Kučić Grgić, Automatsko brojanje bakterijskih kolonija, J. Babić, V. Ocelić Bulatović i D. Kučić Grgić (ur.), 19. Ružičkine dani „Danas znanost - sutra industrija“. Vukovar, 2023, str. 274–282.
2. K. Grgurević, M. Miloloža, V. Ocelić Bulatović, D. Kučić Grgić, Ispitivanje ekotoksičnosti diklofenaka i pantoprazola, J. Babić, V. Ocelić Bulatović i D. Kučić Grgić (ur.), 19. Ružičkine dani „Danas znanost - sutra industrija“, Vukovar, 2023, str. 220–232.
3. M. Miloloža, K. Bule, A. Badurina-Petričević, L. Anzulović, I. Jazbišek, V. Prevarić, M. Sigurnjak Bureš, M. Cvetnić, M. Markić, T. Bolanča, Investigation of crucial influencing factors for biodegradation of microplastics by taguchi method, *Water research and innovations in digital era*, Riga, Latvija, 2021, str. 38–45.
4. V. Ocelić Bulatović, D. Kučić Grgić, M. Miloloža, Interfacial phenomena in material, *Proceedings of the 18th Ružička days, "Today science - tomorrow industry"*, A. Jukić, V. Ocelić Bulatović, D. Kučić Grgić (ur.). Zagreb, 2021, str. 235–247.
5. D. Kučić Grgić, M. Miloloža, A. Kovačević, E. Lovrinčić, V. Ocelić Bulatović, K. Bule, M. Sigurnjak Bureš, V. Prevarić, M. Cvetnić, Š. Ukić, Biorazgradnja LDPE i PS mikroplastike mješovitom bakterijskom kulturom *Bacillus* sp. i *Pseudomonas alcaligenes*, 18. Ružičkine dani "Danas znanost-sutra industrija", A. Jukić, V. Ocelić Bulatović, D. Kučić Grgić (ur.). Zagreb, 2021, str. 214–226.
6. D. Kučić Grgić, M. Miloloža, L. Ružaj, M. Cvetnić, V. Ocelić Bulatović, Biodegradation and ecotoxicity testing of microplastics, A. Štrkalj i Z. Glavaš (ur.), 2nd International

conference the holistic approach to environment, Sisak: Udruga za promicanje cjelovitog pristupa okolišu, 2021, str. 307–315.

7. D. Kučić Grgić, L. Bera, M. Miloloža, M. Cvetnić, M. Markić, V. Ocelić Bulatović, T. Bolanča, Estimation of antibacterial activity of selected macrolides, 8. međunarodni znanstveno-stručni skup: Voda za sve = 8th International Scientific and Professional Conference: Water for all, Osijek, Hrvatska, 2019. str. 1–6.
8. M. Vuković Domanovac, M. Miloloža, J. Leko, M. Šabić, M. Sudar, Z. Findrik Blažević, Utjecaj eritromicina na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida*, Proceedings 17th Ružička Days “Today Science – Tomorrow Industry”, S. Tomas i Đ. Ačkar (ur.). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2019, str. 46–57.