

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Marija Kuštro i Dubravka Tavra

**PRIMJENA KVASCA *Candida parapsilosis* U BIOREMEDIJACIJI VODE
ONEČIŠĆENE MIKROPLASTIČNIM ČESTICAMA
POLI(VINIL-KLORIDA) I ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA
BIORAZGRADNJE**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije na Zavodu za industrijsku ekologiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.



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

Popis kratica:

ANOVA – analiza varijance (engl. *Analysis of Variance*)

BPA - bisfenol A

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

DDT – diklordifeniltrikloretan

DMSO – dimetilsulfoksid

ECHA – „*European Chemicals Agency*“

EC₂₀ – efektivna koncentracija tvari koja rezultira 20 %-tnim štetnim učinkom na ispitivanu populaciju

EC₅₀ – efektivna koncentracija tvari koja rezultira 50 %-tnim štetnim učinkom na ispitivanu populaciju

ED₅₀ - efektivna doza koja uzrokuje štetan učinak kod 50 % ispitivanih jedinki

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

ISO – *International Organization for Standardization*

LD₅₀ – letalna doza tvari koja uzrokuje smrt kod 50 % jedinki izloženih štetnoj tvari

LOEC - najniža doza tvari koja izaziva štetni učinak (engl. *Lowest Observed Effect Concentration*)

MA – malt agar

MAP – makroplastika

MEP – mezoplastika

MM – mineralni medij

MP – mikroplastika

NOEC - najviša doza tvari koja ne izaziva štetni učinak (engl. *No Observed Effect Concentration*)

NP – nanoplastika

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*

OG – optička gustoća

PBDE - polibromirani difenil eteri

PCB - poliklorirani bifenili

PE – polietilen

PET – polietilen tereftalat

PP – polipropilen

PS – polistiren

PVC – poli(vinil-klorid)

SP – slijepa proba

THF - tetrahidrofur

VCM – monomer vinil klorid (engl. *vinyl chloride monomer*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. Plastika	3
2.1.1. Vrste plastika.....	5
2.1.1.1. Poli(vinil-klorid).....	6
2.2. Mikroplastika	8
2.3. Svojstva mikroplastike	10
2.3.1. Aditivi u mikroplastici	11
2.3.2. Adsorpcija na mikroplastiku	11
2.4. Mikroplastika u okolišu.....	12
2.5. Postupci uklanjanja mikroplastike iz okoliša	14
2.5.1. Biorazgradnja	16
2.5.2. Biorazgradnja pomoću kvasaca.....	19
2.5.2.1. <i>Rhodotorula glutinis</i>	21
2.5.2.2. <i>Geotrichum candidum</i>	22
2.5.2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.5.2.4. <i>Trichosporon</i> sp.....	23
2.5.2.5. <i>Candida parapsilosis</i>	23
2.6. Testovi toksičnosti.....	24
2.6.1. Test toksičnosti s morskou bakterijom <i>Vibrio fischeri</i>	25
2.7. Statističko planiranje eksperimenta - dizajn eksperimenta	26
2.7.1. Puni faktorski plan	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	29
3.1. Materijali	29
3.1.1. Mikroplastika	29
3.1.2. Kulture kvasaca	30
3.1.3. Mediji i kemikalije	31
3.2. Mjerni instrumenti i aparatura	33
3.3. Metode rada.....	34
3.3.1. Priprema mikroplastike	34
3.3.2. Sterilizacija mikroplastike.....	35
3.3.3. Preduzgoj kvasaca	36
3.3.4. Provedena mjerenja tijekom procesa biorazgradnje.....	36

3.3.4.1. Određivanje broja živih stanica kvasaca (CFU).....	36
3.3.4.2. TOC analiza.....	37
3.3.4.3. HPLC/MS analiza	38
3.3.4.4. FTIR-ATR analiza.....	39
3.3.4.5. Određivanje ekotoksičnosti morskom bakterijom <i>Vibrio fischeri</i>	40
3.3.4.6. Praćenje morfoloških promjena stanica kvasca.....	41
3.4. Priprema baždarnog dijagrama.....	42
3.5. Provedba eksperimenata: biorazgradnja MP-a kvascima izoliranim iz okoliša.....	42
4. REZULTATI.....	46
4.1. Preliminarni pokus: Biorazgradnja PS-a i PVC-a kvascima izoliranim iz okoliša	46
4.1.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascima izoliranim iz okoliša	47
4.1.2. FTIR-ATR analiza mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a	48
4.2. Glavni pokus: Određivanje optimalnih uvjeta za biorazgradnju PVC-a kvascem <i>Candida parapsilosis</i>	50
4.2.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PVC-a <i>Candidom parapsilosis</i>	50
4.2.2. TOC analiza filtrata	54
4.2.3. HPLC/MS analiza filtrata.....	54
4.2.4. FTIR-ATR analiza PVC-a.....	55
4.2.5. Mikroskopska analiza kvasca <i>Candidom parapsilosis</i>	59
4.2.6. Test ekotoksičnosti filtrata bakterijom <i>Vibrio fischeri</i>	59
4.2.7. Rezultati statističke analize varijance (ANOVA)	60
5. RASPRAVA.....	63
5.1. Preliminarni pokus: analiza biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascima izoliranim iz okoliša	63
5.1.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascima izoliranim iz okoliša	64
5.1.2. FTIR-ATR spektroskopska analiza mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a	67
5.2. Glavni pokus: određivanje optimalnih uvjeta za biorazgradnju PVC-a kvascem <i>Candida parapsilosis</i>	69
5.2.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje PVC-a kvascem <i>Candida parapsilosis</i>	69
5.2.2. Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i TIC-a tijekom pokusa biorazgradnje PVC-a kvascem <i>Candida parapsilosis</i>	73
5.2.3. HPLC/MS analiza filtrata tijekom provedbe biorazgradnje PVC-a kvascem <i>Candida parapsilosis</i>	74

5.2.4. FTIR-ATR spektroskopska analiza mikroplastičnih čestica PVC-a	77
5.2.5. Ispitivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije <i>Vibrio fischeri</i>	78
5.2.6. Statistička analiza varijance (ANOVA)	79
6. ZAKLJUČAK	81
7. ZAHVALA.....	83
8. LITERATURA.....	84

1. UVOD

Kontinuirano povećanje proizvodnje plastičnih proizvoda i njihovim neadekvatnim upravljanjem te nepropisnim odlaganjem, dolazi do opterećenja svih sastavnica okoliša. Njihova fizikalna i kemijska svojstva, kao što su trajnost i otpornost, postaju ozbiljan problem i izazivaju dokazano štetne učinke na okoliš.¹ Plastika kao materijal nudi brojna svojstva: lagana je, elastična, ima otpornost na koroziju, može se bojati jer je karakterizira prozirnost te ima mogućnost jednostavne obrade, zatim svestranost i niska cijena.² Mikroplastika (MP) obično se definira kao tvar čija je veličina čestica manja od 5 mm. U okolišu možemo pronaći MP-e kao što su polietilen (PE), polietilen tereftalat (PET), polistiren (PS), polipropilen (PP) i polivinil klorid (PVC). Dijelimo ju na primarnu, proizvedena je kao takva za upotrebu, i sekundarnu, nastala razgradnjom većih polimera. Primarna MP-e koju čini više od 0,01 % čvrstog polimera, od kojih je više od 1 % veličine manje od 5 mm, kao takva ne smije završiti u okolišu prema ECHA (*European Chemicals Agency*).³ Zbog sveprisutnosti MP-a u ekosustavima, postaje nova vrsta onečišćujuće tvari i stvara zabrinutost među znanstvenicima te u javnim i državnim tijelima.⁴ Pronalazimo ju u oceanu, estuarijima, slatkim vodama, arktičkom ledu, plažama, površinskim vodama, morskom sedimentu kao i u morskim organizmima.⁵ Osim u vodi, MP-e je prisutna u tlu i atmosferi te predstavlja ozbiljnu prijetnju biotičkim i abiotičkim komponentama okoliša.^{6,7} Zbog toga privukla je ogromnu pozornost za istraživanje alternativa i potencijalnih opcija uklanjanja iz okoliša. MP-e može djelovati kao prijenosnik raznih toksičnih tvari kao što su aditivi prisutni u MP-u te mogu uzrokovati velike zdravstvene probleme kod ljudi.⁴ MP-e koja se nalazi u okolišu izložena je fotorazgradnji, uzrokovana UV zračenjem, toplinskoj razgradnji, mehaničkom djelovanju i biološkim djelovanjem (biorazgradnja).⁴ Mikroorganizmi imaju dobar potencijal za razgradnju MP-a, a taj proces nazivamo biorazgradnja, što je ekološki prihvatljiva metoda.⁶ Biorazgradnja MP-a koja se nalazi u okolišu ovisi o okolnim uvjetima (kopneni ili morski ekosustav), vrstama plastike (sintetička ili prirodna plastika) i o njihovim karakteristikama (hidrofobnost, molekularna težina, kristaliničnost, tvrdoća, oblici plastike).⁷ U prirodnom okolišu čimbenici kao što su hidrofobnost i površinska nepravilnost plastičnih čestica utječu na prijanjanje mikroorganizama na površinu materijala.⁸ Uz navedena obilježja, kombinacija fizikalnih, kemijskih i bioloških procesa može pospješiti uklanjanje MP-a iz okoliša. Danas se prilikom planiranja provođenja eksperimenta koriste suvremeni programski paketi na principu odzivne površine.

Osnovna ideja metodologije odzivne površine jest dobiti odnos utjecajnih nezavisnih faktora poput pH-vrijednosti, broja okretaja i optičke gustoće (OG) na zavisnu varijablu (odziv) logaritam CFU kroz odzivnu funkciju. Provođenje planiranja eksperimenta služi kako bismo odredili optimalne uvjete procesa i sustava ili utvrdili područja faktora u kojem su radne specifikacije ili ograničenja zadovoljena.⁹

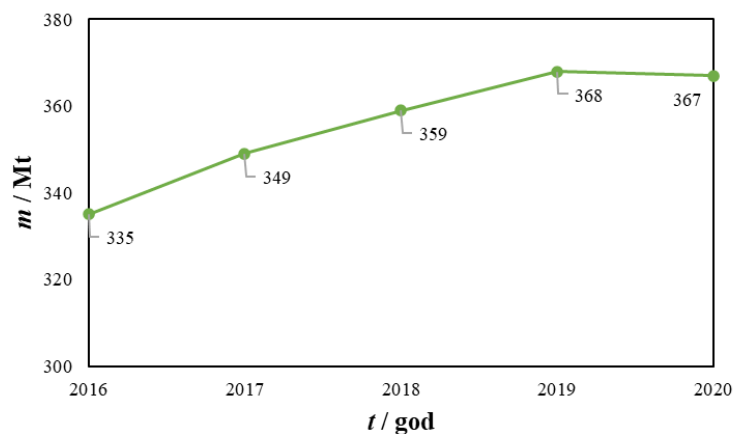
Istraživanja ovog rada podijeljena su u dva dijela, preliminarni pokusi, odabir najučinkovitijeg kvasca u bioremedijaciji vode onečišćene mikroplastičnim česticama PS-a i PVC-a, i glavni pokusi, određivanje optimalnih uvjeta biorazgradnje PVC-a najučinkovitijim kvascem. U tu svrhu u preliminarnim pokusima biorazgradnje PS-a i PVC-a ispitano je pet kvasaca, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis*, izoliranih iz okoliša. Provedbom preliminarnog pokusa utvrđen je najučinkovitiji kvasac, *Candida parapsilosis*, za MP PVC-a na kojem su se provela daljnja istraživanja (glavni pokus). Provela su se tri pokusa na tri razine, optička gustoća (0,1; 0,5 i 1,0), pH-vrijednost (3; 5 i 7) i broj okretaja (120, 160 i 200), te su se prema dizajnu punog faktorskog plana odredili optimalni uvjeti biorazgradnje MP PVC-a kvascem *Candida parapsilosis*. Uvjeti koji su se pokazali optimalnim za proces biorazgradnje PVC-a kvascem *Candida parapsilosis* su najveća OG vrijednost (1,0), srednja pH-vrijednost (5) i najmanji broj okretaja u minuti (120 o/min). Analiza varijance (ANOVA) u programu *Design Expert* primijenjena je kako bi se ispitao učinak pojedinih faktora (procesnih parametara) na pojedine odzive (logaritamska vrijednost CFU-a) u procesu biorazgradnje PVC-a. Koeficijent determinacije R^2 za biorazgradnju PVC-a primjenom kvasca *Candida parapsilosis* iznosio je 0,9611 što pokazuje da je model značajan.

2. OPĆI DIO

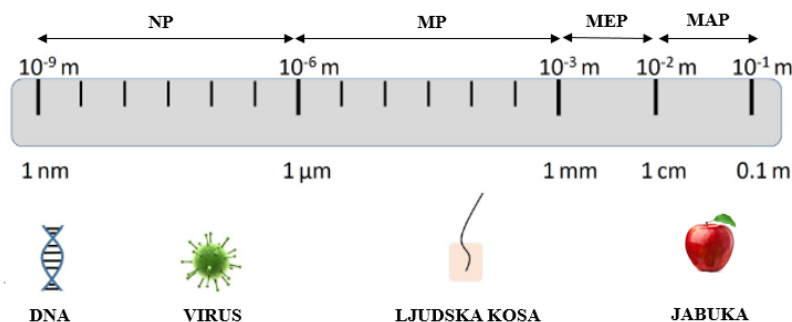
2.1. Plastika

Povijest plastike, sveprisutnog materijala, kreće početkom 20. stoljeća. Točnije, godine 1907. Leo Baekeland napravio je prvu sintetičku plastiku.¹⁰ Plastični proizvodi postali su sastavni dio svake ljudske djelatnosti zbog svoje male težine i praktičnosti, postajući tako sveprisutni u svim aspektima gospodarstva. Zbog dobrih svojstava sve je veća potražnja za plastikom, povećava se proizvodnja, a to dovodi do stvaranja otpada, što stvara ogromne probleme.⁷ Jedan od ključnih faktora je i niska cijena uz dobra svojstva, pa se plastika koristi u cijelom svijetu, služeći kao važan faktor za različite sektore kao što su pakiranje, građevinarstvo, transport, zdravstvo i elektronika.¹¹ Zbog nepravilnog gospodarenja otpadom, velika količina plastike završava u ekosustavima, pri čemu dolazi do njezine razgradnje, što za posljedicu ima velik utjecaj na ekosustave i okoliš.⁷ Plastika je skupina materijala koji mogu biti sintetičkog ili prirodnog podrijetla. Takvi materijali se mogu oblikovati kada su mekani, a zatim stvrdnuti kako bi zadržali zadani oblik. Zbog svoje strukture plastiku svrstavamo u polimere. Polimer je tvar sastavljena od mnogih ponavljajućih jedinica. Polimer (izvedeno od grčkih riječi: *poly*, što znači mnogo, i *meros*, što znači dijelovi ili jedinice) je lanac sastavljen od više monomera (jedna jedinica). Lanac polimera nastaje spajanjem ili polimerizacijom najmanje 1000 monomera zajedno. Neki od prirodnih polimera su katran, oklop od kornjače, celuloza i jantar, dok sintetički polimeri uključuju polietilen (PE), polistiren (PS), polipropilen (PP), poli(vinil-klorid) (PVC) i poli(etilen-tereftalat) (PET).¹² Upravo ove vrste čine 80 % najčešće proizvedenih i korištenih plastika.^{12,13} Mnogi polimeri su ugljikovodici koji sadrže samo ugljik i vodik, no većina drugih polimera mogu sadržavati kisik, klor, fluor, dušik, silicij, fosfor i sumpor.¹⁰ Proizvodnja plastike porasla je s 0,5 na 260 milijuna tona godišnje od 1950. godine, a očekuje se da će se taj broj udvostručiti do 2035. godine. Svake godine se distribuira više od 500 milijardi plastičnih vrećica, a reciklira se manje od 3 % vrećica. Svjetska proizvodnja sintetičke plastike će biti oko 1800 milijuna tona 2050. godine i približno 12000 milijuna m³ plastičnog otpada će do te godine biti u okolišu.^{14,15} U 2020. globalna proizvodnja plastike iznosila je 367 milijuna tona, u odnosu na 2019. kada je bila 368 milijuna tona, pa se može zaključiti da napokon dolazi do pada proizvodnje, s obzirom da je do 2019. godine bio linearan rast (slika 1). Sektor ambalaže glavni je doprinos ukupnom globalnom plastičnom otpadu (40,5 %).¹⁶

Na globalnoj razini predviđa se da će plastični otpad, koji se pravilno ne zbrinjava, u 2025. iznositi 69,1 milijuna tona te da će završiti na odlagalištima otpada ili u oceanima, što će dovesti do fragmentacije do manjih veličina čestica, mikroplastike (MP) i konačno u nanoplastiku (NP).⁷ Par desetljeća kasnije, došlo je do spoznaje o plastici veličine < 5 mm. Kao novi pojam, „mikroplastika“ se uvela još 1968., a tada je predstavljala deformaciju plastičnih materijala, no znanstvenici su ju 1970. godine definirali kao manje fizičke dijelove plastike, a to je pojam kojeg i dan danas poznajemo.¹⁰ Novija podjela plastike datira iz 2004. godine kada su određene kategorije na temelju veličine čestice. Od tada razlikujemo polimerne materijale čija se veličina kreće između 1 μm i 5 mm i oni se nazivaju mikroplastikom (MP), čestice veće od 5 mm pripadaju skupini mezoplastike (MEP), a one veće od 1 cm skupini makroplastike (MAP), dok je danas uz MP velika usmjerenost prema nanoplastici (NP), česticama manjima od 1 μm (slika 2).¹⁴ Prema novijim podacima, MP se definira kao mala (<1 mm), srednja (1–3 mm) i velika (3–5 mm).⁶



Slika 1. Prikaz rasta globalne proizvodnja plastike.¹⁶

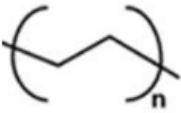
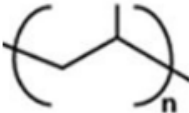
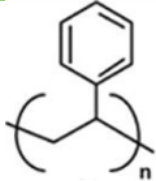
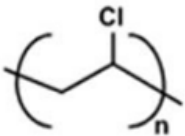
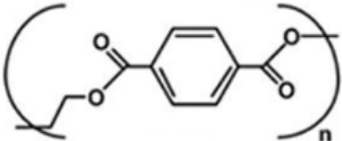


Slika 2. Podjela plastike prema veličini čestica.¹⁷

2.1.1. Vrste plastika

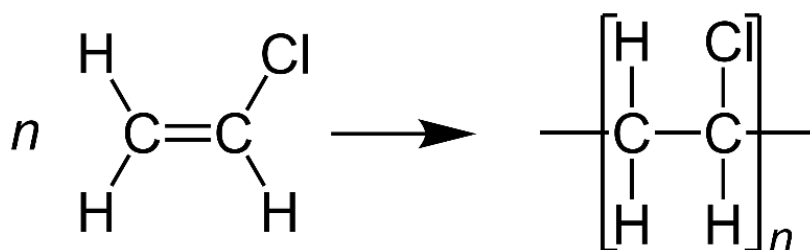
Najpoznatije plastike su PE, PS, PP, PVC i PET. Ovi plastični materijali se koriste na raznim tržištima, kao ambalažni materijal, u građevinarstvu, automobilske industriji, elektronici, poljoprivredi, potrošačkim sredstvima i kućanskim aparatima (tablica 1). PP, PE i PVC su najčešće korištene vrste polimera te čine 19,2 %, 29,3 % i 10,3 % potražnje za plastikom u Europi.¹⁸ Često otkrivanje PP i PE u morskom okolišu povezano je s njihovom malom gustoćom, što znači da su ove vrste polimera plovne, odnosno plutaju na površini i lako se transportiraju s vodom. Osim toga, veća globalna potražnja za PE i PP čini ih rasprostranjenijima u okolišu.¹⁸ PE, PVC i PET su polimeri koji se najčešće nalaze u kopnenom ekosustavu.⁷

Tablica 1. Prikaz najčešće upotrebljivanih MP-a.¹²

IME POLIMERA	STRUKTURNA FORMULA	UPOTREBA
PE		Najčešći polimer. Koristi se u vrećicama, izolaciji žice i bocama.
PP		Vlakna, unutarnji i vanjski tepisi, boce.
PS		Stiropor, stolno posuđe, pladnjevi, kutije za video kasete, CD.
PVC		Prozirna folija za hranu, boce, sintetička koža, cijevi za vodu i odvod.
PET		Boce za pića, ambalažni materijal.

2.1.1.1. Poli(vinil-klorid)

PVC se proizvodi polimerizacijom monomera vinil klorida (VCM) (slika 3). Glavne metode polimerizacije uključuju metode suspendiranja i emulgiranja. Oko 80 % proizvodnje uključuje suspenzijsku polimerizaciju. PVC se oblikuje u obliku sitnih čestica koje rastu, a kada dosegnu željenu veličinu reakcija se zaustavlja, a svaki neizreagirani monomer se ponovno koristi. PVC se odvaja i suši te nastaje bijeli prah također poznat kao PVC smola. Emulzijska polimerizacija proizvodi finije smole s mnogo manjim česticama koje su potrebne za određene primjene.¹⁹ PVC smole mogu biti ili krute (neplastificirane) i proizvedene uglavnom ekstruzijom ili kalupljenjem, ili fleksibilne (plastificirane), gdje se plastifikatori dodaju u visokim udjelima (do 50 %) kako bi se postigla mekoća i elastičnost.²⁰ Čisti PVC je bijela, krhka krutina s kemijskom formulom $[C_2H_3Cl]_n$, koja sadrži 56,77 % elementa klor. Netopiva je u vodi i alkoholu, ali topiva u tetrahidrofuranu (THF). PVC se komercijalno primjenjuje u krutom i fleksibilnom obliku. Kruti oblik se koristi u konstrukciji cijevi i profilnim aplikacijama (vrata i prozori), pakiranju (neprehrambena ambalaža i prekrivači za hranu) i karticama (bankovne ili članske iskaznice). Fleksibilni oblik izrađen je dodatkom plastifikatora i koristi se u vodovodu, imitaciji kože i mnogim drugim primjenama kao što je npr. zamjena za izradu gume i platna.²¹



Slika 3. Prikaz polimerizacije monomera vinil klorida u poli(vinil-klorid).²²

Dodavanje aditiva je postupak koji uzrokuje zabrinutost znanstvene zajednice zbog štetnih ekotoksikoloških učinaka, a važan je i u procesima biorazgradnje jer mikroorganizmi prvo razgrađuju aditive, a zatim polimere. Aditivi su složena skupina određenih kemijskih spojeva i minerala koji plastici daju karakteristična svojstva koja zahtjeva tržište ovisno o upotrebi i primjeni. Postoji više od 300 spojeva koji služe kao aditivi.²³ Bez aditiva PVC ne bi bio osobito korisna tvar, ali njegova kompatibilnost sa širokim rasponom aditiva – da se omekša, oboji, učini obradivim ili dugotrajnijim, rezultira širokim rasponom potencijalnih

primjena.²⁴ Osnovni aditivi za sve PVC materijale su stabilizatori i maziva, a u slučaju fleksibilnog PVC-a također se ugrađuju plastifikatori. Ostali aditivi koji se mogu koristiti uključuju punila, pomoćna sredstva za obradu, modifikatore udarca i pigmente.²³ U tablici 2. navedeni su najčešći aditivi u PVC-u.

Tablica 2. Najčešći aditivi u PVC-u i njihova primjena.²³

Aditiv	Primjena
Bisfenol A	Plastifikator, podloga za limenke
Ftalati	Plastifikator, umjetni mirisi
Postojani organski spojevi (POP)	Usporivači gorenja
Nonifenol	Antistatik
Poliklorirani bifenili (PCB)	Dielektrici

Nedavne procjene pokazuju da PVC čini 12-25 % ukupne plastike proizvedene u svijetu, a premašuje ga samo PP i PE.²⁰ Neplastificirani PVC koristi se u vodovodnim cijevima, građevinarstvu, oblaganju, odvodnim sustavima i u automobilskoj industriji, dok primjena plastificiranog PVC-a uključuje crijeva za tekućine, izolaciju električnih kabela, medicinske uređaje, elastične automobilske dijelove, vodootporna odjeću i igračke na napuhavanje.²⁰ Otprilike 75 % svih proizvedenih vinila ide u dugotrajne građevinske namjene.²⁵ Budući da je čvrst i otporan na vlagu i habanje, idealan je za oblaganje, prozore, krovove, ograde, podove, zidne obloge i podove. PVC ne korodira kao neki građevinski materijali, ne zahtijeva često bojenje i može se čistiti blagim sredstvima za čišćenje.²⁵ PVC prozori imaju tri puta veću toplinsku izolaciju od aluminijskih prozora stoga ne čudi što su toliko primjenjivi. Ovaj polimer u stanju je izdržati teške uvjete iza zidova zgrade, kao što je izlaganje promjenjivim temperaturama i vlazi, tijekom cijelog životnog vijeka zgrade. Kao rezultat toga, to je jedan od najzastupljenijih i najpouzdanijih materijala koji se koriste u električnim ožičenjima i kabelima. PVC pomaže i u očuvanju energije i vode jer su cijevi, građene od ovog materijala, nepropustljive te nisu sklone koroziji, a otporne su i na stres iz okoliša.²⁵ Budući da je izdržljiv, pouzdan i lagan, fleksibilni PVC koristi se i u procesu pakiranja. Čvrsta folija koristi se u ambalaži za zaštitu lijekova, proizvoda za osobnu njegu i drugih kućanskih potrepština.²⁵ Navedene fizikalne i kemijske karakteristike prikazane su u tablici 3., a izrazito ih je bitno za poznavati kako bi se upotrijebili ispravni postupci uklanjanja i biorazgradnje.

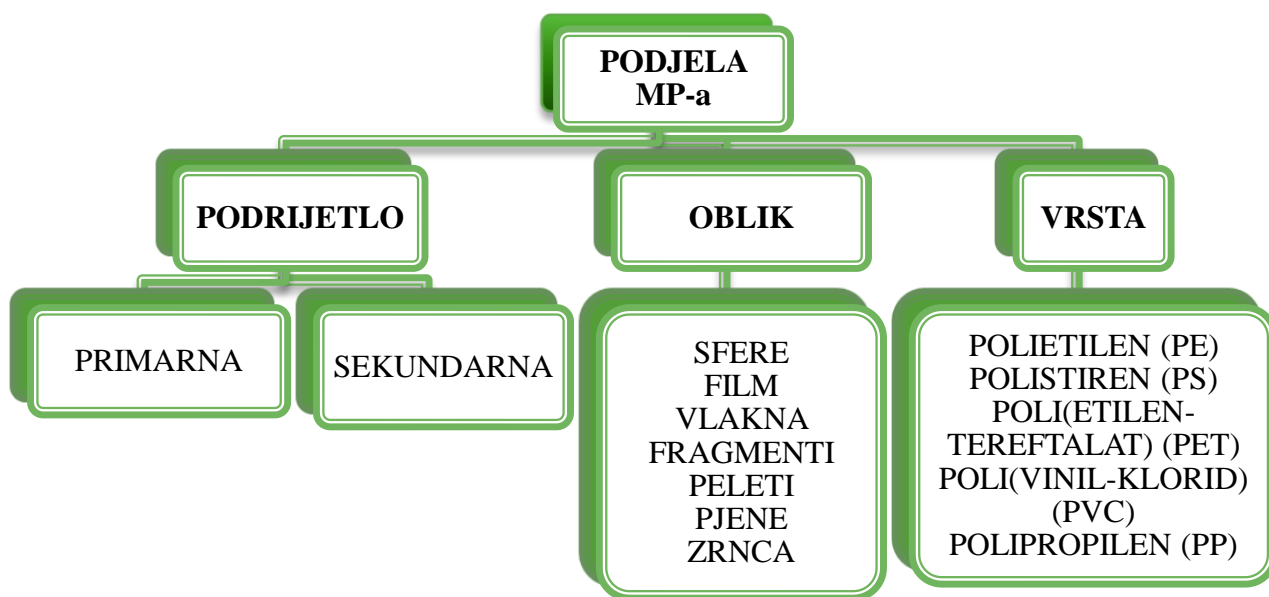
Iako sva navedena svojstva čine ovaj materijal odličnim u tehnološkom pogledu, ona su pak otežavajuća okolnost u pogledu razgradnje istog u okolišu. Postojanost i otpornost svojstva su koja znatno otežavaju razgradnju ovog materijala.

Tablica 3. Karakteristike PVC-a.²⁶

Karakteristike	Mjerna jedinica	Vrijednost
Područje tvrdoće (23°C)	ShA	30 do 95
Temperatura primjene	°C	-10 do +60
Otpornost na ulja i kemikalije	Otpornost	Slaba
Otpornost na vodu	Otpornost	Dobra
UV stabilnost	Otpornost	Dobra
Specifična težina	g/cm ³	1,25
Otpornost na habanje	Otpornost	Dobra
Opća otpornost na atmosferske utjecaje	Otpornost	Dobra
Povratna elastičnost	%	40
Izduženje do prekida	%	400

2.2. Mikroplastika

MP-e se dijeli u više kategorija ovisno o ključnim čimbenicima. MP-e su plastične čestice promjera manjeg od 5 mm. MP-e možemo klasificirati prema podrijetlu, obliku i vrsti (slika 4). Prema svom podrijetlu, MP-e se može klasificirati kao primarna i sekundarna MP-e.^{27,28} Carpenter i Smith²⁸ prvi su otkrili prisutnost plastičnih čestica u oceanu i dokumentirali njihov potencijalni utjecaj 1970-ih. Akumulacija MP-a u vodenim i kopnenim ekosustavima dolazi iz primarnih izvora izravnim dodavanjem MP-a koja se proizvodi kao čestice mikrometarske veličine u više industrija ili sekundarno fizikalnom, kemijskom i biološkom fragmentacijom MAP.²⁹ MP-e izaziva veliku zabrinutost zbog svoje površinske morfologije, veličine čestica, rasprostranjenosti i hidrofobne prirode, što pomaže u adsorbiranju i transportu raznih kontaminanata (plastifikatori, pesticidi, štetni agensi) do organizama, te u konačnici ulaze u organizam putem hranidbenog lanca. Mali plastični komadi, vlakna i granule kao MP-esu istaknuti oblici oceanske plastike.³⁰



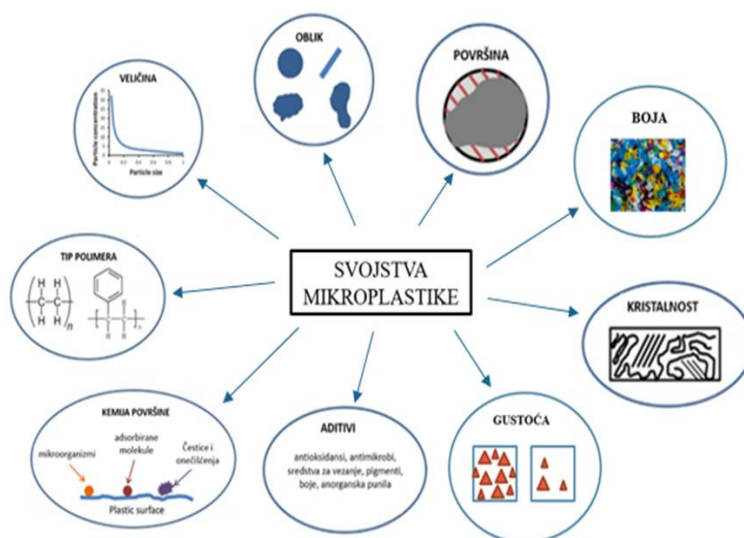
Slika 4. Grafički prikaz podjele MP-a.

Vrlo je značajna podjela na primarnu i sekundarnu mikroplastiku. **Primarnom MP-e** nazivaju se one čestice koje su izvorno proizvedene da imaju veličinu manju od 5 mm i koje se izravno kao takve ispuštaju u okoliš.^{14,31} Dodaje se u sredstva za čišćenje, kozmetičke proizvode poput gelova za tuširanje, piling preparata za tijelo i lice, paste za zube, tekstil, lijekove, poput plastičnog praha koji se koristi u kozmetici, bojama i premazima te deterdžentima.^{7,14} Koriste se za stabilizaciju emulzije, regulaciju viskoznosti i kondicioniranje kože.²⁷ Isto tako, primarna MP-e koristi se i za propuhivanje mašina i motora kako bi se sa njih uklonila hrđa i boja te i u tehnologiji pjeskarenja.¹⁰ Čestice primarne MP-e najčešće imaju pravilan izgled, okruglasti ili vlaknasti i površina im je ravnomjerno raspoređena.¹⁰ Može se transportirati rijekama, ispuštanjem od postrojenja za pročišćavanje voda, vjetrom i površinskim otjecanjem u slatke i morske vode.³¹ **Sekundarna MP-e** je ona koja je nastala razgradnjom većih plastičnih proizvoda u manje čestice zbog procesa kao što je foto-razgradnja, fizičke, kemijske i biološke interakcije, odnosno nije izravno kao takva dospjela u okoliš.^{14,31} MAP proizvodi od kojih nastaje sekundarna MP su najčešće plastične vrećice, plastične boce, ribarske mreže, pelete industrijske smole, kućanske potrepštine i ostali odbačeni plastični otpad.³¹ Otpadna plastika, abrazija guma, urbana prašina i sintetičke tkanine sekundarni su izvori MP.⁷ Prema navedenom, većinu čini sekundarna MP. Glavni problem za okoliš i kod primarne i kod sekundarne MP

predstavlja njihova veličina koja je dovoljno mala da prolaze kroz filtre za obradu otpadnih voda te tako dospijevaju u hranidbeni lanac.⁷

2.3. Svojstva mikroplastike

Svojstva MP-e možemo podijeliti na fizikalna i kemijska (slika 5) koja imaju utjecaj na okoliš. U **fizikalna svojstva** MP-e ubrajamo gustoću, veličinu čestica, oblik čestica, površinu i kristalnost. Čimbenici kao što su promjena u kristaliničnosti, plastifikatori, aditivi i punila značajno utječu na gustoću materijala.³² Veličina čestice koja može završiti u organizmu biti će određena morfologijom probavnog sustava određene vrste. Prema studiji³³, istraživao se utjecaj različitih oblika čestica na amfipodu *Hyaella azteca*, što je dovelo do zaključka da je veća toksičnost PP vlakana u usporedbi s PP kuglicama. Daljnja istraživanja potvrdila su da se čestice nepravilnijeg ili igličastog oblika mogu lakše pričvrstiti na unutarnje i vanjske površine i kao takve imaju veći učinak na organizam. Važno je naglasiti da se površina povećava sa smanjenjem veličine čestica. Kristaliničnost je važno polimerno svojstvo jer se kristalno područje sastoji od više uređenih i čvrsto strukturiranih polimernih lanaca. Promjena kristaliničnosti utjecat će na gustoću i propusnost. U **kemijska svojstva** spadaju kemijski sastav, tip polimera i aditivi. Toksičnost MP-a je zapravo povezana s ispuštanjem kemikalija koje se nalaze u MP-u, uključujući otapala i katalizatori, kao i aditive (npr. antioksidansi, boje, biocidi, plastifikatori) ugrađeni tijekom miješanja i obrade. Na površinu MP-a utječu procesi razgradnje, što dovodi do stvaranja novih funkcionalnih skupina ili pucanja površine što će oslabiti MP-e.³³



Slika 5. Shematski prikaz fizikalno-kemijskih svojstava MP-a.³³

Kako bi se kemijski okarakterizirala MP-e koristi se nekoliko analitičkih metoda. Najčešće korištene metode za kvantifikaciju su FTIR spektroskopija, Ramanova spektroskopija, piroliza-GC/MS i tekućinska kromatografija.³¹ Za utvrđivanje aditiva u MP-u koristi se HPLC/MS analiza.

2.3.1. Aditivi u mikroplastici

Tijekom proizvodnje plastike dodaju se različiti aditivi zbog poboljšanja fizičkih svojstava (boja, otpornost na plamen i tvrdoća). Aditivi mogu biti niskomolekularne ili polimerne, anorganske ili organske tvari. Najčešći aditiv je plastifikator kojemu je svrha poboljšanje plastičnosti ili viskoznosti. Kod PVC-a se dodaju plastifikatori poput ftalata i bisfenola kako bi se toplinska i foto-razgradnja svela na minimum. Spojevi koji sadrže teške metale, kao što su krom, kadmij i olovo, često se koriste u proizvodnji bojila, stabilizatora i plastifikatora. Aditivi se mogu akumulirati u ljudskim tijelima kroz proces bioakumulacije te tako utjecati na endokrini sustav. Aditivi nađeni u ljudskom organizmu su bisfenol A, polibromirani difenilni eteri, tetrabromobisfenol A i ftalati. U aditivima se mogu pronaći i tako ući u hranidbeni lanac i teški metali.³¹ **Bisfenol A** spada u polikarbonate, a ima svojstva poput visoke žilavosti, udarne čvrstoće i optičke prozirnosti i stoga imaju veliku primjenu u industriji (građevinska, automobilska, zrakoplovna, prehrambena).¹¹ Mnogi plastični aditivi djeluju kao endokrini inhibitori i mogu promijeniti hormonsku signalizaciju koja utječe na metaboličke i reproduktivne procese.³⁰

2.3.2. Adsorpcija na mikroplastiku

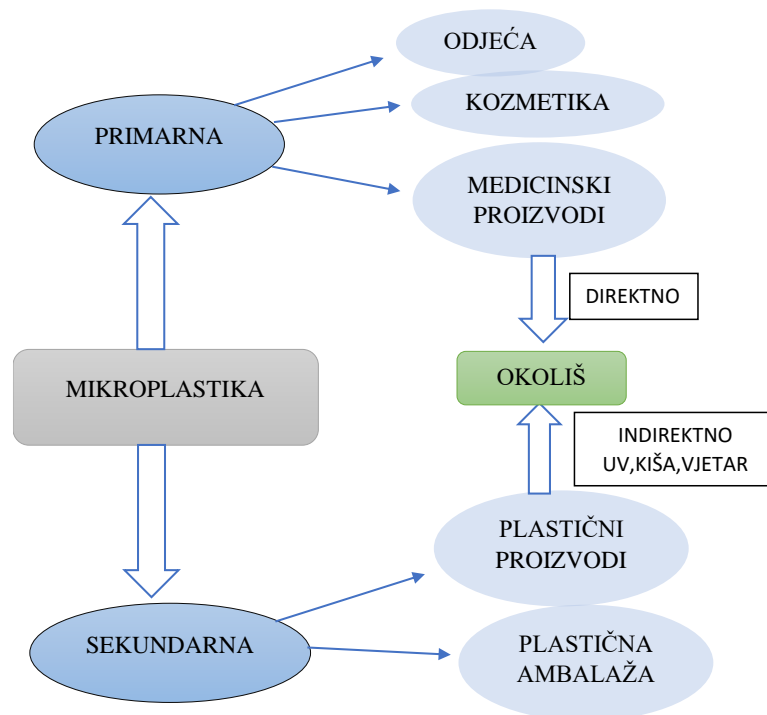
Na MP-e se mogu vezati razne onečišćujuće tvari. To mogu biti poliklorirani bifenili (PCB) i diklordifeniltrikloretan (DDT), koji su dobro poznati po svojoj visokoj toksičnosti i postojanosti u okolišu. Zbog velikih specifičnih površina i hidrofobnosti imaju potencijal kemijske adsorpcije na površini MP-a.³¹ PCB je kancerogen, mutagen i teratogen. DDT ima štetne posljedice na neurološki sustav i imunodeficijenciju. MP-a može adsorbirati ulja za podmazivanje, teške metale, razna onečišćenja i kemikalije, čime se povećavaju njihovi toksikološki učinci i postaju štetniji za organizme. Adsorpcijsko ponašanje MP-a također ovisi o veličini čestica, starosti, hidrofobnosti, vodikovim vezama i specifičnom površinskom omjeru.⁷

2.4. Mikroplastika u okolišu

Prisutnost plastike u svim ekosustavima utječe na tlo, vodu i atmosferski okoliš, stvarajući tako štetne utjecaje na vodene i kopnene organizme. Istodobno, hranidbeni lanci postupno postaju onečišćeni plastičnim česticama (MP, NP) što dovodi do sve većeg problema onečišćenja plastikom koji bi mogao imati dugotrajan utjecaj na ekosustave i zdravlje živih bića.⁷ Ubrzana industrijalizacija i eksponencijalni porast broja stanovnika doveo je do sve masovnije proizvodnje, ali i upotrebe plastike. Procjenjuje se da je u posljednjem desetljeću proizvedeno i korišteno više plastike nego u cijelom prošlom stoljeću.¹⁵ Moderna plastika napravljena je s ciljem dugog vijeka trajanja, odnosno plastični proizvodi su dizajnirani i kemijski stabilizirani kako bi što duže trajali. Na morska staništa utječu plastični ostaci koji se u geografskom smislu brzo šire i akumuliraju u oceanu.³⁴ Raspodjela tih ostataka u moru ovisi o različitim mehanizmima, uključujući vjetrove, struje, geografske karakteristike obale i ljudske čimbenike poput urbanizacije i trgovačkih ruta.³⁴ Čimbenici, inherentna svojstva MP-a kao što su gustoća, oblik i veličina mogu utjecati na transport i distribuciju u okolišu.³¹ MP-e nađena u morskom okolišu može dospjeti i s kopna i iz oceanskih izvora. Pod izvore temeljene na oceanu spadaju otpuštanja uslijed komercijalnog ribolova, sa plovila i drugih aktivnosti u morskom okolišu, a oni doprinose samo 20 % ukupnog plastičnog otpada u morskom okolišu. MP-e iz kopnenog izvora doprinosi preostalih 80 %, a u to se uključuju izvori različitog porijekla poput proizvoda za osobnu njegu, proces zračnog pjeskarenja, nepropisno odložena plastika i procjedne vode s odlagališta. Kada se MP-e nađe u kopnenim prirodnim vodenim sustavima, većina se transportira rijekama do mora i oceana, dok bi ostatak ostao u slatkoj vodi, uključujući i izolirane dijelove poput planinskih jezera.²³ Broj plastičnih ostataka u Sredozemnom moru i Atlantskom oceanu je vrlo visok, što se pripisuje i prirodnim i ljudskim čimbenicima.³⁴ Prikaz akumulacije MP-a u okolišu prikazan je na slici 6. Značajno onečišćenje plastikom primijećeno je i na plažama. Istraživanjima iz 2011. sedimenta plaža uz Belgijsku obalu, utvrđena je prosječna koncentracija MP-a od 92,8 čestica/kg suhog taloga. Utvrđeno je da je nakupljanje MP-a u sedimentu na plažama Južne Koreje nakon kišne sezone bilo veće od one prije kišne sezone.^{35,36} Uz to, smjerovi vjetra i oceanskih struja važne su odrednice razine onečišćenja MP-om na plažama. Isto tako, više predmeta od plastike uočeno je na vjetrovitim plažama u usporedbi sa zavjetrinskim plažama.³⁶ Navodno je MP-e pronađena i u tropskim područjima te u polarnim vodama Antarktika.³¹ MP-e ima pogodnu površinu za adsorpciju raznih kemikalija u okolišu, uključujući teške metale, farmaceutike i druge onečišćujuće tvari prisutne u okolišu, što povećava toksične učinke.³⁷

Kada je MP-e izložena u okolišu, postoji veća mogućnost njene razgradnje u nanoplastiku (NP) koja može imati veći toksični učinak i rizik na okoliš zbog svoje prirode.³¹

Fizički utjecaj MP-a odnosi se na zaplitanje i gutanje. Zaplitanje može uzrokovati ozbiljne utjecaje na organizme u vodenom ekosustavu, mogu biti čak i smrtonosni zbog utapanja, gušenja, davljenja ili gladovanja. Putevi ulaska MP-a u trakt uključuju izravno i neizravno gutanje. Najranjivije vrste su morske kornjače, sisavci, morske ptice i rakovi. Kemijski i biološki učinci su faktori koji igraju ključnu ulogu. Nakon gutanja, MP-e uzrokuje toksične učinke na ljude i žive organizme kroz nekoliko putova i mehanizama. Razne toksične tvari koje se nalaze u vodama mogu se adsorbirati na MP-e, što se može naknadno desorbirati u živom organizmu.³¹ Mikroorganizmi mogu brzo kolonizirati površinu MP-a i biti transportirani dalje od izvora nastanka jer je MP-e izdržljiva i postojana za razliku od medija u kojem se nalazi. Često se na MP-u pojavljuju patogeni mikroorganizmi. Na MP-u se stvara biofilm koji može promijeniti gustoću, a povećanjem gustoće dolazi do tonjenja MP-a do dna vodenog ekosustava te površina MP-a postaje manje hidrofobnija. Izvori MP-a u slatkoj vodi su najvećim dijelom iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda.³¹ PS posjeduje mogućnost nakupljanja u želucu ribe, a zatim i mogućnost translociranja kroz cirkulaciju krvi. Istraživanjem provedeno na kamenicama, izložene dva mjeseca PS-u, primijećeno je smanjenje brzine kretanja spolnih stanica u mužjaka, odnosno uočen je reproduktivni poremećaj.³¹



Slika 6. Shematski prikaz akumulacije mikroplastike u okolišu.

Unatoč svojoj opsežnoj proizvodnji i širokoj primjeni, PVC se naziva "spornim" svestranim materijalom zbog zabrinutosti o rizicima za ljudsko zdravlje iz njegovog životnog ciklusa koju su istakla znanstvena istraživanja i regulatorna tijela. Ove zabrinutosti uglavnom proizlaze zbog stvaranja i oslobađanja štetnih kemikalija tijekom proizvodnje, uporabe i zbrinjavanja materijala. Dakle, iako se PVC smatra relativno inertnim, samo stvaranje klora povezano je s opasnim nusproizvodima. Unatoč njegovoj raširenoj uporabi i prisutnosti štetnih aditiva, postoji relativno malo dokumentacije o pojavi, distribuciji i karakterizaciji PVC-a u okolišu u usporedbi s drugim plastičnim materijalima.

2.5. Postupci uklanjanja mikroplastike iz okoliša

Trenutno stanje u svijetu ukazuje na to da se čestice MP-a najvećim dijelom iz okoliša uklanjaju putem obrade otpadnih voda, iako dio tih čestica može proći i kroz filtere u takvim postrojenjima. Proces bioremedijacije još uvijek nije dovoljno istražen i optimiran pa se ne koriste u konvencionalnom smislu. To je još uvijek postupak u razvoju, međutim njen potencijal je izrazito velik zbog ekološkog i ekonomskog profita. Postrojenja za pročišćavanje pitke vode često crpe vodu iz različitih izvora vode, uključujući površinske, podzemne i morske vode za pročišćavanje, a ti izvori vode su podložni onečišćenju MP-om. Uređaji za pročišćavanje otpadnih voda usmjereni su na obradu tokova otpadnih voda koje nastaju iz industrijskih, komercijalnih ili stambenih objekata. Obrada vode daje otpad kao što su otpadne vode i mulj koji zadržavaju MP-e i njihov povratak u okoliš ponovno uvodi MP-e kao što je i prethodno navedeno.^{38,39} Također, bitno je uzeti u obzir da trenutno uređaji za obradu otpadnih voda nisu specifično građeni niti pripremljeni za uklanjanje MP-a. Sastoje se od primarne, sekundarne i tercijarne obrade, ali čestice MP-a na kraju ipak mogu završiti u ispuštenim vodama. Tercijarni tretman može uključivati kloriranje, ozoniranje, UV zračenje, diskfilter, brzu filtraciju pijeska, granulirani aktivni ugljen. Prema podacima⁴⁰ primarnom obradom u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda uklanja se 16,5 % do 98,4 % MP-a. Sekundarni tretman postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda ima ukupnu učinkovitost uklanjanja MP-a u rasponu od 78,1 % do 100 % i stupanjsku učinkovitost od 7 % (aktivni mulj) do 99,9 % (membranski reaktor). Tercijarni tretman uklanja ukupno 87,3 % do više od 99,9 % MP-a. Koagulacijai taloženje u uređajima za pročišćavanje pitke vode mogu ukloniti 1,8 % do 54,5 % MP-a, iako napredni tretman potiskuje uklanjanje MP-e na ukupno 88,6 % (slika 7).⁴⁰

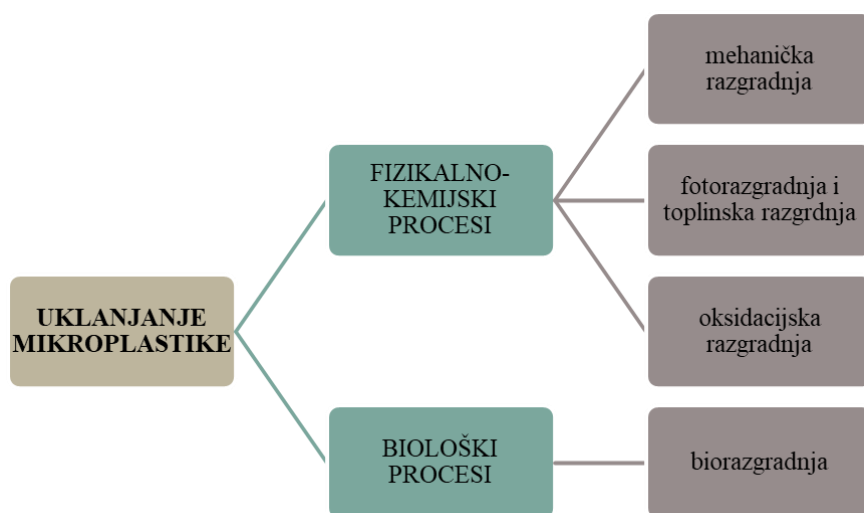


Slika 7. Shematski prikaz rada postrojenja za obradu otpadnih voda i učinkovitosti uklanjanja MP-a.

U slučaju primarne i sekundarne obrade utvrđeno je uklanjanje čak više od 99,9 % čestica MP-a jer je plutajuća MP-e manje gustoće od vode, međutim, određeni dio MP-a se može „zarobiti“. Osim toga, mijenja se stvaranje biofilma na plastici pa se i njihova površinska svojstva mijenjaju i otežava se uklanjanje tijekom obrade. Na stvaranje biofilma utječe vrijeme zadržavanja otpadne vode tijekom sekundarne obrade i hranjivi sadržaj otpadnih voda.^{41,42}

U fizikalno-kemijske procese uklanjanja MP-a ubrajamo mehaničku razgradnju, fotorazgradnju te kemijsku razgradnju, dok u biološke procese ubrajamo biorazgradnju (slika 8). O biorazgradnji će biti više riječi u potpoglavlju 2.5.1., a u nastavku će se opisati fizikalno-kemijski procesi biorazgradnje. **Mehanička razgradnja** događa se kroz abraziju kada MP-e naiđe na druge materijale kao što su plutajuće drvene krhotine, školjke i drugi otpad te se zatim usitnjava na manje čestice silama trenja koje se javljaju tijekom kretanja kroz različita staništa u okolišu. Do mehaničke razgradnje najčešće dolazi u vodenom ekosustavu. Moguće je doći do određenog stupnja depolimerizacije. Prema istraživanjima Enfrin i sur. mehanička abrazija mogla bi razgraditi MP-e, ali proces je ili poboljšani ili je pokrenut kemijskom razgradnjom – fotooksidacijom, toplinskom oksidacijom, hidrolizom. Mehanička razgradnja dovodi do smanjenja veličine čestica i posljedično do povećanja površine polimernih čestica, što rezultira bržom razgradnjom zbog veće reaktivnosti.^{43,44} **Fotorazgradnja i toplinska razgradnja** je proces kada UV zračenje u kombinaciji s kisikom mijenja fizikalnu i kemijsku strukturu. Fotorazgradnja je brz proces, no prema istraživanjima brža je u kopnenom ekosustavu, najviše u zraku, za razliku od vodenog ekosustava. Unutar vodenog ekosustava razgradnja je brža na površini vode.⁴⁴

Fotorazgradnja je učinkovitija od toplinske razgradnje, što je vidljivo kod PVC-a jer prije dolazi do oslobađanja Cl kod fotorazgradnje. Termička razgradnja se odnosi na kemijske promjene u polimerima kao rezultat povišene temperature.⁴⁵ **Kemijska razgradnja**, odnosno napredni oksidacijski procesi dobivaju sve više pažnje u znanstvenim krugovima. To je skup postupaka kemijske obrade dizajniranih za uklanjanje organskih (i ponekad anorganskih) materijala u vodi i otpadnoj vodi oksidacijom kroz reakcije s hidroksilnim radikalima ($\cdot\text{OH}$). Može se kombinirati s ozonom, katalizatorom ili ultraljubičastim (UV) zračenjem u tercijarnom stupnju obrade kako bi se uklonile sve zaostale nečistoće iz sekundarnog stupnja.⁴⁶ Međutim, ti procesi i tehnologije imaju svoja ograničenja, a krajnji proizvodi također mogu biti toksične prirode. Stoga postoji potreba za identificiranjem i istraživanjem održivih i ekološki prihvatljivih metoda koje zahtijevaju manju količinu kemikalija, ekonomski su izvedive i proizvode netoksične krajnje proizvode poput biorazgradnje.



Slika 8. Shematski prikaz podjele uklanjanja MP-a u okolišu.

2.5.1. Biorazgradnja

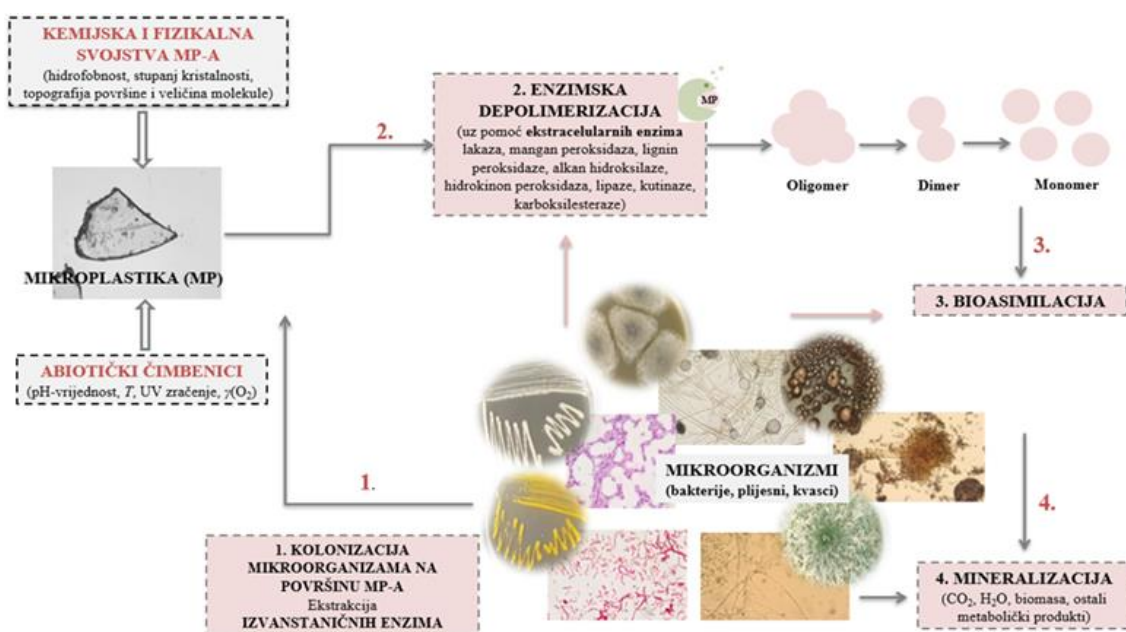
Biorazgradnja je definirana kao biološki katalizirano smanjenje složenosti kemijskih spojeva.⁴⁷ To je proces kojim se organske tvari razgrađuju na jednostavnije spojeve pomoću živih stanica mikroorganizama. Završni korak u procesu biorazgradnje je mineralizacija, a krajnji produkti su ugljikov dioksid, CO_2 , i voda, H_2O . Međutim, u većini slučajeva izraz „biorazgradnja“ općenito se koristi za opisivanje gotovo svake biološki posredovane promjene u supstratu.⁴⁷ Bioremedijacija je nova i inovativna tehnologija koja je prepoznatljiva zbog svoje ekonomičnosti te ekološke prihvatljivosti. Navedena tehnologija koristi razne ekološki

prihvatljive procese s mikroorganizmima za rješavanje sve većeg onečišćenja okoliša. U takvim pristupima, mikroorganizmi se prilagođavaju štetnom otpadu, a ekološki prilagođeni sojevi mikroorganizama rastu prirodno, koji potom pretvaraju široku raznolikost otrovnih kemikalija u netoksične oblike.⁴⁸ Procesi bioremedijacije prisutni su u rješavanju mnogih onečišćenja – teški metali, pesticidi, nafta i naftni derivati, miješana onečišćenja. Bioremedijacija petrokemijskih ugljikovodika koji onečiste tlo i vode je složen proces zbog njihovog toksičnog hidrofobnog ponašanja i višefazne prirode, raznolikosti zajednice mikroorganizama i postojećih ekoloških čimbenika. Učinkovitost unosa mikroorganizama i metabolizma toksičnih ugljikovodika može se mijenjati različitim okolišnim faktorima. U većini eksperimentalnih izvješća o razgradnji petrokemijskog otpada su identificirani različiti ograničavajući čimbenici (fizički, kemijski, biološki) koji utječu na procese razgradnje, na primjer, opterećenje onečišćujućim tvarima, prisutnost elektrona donori i akseptori, sadržaj otopljenog kisika, temperatura, pH, status hranjivih tvari i prilagodljivost mikroorganizama.⁴⁹ Razumijevanje procesa biorazgradnje zahtijeva razumijevanje mikroorganizama. Mikroorganizmi transformiraju tvar putem metaboličkih ili enzimskih procesa. Taj proces temelji se na dva procesa: rastu i kometabolizmu. U rastu, organska tvar koristi se kao jedini izvor ugljika i energije. Ovaj proces rezultira potpunom razgradnjom (mineralizacijom) organskih onečišćujućih tvari. Kometabolizam se definira kao metabolizam organskog spoja u prisutnosti supstrata za rast koji se koristi kao primarni izvor ugljika i energije.⁴⁹ Nekoliko mikroorganizama, uključujući gljive i bakterije sudjeluje u procesu biorazgradnje. Izvještaji o algama i protozoama su oskudni u pogledu njihove uključenosti u biorazgradnju. Organski materijal može se razgraditi aerobno, s kisikom ili anaerobno, bez kisika.⁴⁷ Istraživanja pokazuju u slučaju biorazgradnje PVC-a kako se mikroorganizmi, uglavnom bakterije usredotočuju na razgradnju aditiva, dok je konkretna razgradnja samog polimera vrlo slaba.⁵⁰ Mikroorganizmi kao što su gljive (npr. *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp.), bakterije (npr. *Azotobacter* sp. i *Pseudomonas* sp.) i aktinomicete (npr. *Amycolatopsis* sp. i *Actinomyces* sp.) mogu razgraditi i sintetičku i prirodnu plastiku.⁷ Razgradnja MP-a u ekosustavima uglavnom je potaknuta fotooksidacijom izazvanom ultraljubičastim (UV) zračenjem, koja oslobađa monomere i oligomere i stvara manje fragmente. Manji fragmenti polimera su osjetljiviji na biorazgradnju. Najprije se MP-e razgrađuju u svoje monomere, a zatim se monomeri konačno mineraliziraju. Iako se MP-e akumulira iz različitih izvora, oceani postaju konačni ponor za sve vrste plastičnih čestica jer MP-e koja se nalazi na kopnu ili slatkovodnim vodama, završit će u oceanima. MP-e sadrži aditive (bisfenol A (BPA), ftalati, polibromirani difenil eteri (PBDE))

koji obično nisu kovalentno vezani s polimerom i oslobađaju se tijekom procesa biorazgradnje. Prvo dolazi do stvaranja biofilma, formira se tanak sloj na površini plastičnih čestica te će mikroorganizmi prvo reagirati s aditivima u MP-u.⁷ Brzina biorazgradnje ovisi o nekoliko karakteristika MP-a, kao što su molekularna težina, kristaliničnost, funkcionalne skupine i aditivi. Ako sumiramo sve navedeno, možemo biorazgradnju opisati kao proces razgradnje MP-a na manje čestice pomoću mikroorganizama, a taj proces podijeliti u četiri faze (Slika 9): kolonizaciju, enzimsku depolimerizaciju, bioasimilaciju i kao ciljane faze, mineralizaciju.

Kolonizacija mikroorganizama odnosi se na stvaranje biofilma na čestici MP-a. Koloniziraju se mikroorganizmi na površini MP-a, najprije duž površinskih pukotina, jama i drugih udubljenja koja su nastala mehaničkim i kemijskim procesima trošenja. Nakon što je površina MP-a kolonizirana, to još nazivamo „plastisfera“, mikroorganizmi kreću oslobađati enzime koji razgrađuju MP-e na oligomere, dimere ili monomere. **Enzimsku depolimerizaciju** odvija se u dvije faze, adsorpcija enzima na površini polimera, nakon čega slijedi hidroliza. Veze u polimernim lancima se cijepaju enzimima koje proizvode mikroorganizmi, a produkti hidrolize se metaboliziraju dalje u biorazgradnji. Enzimsku aktivnost uključuju hidrolizu, oksidaciju, hidroksilaciju, što rezultira cijepanjem polimernih lanaca na oligomere, dimere i monomere. Sljedeća faza, **bioasimilacija**, može se nastaviti samo ako je izvorna MP-a fragmentirana do veličina koje omogućuju prolaz molekula kroz stanične stijenke mikroorganizama. Kada dođe do asimilacije, molekule se mogu koristiti kao ugljik i izvori energije. CO₂, H₂O i CH₄ nastaju u ovom završnom koraku poznatom kao **mineralizacija**. Ovaj posljednji korak također zatvara biogeokemijski ciklus ugljika. Biorazgradnja se može odvijati aerobno (CO₂, H₂O) i anaerobno (CO₂, H₂O i CH₄). Anaerobna biorazgradnja najčešće se odvija na odlagalištima, dok je aerobna biorazgradnja učinkovitija, ako su uvjeti u okolišu odgovarajući. Nekada kolonizacija mikroorganizama može spriječiti biorazgradnju jer mijenja gustoću MP-a, što može dovesti do potonuća i tako smanjiti utjecaj UV zračenja i spriječiti fotooksidaciju.^{51,52} Plastični polimeri dijele se na hidrolizirajuće (PET) i nehidrolizirajuće (PE, PP, PS i PVC), pri čemu je prva skupina podložnija biorazgradnji od druge skupine. PET se može hidrolizirati hidrolazama mikroorganizama, dok depolimerizacija polimera, koji se ne mogu hidrolizirati, zahtijeva enzime s visokim redoks potencijalom za oksidativno cijepanje C-C veza.²¹ Pokazalo se da *Kutinaze* iz *Humicola insolens*, *Pseudomonas mendocina*, *F. solani*, *Thermobifida cellulosilytica* i *Thermobifida fusca* mogu hidrolizirati aromatične poliestere kao što je PET.⁸ *Yarrowia lipolytica* je dobro poznati nekonvencionalni nepatogeni kvasac. Zbog sposobnosti asimilacije različitih hidrofobnih izvora ugljika, kao što su n-alkani, masne kiseline ili šećerni alkoholi, Y.

lipolytica se koristi u procesima bioremedijacije tla onečišćenog uljima, gorivima ili aromatskim spojevima.⁸ Iako su fizikalno-kemijska svojstva PVC-a oslabljena kada je izložen toplini, sunčevoj svjetlosti ili UV-B zračenju, stope reakcije biorazgradnje prilično su spore u usporedbi s velikom potražnjom i proizvodnjom PVC-a u cijelom svijetu. Do danas se smatra da je biorazgradnja PVC-a od strane mikroorganizama vrlo teška zbog njegove otpornosti na abraziju, hidrofobne i postojeane makromolekularne strukture. Dosadašnja istraživanja o razgradnji PVC-a nisu izvijestila o modifikaciji molekularne mase PVC-a i mineralizaciji kao ni o sadržaju plastifikatora u ispitivanim uzorcima.²¹



Slika 9. Shematski prikaz biorazgradnje MP-a.

2.5.2. Biorazgradnja pomoću kvasaca

Enzimska aktivnost kvasaca ključan je faktor za proces biorazgradnje. Korištenjem enzima imaju sposobnost detoksikacije onečišćujućih tvari. Studije na mikrogljivama o biorazgradnji MAP i MP pokazale su da mogu koristiti te materijale kao jedini izvor ugljika i energije (tablica 4).⁵³ Karakteristike organizama čine upravo vrste enzima koje proizvode za biorazgradnju poput izvanstaničnih ili unutarstaničnih enzima koji pomažu u razgradnji polimera. Mikroorganizmi mogu lako razgraditi male podjedinice polimernih molekula u obliku monomernih jedinica ili u oligomernom obliku.⁵⁴ Istraživanja pokazuju da neki kvasci mogu koristiti aromatične spojeve kao supstrate za rast, ali važnija je njihova sposobnost kometaboličke pretvorbe aromatičnih tvari.

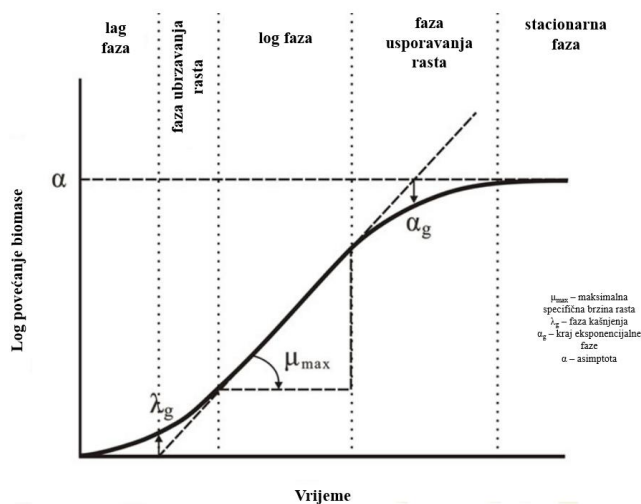
Neke vrste, kao što je zemljišni kvasac *Trichosporon cutaneum*, posjeduje specifične sustave uzimanja aromatičnih supstrata. Nadalje, biorazgradnja alifatskih ugljikovodika koja se javlja u sirovoj nafti i naftnim derivatima dobro je istražena, posebno za kvasce. *N*-alkani su ugljikovodici koji se najčešće i najlakše koriste, a oni između C₁₀ i C₂₀ su najprikladniji kao supstrati za mikrogljive. Tipični predstavnici kvasaca koji koriste alkane uključuju *Candida lipolytica*, *C. tropicalis*, *Rhodoturularubra* i *Aureobasidion (Trichosporon) pullulans*. Utvrđeno je da su *Rhodotorula aurantiaca* i *C. ernobii* sposobne razgraditi dizelsko ulje.⁵⁵ Pronađeno je da pročišćena lipaza iz kvasca *Cryptococcus* sp. soj S-2 može učinkovito razgraditi polimljičnu kiselinu visoke molekularne težine, kao i drugu biorazgradivu plastiku, uključujući polibutilen sukcinat, poli (ϵ -kaprolakton) i poli(3-hidroksibutirat). Polilaktična kiselina (PLA) je plastika dobivena iz obnovljivih izvora, a mehanizmi razgradnje iste mogu pomoći u razumijevanju razgradnje konvencionalnih vrsta plastika. Razgradnja PLA niske molekularne mase ispitana je lipazom iz kvasca *Rhizopus delemere* i poliuretan esterazom iz *Comamonas acidovorans* TB-35. Međutim, također se pokazalo da komercijalne lipaze iz različitih mikroorganizama nisu mogle razgraditi PLA visoke molekularne težine.⁵⁶ Prema mnogim autorima, bakterije su opisane kao učinkovitiji organizmi u biorazgradnji ugljikovodika od kvasaca ili se trenutno bakterije češće koriste kao testni mikroorganizmi. Međutim, postoje podaci da kvasci bolje razgrađuju ugljikovodike od bakterija.⁵⁷ Osim aromatskih i alifatskih spojeva ugljikovodika, mikrogljive mogu kometabolički transformirati brojne druge aromatske organske onečišćujuće tvari, uključujući policikličke aromatske ugljikovodike (PAH) i bifenile, dibenzofurane, nitroaromate, razne pesticide i plastifikatore. Također su provedena istraživanja metabolizma PCB-a od strane kvasaca *C. boidinii*, *C. lipolytica* i *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* također može adsorbirati insekticide i fungicide tijekom aerobne fermentacije.^{57,58} Također, kvasci su poznati po tome što igraju važnu ulogu u uklanjanju otrovnih teških metala. Postoje brojni izvještaji o bioasorpciji teških metala od strane kvasaca.⁵⁹

Rast kvasca prikazan je na slici 10, na x-osi nalazi se vrijeme inkubacije, a na y-osi biomasa ili broj stanica. Proces prvo započinje s lag fazom, odnosno fazom prilagodbe, slijedi faza ubrzanja (uzrokovana činjenicom da sve stanice u inokulumu ne počinju rasti u isto vrijeme), nakon toga ide log faza koju još nazivamo eksponencijalna faza, zatim dolazi do faze usporavanja rasta (uzrokovanu koncentracijom izvora ugljika, ograničavajućim hranjivim tvarima u mediju, smanjenjem ispod potrebnog za održavanje μ_{max}), te, konačno, stacionarne faze (uzrokovane iscrpljivanjem izvora ugljika).

Ovakav rast kvasca očekuje se kada je medij u kojem je ograničavajuća hranjiva tvar ugljik i izvor energije, kao što je glukoza. Kada ograničavajući nutrijent nije ugljik i izvor energije, situacija je složenija zbog neuravnoteženog rasta.⁶⁰

Tablica 4. Biorazgradnja onečišćujućih tvari u okolišu.

Naziv mikroorganizma	Onečišćujuća tvar	Literatura
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cd, Cr, Cu, Pb, Zn	Yakout i sur., 2014.
<i>Pleurotus sp.</i>	Sirova nafta i naftni ugljikovodici	Njoku i sur., 2017.
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Sirova nafta i naftni ugljikovodici	Njoku i sur., 2017.
<i>Cunninghamella elegans</i>	Antracen	Kadri i sur., 2017.
<i>Ganoderma lucidum</i>	PAH	Hunsa Punnapayak, 2009.
<i>Candida parapsilosis</i>	Alfatoksin B1	García-Béjar i sur., 2020.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Alfatoksin B1	García-Béjar i sur., 2020.



Slika 10. Krivulja rasta kvasca.⁶⁰

2.5.2.1. *Rhodotorula glutinis*

Naziv roda potječe od riječi *rhodos* (crveno na grčkom) i *torula* (deminutivni oblik novolatinskog *torus* — izbočina). *Rhodotorula glutinis* se smatra tipičnom vrstom ovog roda, a opisao ju je Georg Fresenius 1850. godine. Kvasci su tada izolirani iz vrhnja kiselog mlijeka i nazvani *Cryptococcus glutinis*. Većina kvasaca uključenih u ovu vrstu su mezofilni, iako neki od njih uspijevaju pod nižim temperaturama, te aerobni organizmi.

Stanice su sfernog, elipsoidnog ili izduženog oblika. *R. glutinis* se razmnožavaju aseksualno višestranim ili polarnim pupanjem; određeni sojevi tvore rezidualni pseudomicelij. Ovi kvasci su sposobni koristiti mnoge spojeve kao izvore ugljika. Oni uključuju glukozu, galaktozu, saharozu, maltozu, trehalozu, etanol, glicerol i heksadekan.

Karakteristična karakteristika ovog roda je nedostatak sposobnosti za fermentaciju šećera. Stanice proizvode ureazu i koenzim Q-10. Mogu rasti u prisutnosti 10 % NaCl, ali ne podnose koncentraciju glukoze iznad 50 %.⁵⁹ Obojena pigmentacija stanica posljedica je proizvodnje velikih količina karotenoida, koji su odgovorni za zaštitu stanica od djelovanja singletnog kisika i prekomjernog zračenja vidljivog i UV spektra svjetla. *Rhodotorula* kvasci se često javljaju u okolišu. Izolirani su iz zraka, tla, trave, jezera, oceana, hrane (tj. mlijeka, voćnih sokova), ljudske kože i izmeta. Većina predstavnika roda ne pokazuje patogene svojstva.⁶¹

2.5.2.2. *Geotrichum candidum*

Naziv potječe od latinske riječi *candidus*, što znači bijel, a široka genotipska i fenotipska raznolikost sojeva *Geotrichum candidum* otežava njegovu klasifikaciju kao kvasac ili gljivu nalik kvascu o kojoj se još uvijek raspravlja. *G. candidum* najpoznatija je vrsta roda *Geotrichum*, koji se sastoji od ukupno 22 vrste, a čiji su taksonomski položaj revidirali de Hoog i Smith 2004. godine.⁶² No, bez obzira na njegovu klasifikaciju, *G. candidum* posjeduje mnogo različitih metaboličkih puteva koji su od posebnog interesa. Raznovrstan metabolički potencijal znači da *G. candidum* može igrati važnu ulogu u potencijalnoj biorazgradnji.⁶³ *G. candidum* je uobičajeni sveprisutni kvasac primjenjivan u prehrambenoj industriji, a najviše je poznat zbog svog doprinosa na proces zrenja i formiranje okusa sira.⁶⁴ *G. candidum* proizvodi nekoliko enzima važnih za razgradnju aminokiselina i masnih kiselina, a katabolizam aminokiselina *G. candidum* dovodi do mnogih spojeva važnih za razvoj okusa sira, kao što su 2-metilpropanol, 3-metilbutanol, a posebno spojevi sumpora.⁶⁵ Ovaj kvasac raste brzo, na temperaturama u rasponu od 5 do 38 °C, dok je temperaturni optimum 25 °C, a kako raste, tako stvara kolonije bijele i krem boje, odakle i potječe njegov naziv.⁶⁶

2.5.2.3. *Saccharomyces cerevisiae*

U industrijskoj biotehnološkoj proizvodnji primjenjuje se tek dvadesetak rodova kvasaca, a najznačajniji su askomiceti iz roda *Saccharomyces*, koji su važni uzročnici vrenja, odnosno fermentacije, pa se rabe kao pivski, vinski, alkoholni i pekarski kvasac.⁶⁷

Sojevi *Saccharomyces cerevisiae* preinačeni metodama genetičkog inženjerstva se u nekoliko posljednjih desetljeća rabe u suvremenoj farmaceutskoj proizvodnji bioloških lijekova (primjerice inzulina).⁶⁷ Osim toga, *Saccharomyces cerevisiae* bio je ključni eksperimentalni organizam za proučavanje zaraznih bolesti, uključujući dsRNA viruse, ssRNA viruse i prione.⁶⁸ *Saccharomyces cerevisiae* razvijen je kao model eukariotskog organizma – to je mala pojedinačna stanica koja se može genetski manipulirati, dopuštajući i dodavanje novih gena ili brisanje kroz mnoštvo tehnika homologne rekombinacije. *S. cerevisiae* bio je i prvi eukariotski genom koji je u potpunosti sekvenciran. Kao eukariot, *S. cerevisiae* ima sličnu unutarnju staničnu strukturu kao biljke i životinje, a to je i ekonomski najvažniji mikroorganizam koji se koristi u biljkama.⁶⁹ Kvasac *S. cerevisiae* modelni je organizam koji se koristi i za proučavanje staničnih bioloških procesa zbog svoje lake genomske manipulacije i bliske povezanosti s eukariotima, a njegova dobra svojstva zamrzavanja i mala veličina stanica kvasca čine ga idealnim uzorkom za razvoj tehnika kriopreparacije, tehnika elektronske mikroskopije.⁷⁰

2.5.2.4. *Trichosporon* sp.

Ovaj mikroorganizam prvi je opisao Beigel 1865. godine kao agens odgovoran za benignu infekciju kose zvanu bijela piedra (što na španjolskom znači "kamen"). *Trichosporon* sp. dio je mikrobioma kože, a osim što može uzrokovati meke čvorove, poznate kao bijela piedra, također je odgovoran za infekcije kod imunosupresivnih pacijenata, uglavnom onih s hematološkom neoplazijom.⁷¹ *Trichosporon* sp. pripada tipu *Basidiomycota*. To je gljiva slična kvascu, makroskopski karakterizirana stvaranjem radijalno simetričnih kolonija. Vrste *Trichosporon* lako rastu na standardnim bakterijskim kulturama, a ove kolonije mogu biti bijele ili žućkaste, glatke teksture, kremaste, cerebriformne, praškaste ili vlažne. Mikroskopski, *Trichosporon* sp. formira hijaline septirane hife, s obilnim artrokonidijama i blastokonidijama, a u nekim slučajevima ima apresorije. Što se tiče fizioloških testova, asimiliraju nekoliko ugljikohidrata i drugih izvora ugljika, ali ne posjeduju fermentacijske sposobnosti. Glavna karakteristika *Trichosporon* roda je njihova sposobnost hidrolize uree.^{72,73} Ovi kvasci naširoko su rasprostranjeni u prirodi i izolirani su iz tla, sedimenata, otpadnih voda, mulja, drvene pulpe i kliničkih uzoraka.⁷⁴

2.5.2.5. *Candida parapsilosis*

Ova vrsta se pojavila kao važan bolnički patogen, s kliničkim manifestacijama uključujući fungemiju, endokarditis, endoftalmitis, septički artritis i peritonitis.⁷⁵

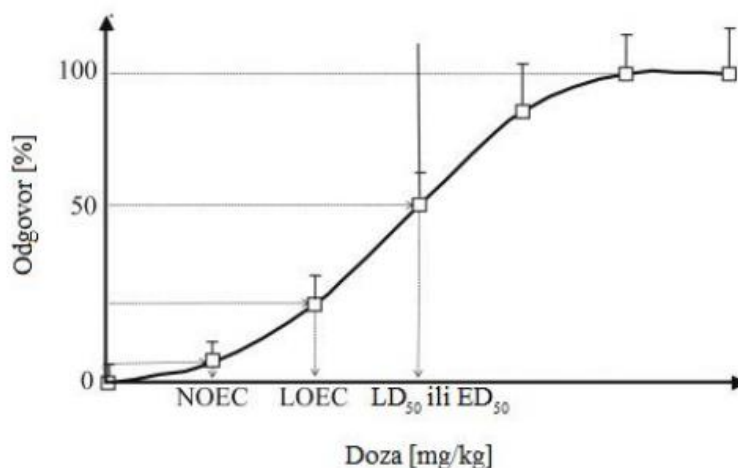
Candida parapsilosis otkrio je Ashford u Puerto Ricu 1928. godine iz stolice s proljevom – prvo je nazvana *Monilia parapsilosis* i smatrana je nepatogenom, no kasnije je bila uzročnikom sepse kod intravenskog korisnika droga, a sada se smatra važnim bolničkim patogenom u nastajanju.⁷⁶ Nedavno je otkriveno da oslobađaju ekstracelularne vezikule koje su uključene u mnoge vitalne biološke procese u stanicama gljivica.⁷⁵ Od posebne važnosti je *C. parapsilosis*, koja može stvarati žilave biofilmove na centralnim venskim kateterima i drugim medicinski implantiranim uređajima. Stvaranje biofilma na plastici važna je činjenica koja se primjenjuje i u procesu biorazgradnje kada mikroorganizmi stvaraju biofilm na površini čestica MP-a. Od najčešće izoliranih vrsta, *C. parapsilosis* je često druga ili treća najraširenija, ovisno o skupini pacijenata kao i zemljopisnim regijama.⁷⁷ Najčešća *Candida* koja uzrokuje ljudske bolesti je *Candida albicans*. Druge medicinski važne vrste *Candida* uključuju kompleks *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* kompleks i *Candida dubliniensis*.⁷⁸ Ipak, za razliku od *Candida albicans* i *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* nije obvezni ljudski patogen, budući da je izoliran iz neljudskih izvora kao što su domaće životinje, kukci i tlo.⁷⁸

2.6. Testovi toksičnosti

MP-e uzrokuje ozbiljne toksične učinke i onečišćuje okoliš. Kako bi se utvrdili štetni učinci određene onečišćujuće tvari na provode se testovi toksičnosti na organizmima poput morske bakterije (*Vibrio fischeri*; ISO 11348:2007), kvasca (npr. *Saccharomyces cerevisiae*; ISO 19040-1:2018), slatkovodnih i morskih algi (OECD 201:1984) te drugim beskralježnjacima i manjim ribama odnosno njihovim embrijima (ISO 21115:RTgill-W1). Svi testovi toksičnosti moraju biti standardizirani, stoga se provode prema ISO i OECD normama. Najčešće ispitivana štetna svojstva su: akutna toksičnost, kronična toksičnost, genotoksičnost, mutagenost, reproduktivna toksičnost, teratogenost.⁷⁹ Istraživanje koje su proveli Ma i suradnici na *Daphnia magna*, vodeni organizam za proučavanje toksičnosti MP-a, došli su do zaključka da NP PS ima visoku toksičnost i vidljiva su fizička oštećenja *Daphnia magna*. Toksičnost je pojačana zbog apsorpcije fenantrena (aromatski ugljikovodik) na MP-u.⁸⁰

Na temelju eksperimentalno dobivenih podataka testova toksičnosti modelira se krivulja doza-odgovor (slika 11). Krivuljom je moguće identificirati najnižu dozu ili koncentraciju tvari koja se ispituje i koja izaziva prvi učinak, kao i najveću dozu ili koncentraciju bez učinka. Modeliranje takve krivulje je jedan od najvažnijih koraka procjene ekološkog rizika. Na slici su označene neke od oznaka, koje označavaju za LOEC (engl. *Lowest Observed Effect Concentration*) je najniža doza koja izaziva štetni učinak, dok je NOEC (engl. *No Observed*

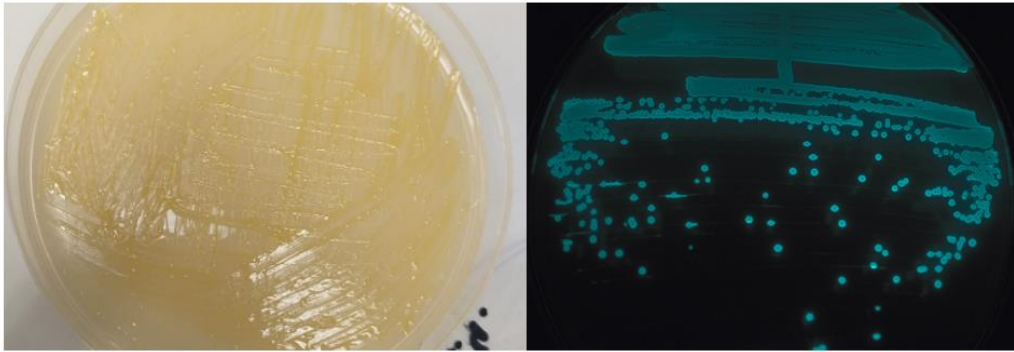
Effect Concentration) najviša doza koja ne izaziva štetni učinak. Najčešći cilj ispitivanja toksičnosti je određivanje letalne doze, LD₅₀, (engl. *Lethal dose*) i efektivne doze, ED₅₀, (engl. *Half maximal effective dose*). LD₅₀ označava dozu tvari koja je uzrokovala smrt kod 50 % jedinki izloženih štetnoj tvari, a ED₅₀ je efektivna doza koja uzrokuje štetan učinak kod 50 % ispitivanih jedinki.⁸¹



Slika 11. Krivulja doza-odgovor.⁸¹

2.6.1. Test toksičnosti s morskom bakterijom *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri (slika 12) je gram-negativna, štapičasta, nepatogena bakterija koja posjeduje svojstvo bioluminiscencije. Široko je rasprostranjena u okolišu, a obuhvaća subtropsko i umjereno morsko okruženje. Egzistira kao slobodnoživući (planktonski) organizam ili živi u simbiozi s određenim organizmima poput riba i glavonožaca. Prilikom provedbe testa ekotoksičnosti morska bakterija *Vibrio fischeri* predstavlja bioindikator koji emitira svjetlost ujednačenog intenziteta, danju i noću. Emitiranje svjetlosti bakterije *Vibrio fischeri* je sastavni dio njezinog metabolizma. Mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće je povezati s utjecajem onečišćujuće tvari.⁷⁹ Ukoliko je ispitivana tvar ili smjesa tvari toksična, doći će do smanjenja intenziteta svjetlosti. To je posljedica toksičnog utjecaja na enzim luciferazu prisutnog u toj bakteriji, a zaslužnog upravo za svojstvo bioluminiscencije. Kratkoročni test inhibicije bioluminiscencije s *Vibrio fischeri* (predhodno nazivan *Photobacterium phosphoreum*) je široko korišten, visoko standardiziran biotest. Koristi se za određivanje akutne i kronične toksičnosti tvari. Njegove prednosti su prvenstveno jednostavnost korištenja, brzina i relativno niski troškovi, a glavni nedostatak je ograničena ekotoksikološka relevantnost korištenog parametra.⁸²



Slika 12. *Vibrio fischeri* izrasle kulture na Petrijevoj zdjelici, lijevo na svjetlu i desno, u mraku.

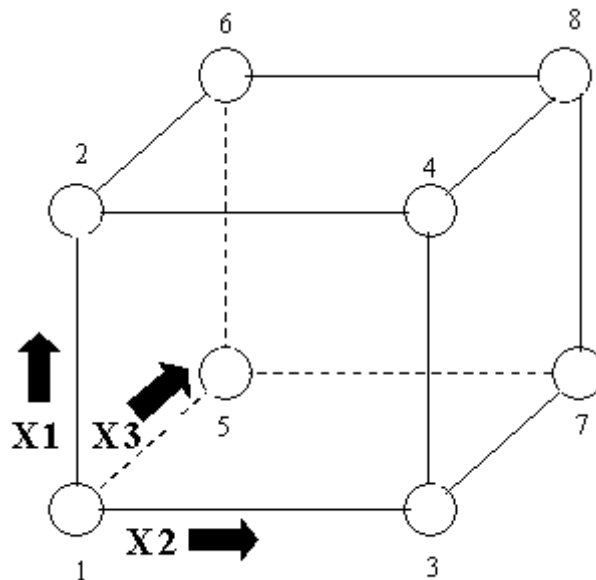
2.7. Statističko planiranje eksperimenta - dizajn eksperimenta

Sva istraživanja u znanosti i inženjerstvu, a pogotovo u industriji provode se empirijski. Sve je veća upotreba statističkih metoda planiranja pokusa. Planiranje pokusa može znatno povećati učinkovitost samog procesa eksperimentiranja i dovesti do boljih i pouzdanijih zaključaka.⁸³ Statističko planiranje eksperimenata, ili dizajn eksperimenata, koristi se radi izrade plana eksperimenata i statističke obrade podataka metoda dizajniranog eksperimentiranja u kojoj se upravljanjem čimbenicima koji se mogu kontrolirati (nezavisne varijable) u svom procesu na različitim razinama može uočiti njihov učinak na neku varijablu odgovora (zavisna varijabla).^{84,85} Cilj ovog pristupa je optimizirati eksperimentalne procese primjenom specifičnih kombinacija varijabilnih razina za dobivanje podataka o proučavanom sustavu. Dizajn eksperimenta omogućuje dobivanje maksimalne količine informacija iz minimalnog broja eksperimentalnih podataka, a također daje i uvid u interakciju između varijabli te učinkovito pronalazi najbolje uvjete za provođenje eksperimenta. Ova metoda koristi se za unaprjeđenje različitih procesa poboljšavanjem preciznosti, osjetljivosti, točnosti i samim time učinkovitosti tih procesa.^{84,85} U ovom radu koristio se puni faktorski plan (engl. *Full factorial*) za dizajniranje pravog eksperimenta.

2.7.1. Puni faktorski plan

Puni faktorski plan je jedan od nekoliko pristupa dizajniranju i provođenju eksperimenta kako bi se odredio učinak koji će različite razine ulaza imati na izlaze, odnosno, nezavisnih varijabli na zavisne (slika 13). Eksperimentiranje korištenjem svih mogućih kombinacija faktora naziva se puni faktorski plan, a minimalni broj eksperimenata koji bi se morao napraviti naziva se "Runs".⁸⁶

Mnoge su prednosti korištenja upravo ovog dizajna eksperimenta poput određivanja glavnih učinaka, određivanje učinaka interakcija na varijablu odgovora, određivanje optimalnih postavki nezavisnih varijabli.⁸⁶ R. Fischer je 1935. godine predložio metodu *faktorijalnog* organiziranja pokusa pri čemu se istodobno promatra kombinacija čimbenika.⁸³



Slika 13. Prikaz primjera punog faktoriskog plana s tri ulazne varijable.⁸⁶

Puni faktorski plan ima princip da se izvode sve moguće kombinacije razina čimbenika što dovodi do velike točnosti dobivenih podataka. Upotreba takvog plana omogućuje istovremeno određivanje neograničenog broja čimbenika i utvrđivanje utjecaja osjetljivosti pojedinih čimbenika i stupanj njihova međusobnog djelovanja. Najjednostavniji i u praksi najviše primjenjivan je faktorijalni plan s varijacijom čimbenika na dvije razine. To osigurava mali broj pokusa čiji je ukupni broj definiran s $N = 2^k$, gdje k označava broj čimbenika. Postavlja se matrica (Tablica 5) eksperimentalnih uvjeta faktorijalnog plan, pri čemu su istovremeno varirana tri čimbenika na dvije razine. Vrijednosti razina su prikazane u transformiranom obliku s maksimalnom (+1) i minimalnom (-1) vrijednošću. Matrica sadrži osam redaka (2^3 , pri čemu pojedini red odgovara eksperimentalnim uvjetim pojedinog pokusa) i tri kolone (tri čimbenika). U prvoj koloni minimalne (-1) i maksimalne (+1) vrijednosti se izmjenjuju u svakom redu, u drugoj koloni svaki drugi red, a u trećoj koloni svaki četvrti red. Na taj način je osigurana ortogonalnost plana (suma svih vrijednosti razina za pojedini čimbenik je jednaka nuli), što omogućuje međusobno nezavisnu procjenu utjecaja pojedinačnih čimbenika i njihova

međudjelovanja. Matrica faktorijskog plana s tri čimbenika može se geometrijski prikazati kao kocka, gdje rubovi kocke čine točke pojedinih uvjeta (slika 13).⁸³

Tablica 5. Matrica pokusa punog faktorskog plana s tri čimbenika na dvije razine (2^3).⁸³

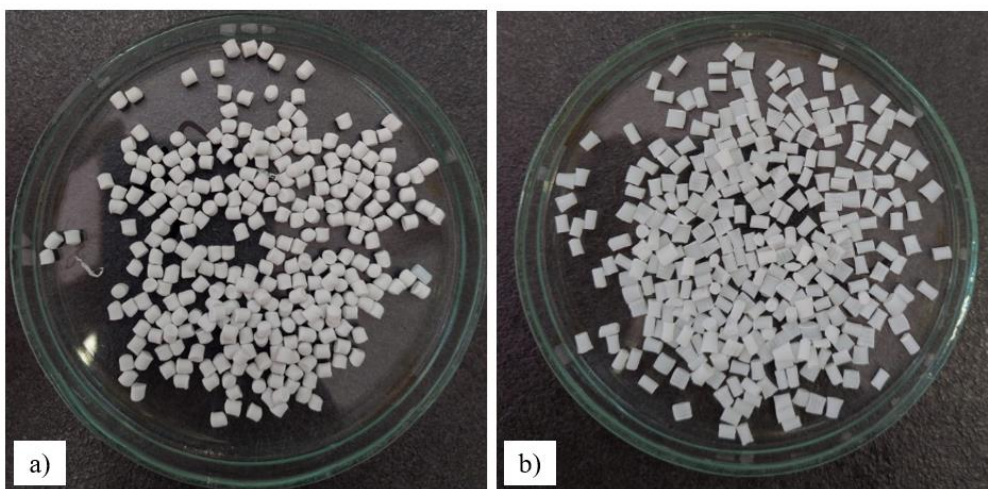
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

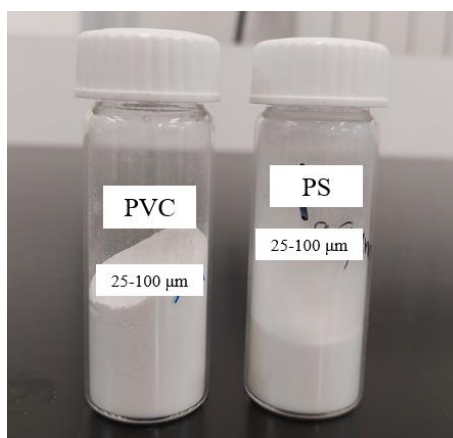
3.1.1. Mikroplastika

Za pokus biorazgradnje s kvascima *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis* korištene su dvije vrste MP-a, PS i PVC, dobivene usitnjavanjem granula MAP-a (slika 14) kriomlinom i vakuum filtracijom. Veličine čestica MP-a su u rasponu 25-100 μm .



Slika 14. Granule MAP-a koje su korištene u pokusu: a) granule PS-a, b) granule PVC-a.

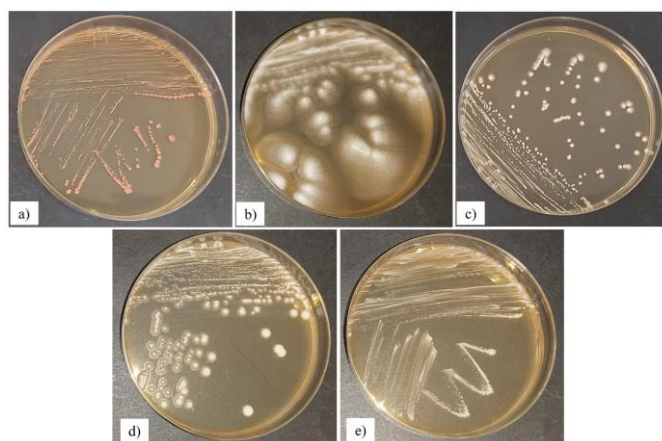
Usitnjene čestice čuvale su se u staklenim bočicama (slika 15) kako bi se sačuvale za daljnji tijek pokusa biorazgradnje.



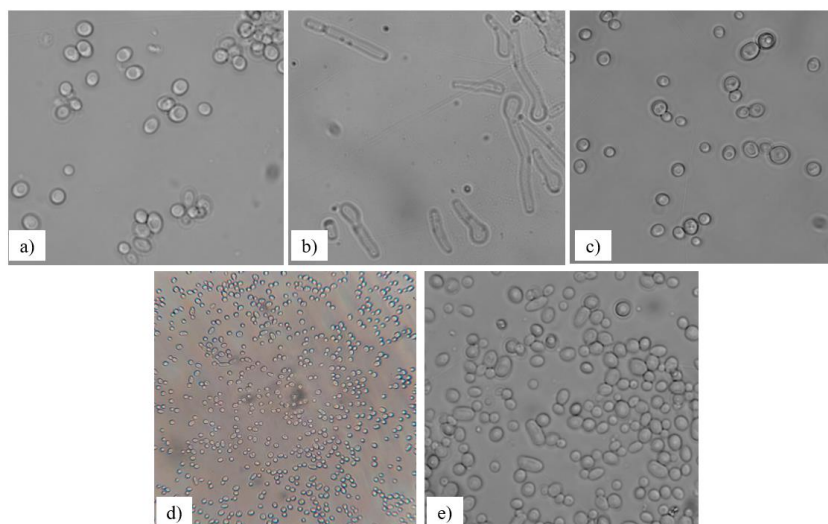
Slika 15. Usitnjena i prosijana MP-e, PS i PVC, veličina čestica 25-100 μm .

3.1.2. Kulture kvasaca

Pokus biorazgradnje PS-a i PVC-a provodio se primjenom pet kultura kvasaca izoliranih iz okoliša: *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis*. Kvasci su pohranjeni u zbirci mikroorganizama u Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Precijepljene kulture kvasaca, uzgajane su na malt agru (MA), prikazane su na slici 16 dok je na slici 17 prikazana morfologija kultura kvasaca snimljena pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 400 ×.



Slika 16. Izrasle kulture kvasaca: a) *Rhodotorula glutinis*, b) *Geotrichum candidum*, c) *Saccharomyces cerevisiae*, d) *Trichosporon* sp. i, e) *Candida parapsilosis* dobivene tehnikom iscrpljivanja na MA.

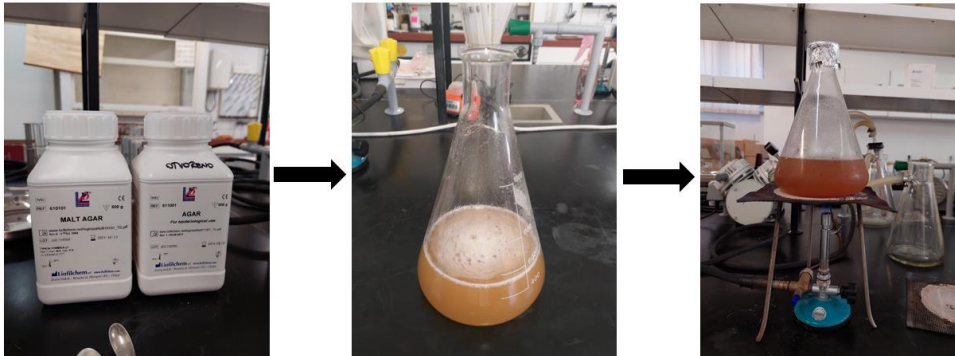


Slika 17. Mikrofotografije kultura kvasaca: a) *Rhodotorula glutinis*, b) *Geotrichum candidum*, c) *Saccharomyces cerevisiae*, d) *Trichosporon* sp. i e) *Candida parapsilosis* dobivene pod svjetlosnim mikroskopom, P = 400×.

3.1.3. Mediji i kemikalije

✓ Hranjiva podloga

Za uzgoj kultura kvasaca pripremala se 1 L MA prema recepturi tako da se 47 g MA izvagalo u 1 L deionizirane vode u Erlenmayerovoj tikvici od 200 mL (slika 18). Tako pripremljena, homogenizirana otopina MA ostavila se 15 minuta da bubri te zagrijavała do vrenja, nakon čega se sterilizirala u autoklavu 15 minuta u autoklavu pri 121 °C i 1,1 atm.



Slika 18. Slijed pripreme MA koji služi kao hranjiva podloga za rast kvasaca.

✓ Etanol

Za sterilizaciju MP-a korištena je 70 %-tna otopina etanola prethodno pripremljena u odmjerne tikvici od 1000 mL ($\omega=96\%$, $M=46,07\text{ g/mol}$, $\rho=0,805\text{ kg/L}$) (slika 19).



Slika 19. 96 %-tni etanol za pripremu 70 %-tnog etanola za sterilizaciju MP-a.

✓ Mineralni medij

Za potrebe pokusa biorazgradnje pripremljen je mineralni medij (MM), pripremljen prema Gong i sur⁸⁷., Tablica 6, slika 20, pH-vrijednosti 6. S obzirom da su se eksperimenti provodili pri različitim pH-vrijednostima (3; 5 i 7), pH-vrijednost MM podešavala se s 1 M HCl i/ili 1 M NaOH. Upotrebom MM osigurani su minimalni uvjeti za rast kvasaca.



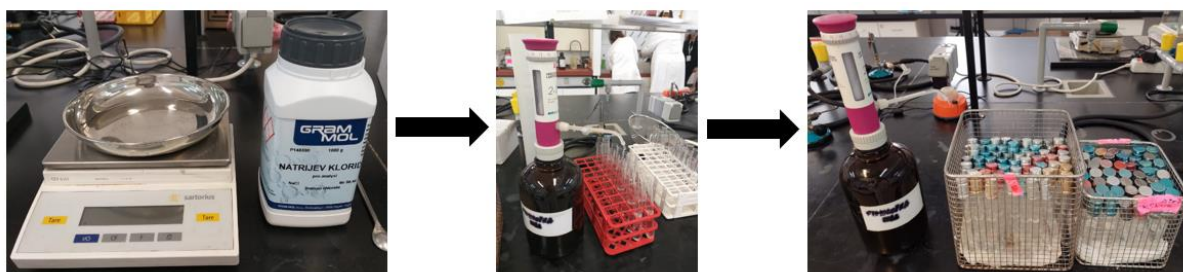
Slika 20. Kemikalije koje su se koristile za pripravu MM.

Tablica 6. Sastav mineralnog medija.⁸⁷

Tvar	Masa / g
K_2HPO_4	1
KH_2PO_4	1
NH_4NO_3	1
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2
$FeCl_3 \times 6H_2O$	0,005
NaCl	0,5
CaCl ₂	0,02

✓ Fiziološka otopina

Korištena je 0,9 % fiziološka otopina za pripremu decimalnih razrjeđenja (9 g NaCl u 1 L deionizirane vode). U epruvete se otpipetira 9 i 9,9 mL priređene fiziološke vode (slika 21).



Slika 21. Sljedi priprema 0,9 %-tne fiziološke otopine.

- ✓ Otopina za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izoosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture *Vibrio fischeri*. Priprema se otapanjem 20 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 0,5 g CaCl₂, 0,2 g MgSO₄, 0,5 mL glicerola, 10 g glukoze i 10 g rafinoze u 1 L deionizirane vode, zatim se prokuha i ohladi te joj se pH-vrijednost podešava pomoću NaOH ili HCl 1 M tako da se nalazi u rasponu od 6,8 do 7,2.

- ✓ Otopina NaCl

2 %-tna otopina NaCl-a korištena je kao radna otopina za pripremu niza razrjeđenja prilikom provedbe testa ekotoksičnosti MP-a primjenom bakterijske kulture *Vibrio fischeri*. Otopina se priprema otapanjem 2 g NaCl u 100 mL deionizirane vode pri čemu pH-vrijednost mora biti u rasponu od 6,8 do 7,2.

3.2. Mjerni instrumenti i aparatura

Za provedbu i praćenje procesa biorazgradnje korišteni su niže navedeni uređaji.

- ✓ Analitička vaga KERN ALJ 220-4NM i Sartorius GM 6101, korištene radi vaganja MA, soli i uzoraka (PS i PVC).
- ✓ Miješanje uzoraka provedeno je na rotacijskim tresilicama PSU-20i Multi-functional Orbital Shaker, Biosan.
- ✓ pH-vrijednost i temperatura pratila se pH elektrodom SenTix® 940, a koncentracija otopljenoga kisika kisikovom elektrodom FDO® 925 pomoću prijenosnog uređaja WTW Multimetar 3430.
- ✓ Optička gustoća određena je spektrofotometrom HACH, DR2400, SAD.
- ✓ Prilikom provedbe razrjeđenja potrebno je suspenziju homogenizirati na homogenizatoru REAX top.
- ✓ Autoklav Sutjeska, Jugoslavija, korišten je za vlažnu sterilizaciju hranjivih podloga te čistog i nečistog staklenog posuđa.
- ✓ Ukupni organski ugljik (TOC), organski ugljik (TC) i anorganski ugljik (IC) određeni su pomoću uređaja TOC-VCSH, Shimadzu.
- ✓ Uređajem za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU, uzorci su razdvojeni po masi.
- ✓ Za karakterizaciju MP-a korišten je FTIR-ATR spektrometar, PerkinElmer, Spectrum One.

- ✓ Za filtraciju sterilizirane mikroplastike koristio se vakuumski filtar lijevak i sterilni celulozno nitratni (C/N) membranski filteri Ahlstrom ReliaDiscTM, promjera pora 0,45 µm.
- ✓ Kriomlin, Retsch CryoMill, uređaj za usitnjavanje plastičnih granula koristeći tekući dušik.
- ✓ Za mjerenje luminiscencije bakterija *Vibrio fischeri* korišten je mjerni uređaj LUMIStox 300 u kombinaciji s inkubacijskim blokom LUMIStherm, Dr. Lange.
- ✓ Bakterijska kultura *Vibrio fischeri* uzgajana je u termostatu Termomedicinski aparati, Hrvatska.
- ✓ Kvasci su mikroskopirani pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera).

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprema mikroplastike

U svrhu provođenja pokusa biorazgradnje MP-a, PS-a i PVC-a, pomoću pet kultura kvasaca (*Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis*), potrebno je granule MP-a usitniti na veličine čestica koje se žele ispitati, a u ovom istraživanju bile su 25-100 µm. Granule polimernih materijala, prikazani na slici 14, usitnile su se na kriomlinu. Kriomlin (slika 22) je uređaj za usitnjavanje krutih uzoraka, poput polimera, na manje čestice s tekućim dušikom koji služi za termostatiranje. Metoda mljevenja uzoraka na kriomlinu je jednostavnija i brža u odnosu na metodu mljevenja sa suhim ledom. Na uređaju je moguće podesiti broj i frekvenciju udaraca te vrijeme trešnje. U utor metalnog spremnika unutar kriomlina stavi se plastika koja se pomoću tekućeg dušika dopremljenog putem cijevi zaledi. Tako zaleđena plastika se uslijed trešnje i udaraca kuglice unutar spremnika usitnjava. Dobivene čestice MP-a su osušene i prosijane na vakuumskom situ u svrhu dobivanja veličina čestica 25-100 µm. Prikaz usitnjenih čestica prikazan je na slici 15.



Slika 22. Kriomlin - uređaj za usitnjavanje

3.3.2. Sterilizacija mikroplastike

Nakon što se MP-e usitni na određenu veličinu, provodi se postupak sterilizacije. Sterilizacija MP-a potrebna je kako bi se uklonile potencijalno postojeće nečistoće na površini i potrebno ju je provesti prije provedbe pokusa biorazgradnje. Izvagana MP-e stavi se u Erlenmayerove tikvice od 100 mL i ulije se 70 %-tni etanol dovoljno da pokrije površinu čestica MP-a kao što je prikazano na slici 23. Erlenmayerove tikvice postavljaju se na rotacijsku tresilicu 10 minuta na 160 o/min pri sobnoj temperaturi.



Slika 23. Prikaz usitnjene MP-e s etanolom u Erlenmayerovim tikvicama prije početka sterilizacije.

Nakon toga se MP-e filtrirala kroz membranski filter veličine pora 0,45 μm . Filtracija se provodila u sterilnim uvjetima rada, a priprema za filtraciju u sterilnim uvjetima je prikazana na slici 24.



Slika 24. Vakuumska filtracija te pribor potreban za postupak filtriranja MP-a.

3.3.3. Preduzgoj kvasaca

Kvasci *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis* uzgajani su na podlozi – malt agar. MA je agar koji se koristi za izolaciju, identifikaciju i prebrojavanje gljivica, posebice kvasaca i plijesni. Izrasli kvasci na podlozi (slika 16) upotrjebljeni su za pripremu suspenzije koje su potrebne za postavljanje pokusa. Priprema suspenzije (slika 25) sastoji se od izuzimanja veće biomase kulture kvasca, svakog posebno, s Pastuer pipetom te se pomoću MM (tablica 5) prenese u sterilnu Erlenmayerovu tikvicu. Pripremljenu suspenziju potrebno je dobro homogenizirati.



Slika 25. Priprema suspenzije kvasaca u laminaru.

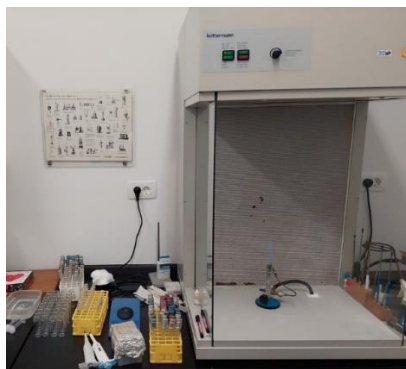
3.3.4. Provedena mjerenja tijekom procesa biorazgradnje

3.3.4.1. Određivanje broja živih stanica kvasaca (CFU)

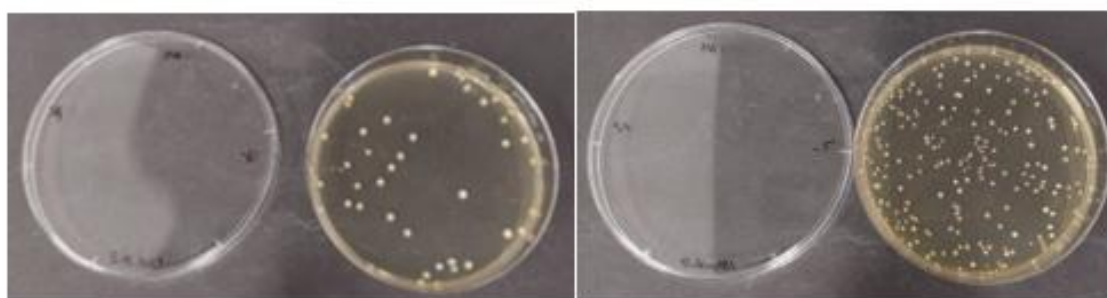
Za određivanje CFU (*Colony forming Unit*) potrebno je izuzeti 1 mL uzorka iz Erlenmayerove tikvice i prirediti decimalna razrjeđenja od 10^{-5} i 10^{-6} (kako bi se dobio brojevni

raspon: 30 – 300). Postupak određivanja CFU sastoji se od nekoliko koraka, a prvi je da se inokulira 1 mL prethodno pripremljenog razrjeđenja (10^{-5} ili 10^{-6}) u praznu sterilnu Petrijevu zdjelicu koji se potom zalije s MA i dobro homogenizira 7-10 puta u obliku broja osam. Ovi postupci provedeni su u laminaru (slika 26) s ciljem osiguravanja visokog stupnja mikrobne čistoće. Petrijeve zdjelice s izlivenom podlogom i priređenim razrjeđenjima se inkubiraju u termostatu na 28 °C 3-5 dana. Nakon inkubacije, odredio se broj izraslih kolonija brojanjem (jedna izrasla kolonija predstavlja jednu stanicu) (slika 27), a CFU vrijednost se izračunala prema formuli (1).

$$CFU / (\text{jed./mL}) = \frac{\text{broj izraslih kolonija}}{\text{volumen upotrebljenog uzorka}} * \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja (1)}$$



Slika 26. Prikaz laminara.

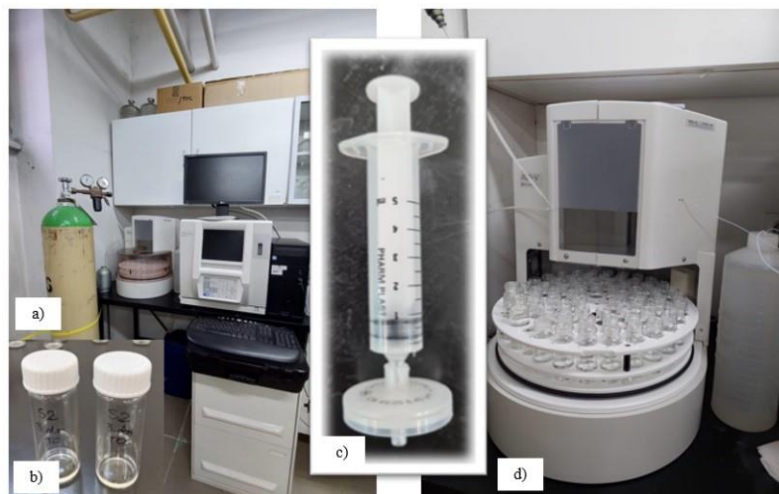


Slika 27. Prikaz izraslih kolonija kvasaca nakon inkubacije, razrjeđenja 10^{-6} (lijevo) i 10^{-5} (desno).

3.3.4.2. TOC analiza

TOC (engl. *Total Organic Carbon*) analiza služi za određivanje ukupnog organskog ugljika, ukupnog ugljika i anorganskog ugljika.

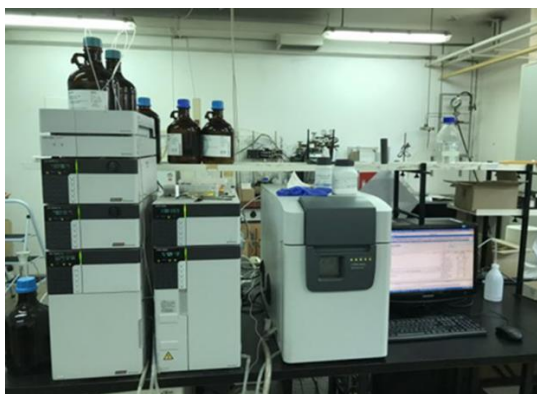
Za analizu je potrebno izuzeti 0,5 mL uzorka, koji se profiltrira pomoću šprice kroz okrugli filter promjera 0,45 μm . Za TC (engl. *Total Carbon*) se ponovi postupak, a IC (engl. *Inorganic Carbon*) se izračuna iz razlike TC-a i TOC-a. Filtrat je stavljan u staklene bočice, koje su za TOC analizu. Ukupan volumen treba biti 10 mL pa se doda još 9,5 mL deionizirane vode. U bočicu za TOC se doda još 3 kapi koncentrirane H_2SO_4 u svrhu neutralizacije anorganskog ugljika. Na slici 28 prikazan je TOC- V_{CSH} , Shimadzu uređaj koji se koristi za analizu te pribor koji se koristio.



Slika 28. Instrumenti i materijali za provedbu TOC analize, pod a) TOC- V_{CSH} , Shimadzu uređaj, b) staklene bočice, c) šprica sa filterom i d) tuba gdje se stavlja staklene bočice.

3.3.4.3. HPLC/MS analiza

Spregnuti sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-MS/MS, high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry) predstavlja sustav koji omogućuje odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica.²⁹ HPLC/MS analiza provedena je u svrhu detekcije potencijalno nastalih razgradnih produkata, poput aditiva koji se dodaju u MP-e. Prilikom HPLC/MS analize korištene su dvije pumpe za podešavanje protoka mobilne faze (0,1 % mravlje kiseline + MiliQ i acetonitril/metanol) vrijednosti 0,5 cm^3/min . Volumen injektiranog uzorka iznosio je 10 μL . S obzirom da se ne zna točan sastav uzorka, korištena je HPLC metoda bez kolone. Na slici 29 prikazan je HPLC/MS uređaj na kojem se provodila analiza.



Slika 29. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, HPLC UFLC XR D4 SHIMADZU za provedbu HPLC/MS analize.

3.3.4.4. FTIR-ATR analiza

FTIR-ATR analiza ili infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama je analiza koja se provodi radi provjere funkcionalnih skupina u kemijskoj strukturi PS-a i PVC-a. Provodi se prije i poslije pokusa biorazgradnje kako bi se moglo utvrditi je li došlo do promjena u funkcionalnoj strukturi MP-a. Analiza se provodi prije i nakon eksperimenta kako bi se utvrdile karakteristične funkcionalne skupine, a rezultat je odgovarajući spektar okarakteriziranog polimera s pripadajućim karakterističnim funkcionalnim skupinama koje se nalaze u kemijskoj strukturi tog polimera. Analizirajući i uspoređujući spektre prije i nakon biorazgradnje moguće je utvrditi je li usitinu došlo do biorazgradnje MP-a. Na slici 30 prikazan je uređaj za FTIR-ATR analizu, a analiza se provodi na način da se na dijamantnu strukturu stavi MP-e tako da prekriva cijelu površinu.



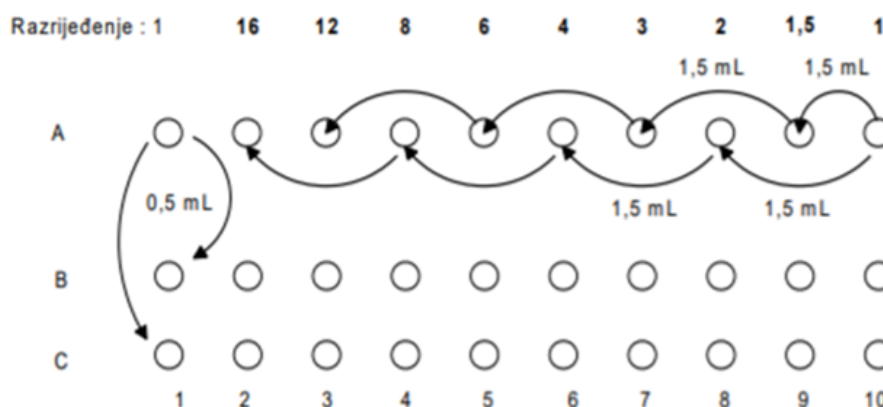
Slika 30. Instrument za provedbu FTIR-ATR analize, pod a) FTIR-ATR spektrometar i b) dijamantna površina prekrivena MP-om.

3.3.4.5. Određivanje ekotoksičnosti morskom bakterijom *Vibrio fischer*

Za ispitivanje ekotoksičnosti koristio se profiltrirani uzorak po završetku eksperimenta te se primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri* provodio test ekotoksičnosti. Otopina filtrata treba imati pH-vrijednost između 6 i 8,5. Otopina suspenzije *Vibrio fischeri* priprema se uzimanjem Pastuer pipetom nastale biomase i stavlja u otopinu za resuspenziju koja se nalazi u epruveti napunjena 2/3 epruvete, nakon toga je potrebno termostatirati bakterijsku suspenziju 15 minuta u termostatu na 15 °C, termometar LUMIStherm, Hach-Lange GmbH. Prije provođenja testa ekotoksičnosti potrebno je provjeriti početnu luminiscenciju pripremljene bakterijske suspenzije, a ona treba iznositi između 1000 i 5000. Test ekotoksičnosti proveden je prema linearnom nizu (slika 31) nakon što je utvrđena valjana vrijednost izmjerene početne luminiscencije.

Postupak provedbe testa toksičnosti prema linearnom nizu:

1. U prvu kivetu stavi se 2/3 kivete 2 %-tne otopina NaCl, u zadnju 2/3 uzorka suspenzije kvasca. U predzadnju kivetu stavi se 1 mL 2 %-tne otopine NaCl, a u sve ostale kivete stavi se po 1,5 mL 2 %-tne otopine NaCl.
2. U A nizu napravi se niz željenih razrjeđenja na način na koji je prikazan na slici 31 .
3. U sve ostale kivete B i C niza stavi se po 0,5 mL inokuluma.



Slika 31. Postupak pripreme razrjeđenja i testa ekotoksičnosti morskom bakterijom *Vibrio fischeri*.

Dobiveni podaci luminiscencije se zapisuju u 0. minuti i nakon 30. minuta, a dobiveni podaci bioaktivnosti su vrijednosti EC_{20} i EC_{50} te faktor f (mora biti između 0,6 i 1,3).

Podaci za EC₂₀ i EC₅₀ ukazuju na veću ili manju toksičnost pojedinog uzorka. Uređaj za određivanje ekotoksičnosti, prikazan na slici 32, luminometar LUMIStox 300.



Slika 32. Luminometar LUMIStox 300 i termometar LUMIStherm, Hach-Lange GmbH.

3.3.4.6. Praćenje morfoloških promjena stanica kvasca

U svrhu praćenja morfoloških promjena stanica kvasca provodila se mikroskopska analiza na svjetlosnom mikroskopu s ugrađenom kamerom (slika 33). Pomoću Pastuer pipete stavila se kapljica suspenzije uzorka na predmetno stakalce te se tako pripremljen preparat mikroskopirao pod ukupnim povećanjem od 100× i 400×.



Slika 33. Svjetlosni mikroskop s ugrađenom kamerom.

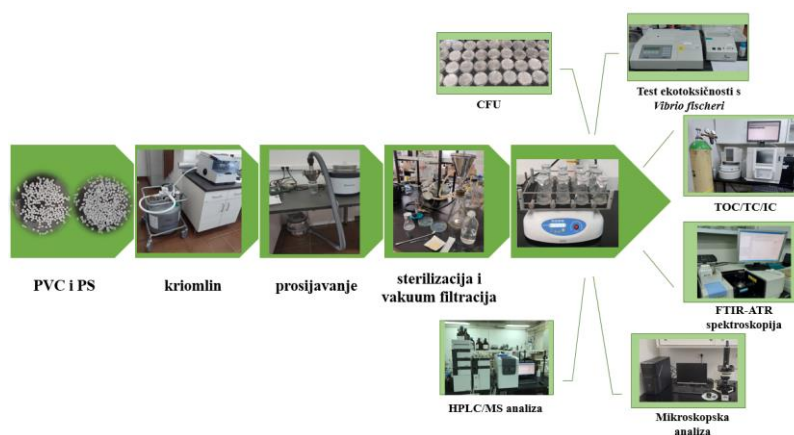
3.4. Priprema baždarnog dijagrama

Prije postavljanja pokusa za svaki kvasac bio je napravljen baždarni dijagram ovisnosti logaritamskog broja živih stanica kulture kvasca (logCFU) i optičke gustoće (OG).

U tu svrhu pripremila se gusta suspenzija kvasca, izmjerila se početna OG ($\lambda=600$ nm) i pripremila su se razrjeđenja za CFU. Zatim se početna suspenzija razrijedila više puta u cilju dobivanja različitih početnih OG-a. Za svaku dobivenu suspenziju izmjerila se OG i odredio se CFU (nakon 3 do 5 dana inkubacije), poglavlje 3.3.4.1.

3.5. Provedba eksperimenata: biorazgradnja MP-a kvascima izoliranim iz okoliša

U ovom radu provela su se dva eksperimenta, preliminarni pokus i glavni pokus, slika 34. Cilj preliminarnih pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascima, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis*, bio je da se na temelju provedenih analiza utvrdi koji kvasac je najučinkovitiji u biorazgradnji MP-a (tablica 7). Nakon odabira najboljeg kvasca (*Candida parapsilosis*) i MP-a (PVC), proveo se glavni pokus prema dizajnu punog faktorskog plana u svrhu određivanja optimalnih uvjeta biorazgradnje MP-PVC 30 dana (tablice 8 i 9). Dizajn eksperimenta provodio se prema dizajnu punog faktorskog plana koji daje kombinaciju čimbenika na određenim razinama (tablica 8). U ovom pokusu predviđena su 3 čimbenika – broj okretaja, pH-vrijednost, i optička gustoća, na 3 razine – minimalna, srednja i maksimalna vrijednost. Nakon unosa čimbenika i razina, prema programu se dobiva matrica (tablica 8) koja predstavlja broj pokusa i kombinaciju čimbenika na tri razine za svaki pokus. Ispitivale su se tri vrijednosti pH: 3, 5, 7, OG: 0,1; 0,5; 1,0 i broja okretaja; 120 o/min, 160 o/min, 200 o/min. Pokusi su se provodili tijekom 30 dana, a uzorci za analizu uzimali su se 0., 3., 7., 14., 21. i 30. danu.



Slika 34. Shematski prikaz provedbe pokusa biorazgradnje.

Preliminarni pokusi provodili su se na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min tijekom 30 dana u Erlenmayerovim tikvicama od 200 mL, radnog volumena $V_R=80$ mL. Prije postavljanja pokusa pripremljena je suspenzija kvasca (5 suspenzija za 5 kvasaca), opisana pod poglavljem 3.3.3.. Sastav tikvica pojedinog pokusa činili su: MM pH-vrijednosti 6, suspenzija kvasca OG vrijednosti koja je odgovarala vrijednosti CFU oko 10^6 , te MP – PS ili PVC veličine čestica 25-100 μm . **Glavni pokusi** provodili na rotacijskoj tresilici tijekom 30 dana u Erlenmayerovim tikvicama od 200 mL, radnog volumena $V_R=80$ mL pri 120 o/min, 160 o/min i 200 o/min. Na dan postavljanja pokusa pripremljena je suspenzija kvasca *Candida parapsilosis*, opisana u poglavlju 3.3.3.

Tablica 7. Početni uvjeti preliminarnog pokusa.

vrsta MP-a	PS i PVC			
veličina MP-a / μm	25 – 100			
kvasac	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
pH-vrijednost / -	5,96	5,98	5,88	6,02
$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	7,27	7,02	6,89	6,57
log CFU ₀ / -	7,38	7,17	6,76	5,90
OG ₀ / -	0,97	0,74	0,77	0,29
$T / ^\circ\text{C}$	28,30	27,91	28,58	27,93

Tablica 8. Početni uvjeti glavnog pokusa.

Eksperiment	1			2			3		
vrsta MP	PVC								
veličina MP-e / μm	25 – 100								
kvasac	<i>Candida parapsilosis</i>								
broj okretaja/ o/min	120			160			200		
pH-vrijednost / -	3	5	7	3	5	7	3	5	7
$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	6,67			7,76			7,90		
log CFU ₀ / -	6,89	7,20	7,56	6,66	7,21	7,60	6,68/	7,09	7,59
OG ₀ / -	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
$T / ^\circ\text{C}$	23,40			26,30			22,70		

Tablica 9. Raspis matrice prema dizajnu punog faktorskog plana (glavni pokus).

broj pokusa	broj okretaja/min	pH-vrijednost / -	OG / -
1-1	120	3	1
1-2	120	3	0,5
1-3	120	3	0,1
1-4	120	5	1
1-5	120	5	0,5
1-6	120	5	0,1
1-7	120	7	1
1-8	120	7	0,5
1-9	120	7	0,1
2-1	160	3	1
2-2	160	3	0,5
2-3	160	3	0,1
2-4	160	5	1
2-5	160	5	0,5
2-6	160	5	0,1
2-7	160	7	1
2-8	160	7	0,5
2-9	160	7	0,1
3-1	200	3	1
3-2	200	3	0,5
3-3	200	3	0,1
3-4	200	5	1
3-5	200	5	0,5
3-6	200	5	0,1
3-7	200	7	1
3-8	200	7	0,5
3-9	200	7	0,1

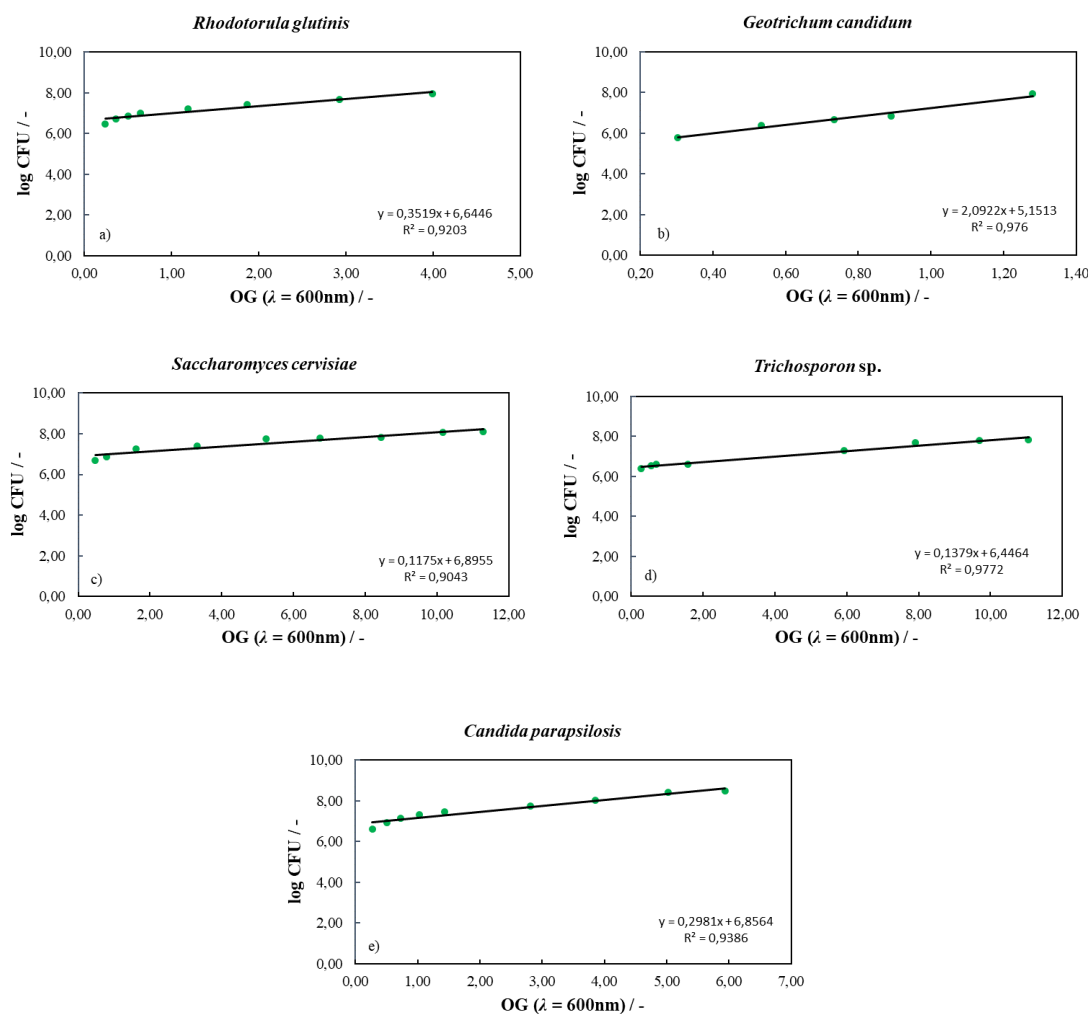
Postavljena su tri pokusa po 18 tikvica, točnije, za svaki pokus s određenim čimbenicima postavljen je jedan pokus s parametrima prikazanim u tablici 9. Ukupno se postavilo 54 tikvica.

Sastav tikvica pojedinog pokusa činili su: MM pH-vrijednosti 3, 5 i 7, suspenzija kvasca OG vrijednosti 0,1; 0,5 i 1,0 te PVC veličine čestica 25-100 μm . U preliminarnim i glavnim pokusima tijekom 30 dana izuzimali su se uzorci određenog volumena kako bi se pratio proces biorazgradnje, tako u 0. i 30. danu određivala se pH-vrijednost, temperatura i koncentracija otopljenog kisika, a u 0., 3., 7., 14., 21. i 30. danu OG, CFU, TOC analiza i HPLC/MS analiza. FTIR-ATR analiza i ekotoksičnost filtrata određena je na početku i kraju eksperimenta. Tijekom procesa pratile su i morfološke promjena kvasca primjenom svjetlosnog mikroskopa.

4. REZULTATI

4.1. Preliminarni pokus: Biorazgradnja PS-a i PVC-a kvascima izoliranim iz okoliša

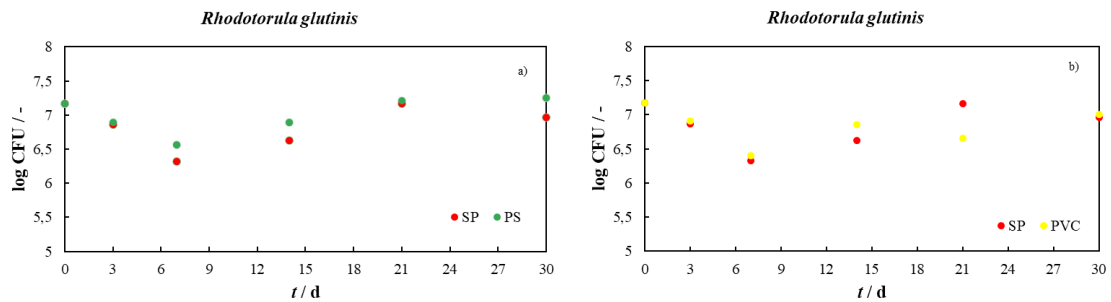
U ovom djelu dani su rezultati preliminarnih pokusa (slike 35. – 45.) biorazgradnje mikroplastičnih čestica, PS-a i PVC-a, kvascima izoliranim iz okoliša, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis*. Eksperiment je opisan u poglavlju 3.5. Prije početka samog eksperimenta uzgojeni su kvasci *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis*, za koje je bilo potrebno napraviti baždarne dijagrame (slika 35), poglavlje 3.4.



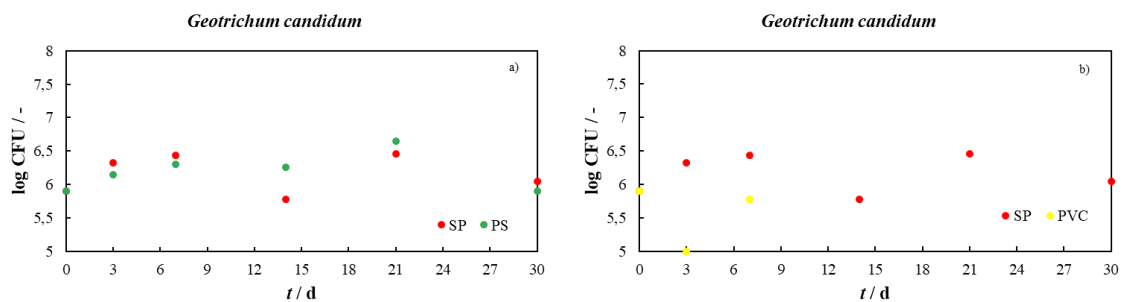
Slika 35. Dobiveni baždarni dijagrami za kvasce a) *Rhodotorula glutinis*, b) *Geotrichum candidum*, c) *Saccharomyces cerevisiae*, d) *Trichosporon* sp. i e) *Candida parapsilosis*.

4.1.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascima izoliranim iz okoliša

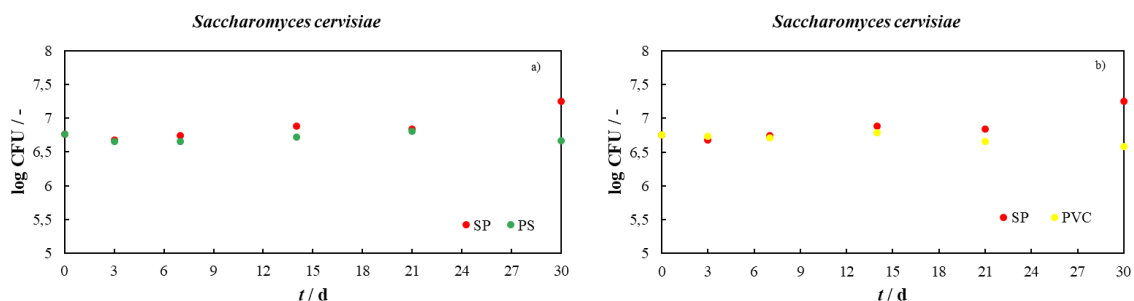
Tijekom 30 dana praćena je promjena živih stanica kvasaca u uzorcima s MP-om i bez MP-a (SP), analiza je opisana u poglavlju 3.3.4.1., a rezultati su dani u slikama 36. – 40.



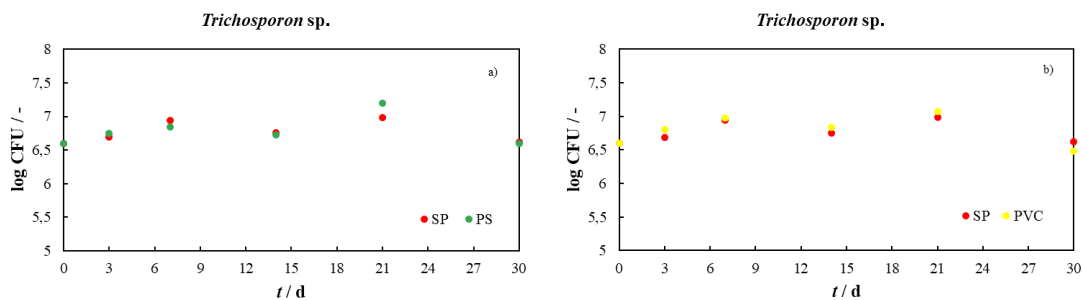
Slika 36. Promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Rhodotorula glutinis* za uzorak PS pod a) i PVC pod b) za veličinu čestica 25 – 100 μm i za kontrolu tijekom 30 dana.



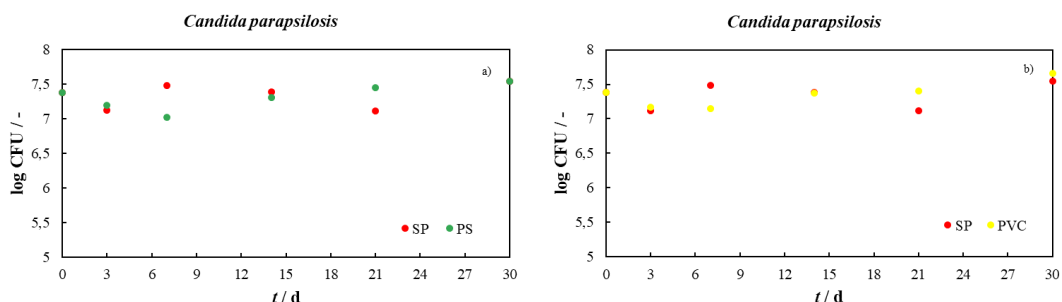
Slika 37. Promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Geotrichum candidum* za uzorak PS pod a) i PVC pod b) za veličinu čestica 25 – 100 μm i za kontrolu tijekom 30 dana.



Slika 38. Promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* za uzorak PS pod a) i PVC pod b) za veličinu čestica 25 – 100 μm i za kontrolu tijekom 30 dana.



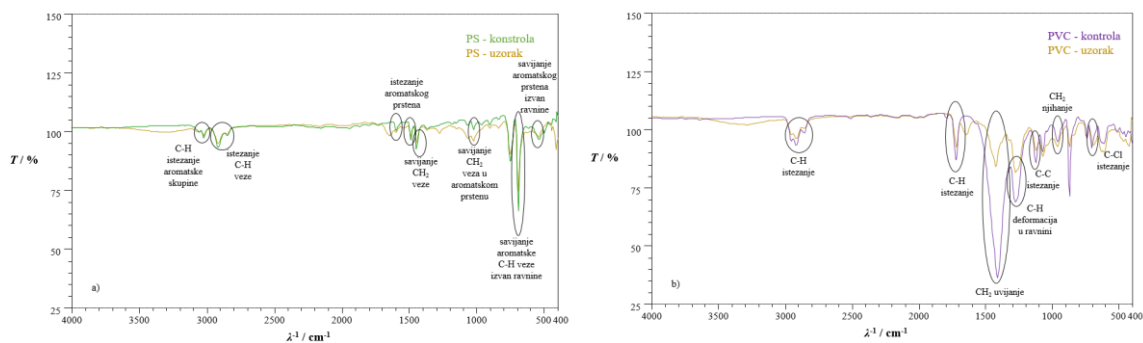
Slika 39. Promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Trichosporon* sp. za uzorak PS pod a) i PVC pod b) za veličinu čestica 25 – 100 μm i za kontrolu tijekom 30 dana.



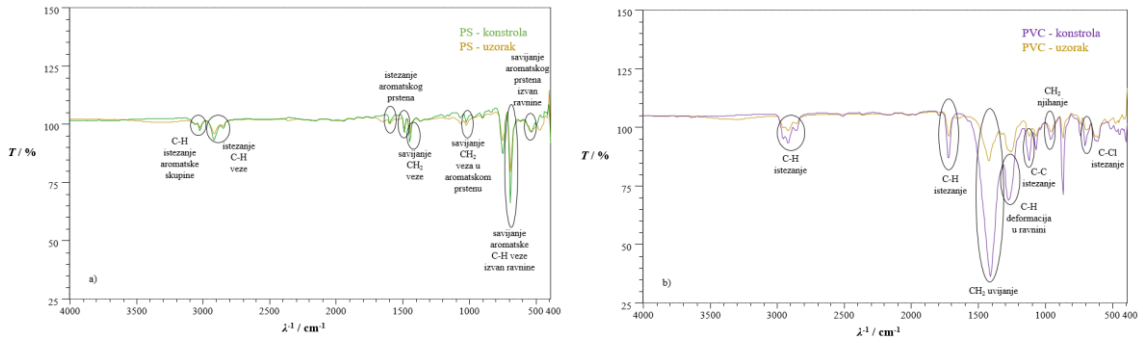
Slika 40. Promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Candida parapsilosis* za uzorak PS pod a) i PVC pod b) za veličinu čestica 25 – 100 μm i za kontrolu tijekom 30 dana.

4.1.2. FTIR-ATR analiza mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a

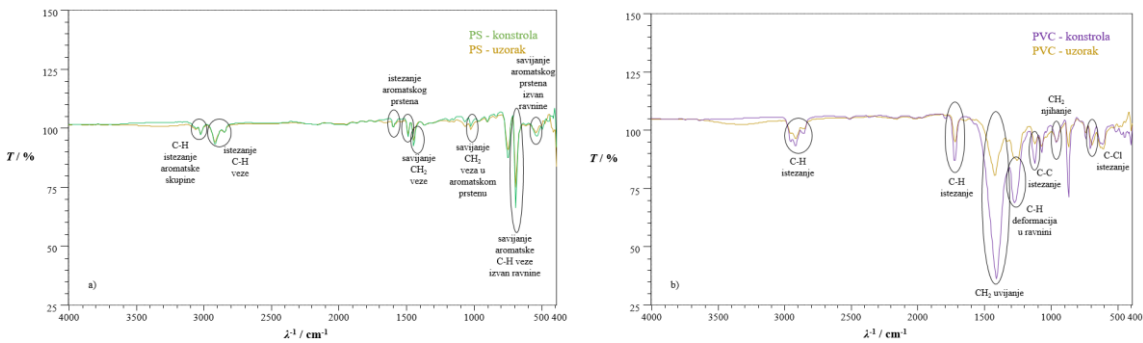
U slikama 41. do 45. dani su FTIR spektri za PS i PVC u 0 danu i nakon 30 dana. Postupak analize opisan je u poglavlju 3.3.4.4.



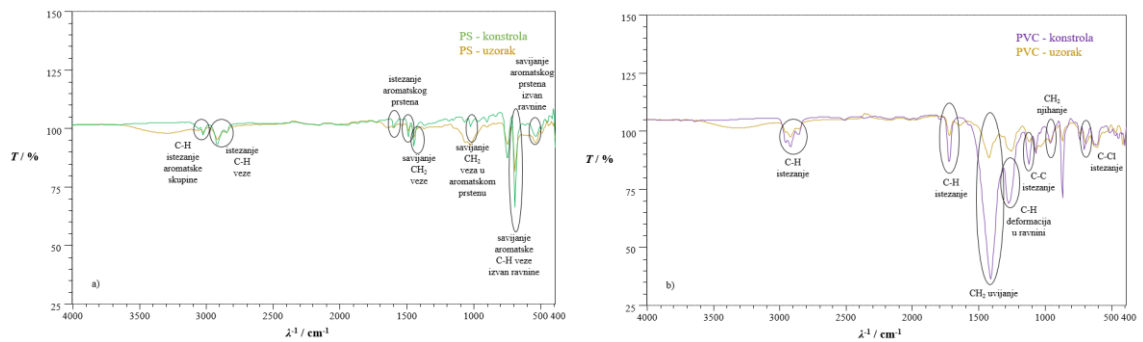
Slika 41. FTIR spektar snimljen za pod a) PS i b) PVC primjenom kvasca *Rhodotorula glutinis* u usporedbi s početnim PS-om i PVC-om nakon 30. dana.



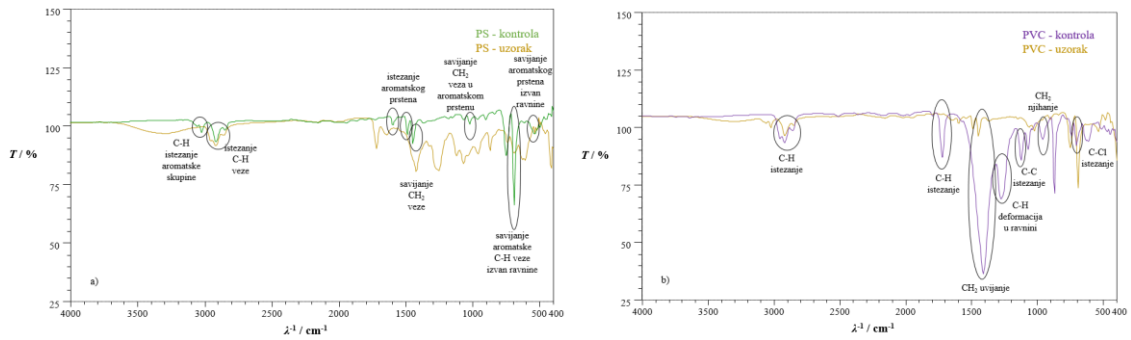
Slika 42. FTIR spektar snimljen za pod a) PS i b) PVC primjenom kvasca *Geotrichum candidum* u usporedbi s početnim PS-om i PVC-om nakon 30. dana.



Slika 43. FTIR spektar snimljen za pod a) PS i b) PVC primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u usporedbi s početnim PS-om i PVC-om nakon 30. dana.



Slika 44. FTIR spektar snimljen za pod a) PS i b) PVC primjenom kvasca *Trichosporon* sp. u usporedbi s početnim PS-om i PVC-om nakon 30. dana.



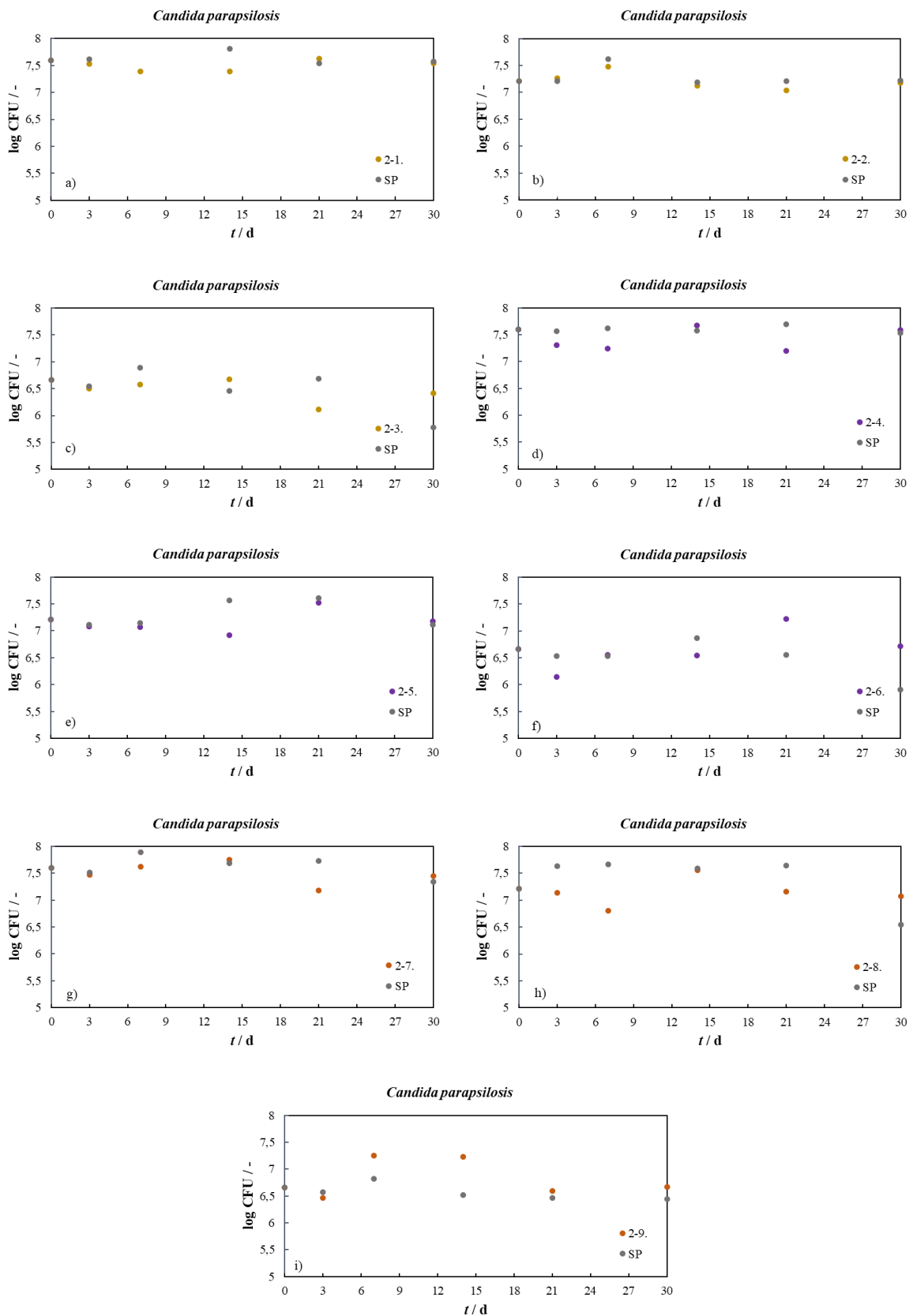
Slika 45. FTIR spektar snimljen za pod a) PS i b) PVC primjenom kvasca *Candida parapsilosis* u usporedbi s početnim PS-om i PVC-om nakon 30. dana.

4.2. Glavni pokus: Određivanje optimalnih uvjeta za biorazgradnju PVC-a kvascem *Candida parapsilosis*

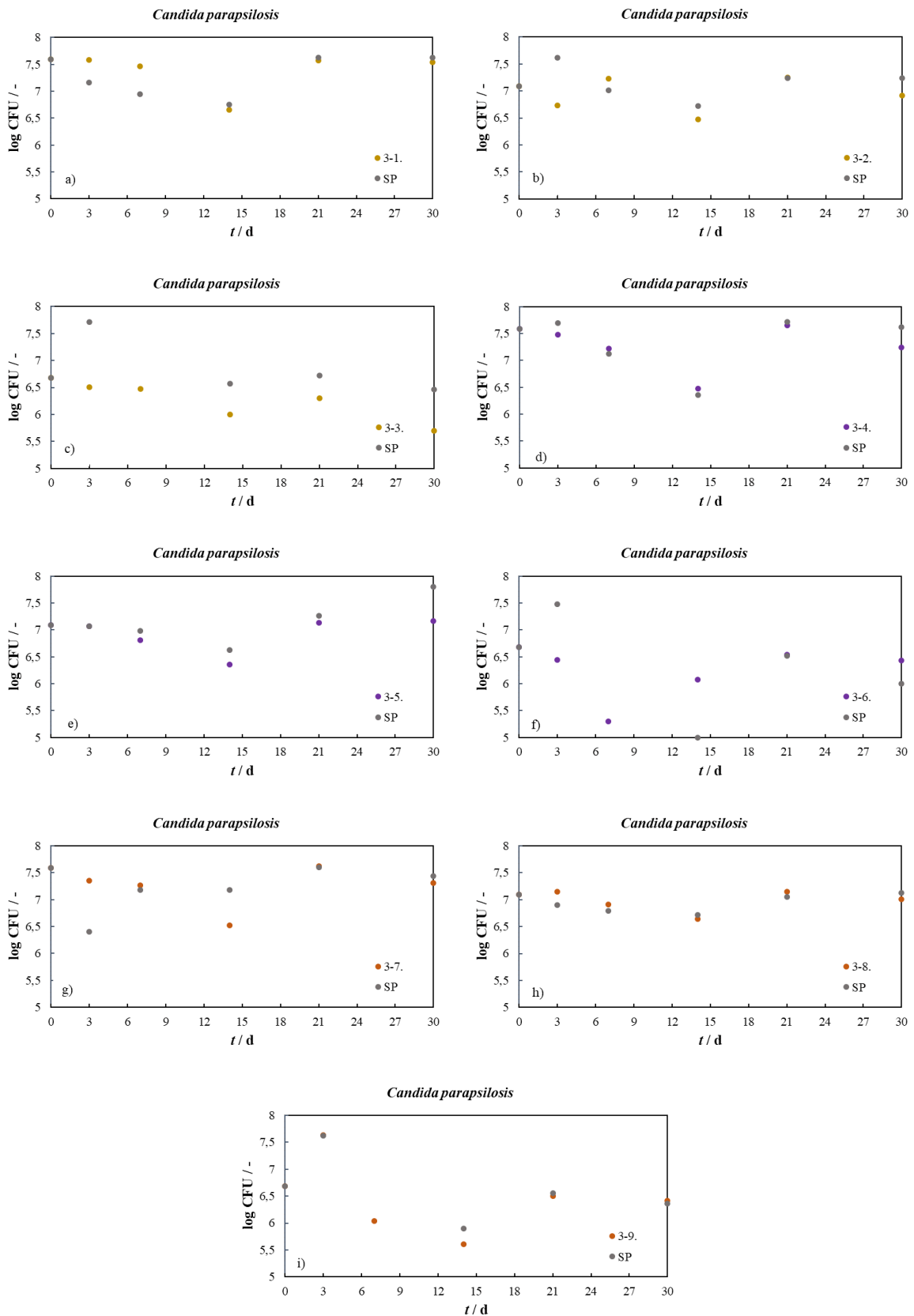
U ovom djelu dani su rezultati glavnog pokusa (slike 46. – 54., tablice 9. - 11.) biorazgradnje mikroplastičnih čestica PVC-a kvascem izoliranim iz okoliša, *Candida parapsilosis*. Eksperiment je opisan u poglavlju 3.5.

4.2.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje PVC-a *Candidom parapsilosis*

Tijekom 30 dana praćena je promjena živih stanica kvasca *Candidom parapsilosis* u uzorcima s PVC-om i bez PVC-a (SP), analiza je opisana u poglavlju 3.3.4.1., a rezultati su dani u slikama 46. – 48.



Slika 47. Promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Candida parapsilosis* za pokus 2 za veličinu čestica 25 – 100 μm i za kontrolu tijekom 30 dana.



Slika 48. Promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Candida parapsilosis* za pokus 3 za veličinu čestica 25 – 100 μm i za kontrolu tijekom 30 dana.

4.2.2. TOC analiza filtrata

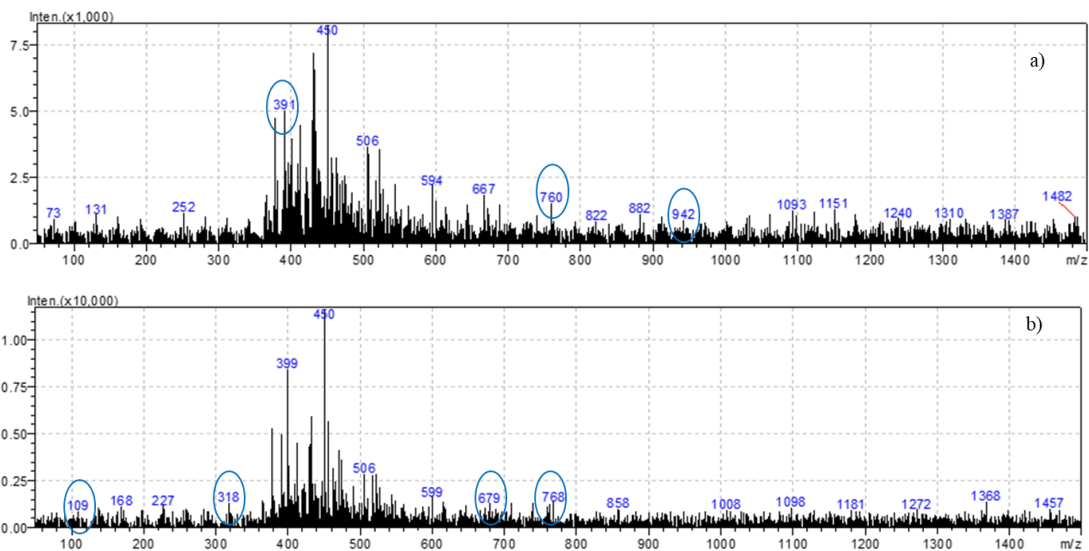
U tablici 10. dani su rezultati promjene TOC-a, TC-a i TIC-a tijekom 30 dana procesa. Postupak analize opisan je u poglavlju 3.3.4.2.

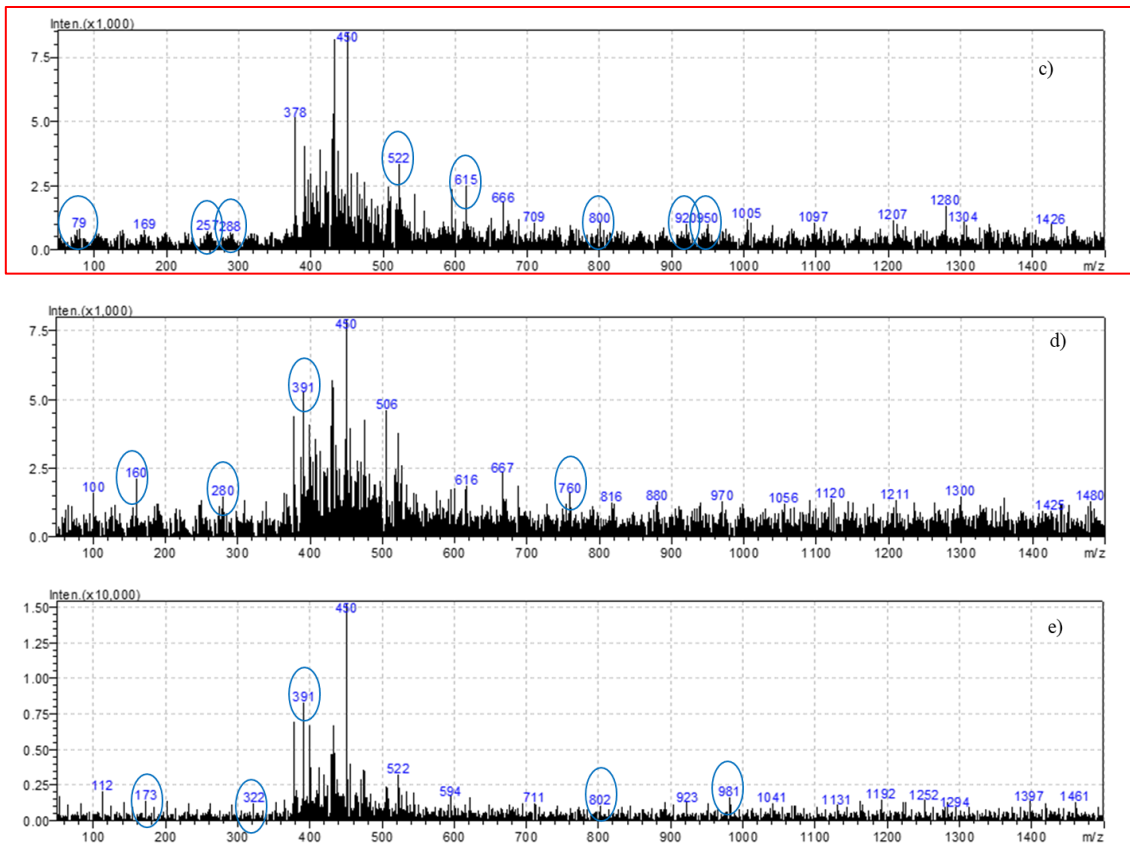
Tablica 10. Promjena vrijednosti TOC-a, TC-a i TIC-a tijekom procesa biorazgradnje PVC-a primjenom kvasca *Candida parapsilosis* za pokus C4 tijekom 30 dana.

t / d	γ (TOC) /mg/L	γ (TOC-SP) /mg/L	γ (TC) /mg/L	γ (TC-SP) /mg/L	γ (TIC) /mg/L	γ (TIC-SP) /mg/L
0	7,84	7,84	8,67	8,67	0,83	0,83
3	4,48	6,79	6,61	7,81	2,13	1,02
7	4,37	4,39	4,84	4,63	0,47	0,24
14	4,58	4,24	6,74	5,41	2,16	1,17
21	8,28	5,54	9,28	9,10	1,00	3,56
30	9,23	2,02	10,58	3,79	1,35	1,77

4.2.3. HPLC/MS analiza filtrata

U slici 49. dan je maseni spektrometar za 3., 7., 14., 21. i 30. dane procesa biorazgradnje u pokusu 1-4. Postupak analize opisan je u poglavlju 3.3.4.3.

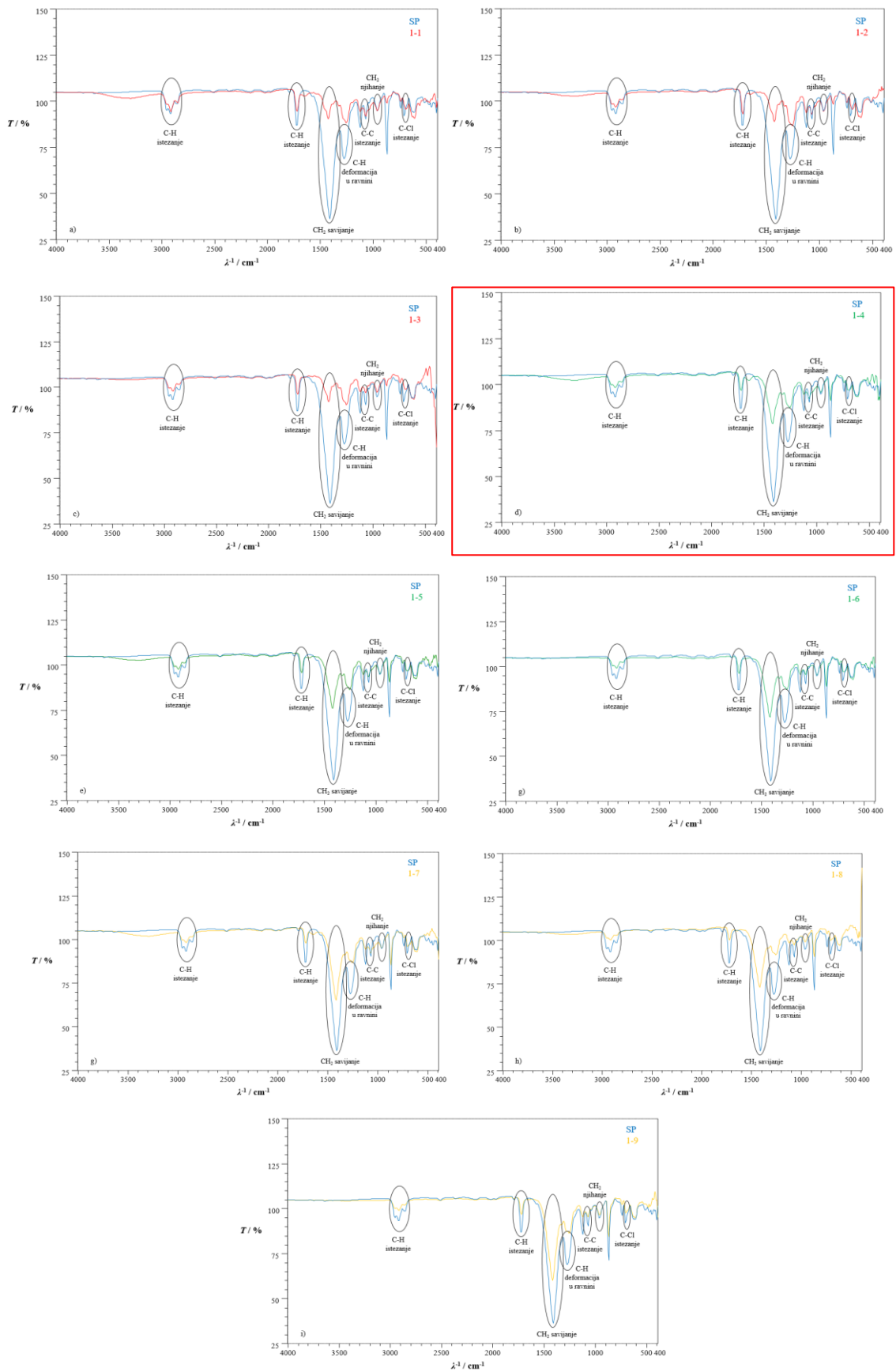




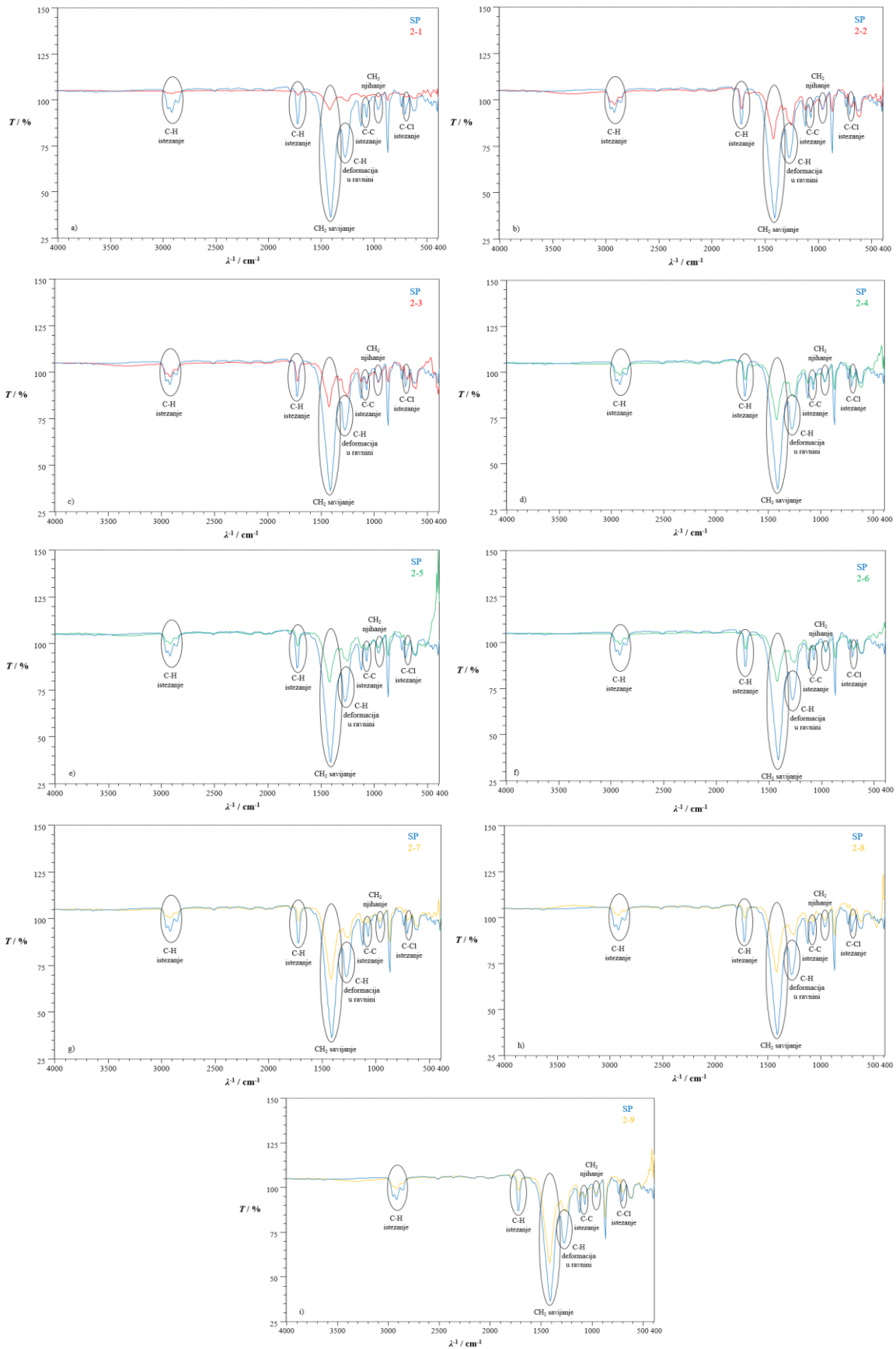
Slika 49. Maseni spektrometar za proces biorazgradnje PVC-a primjenom kvasca *Candida parapsilosis* za pod a) 3. dan, b) 7. dan, c) 14. dan, d) 21. dan i e) 30. dan.

4.2.4. FTIR-ATR analiza PVC-a

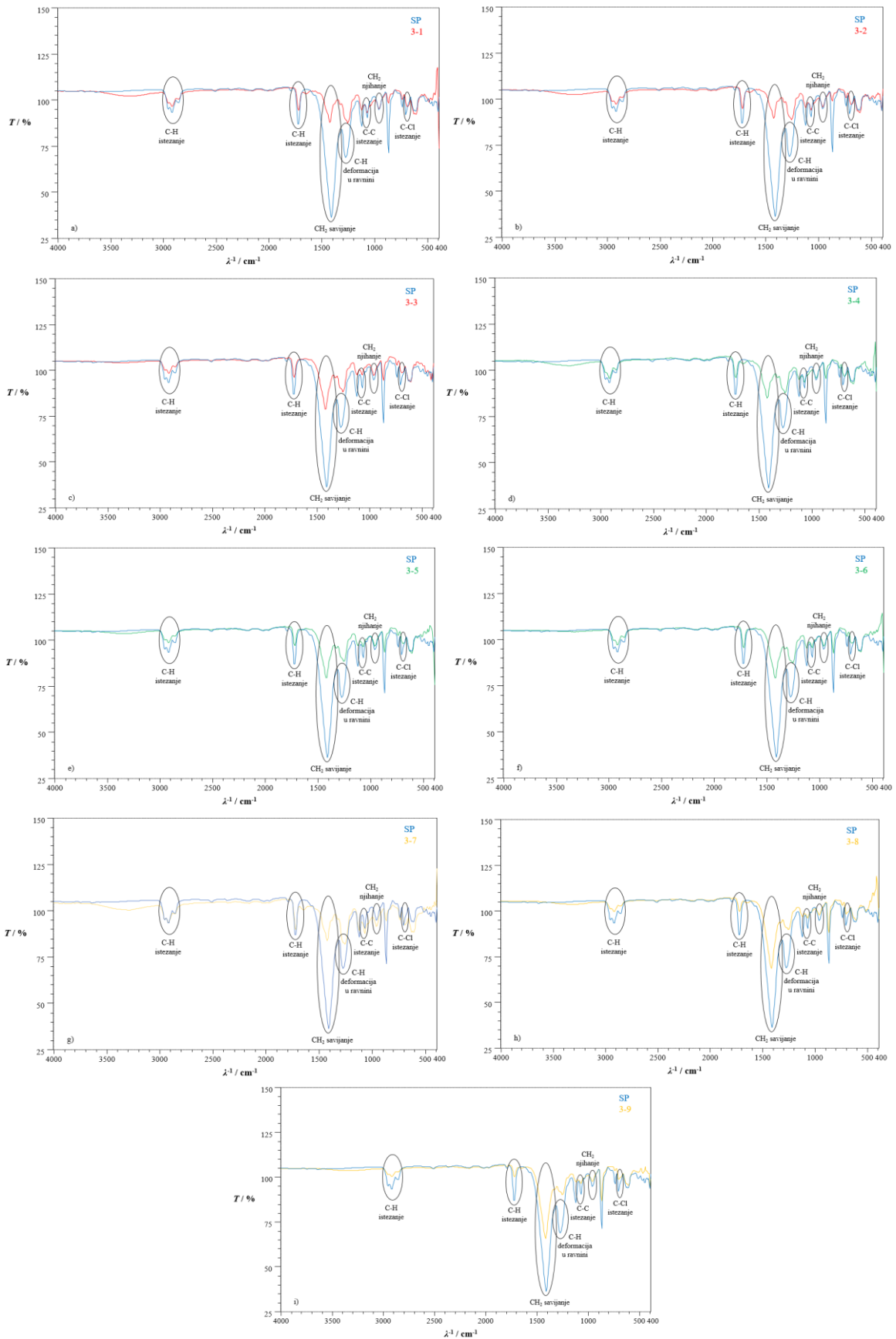
U slikama 50. do 52. dani su FTIR spektri za PVC u 0 danu i nakon 30 dana. Postupak analize opisan je u poglavlju 3.3.4.4.



Slika 50. FTIR spektar snimljen za **pokus 1** primjenom kvasca *Candida parapsilosis* u usporedbi s kontrolom nakon 30. dana.



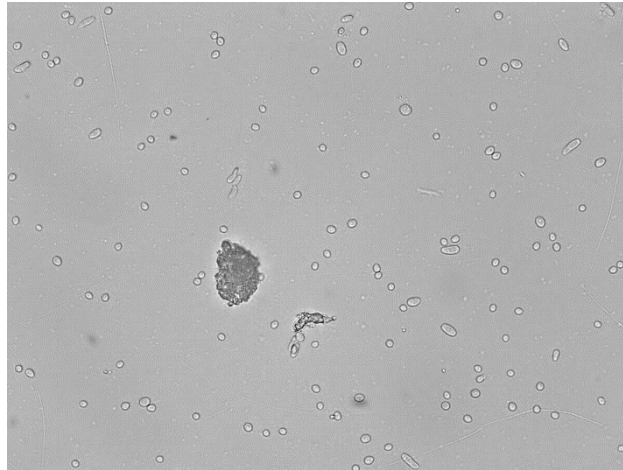
Slika 51. FTIR spektar snimljen za **pokus 2** primjenom kvasca *Candida parapsilosis* u usporedbi s kontrolom nakon 30. dana.



Slika 52. FTIR spektar snimljen za **pokus 3** primjenom kvasca *Candida parapsilosis* u usporedbi s kontrolom nakon 30. dana.

4.2.5. Mikroskopska analiza kvasca *Candidom parapsilosis*

U slici 53. dana je mikrofotografija *Candide parapsilosis* tijekom procesa biorazgradnje PVC-a u pokusu 1-4 nakon 30. dana. Postupak analize opisan je u poglavlju 3.3.4.6.



Slika 53. Mikrofotografija snimljena svjetlosnim mikroskopom s ugrađenom kamerom pri P=400× za pokus 1-4 u 30. danu.

4.2.6. Test ekotoksičnosti filtrata bakterijom *Vibrio fischeri*

U tablici 11. dani su rezultati ekotoksičnosti filtrata na kraju procesa biorazgradnje za Pokus 1, Pokus 2 i Pokus 3. Postupak analize opisan je u poglavlju 3.3.4.5.

Tablica 11. Ekotoksičnost filtrata nakon biorazgradnje PVC-a primjenom kvasaca *Candida parapsilosis*.

POKUS	EC ₂₀ / %	EC ₅₀ / %
1-1	3,80	,446
1-2	3,45	5,91
1-3	16,98	25,92
1-4	21,27	46,29
1-5	12,51	39,71
1-6	9,11	22,09
1-7	-	-
1-8	48,34	10,58
1-9	27,80	12,66
2-1	6,25	21,76
2-2	15,51	29,23
2-3	8,33	27,96
2-4	-	21,33
2-5	4,81	13,80
2-6	25,43	51,44
2-7	25,87	-
2-8	37,04	-
2-9	31,16	-
3-1	20,34	40,54
3-2	18,18	25,74
3-3	-	16,72
3-4	17,24	-
3-5	0,34	10,57
3-6	16,05	40,76
3-7	7,04	-
3-8	-	-
3-9	32,26	-

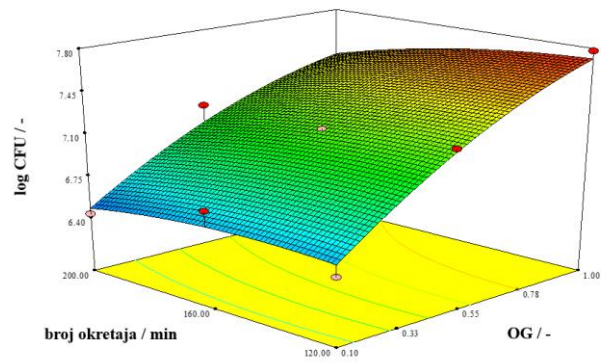
- vrijednosti se nisu mogle očitati.

4.2.7. Rezultati statističke analize varijance (ANOVA)

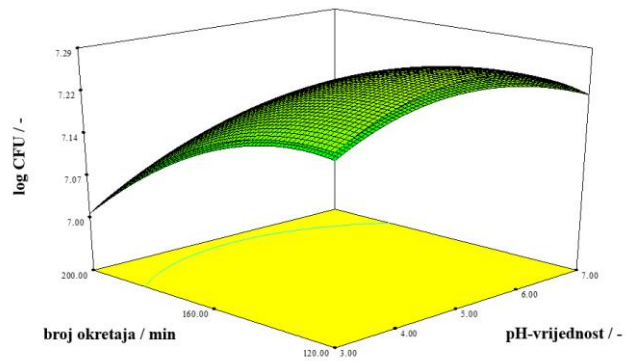
U tablici 12. prikazani su rezultati obrade u programskom paketu *Design Expert* modulom ANOVA, a u slici 54. 3D prikaz odzivne površine u međuovisnosti čimbenika.

Tablica 12. Eksperimentalne vrijednosti parametara analize varijance (ANOVA) za biorazgradnju PVC-a kvascem *Candida parapsilosis*.

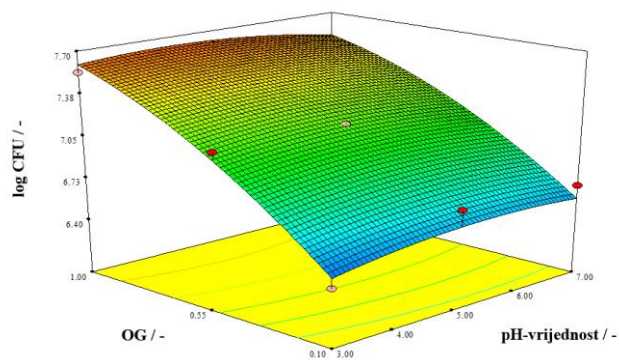
	Zbroj kvadrata	df	Srednji kvadrat	F-vrijednost	p-vrijednost Vjv.> F
Model	5,08	9	0,56	46,67	<0,0001
A-broj okretaja / min	0,19	1	0,19	16,09	0,0009
B-OG / -	4,76	1	4,76	393,61	<0,0001
C-pH-vrijednost / -	$1,836 \times 10^{-5}$	1	$1,836 \times 10^{-5}$	$1,517 \times 10^{-3}$	0,9694
AB	0,032	1	0,032	2,63	0,1233
AC	$3,333 \times 10^{-5}$	1	$3,333 \times 10^{-5}$	$2,754 \times 10^{-3}$	0,9588
BC	0,022	1	0,022	1,78	0,1996
A²	0,023	1	0,023	1,92	0,1838
B²	0,095	1	0,095	7,84	0,0123
C²	0,027	1	0,027	2,24	0,1528
Ostatak	0,21	17	0,012	/	/
Ukupno	5,29	26	/	/	/



a)



b)



c)

Slika 54. 3D prikaz odzivne površine u međuovisnosti čimbenika: AB (broj okretaja i OG) (a), AC (broj okretaja i pH-vrijednosti) (b) i BC (OG i pH-vrijednost) (c).

5. RASPRAVA

Godišnja proizvodnja plastike premašila je 300 tona, stoga je jasno kako je ovaj materijal sveprisutan i neizbježan kako u industriji, tako i u svakodnevnom životu.⁸⁸ Prošlo stoljeće naziva se “erom plastike” (engl. *plastic age*) zbog ogromnog rasta proizvodnje, konzumacije, a posljedično i nastanka otpada od plastike. Nakon što izgubi svoju funkciju, plastika namjerno ili slučajno završava većinskim dijelom u okolišu. Pod utjecajem različitih okolišnih čimbenika, fragmentira do manjih veličina, do MP-e i kao takva je prijatnija okolišu.⁸⁹ MP-e čestice su materijali koji se akumuliraju u okolišu, u rijekama i oceanima, tlu, u svim oblicima. Potrebno je pronaći nove načine sprječavanja nastanka i smanjenja MP-a u okolišu. Danas je sve veći broj istraživanja upravo na postupcima uklanjanja MP-a iz okoliša. Jedan od postupaka je i biorazgradnja pomoću mikroorganizama iz okoliša, koja se ističe kao ekonomski isplativa i ekološki povoljna. U tu svrhu izoliraju se i identificiraju, a u novije vrijeme i modificiraju, različiti mikroorganizmi iz okoliša koji su sposobni za korištenje sintetičkih polimera.^{28,90}

U ovom radu proveli su se preliminarni eksperimenti biorazgradnje mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a primjenom pet kvasaca, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis* i *Trichosporon* sp., te se odabrao najučinkovitiji, *Candida parapsilosis*, s kojim su se ispitali optimalni uvjeti biorazgradnje PVC-a. Tijekom 30 dana pokusa u određenim danima, 0., 3., 7., 14., 21. i 30. dan, izuzimali su se uzorci i provodile su se sljedeće analize: CFU, TOC analiza, HPLC/MS analiza, FTIR-ATR spektroskopija, toksičnost filtrata te se promatrala morfologija stanica. Statističkom obradom u programu *Desgin Export* prema punom faktorskom planu određeni su optimalni uvjeti biorazgradnje PVC-a.

5.1. Preliminarni pokus: analiza biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascima izoliranim iz okoliša

U preliminarnom pokusu biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascima, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis*, izoliranim iz okoliša pratila se biorazgradnja preko CFU vrijednosti, FTIR-ATR analizom, TOC analizom i HPLC/MS analizom. Određivala se i toksičnost filtrata po završetku eksperimenta, odnosno test ekotoksičnosti s *Vibrio fischeri* u svrhu utvrđivanja potencijalne toksičnosti. Na početku i na kraju pokusa pratila se promjena pH – vrijednosti, promjena

koncentracije otopljenog kisika te morfološke promjene kvasaca. Tijekom pokusa nisu zabilježene promjene boje i oblika stanica kvasaca. pH – vrijednosti i koncentracija kisika se također nisu značajno mijenjale tijekom pokusa biorazgradnje. Na slici 35 prikazan je baždarni dijagram ovisnosti logaritamskog broja živih stanica kulture kvasaca (log CFU) o optičkoj gustoći (OG). Za kvasce *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis* R² iznosio je 0,9203, 0,9760, 0,9043, 0,9772 odnosno 0,9386 te se može zaključiti da dobiveni baždarni dijagrami pokazuju dobro slaganje ova dva pokazatelja. Dobiveni baždarni dijagrama služio je za postavljanje preliminarnog i glavnog pokusa, odnosno početni CFU se određivao prema dobivenom baždarnom dijagramu.

5.1.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascima izoliranim iz okoliša

CFU vrijednost u ovom radu služila je kao jedan od pokazatelja za praćenje tijeka biorazgradnje PS-a i PVC-a pomoću kvasaca *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis* tijekom 30. dana trajanja eksperimenta. Na slikama 36-40 prikazana je promjena CFU vrijednosti tijekom 30 dana za PS (a) i PVC (b) za svih pet kvasaca. Kod *R. glutinis* (slika 30) najveći broj izraslih kolonija prilikom biorazgradnje PS-a postignut je u 30. danu u vrijednosti od $1,78 \times 10^7$ st/mL, dok kod PVC-a nije postignut značajan broj izraslih kolonija od početnog (nultog) dana. Broj kolonija u 0. danu za pokus biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascem *R. glutinis* iznosio je $1,47 \times 10^7$ st/mL. Prema grafu je vidljivo da je od 0. do 7 dana kvasac *R. glutinis* u fazi prilagodbe na novonastale uvjete (lag faza), te od 7. dana počinje porast broja stanica kvasaca. Kod PS-a je vidljiv veći broj izraslih stanica nego u kontrolnom pokusu bez mikroplastičnih čestica, dok kod PVC-a CFU je približno jednak CFU-u u kontroli.. Veći broj izraslih stanica je logičan slijed u pokusima s mikroplastičnim česticama jer kvasac *R. glutinis* koristi MP-e kao izvor hrane i energije.⁴⁹ Na slici 36 pod a) kod biorazgradnje PS-a vidimo da vrijednosti broja izraslih stanica kvasaca od 21. dana se ne mijenjaju, pa se može pretpostaviti da stanice kvasca *R. glutinis* uspostavljaju stacionarno stanje. Stacionarna faza rasta je faza kada rast prestaje, ali stanice ostaju metabolički aktivne. Tijekom ove faze događa se nekoliko fizičkih i molekularnih promjena.⁹¹ Kod kvasca *R. glutinis* vidimo očekivani rast kvasaca, prvo kreće faza prilagodbe (lag faza) jer se stanice kvasca prilagođavaju na novu okolinu (u MM) i počinju kondicionirati medij svojim vlastitim metabolitima. Nakon lag faze kreće log faza, nakon koje se broj stanica

kvasaca eksponencijalno povećava. Zatim kreće stacionarna faza kada su stanice kvasca iscrpile sve hranjive tvari iz MM i njihov rast se usporava. Stanice kvasca mogu preživjeti u stacionarnoj fazi dulje vrijeme, nastavljajući rast tek kada su uvjeti povoljni.⁹² Uspoređujući PS i PVC, vidimo (slika 36) da kod PVC-a se prati isti trend rasta kao i kod PS-a. No međutim, kod PVC-a u 30. dana ne dolazi do porasta broja izraslih stanica. Prema navedenim podacima vidimo da je u ovom slučaju došlo do minimalnog iskorištavanja PS-a i PVC-a kao supstrata. Na **slici 37** prikazana je promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Geotrichum candidum* za uzorak PS pod a) i PVC pod b) za veličinu čestica 25 – 100 µm i za kontrolu tijekom 30 dana. Kod *G. candidum* najveći broj izraslih kolonija prilikom biorazgradnje PS-a postignut je u 21. danu u vrijednosti od $4,40 \times 10^6$ st/mL, dok kod PVC-a nije postignut veći broj izraslih kolonija od početnog (nultog) dana, odnosno od 14 dana nije dolazilo do rasta kolonija kvasaca. Broj kolonija u 0. danu za pokus biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascem *G. candidum* iznosio je $8,00 \times 10^5$ st/mL. Za razliku od *R. glutinis*, kod *G. candidum* vidljiv je eksponencijalni rast stanica kvasaca kod PS-a od 0. dana sve do 21. dana, vrijednosti su iznosile redom od 3. dana do 21. dana $1,40 \times 10^6$ st/mL, $2,00 \times 10^6$ st/mL, $1,80 \times 10^6$ st/mL, $4,40 \times 10^6$ st/mL, zatim u 30. danu je vidljiv pad broja izraslih stanica, vrijednost CFU je iznosila $8,00 \times 10^5$ st/mL. To nam govori da su do 21. dana kvasci *G. candidum* iskoristili sve hranjive tvari za rast, odnosno da PS potiče rast kvasca do 21. dana. Iako, i kod PS-a i PVC-a broj izraslih kolonija kvasca nije veći od SP, osim u 14. i 21. danu kod PS-a. Pokus u kojoj se nalazio PVC s MM i kvascem *G. candidum* se obezbojila te su uočeni peleti. Peleti su micelijski agregati koji nastaju iz spora. Razlikuju se po obliku od sfernog do elipsoidnog, mogu imati glatku ili hrapavu površinu, a agregati mogu biti pahuljasti ili kompaktni te smanjuju difuziju supstrata iz okolnog medija u pelet.⁹³ Tijekom pokusa, kuglice micelija su se povećavale, a prema literaturi središte peleta postaje progresivno manjkavo s hranjivim tvarima i kisikom, te unutar toga se odvijaju anaerobni uvjeti. Kod *G. candidum* je poznato da stvara veliku micelijsku masu – pelete.⁹⁴ Na **slici 38** prikazana je promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* za uzorak PS pod a) i PVC pod b) za veličinu čestica 25 – 100 µm i za kontrolu tijekom 30 dana. Možemo uočiti da kod kvasca *S. cerevisiae* ne dolazi do značajnih promjena u rastu kolonija kvasaca, već osciliraju, što znači da je došlo do minimalnog iskorištavanja PS-a i PVC-a kao supstrata. Broj izraslih kolonija u pokusu s PS-om i PVC-om ne premašuje broj izraslih kolonija u SP. Najveći broj izraslih kolonija prilikom biorazgradnje PS-a postignut je u 21. danu u vrijednosti od $6,40 \times 10^6$ st/mL, dok kod PVC-a je postignut u 14. danu u vrijednosti od $6,10 \times 10^6$ st/mL. Zatim kod PS-a dolazi do pada log CFU od 21.

dana, a kod PVC-a od 14. dana. Broj kolonija u 0. danu za pokus biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascem *S. cerevisiae* iznosio je $5,70 \times 10^6$ st/mL. Prema dobivenim podacima kvasac *S. cerevisiae* se nalazi u stacionarnoj fazi u pokusu sa PS i PVC, odnosno kvasac je otporan na okolišne uvjete u kojima se nalazi. No, moguće je da se kvasac nalazi samo u stanju mirovanja zbog nedostatka ugljika.⁹⁵ Na **slici 39** prikazana je promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Trichosporon* sp. za uzorak PS pod a) i PVC pod b) za veličinu čestica 25 – 100 μm i za kontrolu tijekom 30 dana. Uočavamo da rast kvasca *Trichosporon* sp. kod PS-a i PVC-a ima jednak trend. Prvo dolazi do rasta broja kolonija do 7. dana, zatim slijedi nagli pad do 14. dana, zatim opet porast do 21. dana i u 30. danu pada broj izraslih kolonija kvasaca. Rast od 0. do 7. dana u ovom pokusu upućuje da je proces preduzgoja uspješno proveden te da kvascu *Trichosporon* sp. nije bilo potrebno vrijeme prilagodbe na novonastale uvjete. Broj kolonija u 0. danu za pokus biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascem *Trichosporon* sp. iznosio je $4,00 \times 10^6$ st/mL. Kod kvasca *Trichosporon* sp. najveći broj izraslih kolonija prilikom biorazgradnje PS-a postignut je u 7. danu u vrijednosti od $7,00 \times 10^6$ st/mL, dok kod PVC-a je postignut u 21. danu u vrijednosti od $1,17 \times 10^7$ st/mL. Usporedbom pokusa koji je predstavljao SP i pokusa s PS-om i PVC, uočena je neznatna razlika u broju izraslih kolonija. Odnosno, kvasac *Trichosporon* sp. ne iskorištava PS i PVC kao supstrate. Na **slici 40** prikazana je promjena logaritamskog broja živih stanica kvasca *Candida parapsilosis* za uzorak PS pod a) i PVC pod b) za veličinu čestica 25 – 100 μm i za kontrolu tijekom 30 dana. Odmah uočavamo sličnost *C. parapsilosis* s *R. glutinis*, odnosno do 7. dana kvasac *C. parapsilosis* je u fazi prilagodbe, kada mu se smanjuje broj izraslih kolonija kvasca, a nakon 7. dana broj izraslih stanica eksponencijalno raste do 30. dana, što ukazuje da PS i PVC potiču rast kvasca *C. parapsilosis*. Broj kolonija u 0. danu za pokus biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascem *C. parapsilosis* iznosio je $2,39 \times 10^7$ st/mL. U 30. danu, ujedno i najveći broj izraslih kolonija kvasca *C. parapsilosis* prilikom biorazgradnje PS-a u vrijednosti od $3,50 \times 10^7$ st/mL, dok kod PVC-a je u vrijednosti od $4,60 \times 10^7$ st/mL. Kod oba dvije vrste MP-a, broj izraslih kolonija u pokusima s MP-om je bio veći od SP, osim u 7. danu. Uspoređujući PS i PVC, vidimo da je veći broj izraslih stanica kvasca u 3. danu bio kod PS u iznosu od $1,56 \times 10^7$ st/mL kod, u 7. danu $1,40 \times 10^7$ st/mL kod PVC, zatim se taj trend za PVC ponavlja do 30 dana u vrijednostima $2,38 \times 10^7$ st/mL u 14. danu, zatim $2,55 \times 10^7$ st/mL u 21. danu te $4,60 \times 10^7$ st/mL u 30. danu što je ujedno i najveći broj izraslih stanica kvasca *C. parapsilosis*. U 21. danu je biorazgradnja PVC-a u pokusu s kvascem *C. parapsilosis* najintenzivnija. To je rezultat najveće razlike u CFU vrijednosti dobivene prilikom biorazgradnje PVC-a i SP-a. Ta razlika ukazuje na to da je PVC iskorišten kao supstrat

za rast i razmnožavanje te se može pretpostaviti da je započela biorazgradnja. Broj kolonija kultura kvasaca se u odnosu na početni broj kolonija tijekom 30 dana povećao se samo u provedenom pokusu biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascem *C. parapsilosis* što nam potvrđuje da je taj kvasac najbolje biorazgradio obe dvije vrste MP-a. Kvasac, *C. parapsilosis*, koristi PS i PVC kao izvor ugljika i energije, a ne samo hranjive tvari iz MM. Usporedbom log CFU vrijednosti za pokuse biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascima *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis*, utvrđeno je da je biorazgradnja PS-a intenzivnija u odnosu na biorazgradnju PVC-a, osim u slučaju s kvascem *C. parapsilosis* gdje je daleko najintenzivnija kod PVC-a.

5.1.2. FTIR-ATR spektroskopska analiza mikroplastičnih čestica PS-a i PVC-a

FTIR-ATR analiza materijala provedena je neposredno prije provedbe pokusa biorazgradnje PS-a i PVC-a kvascima *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis* kako bi pokazalo da se radi o PS-u odnosno PVC-u. Spektri PS-a i PVC-a prikazani su na slikama 41-45. te su označeni kao PS (zelena boja) i PVC (ljubičasta boja). Ova analiza provedena je i na kraju pokusa biorazgradnje PS-a odnosno PVC-a u svrhu utvrđivanja potencijalno nastalih promjena u funkcionalnim skupinama koje karakteriziraju kemijsku strukturu ovih polimera. FTIR-ATR analiza provedena je prema opisu navedenom u podpoglavlju 3.3.4.3.. Prema literaturi⁹⁶ u tablici 13 prikazani su karakteristični pikovi za PS i PVC. Prema dobivenim pikovima, za PS i PVC potvrđeni su svi pikovi koji karakteriziraju kemijsku strukturu. Nakon provedene analize utvrđeno da je većina pikova karakterističnih za PS i PVC i dalje prisutna. Međutim, intenzitet pojedinih pikova je, više ili manje, smanjen. Na **slici 41** prikazan je FTIR spektar snimljen za PS pod a) i PVC pod b) primjenom kvasca *Rhodotorula glutinis* u usporedbi s početnim PS-om i PVC-om nakon 30. dana. Primjećujemo da je nestao pik na 1601 cm^{-1} , no ne uočavaju se smanjenja ili povećanja intenziteta pikova. Došlo je do stvaranja novih pikova i to pri $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ što bi odgovaralo rastezanju C=C veze te pri $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ koji odgovara vibraciji C-C veze.⁹⁷ Kod PVC-a najviše izraženo smanjenje ili povećanje intenziteta vidljivo je kod pikova 2920 cm^{-1} , 2849 cm^{-1} , 1736 cm^{-1} , 1427 cm^{-1} i 1255 cm^{-1} te nastao je novi pik pri $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, kao i kod PS. Na **slici 42** prikazan je FTIR spektar snimljen za PS pod a) i PVC pod b) primjenom kvasca *Geotrichum candidum* u usporedbi s početnim PS-om i PVC-om nakon 30. dana. Primjećujemo smanjenje pikova kod PS pri pikovima 2847 cm^{-1} i 694 cm^{-1} .

U ovom slučaju nema nastanka novih pikova. Kod PVC dolazi do smanjenja intenziteta pikova pri svim karakterističnim pikovima za PVC, te nema nastanka novih pikova.

Tablica 13. Prikaz karakterističnih pikova za PS i PVC FTIR-ATR analizom.⁹⁶

PS		PVC	
$\lambda^{-1} / \text{cm}^{-1}$	karakteristična funkcionalna skupina	$\lambda^{-1} / \text{cm}^{-1}$	karakteristična funkcionalna skupina
3024	C-H istežanje aromatske skupine	2920, 2849, 1736	C-H istežanje
2847	C-H istežanje	1427	CH ₂ savijanje
1601	istežanje aromatskog prstena	1255	C-H deformacija u ravnini
1492	istežanje aromatskog prstena	1099	C-C istežanje
1451	CH ₂ savijanje	966	CH ₂ njihanje
1027	C-H veza u aromatskom prstenu	616	C-Cl istežanje
694	savijanju C-H veze izvan ravnine aromatskog prstena		
537	savijanje aromatskog prstena izvan ravnine		

Na **slici 43** prikazan je FTIR spektar snimljen za PS pod a) i PVC pod b) primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u usporedbi s početnim PS-om i PVC-om nakon 30. dana. Kod kvasca *S. cerevisiae* do smanjenja intenziteta za PS dolazi kod pika 537 cm^{-1} , dok nastanak novih pikova nije primijećen. Kao i kod *G. candidum*, za PVC, vidljivo je smanjenje intenziteta pikova kod svih karakterističnih pikova za PVC te nema nastanak novih. Na **slici 44** prikazan je FTIR spektar snimljen za PS pod a) i PVC pod b) primjenom kvasca *Trichosporon* sp. u usporedbi s početnim PS-om i PVC-om nakon 30. dana. Pri 1601 cm^{-1} došlo je do nestanka pika, kao i kod *R. glutinis*, dok je smanjenje intenziteta pikova vidljivo kod svih karakterističnih pikova za PS. Nema nastanka novih pikova kod biorazgradnje kvascem *Trichosporon* sp. za PS. Kod PVC je vidljivo je smanjenje intenziteta pikova za sve karakteristične pikove te je nastao novi pik pri $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ što bi odgovaralo rastezanju C=C veze. Na **slici 45** prikazan je FTIR spektar snimljen za PS pod a) i PVC pod b) primjenom kvasca *Candida parapsilosis* u usporedbi s početnim PS-om i PVC-om nakon 30. dana. U slučaju *C. parapsilos* za PS vidimo velike promjene u uzorku u odnosu na kontrolu. Promjena intenziteta, odnosno smanjenje i

povećanje, pikova vidljivo je pri 1492 cm^{-1} i 694 cm^{-1} . Došlo je do nestanka pikova pri 3024 cm^{-1} , 1601 cm^{-1} i 537 cm^{-1} , a tako i do nastanka novih. Pik $\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ te $\sim 950 \text{ cm}^{-1}$, odnosno što odgovara nastanku ketona, vibraciji skeleta C-C veze, CO-O-CO kod aldehida te isto vibraciji skeleta C-C veze.⁹⁷ Za PVC do promjene intenziteta dolazi kod svih karakterističnih pikova, odnosno vidljivo je da u uzorku nema karakterističnih pikova 1736 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} i 966 cm^{-1} . Novonastali pikovi pri $\sim 3030 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$, $\sim 1010 \text{ cm}^{-1}$ i $\sim 550 \text{ cm}^{-1}$ odgovaraju C-H rastezanju, konjugirani C=C, C-C vibracije i C-Cl rastezanje. Navedene promjene nam potvrđuju da dolazi do promjena u funkcionalnim skupinama PVC-a koje dovode do biorazgradnje. FTIR spektri daju korisne informacije o funkcionalnim skupinama kao dokaz biorazgradivih međuprodukta. Pojava karbonilnih, hidroksilnih i karboksilnih skupina smatra se preliminarnim i nezamjenjivim korakom tijekom biorazgradnje. Nastala konjugirana dvostruka veza opisuju promjenjivi uzorak dvostruke veze u molekuli. U takvoj molekuli prisutna je delokalizacija elektrona u π orbitalama ugljikovih atoma vezanih jednostrukom vezom.⁹⁸ Ovakve strukture nastaju uslijed biorazgradnje PVC-a, kao međuprodukti, alil klorid i konjugirane polienske strukture.⁹⁹ Možemo uočiti da prema navedenom, kvasac *C. parapsilosis* ima najveći utjecaj na biorazgradnju PS-a i PVC-a.

5.2. Glavni pokus: određivanje optimalnih uvjeta za biorazgradnju PVC-a kvascem *Candida parapsilosis*

Kao i u predhodnom pokusu, biorazgradnja PVC-a kvascem *Candida parapsilosis* pratila se preko CFU vrijednosti, FTIR-ATR analizom, TOC analizom i HPLC/MS analizom. Određena je i ekotoksičnost filtrata po završetku svakog eksperimenta u svrhu utvrđivanja njihove potencijalne toksičnosti. Statističkom obradom u programu *Design Experiments* prema punom faktorskom planu obrađeni su eksperimentalni podaci biorazgradnje PVC-a kvascem *C. parapsilosis* te su utvrđeni optimalni uvjeti.

5.2.1. Promjena CFU vrijednosti tijekom procesa biorazgradnje PVC-a kvascem *Candida parapsilosis*

Na slikama 46-48 prikazane su promjene CFU vrijednosti koja je služila kao pokazatelj za praćenje tijekom biorazgradnje PVC-a primjenom kulture kvasca *C. parapsilosis*. Promjene su praćene unutar 30 dana, kao što je opisano u podpoglavlju 3.3.4.1.. U daljnjem tekstu bit će dan detaljan pregled rezultata broja živih stanica kvasca (CFU) kroz sve pokuse za biorazgradnju

PVC-a primjenom kulture kvasca *C. parapsilosis*. Pokusi su podjeljeni u – **Pokus 1**, **Pokus 2** i **Pokus 3** (tablica 8). Slike 46-48 prikazuju grafičku ovisnosti broja živih stanica kvasca (CFU), odnosno log CFU, za uzorak PVC-a veličine čestica 25 – 100 µm; broj okretaja 120; 160 i 200; pH – vrijednost 3,5 i 7 i optičke gustoće (OG) 0,1; 0,5 i 1. Broj živih stanica kvasca u 0. danu za Pokus 1 (slika 46) iznosio je za OG=1 – $3,60 \times 10^7$ st/mL (a, d, g), OG 0,5= $1,57 \times 10^7$ st/mL (b, e, h) i OG=0,1 – $7,70 \times 10^6$ st/mL (c, f, i), za Pokus 2 (slika 47) iznosio za OG=1 – $4,00 \times 10^7$ st/mL (a, d, g), OG 0,5= $1,64 \times 10^7$ st/mL (b, e, h) i OG 0,1= $4,60 \times 10^6$ st/mL (c, f, i) te za Pokus 3 iznosio je za OG=1 – $3,90 \times 10^7$ st/mL (a, d, g), OG=0,5 – $1,24 \times 10^7$ st/mL (b, e, h) i OG=0,1 – $4,80 \times 10^6$ st/mL (c, f, i). Ovisno o eksperimentalnim uvjetima najveći broj izraslih kolonija prilikom biorazgradnje PVC-a kvascem *C. parapsilosis* postignut je u 3. danu u pokusima 1-1, 2-2 i 3-9 u vrijednosti od $7,10 \times 10^7$ st/mL, $1,84 \times 10^7$ st/mL, odnosno $4,30 \times 10^7$ st/mL. U 7. danu najveći broj izraslih kolonija postignut je u pokusima 1-5, 2-9 i 3-2 u vrijednosti od $3,70 \times 10^7$ st/mL, $1,78 \times 10^7$ st/mL, $1,71 \times 10^7$ st/mL, dok je u 14. danu najveći broj izraslih kolonija postignut kod pokusa 1-4 i 2-9 u vrijednostima od $7,00 \times 10^7$ st/mL i $1,71 \times 10^7$ st/mL. Zatim u 21. danu vidimo porast broja izraslih stanica u pokusima 1-5, 2-6 i 3-4 u vrijednosti od $3,30 \times 10^7$ st/mL, $1,68 \times 10^7$ st/mL, $4,50 \times 10^7$ st/mL, dok je u 30. danu u pokusima 1-4 i 2-4 najveći broj izraslih kolonija u vrijednosti od $6,00 \times 10^7$ st/mL i $3,90 \times 10^7$ st/mL. Nagli porast broja živih stanica vidljiv je u pokusima 1-2 do 14. dana i 2-6 u danima od 3. do 21. što ukazuje da je došlo do eksponencijalnog rasta odnosno do postepenog ili naglog povećanja broja kvasca *C. parapsilosis* ovisno o eksperimentalnim uvjetima. Može se pretpostaviti da su tijekom pokusa kvasci iskoristili sve ili veliku većinu raspoloživih hranjivih tvari koje su im omogućile brzi rast i razmnožavanje. Međutim, u pokusima 1-1, 1-9, 2-1 i 3-8 CFU se minimalno mijenjao, a kako je vrijeme odmicalo, oscilirao je više-manje oko jednake vrijednosti, što upućuje na uspostavljanje stacionarne faze rasta kvasca. U više od 50 % slučajeva dolazi do neznate promjene kod CFU vrijednosti od 21. do 30. dana. Kod većine pokusa u 30. danu vidljive su CFU vrijednosti približno jednake početnoj CFU vrijednosti, a najniža vrijednost zabilježena kod pokusa 3-3 u vrijednosti od $5,00 \times 10^5$ st/mL, dok je najveća zabilježena vrijednost u 30. danu kod pokusa 1-4 i iznosi $6,00 \times 10^7$ st/mL. Usporedbom pokusa koji je predstavljao kontrolu (SP), koji nije sadržavao MP-e, i većina pokusa u kojemu je MP-e bila prisutna, uočena je neznatna razlika u broju izraslih kolonija. U pokusima u kojima nije došlo do značajne razlike u CFU vrijednostima, pretpostavlja se da je došlo do minimalnog iskorištavanja PVC-a kao supstrata te se može pretpostaviti da uvjeti nisu bili odgovarajući za rast ispitivanog kvasca

Na **slici 46** (a-i) vidljiva je promjena CFU vrijednosti za **Pokus 1** primjenom kulture kvasca *C. parapsilosis* tijekom procesa biorazgradnje PVC-a pri 120 o / min (broj okretaja u minuti), za tri različite OG (0,1; 0,5; 1) i pH – vrijednosti (3; 5; 7). Broj živih stanica kvasca u 0. danu iznosio je za OG=1 – $3,60 \times 10^7$ st/mL (a, d, g), OG=0,5 – $1,57 \times 10^7$ st/mL (b, e, h) i OG=0,1 – $7,70 \times 10^6$ st/mL (c, f, i). Na slici 46 pod a), b) i c) prikazano je za pH – vrijednost 3, pod d), e) i f) za pH – vrijednost 5, dok je pod g), h) i i) za pH – vrijednost 7. U 3. danu došlo je do blagog porasta broja stanica kvasaca u pokusima 1-1, 1-2, 1-4, 1-5 i 1-8, dok je najviša CFU vrijednost zabilježena kod C1 vrijednosti $7,10 \times 10^7$ st/mL. Nakon 3. dana u pokusima 1-1 i 1-8 dolazi do pada vrijednosti CFU, dok kod pokusa 1-2, 1-4 i 1-5, broj izraslih kolonija kvasaca nastavlja rasti. U pokusima 1-7 i 1-8 vidljiv je eksponencijalni rast kvasaca, do 21. dana. Do eksponencijalnog rasta dolazi jer PVC potiče rast kvasaca. Nakon pada ili rasta broja kvasca u 7. ili 14. danu dolazi do osciliranja CFU vrijednost oko jednake vrijednosti do završetka pokusa. Vrijednost CFU-a u uzorku 1-4 s PVC-om veća je od SP, što se može pripisati korištenju PVC-a kao izvora ugljika. Međutim, u ostalim slučajevima vrijednost CFU-a SP je veća od vrijednosti CFU-a u pokusima u kojima se nalazi PVC. Razlika između postignute CFU vrijednosti u pokusima 1-1, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9 i SP-a je neznatna, što znači da je došlo do minimalnog iskorištavanja PVC-a kao supstrata, dok je ta razlika između PVC-a u pokusima 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 i SP-a značajnija i to u 3., 7., i 14. danu, što znači da je PVC barem djelomično iskorišten kao izvor ugljika i energije. Na **slici 47** (a-i) vidljiva je promjena CFU vrijednosti za **Pokus 2** primjenom kulture kvasca *C. parapsilosis* tijekom procesa biorazgradnje PVC-a pri 160 o / min, za tri različite OG (0,1; 0,5; 1) i pH – vrijednosti (3; 5; 7). Broj živih stanica kvasca u 0. danu iznosio je OG=1 – $4,00 \times 10^7$ st/mL (a, d, g), OG=0,5 – $1,64 \times 10^7$ st/mL (b, e, h) i OG=0,1 – $4,60 \times 10^6$ st/mL (c, f, i). Na slici 47 pod a), b) i c) prikazano je za pH – vrijednost 3, pod d), e) i f) za pH – vrijednost 5, dok je pod g), h) i i) za pH – vrijednost 7. Do 3. dana ne dolazi do promjena u CFU vrijednosti, osim u pokusima 2-4 i 2-6 gdje dolazi do pada broja izraslih kolonija. Najviša CFU vrijednost zabilježena je u pokusu 2-5 vrijednosti $3,30 \times 10^7$ st/mL. Nakon 3. dana u pokusima 2-1, 2-4 i 2-8 dolazi do pada vrijednosti CFU do 7. dana zatim naglog rasta do 14. dana, dok kod pokusa 2-2, 2-3, 2-7 i 2-9, broj izraslih kolonija kvasaca raste do 7. dana, zatim kod 2-3 i 2-7 nastavlja rasti do 14. dana. Nakon pada ili rasta broja kvasca u 7. ili 14. danu dolazi do osciliranja CFU vrijednost oko jednake vrijednosti do završetka pokusa za pokuse 2-1, 2-2, 2-8 i 2-9. Vrijednost CFU-a u uzorku 2-9 s PVC-om veća je od SP-a, što se može pripisati korištenju PVC-a kao izvora ugljika. Međutim, u ostalim slučajevima vrijednost CFU-a SP je veća od vrijednosti CFU-a u pokusima u kojima se nalazi

PVC. Na **slici 48** (a-i) vidljiva je promjena CFU vrijednosti za **Pokus 3** primjenom kulture kvasca *C. parapsilosis* tijekom procesa biorazgradnje PVC-a pri 120 o / min, za tri različite OG (0,1; 0,5; 1) i pH – vrijednosti (3; 5; 7). Broj živih stanica kvasca u 0. danu iznosio je za za OG=1 – $3,90 \times 10^7$ st/mL (a, d, g), OG=0,5 – $1,24 \times 10^7$ st/mL (b, e, h) i OG=0,1 – $4,80 \times 10^6$ st/mL (c, f, i). Na slici 48 pod a), b) i c) prikazano je za pH – vrijednost 3, pod d), e) i f) za pH – vrijednost 5, dok je pod g), h) i i) za pH – vrijednost 7. Kod Pokusa 3 vidimo najveće promjene i osciliranja između CFU vrijednosti PVC-a i SP. Do 3. dana dolazi do pada broja izraslih kolonija kvasca u uzorcima 3-2, 3-3, 3-4, 3-6 i 3-7, dok kod 3-8 i 3-9 dolazi do rasta broja izraslih kolonija, a u uzorcima 3-1 i 3-5 nije došlo do značajnih promjena. Kod svih uzoraka vidljivo je da je 14. danu došlo do najvećeg pada broja izraslih stanica, što možemo pripisati infekciji koja se pokazala u Petirijevim zdjelicama prilikom brojanja. Nakon toga provedene su sve mjere sterilizacije kako bi se smanjila infekcija za daljnji tijek provedbe pokusa. Nakon 14. dana dolazi do rasta broja stanica sve do 21. ili 30. dana, a u uzorcima 3-1, 3-5, 3-6 i 3-8 dolazi do uspostavljanja stacionarne faze od 21. dana. Najveći broj izraslih kolonija zabilježen je u pokusu 3-4 u 21. danu u vrijednosti $4,50 \times 10^7$ st/mL. Od svih provedenih pokusa biorazgradnje PVC-a kvascem *Candida parapsilosis* s obzirom na najvišu CFU vrijednost najznačajnijim se pokazao pokus 1-4. Najveća CFU vrijednost u pokusu 1-4 postignuta je u 14. danu te njezina vrijednost iznosila je $7,00 \times 10^7$ st/mL. Najveća razlika između CFU vrijednosti za uzorak PVC-a i SP-a, a koja ukazuje na intenzitet biorazgradnje, postignuta je upravo u 14. danu. Stoga je i biorazgradnja PVC-a primjenom kvascem *C. parapsilosis* najintenzivnija u pokusu 1-4. Dobiveni rezultati potvrđuju da je započela biorazgradnja PVC-a kvascem *C. parapsilosis*. S obzirom na početni broj kolonija koji ovisi o OG pojedinog sustava, nije u svim pokusima došlo do postepenog ili naglog povećanja broja kvascem *C. parapsilosis* sukladno ispitivanim uvjetima, već je u pokusima s OG=0,1 uvijek dolazilo do pada broja kvasca *C. parapsilosis*. Zaključak je da je u pokusima preduzgoj uspješno proveden, no kod OG=0,1 dolazi do pada vjerovatno zbog manjeg broja kvasaca te im je potrebno više vremena za prilagodbu u uvjetima u kojima se nalaze. Utvrđeno je da se u kraćem roku, uglavnom 14. danu, postiže maksimalna CFU vrijednost kod pokusa 1 i pokusa 2, dok kod pokusa 3 je u 14. danu zabilježena najmanja CFU vrijednost, a najveća je u 21. danu. Iz cijelog seta provedenih pokusa biorazgradnje PVC-a kvascem *C. parapsilosis* može se pretpostaviti da pri manjim OG (0,1), manjim pH – vrijednostima (3-5) i manjem broju okretaja (120 o / min) dolazi do boljeg rasta i razmnožavanja kultura kvasca *C. parapsilosis*. Razlog tomu je veća količina hranjivih tvari koja je na raspolaganju jer se u ovim slučajevima PVC koristi kao izvor ugljika i energije, a ne samo

hranjive tvari iz MM. Kao što je već spomenuto, PVC sadrži veliki udio aditiva – plastifikatora (poput dioktil ftalata) u svom sastavu. Uz bakterije i gljive, kvasci mogu isto kolonizirati mikroplastične čestice PVC-a. Prema literaturi¹⁰⁰ skupina kvasaca i gljiva sličnih kvascu, uključujući *Rhodotorula aurantiaca* i *Kluyveromyces* spp., pronađene su u biofilmu PVC bogatim plastifikatorima. Mjerila se početna i konačna masa nakon biorazgradnje, te se potvrdilo smanjenje mase PVC nakon kolonizacije kvascem.¹⁰⁰ Uz aditive, PVC predstavlja opasnost za okoliš zbog sadržaja klora. Atomi klora mogu proizvesti ekološki štetne klorirane spojeve, HCl ili klorirane dioksine (odlagališta otpada, spalionice).¹⁰¹ Najviše istraživanja provedeno je na biorazgradnji PVC-a od strane nekoliko gljiva (*Basidiomycotina*, *Deuteromycota*, *Ascomycota*) ili bakterija (*Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus* i *Acinetobacter*) samo na temelju empirijski uočenih morfoloških i fizikalno-kemijskih promjena, kao što je gubitak molekularne težine te vizualno utvđivanje razgradnje.¹⁰² Mikroorganizmi metaboliziraju velik broj spojeva, poput organskih materijala, kako bi zadovoljili heterotrofne potrebe za ugljikom i energijom, tako i u ovom slučaju PVC je izvor ugljika i energije za rast i razmnožavanje.¹⁰³

5.2.2. Promjena koncentracije TC-a, TOC-a i TIC-a tijekom pokusa biorazgradnje PVC-a kvascem *Candida parapsilosis*

U daljnjem tekstu prikazat će se promjena koncentracije TOC-a, TC-a i IC-a tijekom pokusa biorazgradnje PVC-a kulturom kvasca *C. parapsilosis*. Rezultati dobiveni TOC analizom prikazani su u tablici 10. Rezultati pokazuju promjenu vrijednosti ukupnog ugljika (TC), organskog ugljika (TOC) i anorganskog ugljika (TIC) za pokus 1-4 tijekom procesa biorazgradnje PVC-a primjenom kvasca *C. parapsilosis*. Koncentracija TOC-a u pokusu 1-4 biorazgradnje PVC-a u 0. danu poprima vrijednost u iznosu od 7,84 mg/L nakon čega njezine vrijednosti variraju sve do završetka pokusa. Odnosno, u 3. danu je zabilježen pad u iznosu 4,48 mg/L, zatim se pad nastavlja do 7. dana te kreće rasti sve do 30. dana kada koncentracija TOC-a iznosi 9,23 mg/L. Mikroorganizmi za rast i razmnožavanje koriste ugljik kao izvor hranjivih tvari, i uobičajeno je da povećanjem CFU vrijednosti doći do pada koncentracije TOC-a. Međutim, u ovom slučaju nemamo otopljenu organsku tvar, nego čvrstu česticu i pretpostavka je da će razgradnjom čvrste čestice (razbijanjem strukture polimera) doći do otpuštanja jednostavnih molekula u vodenu fazu, te da će tijekom procesa doći do povećanja TOC-a. Od 14. do 30. dana vrijednosti TOC-a više su u uzorku s PVC-om od uzorka SP-a pa se može pretpostaviti da dolazi do razgradnje PVC-a. Do porasta vrijednosti TOC-a dolazi u uzorku jer

nastaju monomeri i oligomeri koji sadrže organske tvari kao nusprodukti biorazgradnje. Te može doći i do otpuštanja aditiva s površine PVC-a u uzorku ili dolazi do nastanka novih razgradnih organskih produkata.^{4,51} Kako bi se to potvrdilo, provode se daljne analize kao što su FTIR-ATR spektroskopija i HPLC/MS analiza. TC vrijednosti koncentracija veće su od TOC vrijednosti koncentracija što je u skladu s očekivanim, te je najviša vrijednosti TC-a postignuta je u 30. danu i iznosi 10,58 mg/L, dok je najveći porast TIC-a postignut u 14. danu i iznosi 2,16 mg/L. Vrijednost TIC-a je u 0. danu za uzorak 1-4 iznosio je 0,83 mg/L. U uzorku SP-a vrijednost TIC-a je rasla u 3. danu, zatim padala do 7. dana te je došlo do porasta do 30. dana te je najveća vrijednost zabilježena u 21. danu u vrijednosti od 3,56 mg/L. Tijekom 30 dana pokusa, vidljive su približno jednake vrijednosti TIC-a u uzorcima koji sadržavaju MP-e i vrijednostima TIC-a u SP-i. Do najveće promjena TIC-a u uzorku i SP-a došlo je u 21. danu. Kako trend ponašanja TIC vrijednosti prati trend ponašanja TOC-a, najznačajnija vrijednost koncentracije anorganskog ugljika postignuta je upravo u 14. danu. Prema literaturi¹⁰⁴, TIC se veže uz razvijanje CO₂ kao jednog od produkta biorazgradnje, pa se pretpostavlja da je u 14. danu došlo do najintenzivnije biorazgradnje PVC-a kvasce *C. parapsilosis*. Prilikom biorazgradnje može doći do otpuštanja aditiva s površine MP-a ili nastanka novih razgradnih organskih produkata stoga na temelju procjene da je biorazgradnja PVC-a najintenzivnija u 14. danu ide i postojanje najveće razlike između CFU vrijednosti ovih uzoraka MP-a i SP-a upravo u ovom danu. Vrijednost CFU-a je rasla (slika 46 pod d)) do 14. dana te je ujedno tada postignuta i najviša vrijednost tijekom pokusa od $7,00 \times 10^7$ st/mL. Dakle, može se zaključiti da kultura kvasca *C. parapsilosis* u najvećoj mjeri iskorištava PVC kao supstrat u danima u kojima je i biorazgradnja najintenzivnija. PVC u svojoj strukturi ne sadrži aromatski prsten, te zbog svoje niske kristaličnosti ga čini materijalom koji se može biorazgraditi pomoću mikroorganizama.^{105,106}

5.2.3. HPLC/MS analiza filtrata tijekom provedbe biorazgradnje PVC-a kvascem

Candida parapsilosis

Dalje se provodila HPLC/MS analiza gdje su kao rezultat dobiveni maseni spektrometri vodene faze nastale prilikom biorazgradnje PVC-a kvascem *C. parapsilosis*. Na slici 49 (a-e) prikazani su rezultati za najznačajniji pokus biorazgradnje PVC-a, pokus 1-4. Analiza se provodila na uređaju za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti bez kolone. U tablici 14 prikazani su ionski oblici i imena identificiranih spojeva kroz 30. dana biorazgradnje PVC-a kvascem *C. parapsilosis* za pokus 1-4. Biorazgradnja PVC-a kvascem *C. parapsilosis* u

pokusu 1-4 najintenzivnija je u 14. danu, te od 14. dana dolazi do porasta TOC-a, stoga je iz tog razloga zaokružen maseni spektar PVC-a u 14. danu (slika 49 pod c)). U tom periodu je očekivano da dolazi do otpuštanja aditiva s površine MP-a i/ili do nastanka novih razgradnih organskih produkata. Ovakav rezultat je u skladu s razlikom između CFU vrijednosti PVC-a u pokusu 1-4 i SP-a koja je u 14. danu najveća. U tom danu je i biorazgradnja PVC-a kvascem *C. parapsilosis* najintenzivnija.

Kako je vidljivo iz tablice kemijski sastav PVC-a sadrži nekoliko aditiva. Pik na m/z 97 i 257 poprimaju strukturu iona $[M+H]^+$ te označuje da se radi o dimetilsulfoksidu (DMSO), formule C_2H_6OS . To je bezbojna tekućina koja je važno polarno aprotično otapalo koje otapa i polarne i nepolarne spojeve i miješa se u širokom rasponu s organskim otapalima kao i u vodi. DMSO se može apsorbirati kroz kožu i imati posljedice na bolove u trbuhu i iritaciju kože, te može dovesti do alergijskih reakcija, glavobolje te do smrti ako se unese u velikim količinama.¹⁰⁸ Ovaj se spoj najčešće koristi kao otapalo. Sljedeći identificiran pik je na m/z 288, koji odgovara n,n-bis(2-hidroksietil)dodekanamid (n,n-DDA) strukture iona $[M+H]^+$. To je antistatičko sredstvo, odnosno sredstvo za čišćenje plastičnih površina. Prema literaturi¹⁰⁹ spada u aditive koji se koriste u MP. Prema istraživanjima nema utjecaja na genske mutacije provedeno na bakterijama i na stanicama sisavaca (miš, hrčak), odnosno nije genotoksičan. U studijama oralne subkronične toksičnosti pokazuje blagi utjecaj na biokemijske parametre te je povećana težina jetre i bubrega. Studije su pokazale da nije kancerogen.¹¹⁰ Idući spoj koji se nalazi na m/z 522 pripada ionskom obliku $[M-Cl]^+$, odnosno spoju dipalmitil dimetilamonij klorid (DPDMA). Koristi se kao aditiv za proizvode za osobnu njegu. Najčešće se primjenjuje kao sredstvo za dezinfekciju, kao antiseptik, fungicid i baktericid te kao antimikrobno sredstvo za površine.¹¹¹ Na m/z 615 i 920 nalazimo ionski spoj $[A_{13}B+Na]^+$ odnosno $[A_{20}B+Na]^+$, polietilenglikog (PEG). Iako se od strane FDA (engl. *Food and Drug Administration*), PEG smatra sigurnim za ljude i okoliš, u posljednje se vrijeme često pojavljuje sve više slučajeva alergijskih reakcija kod ljudi izazvanih od strane PEG-a koji je prisutan u brojnim naizgled nepovezanim proizvodima poput prerađene hrane, kozmetike, lijekova i dr.¹¹² PEG je biokompatibilan spoj pa koristi se kao premaz u području biomaterijala te se pokazao učinkovitim u smanjenju hrapavosti površine plastičnih materijala.¹¹³ PEG spada pod poliglikole te je vjerojatno najsvestraniji glikol. Često se koristi u kombinaciji s glicerinom u kremama za kožu, osobnim lubrikantima i u pastama za zube. PEG također djeluje kao sredstvo protiv pjenjenja u hrani.

Vjeruje se da ne uzrokuje nikakve štetne interakcije s biološkim sustavima i stoga je dopušten za izravno dodavanje u prehrambene proizvode za ljudsku prehranu.¹¹⁴ Masovno gutanje PEG-a može dovesti do ozljeda bubrega, metaboličku acidozu, proljev, što može dovesti do dehidracije, osobito ako je unos vode minimalan.¹¹⁵

Tablica 14. Popis svih ionski oblika i ime spoja identificiranih u 30. dana biorazgradnje PVC-a kvascem *Candida parapsilosis* za pokus 1-4.¹⁰⁷

m/z omjer	Forma iona	Spoj
79, 97, 257	[M+H] ⁺	C ₂ H ₆ OS dimetilsulfoksid, DMSO
288	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₃₃ NO ₃ n,n-bis(2- hidroksietil)dodekanamid n,n-DDA
522	[M-Cl] ⁺	C ₃₆ H ₇₆ NCl dipalmitildimetilamonijev klorid, katalizator, aditiv za proizvode za osobnu njegu, DPDMA
109, 173, 318, 322, 615, 679, 760, 768, 920	[A ₁₃ B+Na] ⁺	[C ₂ H ₄ O] _n H ₂ O polietilen glikol, PEG
391, 800	[M ₂ +NH ₄] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ diizooktil ftalat, plastifikator
942	[AB ₁₃ +Na] ⁺	[C ₁₈ H ₃₄ O ₆][C ₂ H ₄ O] _n Tween 20
950	[AB ₁₂ +Na] ⁺	[C ₂₂ H ₄₂ O ₆][C ₂ H ₄ O] _n Tween 40
981	[AB ₁₂ +Na] ⁺	[C ₂₄ H ₄₆ O ₆][C ₂ H ₄ O] _n Tween 80

Vrijednost m/z omjera 800 pripada ionskom obliku [M₂+NH₄]⁺ kemijske formule C₂₄H₃₈O₄. Diizooktil ftalat, plastifikator (DIOP) pripada kategoriji ftalatnih estera visoke molekularne težine. DIOP se metabolizira i brzo uklanja nakon gutanja kod ljudi putem urina. Ima nisku akutnu oralnu i dermalnu toksičnost, no nisu dostupne studije o inhalacijskoj toksičnosti.¹¹⁶ U PVC možemo pronaći plastifikatore kao što su ftalati, adipati, glutarati, sebakati, fosfati, polimeri, trimelitati i epoksidni spojevi. Stavljaju se kod plastike koja će biti izložena visokim temperaturama, kao i za dobru fleksibilnost pri niskim temperaturama.¹¹⁷ Plastifikatori su organske tvari s različitim karakteristikama, čija je glavna funkcija interkalirati krute polimerne strukture materijala kao što je PVC za lako kretanje i fleksibilnost. Prisutnost plastifikatora u PVC strukturi utjecat će na različita specifična fizikalno-mehanička svojstva,

posebice na modul elastičnosti, istežanje pri lomu, tvrdoću, fleksibilnost pri niskim temperaturama.¹¹⁸ Analizom je potvrđen spoj kemijske formule $[C_{22}H_{42}O_6][C_2H_4O]_n$ kojeg nazivamo Tween (40) na m/z omjeru 950. Ti spojevi pripadaju skupini surfaktanata tj. površinski aktivnim tvarima, za raspršivanje hidrofobnih čestica u vodenim otopinama. Naziva se i polisorbat-40. Analizom su potvrđeni spojevi kemijske formule $[C_{18}H_{34}O_6][C_2H_4O]_n$ i $[C_{24}H_{44}O_6][C_2H_4O]_n$ te se nazivaju Tween (20) odnosno Tween (80). Sinonimi ovih spojeva su polietilen glikol sorbitan monolaurat i polietilen glikol sorbitan monooleat. Tween 80 ima duži alifatski rep i stoga je lipofilniji. Tween 20 je hidrofilniji.¹¹⁹

5.2.4. FTIR-ATR spektroskopska analiza mikroplastičnih čestica PVC-a

FTIR-ATR analiza PVC-a provedena je neposredno prije provedbe pokusa biorazgradnje PVC-a kvascem *C. parapsilosis* kako bi potvrdili da se radi o PVC-u. Ova analiza provedena je i na kraju pokusa biorazgradnje PVC-a u svrhu utvrđivanja potencijalno nastalih promjena u funkcionalnim skupinama koje karakteriziraju kemijsku strukturu ovog polimera. FTIR-ATR analiza provedena je prema opisu navedenom u poglavlju 3.3.4.3. Spektri PVC-a su označeni plavom bojom (PVC – kontrola) te uz njih se nalaze spektri uzorka gdje su označeni prema pH – vrijednosti, crveno za **pH 3**, zeleno za **pH 5** te žuto za **pH 7**, kako bi se lakše moglo okarakterizirati promjene. Na slici 50 prikazani su dobiveni spektri FTIR spektroskopije za početni PVC (kontrola) i PVC (uzorak) nakon provedbe procesa biorazgradnje primjenom kvasca *C. parapsilosis* za Pokus 1, dok na slici 51 za Pokus 2 te na slici 52 za Pokus 3. Prema literaturi⁹⁶, spektar PVC-a karakteriziraju pikovi prikazani u tablici 12. PVC spektar karakteriziraju pikovi na 2920 cm^{-1} , 2849 cm^{-1} i 1736 cm^{-1} koji odgovaraju simetričnom C-H istežanju. Karakterizira još i pik pri 1427 cm^{-1} koji odgovara CH_2 uvijanju dok je pri valnoj duljini od 1255 cm^{-1} pik koji odgovara C-H deformaciji u ravnini. Vrijednost pika 1099 cm^{-1} odgovara istežanju C-C veze dok pik 966 cm^{-1} odgovara njihanju CH_2 . Pik na 616 cm^{-1} predstavlja istežanje C-Cl veze. Nakon procesa biorazgradnje većina pikova karakterističnih za PVC i dalje je prisutna. Usporedbom FTIR spektara prije i poslije biorazgradnje uočeno je da je došlo do najizraženijih promjena u intenzitetu pikova na 2920 cm^{-1} , 2849 cm^{-1} , 1736 cm^{-1} , 1427 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} i 616 cm^{-1} . Uočavamo da u određenim pokusima dolazi do stvaranja novog pika jedino pri $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ što bi odgovaralo rastežanju C=C veze, tako i u pokusu 1-4. Prema literaturi¹²⁰, vrpca vibracije istežanja C-Cl skupine pri 690 cm^{-1} , karakteristična isključivo za PVC, prisutna je u strukturi prema grafovima. Ako dođe do njenog uklanjanja, to ukazuje da su iz polimera uklonjeni gotovo svi atomi klora, no u našem slušaju to nije vidljivo.

5.2.5. Ispitivanja ekotoksičnosti filtrata pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*

Na kraju provedenih pokusa biorazgradnje PVC-a kvascem *C. parapsilosis* provodilo se ispitivanje ekotoksičnosti filtrata za sva tri pokusa pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*. Test ekotoksičnosti provodio kako bi se utvrdili potencijalno štetnih učinci na ovaj organizam, a koji mogu nastati kao posljedica otpuštanja aditiva s površine MP-a ili nastanka novih organskih razgradnih produkata prilikom biorazgradnje MP-a. Postupak ispitivanja opisan je u poglavlju 3.3.4.5., a u tablici 11 prikazani su rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata nakon procesa biorazgradnje. Rezultati su izraženi preko EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti, odnosno tijekom pokusa pratio se intenzitet luminiscenije na početku i na kraju pokusa te se iz dobivenih rezultata očitala vrijednost EC₂₀ i EC₅₀. Prednost ovog testa je kratko vrijeme trajanja. EC₂₀ se prema literaturi⁸¹ definira kao koncentracija tvari koja rezultira 20 %-tnim štetnim učinkom na ispitivanu populaciju, odnosno EC₅₀ kao koncentracija tvari koja rezultira 50 %-tnim štetnim učinkom. Općenito, što je ova vrijednost manja, štetni učinak je veći. Rezultati ispitivanja ekotoksičnosti filtrata provedenog pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri* pokazuju najniže izmjerene EC₂₀ vrijednosti za Pokus 1 za uzorak 1-2, za Pokus 2 uzorak 2-5, odnosno kod Pokus 3 za uzorak 3-5. To bi značilo da koncentracija štetnih tvari u filtratu za te uzorke nakon 30. dana biorazgradnje, s obzirom na najniže izmjerene EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti, u iznosu 3,45 %, 4,81 % odnosno 0,34 % će izazvati štetni učinak kod 20 % populacije bakterije *Vibrio fischeri*. Najniže izmjerene EC₅₀ vrijednosti prate EC₂₀ pa su u istim uzorcima zabilježene najniže EC₅₀ vrijednosti u iznosu 5,99 %, 13,80 % odnosno 10,57 % štetni učinak kod 50 % populacije bakterije *Vibrio fischeri*. Dobivene niske EC₂₀ vrijednosti su u skladu s očekivanim jer prilikom biorazgradnje dolazi do otpuštanja aditiva s površine MP-a ili nastanka novih organskih razgradnih produkata čije je štetno djelovanje već ranije utvrđeno kod HPLC/MS analize. Uspoređujući CFU za uzorke 1-2, 2-5 i 3-5 vidimo da dolazi do povećanog broj izraslih kolonija u 14. danu, 21. danu te 21. danu što dodatno potvrđuje kako je do biorazgradnje uistinu došlo i da je PVC iskorišten kao supstrat od strane kvasca. EC₂₀ i EC₅₀ vrijednost dobivena u pokusu 1-4 iznosi 21,27 % odnosno 46,29 %. Najviše EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti izmjerene su u pokusima 1-8, 2-8 i 3-9, odnosno 1-4, 2-6 i 3-6 te se njihove vrijednosti kreću između 32 – 52 %. Visoke vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ izmjerene za navedene pokuse ukazuju da je štetni učinak zanemariv, odnosno gotovo da ga i nema. Uzorci koji su označeni s – za EC₂₀ i EC₅₀, za njih nije moguće iščitati rezultate jer uzorci nisu bili toksični.

5.2.6. Statistička analize varijance (ANOVA)

Glavni eksperiment provodio se u svrhu određivanja optimalnih uvjeta za proces biorazgradnje PVC-a prema potpunom faktorskom dizajnu (engl. *Full Factorial design*). U tablici 12 prikazani su rezultati obrade u programskom paketu *Design Expert* modulom ANOVA. Za dizajn i optimizaciju procesa biološke transformacije potrebni su kvantitativni eksperimentalni podaci. Razlikujemo više različitih matematičkih modeli za opisivanje dinamike metabolizma spojeva izloženih čistim kulturama mikroorganizama ili mikrobnim populacijama prirodnog okoliša.¹²¹ Postoji mnogo studija o kinetičkom modeliranju reakcije biorazgradnje MP-a, prema Chamas et al.¹²² koristio se model $-\frac{dm}{dt} = k_d \rho SA$, gdje su se pratili putevi razgradnje u različitim uvjetima. Matematičko modeliranje biorazgradnje različite MP-e pokazalo je mogućnost simulacije eksperimentalnih uvjeta i mogućnost procijene učinkovitosti procesa biorazgradnje tijekom vremena. Glavni utjecajni čimbenici, kao što su temperatura, aeracija, vlažnost, sastav supstrata i veličina čestica ključni su kako bi se omogućili optimalni uvjeti za rast mikroorganizama i napad na mikroplastične čestice.¹²³ U situacijama kada je naglasak na otkrivanju faktora koji imaju utjecaja na proces ili na procjenu samog utjecaja najčešće se koristi potpuni faktorski dizajn. Ispitivao se učinak nezavisnih varijabli (broj okretaja u minuti, OG i pH-vrijednost) s obzirom na jednu (zavisnu) varijablu (log CFU) u procesu biorazgradnje analizom varijance (ANOVA) u programu *Design Expert*, sa razinom značajnosti $p < 0,05$. F-vrijednost modela manja od 0,0500 ukazuje na to da su čimbenici modela značajni. Provedbom analize značajni čimbenici modela su **A** i **B**, a oni predstavljaju broj okretaja i OG. Vrijednosti veće od 0,1000 označavaju da parametri modela nisu značajni. Model se može prikazati u obliku trodimenzionalnih grafova površine odziva. Trodimenzionalni (3D) prikaz odzivnih površina prikazuje nam površinu prema kojoj se može vidjeti utjecaj promatranih parametara na log CFU. Crvena boja označava maksimalan utjecaj parametra na log CFU, dok plava boja prikazuje područje s najmanjim utjecajem parametara na log CFU. Slika 54. pod a) prikazuje 3D dijagram ovisnosti nezavisnih varijabli (broj okretaja i OG) i zavisne (log CFU). Prema obliku krivulje, log CFU se povećava kod većih vrijednosti za OG i kako se smanjuje broj okretaja s obzirom na crveno područje na krivulji. Na slici 54. pod b) vidljivo je da smanjenjem broja okretaja i pri srednjoj pH-vrijednosti, postiže se najviša CFU vrijednost. Kod 3D dijagrama na slici 54. pod c) koji nam daje uvid odnos OG i pH-vrijednosti vidimo da je najveća log CFU vrijednost pri većoj OG i srednjoj pH-vrijednosti. S obzirom na crveno područje na 3D dijagramu, broj okretaja ima značajniji utjecaj na biorazgradnju PVC-a.

Log CFU se povećava sa smanjenjem broja okretaja i povećanjem OG te prema srednjoj pH-vrijednosti što je i vidljivo prema dobivenim rezultatima provedenih analiza. Na temelju dobivenih rezultata prikazanih u tablici 15 uvjeti koji su se pokazali značajnim za proces biorazgradnje PVC-a primjenom kvasca *C. parapsilosis* su najmanji broj okretaja u minuti (120), najviša vrijednost OG-a (1,0) te srednja pH-vrijednost (5).

Tablica 15. Optimalni uvjeti za proces biorazgradnje PVC-a primjenom kvasca *Candida parapsilosis* dobiveni pomoću *Design Expert*-a.

broj okretaja / min	120
OG / -	1,0
pH-vrijednost / -	5

6. ZAKLJUČAK

Biorazgradnja je ekološki prihvatljiv postupak uklanjanja onečišćujućih tvari iz okoliša, u koje spada i MP-e. Cilj ovog rada bio je ispitati potencijal kvasaca izoliranih iz okoliša – *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis* za biorazgradnju PS-a i PVC-a. S najučinkovitijim kvascem, *Candida parapsilosis*, ispitani su se optimalni uvjeti za biorazgradnju PVC-a primjenom dizajna punog faktorskog plana. Pokusi su se provodili tijekom 30 dana i na temelju dobivenih rezultata zaključeno je sljedeće:

- ✓ pH-vrijednost se tijekom 30. dana nije značajno mijenjala osim u pokusima s *C. parapsilosis* i *S. cerevisiae* kada je vrijednost pH pala na ~3, odnosno ~4 u slučaju SP, dok u pokusu biorazgradnje PVC kvascem *C. parapsilos* kod pH – vrijednosti 3 i 5 došlo je do rasta;
- ✓ u pokusima gdje je razlika CFU-a između SP i uzoraka sa PS i PVC-om značajna može se zaključiti da je došlo do biorazgradnje, odnosno da su kvasci koristili navedene tvari kao izvore ugljika za preživljavanje i rast;
- ✓ kod preliminarnog pokusa najveća razlika u CFU uočena je kod kvasca *C. parapsilosis* s PVC-om (pokus 1-4);
- ✓ najveća CFU vrijednost u odabranom pokusu 1-4 postignuta je u 14. danu i njezina vrijednost iznosila je $7,00 \times 10^7$ st/mL;
- ✓ TOC analizom uočen je porast TOC-a i TIC-a nakon 14. dana tijekom trajanja pokusa u odnosu na SP, što ukazuje da je došlo do otpuštanja aditiva s MP-a;
- ✓ TIC vrijednost najveća je u 14. danu, a ona se veže uz razvijanje CO₂ kao jednog od produkata biorazgradnje, pa se pretpostavlja da je upravo u 14. danu biorazgradnja PVC-a najintenzivnija;
- ✓ provedbom HPLC/MS analize potvrdila se prisutnost aditiva tijekom procesa u filtratu što je dodatna potvrda da je došlo do biorazgradnje PVC-a kvascem *C. parapsilosis*
- ✓ FTIR analiza ukazala je da je došlo do veće razgradnje PVC-a nego PS-a, te u slučaju *C. parapsilosis* došlo je do stvaranja novih pikova i nestajanja postojećih;
- ✓ promjene intenziteta pikova apsorpcijskih vrpca te broja nastanka novih i nestanka postojećih na FTIR spektru PVC-a, utvrđeno je da je biorazgradnja PVC-a učinkovita primjenom kvasca *C. parapsilosis*, dok je najveća promjena u spektru vidljiva upravo u pokusu 1-4;

- ✓ EC₂₀ vrijednosti dobivene nakon biorazgradnje PS-a i PVC-a najniže su kod kvasca *S. cerevisiae* i *R. glutinis*;
- ✓ EC₂₀ vrijednost najveća je kod *C. parapsilosis* što možemo pripisati da nastale aditive koristi kao izvor hrane;
- ✓ optimalni uvjeti za biorazgradnju PVC-a pokazali su se broj okretaja, pri manjim vrijednostima (120 o/min), pri većoj OG (1,0) i srednjoj pH-vrijednosti (5);
- ✓ primjenom kvasca *C. parapsilosis* moguće je biorazgraditi PVC uz optimiranje uvjeta biorazgradnje, no potrebno je provoditi daljnja i duža istraživanja.

7. ZAHVALA

Prije svega, zahvaljujemo se svojoj mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić što nas je primila pod svoje mentorstvo i omogućila nam izradu rada za Rektorovu nagradu pod njezinim stručnim vodstvom te se zahvaljujemo na svojoj podršci, strpljenju, savjetima, uloženom trudu i vremenu.

Zahvaljujemo se asistenticama Kristini Bule i Martini Miloloži koje su također uložile puno truda, strpljenja i vremena te nas vodile i usmjeravale prilikom izrade rada.

Zahvaljujemo se i tehničarki Marijani Vidaković na svim savjetima i pozitivnoj energiji kojima je olakšala izradu ovog rada, uz uvijek prisutan osmijeh i podršku.

Za kraj, veliko hvala našim obiteljima, prijateljima i prijateljicama, našim najbližima koji su nam bili ogromna podrška prilikom cjelokupnog dosadašnjeg studiranja i tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujemo jedna drugoj jer smo si bile najveća podrška i motivacija.

8. LITERATURA

1. Bhatt, P., Pathak, V. M., Bagheri, A. R., Bilal, M., Microplastic contaminants in the aqueous environment, fate, toxicity consequences, and remediation strategies, *Environmental Research*, 200 (2021) 111762.
2. http://www.davidmoore.org.uk/21st_century_guidebook_to_fungi_platinum/Ch17_05.htm (pristup 30. 5. 2022.)
3. Mitrano, D. M., Wohlleben, W., Microplastic regulation should be more precise to incentivize both innovation and environmental safety, *Nature Communications*, 11 (2020) 5324.
4. Jingyi, L., Huihui, L., J. Paul, C., Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection, *Water Research*, 137 (2017) 362-374.
5. Maryani, A. T., Wibowo, Y. G., Maysatria, K., The physical and Chemical Impact of Microplastic in The Marine Environment: a Systematic Review, *Sriwijaya Journal of Environment*, 5(1) (2020) 60-68.
6. Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Schnekenburger, J., Kanno, J., Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo, Adverse Effects of Engineered Nanomaterials, 3 (2017) 51–82.
7. Roy, P., Mohanty, A. K., Misra, M., Microplastics in ecosystems: their implications and mitigation pathways, *Environmental Science: Advances*, 1 (2022) 9-29.
8. Kosiorowska, K. E., Połomska, X., Wang, G., Borodina, I., Mirończuk, A. M., Efficient biodegradation of aliphatic polyester by genetically engineered strains of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 161 (2021) 105232.
9. Morgan, E., Burton, K.W., Church, P.A., Practical exploratory experimental designs, *Chemom. Intel. Lab. Syst.* 5 (1989) 283–301.
10. Crawford, C. B., Quinn, B., Microplastics, standardisation and spatial distribution i The interactions of microplastics and chemical pollutants, u: *Microplastic Pollutants*, Amsterdam (2017) 101–130, 131-157.
11. Cui, S., Borgemenke, J., Qin, Y., Liu, Z., Li, Y., Chapter Five - Bio-based polycarbonates from renewable feedstocks and carbon dioxide, *Advances in Bioenergy*, 4 (2019) 183–208.
12. <https://www.sciencehistory.org/science-of-plastics> (pristup 3. 6. 2022.)
13. Gewert, B., Plassmann, M. M., MacLeod, M., Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment, *Environmental Science: Processes Impacts*, 17 (2015) 1513-1521.

14. Boucher J., Friot D., Primary Microplastics in the Oceans, A Global Evaluation of Sources (2017)
15. Laskar, N., Kumar, U., Plastics and microplastics: A threat to environment, Environmental Technology & Innovation, 14 (2019) 100352.
16. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/> (pristup 11. 6. 2022.)
17. <https://nanopartikel.info/en/basics/cross-cutting/nanoplastic-in-the-environment/> (pristup 11. 6. 2022.)
18. Wu, C., Zhang, K., Xiong, X., Microplastic Pollution in Inland Waters Focusing on Asia. Freshwater Microplastics, (2017) 85-99.
19. S. Zhu, A. Hamielec, in Polymer Science: A Comprehensive Reference (2012)
20. Turner A., Filella M., Polyvinyl chloride in consumer and environmental plastics, with a particular focus on metal-based additives, Environ. Sci., Processes Impacts, 23 (2021) 1376-1384.
21. Bo-Yu Peng, Zhibin Chen, Jiabin Chen, Huarong Yu, Xuefei Zhou, Craig S. Criddle, Wei-Min Wu, Yalei Zhang, Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae, Environment International, 145 (2020) 106106.
22. https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Vinyl_chloride_Polymerization_V1.svg (pristup 12. 6. 2022.)
23. Čačko, S., Pančić, E., Zokić, I., Miloloža, M., Kučić Grgić, D., Aditivi u plastici – potencijalno štetni učinci na ekosustav, Kem. Ind. 71 (1-2) (2022) 49–56.
24. <http://www.seepvcforum.com/en/content/9-pvc-additives> (pristup 22.5.2022.)
25. <https://www.chemicalsafetyfacts.org/polyvinyl-chloride/> (pristup 20.5.2022.)
26. http://www.gasket.hr/documents/PVC_tablica.pdf (pristup 12. 6. 2022.)
27. Nerland I., L., Halsband C., Allan I., Thomas K. V., Microplastics in marine environments: Occurrence, distribution and effects, Akvaplan-niva 2014.
28. Paço, A., Duarte, K., P. da Costa, J., S.M. Santos, P., Pereira, P., E. Pereira, M., C. Freitas, A., C. Duarte, A., A.P. Rocha-Santos, T., Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*, Science of The Total Environment, 586 (2017) 10-15.
29. Dissanayake, P. D., Kim, S., Sarkar, B., Oleszczuk, P., Kyung Sang, M., Niamul, M., Haque, J. H. A., S. Bankgh, M., Sik Ok, Y., Effects of microplastics on the terrestrial environment: A critical review, Environmental Research, 209 (2022) 112734.

30. Bhatt, P., Mohan Pathak, V., Reza Bagheri, A., Bilal, M., Microplastic contaminants in the aqueous environment, fate, toxicity consequences, and remediation strategies, *Environmental Research*, 200 (2021) 111762.
31. Li, J., Liu, H., Chen, J. P., Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research* (2017)
32. Shrivastava, Anshuman, Introduction to Plastics Engineering, Plastic Properties and Testing (2018) 49–110.
33. Lambert, Scott, Scherer, Christian, Wagner, Martin, Ecotoxicity testing of microplastics: Considering the heterogeneity of physicochemical properties. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3) (2017).
34. Li, W.C., Tse, H.F., Fok, L., Plastic waste in the marine environment: a review of sources, occurrence and effects (2016) 566–567, 333–349.
35. Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 62 (2011) 2588–2597.
36. Claessens, M., De Meester, S., Landuyt, L.V., De Clerck, K., Janssen, C.R., Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Marine Pollution Bulletin*, 62 (2011) 2199–2204.
37. Tang, K.H.D., Ecotoxicological impacts of micro and nanoplastics on marine fauna, 3 (2020) 1–5.
38. Collivignarelli, M.C., Abbà, A., Benigna, I., Sorlini, S., Torretta, V., Overview of the main disinfection processes for wastewater and drinking water treatment plants, 10(1) (2018) 1–21.
39. Kay, P., Hiscoe, R., Moberley, I., Bajic, L., McKenna, N., Wastewater treatment plants as a source of microplastics in river catchments, 25 (2018) 20264–20267.
40. Hadibarata, Tony, Tang, Kuok Ho Daniel., Microplastics removal through water treatment plants: Its feasibility, efficiency, future prospects and enhancement by proper waste management, *Environmental Challenges*, 5 (2021).
41. Sun, J., Dai, X., Wang, Q., van Loosdrecht, M.C.M., Ni, B.J., Microplastics in wastewater treatment plants: detection, occurrence and removal. *Water Res*, 152 (2019) 21–37.
42. Carr, S.A., Liu, J., Tesoro, A.G., Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Res*, 91 (2016) 174–182.
43. A. Arpia, A., Wei-Hsin, C., T. Ubando, A., Raza Naqvi, S., B. Culaba, A., Microplastic degradation as a sustainable concurrent approach for producing biofuel and obliterating

hazardous environmental effects: A state-of-the-art review, *Journal of Hazardous Materials*, 418 (2021) 126381.

44. Klein, S., K. Dimzon, I., Eubeler, J., P. Knepper, T., Analysis, Occurrence, and Degradation of Microplastics in the Aqueous Environment, *The Handbook of Environmental Chemistry*, 58 (2017) 51-67.

45. Svedin, J., Photodegradation of macroplastics to microplastics: A laboratory study on common litter found in urban areas, *Natural Resources Engineering*, master's (2020)

46. Ghime, D., Ghosh, P., Advanced Oxidation Processes: A Powerful Treatment Option for the Removal of Recalcitrant Organic Compounds, in C. Bustillo-Lecompte (ed.), *Advanced Oxidation Processes - Applications, Trends, and Prospects*, IntechOpen, London (2020).

47. Joutey, N. T. et al., Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms, in R. Chamy, F. Rosenkranz (eds.), *Biodegradation - Life of Science*, IntechOpen, London (2013).

48. Kümmerer, K., Dionysiou, D.D., Olsson, O., Fatta-Kassinos, D., Reducing aquatic micropollutantseincreasing the focus on input prevention and integrated emission management. *The Science of the Total Environment*, 652 (2019) 836-850.

49. Singh, P., Jain, R., Srivastava, N., Borthakur, A., Pal, D.B., Singh, R., Madhav, S., Srivastava, P., Tiwary, D., Mishra, P.K., Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 47 (3) (2017) 155-201.

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

51. Corcoran, Patricia L., Degradation of Microplastics in the Environment, *Handbook of Microplastics in the Environment*, (2022) 531–542.

52. Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., Levin, D. B. Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics, *Frontiers in Microbiology* (2020).

53. Sánchez, C., Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances*, 40 (2020) 107501.

54. Bhardwaj, H., Gupta, R., Tiwari, A., Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2) (2012) 575–579.

55. De Cássia Miranda R., de Souza C. S., de Barros Gomes E., Lovaglio R. B., Lopes C. E., de Fátima Vieira de Queiroz Sousa M., Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from

- the Vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco –Brazil. *Brazilian archives of biology and technology*, 50(1) (2007) 147-152.
56. Masaki, K., Kamini, N. R., Ikeda, H., & Iefuji, H., Cutinase-Like Enzyme from the Yeast *Cryptococcus* sp. Strain S-2 Hydrolyzes Polylactic Acid and Other Biodegradable Plastics. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11) (2005) 7548-7550.
57. Fritsche W., Hofrichter M., Aerobic degradation by microorganisms, in: *Biotechnology. Environmental Processes*, Wiley-VCH, Weinheim, 11 (2000) 145–167.
58. Eaton D. C., Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: a ligninolytic fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 7 (1985) 194-196.
59. Ksheminska H., Fedorovych D., Honchar T., Ivash M., Gonchar M., Yeast Tolerance to Chromium Depends on Extracellular Chromate Reduction and Cr(III) Chelation. *Food Technology and Biotechnology*, 46(4) (2008) 419-426.
60. http://www.davidmoore.org.uk/21st_century_guidebook_to_fungi_platinum/Ch17_05.htm (pristup 11.6.2022.)
61. Kot, A.M., Błażej, S., Kurcz, A. et al., *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (2016) 6103–6117.
62. Eliskases-Lechner, F., *Encyclopedia of Dairy Sciences, Yeasts and Molds, Geotrichum candidum.*, (2011) 765–771.
63. R. Boutrou, M. Guéguen, Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology, *International Journal of Food Microbiology*, 102(1) (2005) 1-20.
64. Alper, I., Frenette, M., & Labrie, S., Genetic diversity of dairy *Geotrichum candidum* strains revealed by multilocus sequence typing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(13) (2013) 5907–5920.
65. P.Ratray, F., Eppert, I., *Secondary Cultures*, *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Third edition), (2022) 336-342.
66. Eliskases-Lechner, F., *Geotrichum candidum*, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, (2002) 1229-1234.
67. Hrvatska tehnička enciklopedija, kvasac, <https://tehnika.lzmk.hr/kvasac-2/> (pristup 28.5.2022)
68. Wickner, Reed B., *Advances in Virus Research, Mycoviruses, Viruses and Prions of Saccharomyces cerevisiae*, 86 (2013) 1–36.

69. Stewart, G.G., *Saccharomyces cerevisiae*, Encyclopedia of Food Microbiology, (2014) 309–315.
70. Buser, C., Toward Sub-second Correlative Light and Electron Microscopy of *Saccharomyces cerevisiae*, Electron Microscopy of Model Systems, 96 (2010) 217–234.
71. de Macedo, Priscila M., Reference Module in Life Sciences, Superficial Infections of the Skin and Nails., 1 (2020) 707 –718.
72. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. Clinical Microbiology Reviews, 24 (2011) 682-700.
73. Patterns of morphologic variation among isolates of *Trichosporon beigeli*. Journal of Clinical Microbiology, 28 (1990) 2823-2827.
74. Johnson, Eric A., Yeast Biotechnology, (2011), 21–44.
75. Karkowska-Kuleta, J.; Kulig, K.; Karnas, E.; Zuba-Surma, E.; Woznicka, O.; Pyza, E.; Kuleta, P.; Osyczka, A.; Rapala-Kozik, M.; Kozik, A., Characteristics of Extracellular Vesicles Released by the Pathogenic Yeast-Like Fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. Cells, 9 (2022) 1722.
76. Trofa, D., Gacser, A., Nosanchuk, J. D., *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. Clinical Microbiology Reviews, 21(4) (2008) 606–625.
77. Tóth, R., Nosek, J., Mora-Montes, H. M., Gabaldon, T., Bliss, J. M., Nosanchuk, J. D., Gácser, A., *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. Clinical Microbiology Reviews, 32(2) (2019).
78. Wanger, A., Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology, Overview of Fungal Infections, (2017) 173–189.
79. Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Schneckeburger, J., Kanno, J., Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo, Adverse Effects of Engineered Nanomaterials, 3 (2017) 51–82 .
80. Ma, Y., Huang, A., Cao, S., Sun, F., Wang, L., Guo, H., Ji, R., Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water. Environmental Pollution, 219(2016) 166–173.
81. Kučić Grgić, D., Miloloža, M., Skripta iz laboratorijskih vježbi iz kolegija Ekotoksikologija, 2021.
82. Backhaus, T., Froehner, K., Altenburger, R., L.H., Grimme Toxicity testing *with Vibrio Fischeri*: A comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. (1997).
83. Ukrainczyk, M., Planiranje pokusa u industriji Design of Experiments in Industry, (2010).

84. Bezerra, M. A., Lemos, V. A., Novaes, C. G., de Jesus, R. M., Filho, H. R. S., Araújo, S. A., Alves, J. P. S., Application of mixture design in analytical chemistry, *Microchemical Journal*, 152 (2019) 104336.
85. Cavazzuti, M. *Design of Experiments, Optimization Methods*, (2012) 13–42.
86. <https://www.isixsigma.com/dictionary/full-factorial-doe/> (pristup: 1.6.2022.)
87. Gong, Y., Ding, P., Xu, M., Zhang, C., Xing, K., Qin, S., Biodegradation of phenol by a halotolerant versatile yeast *Candida tropicalis* SDP-1 in wastewater and soil under high salinity conditions. *J Environ Manage*, 289 (2021) 112525.
88. Sánchez, C., Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation, *Biotechnology Advances*, 40 (2020)
89. A. Arpia, A., Chen, W-H., T. Ubando, A., Raza Naqvi, B. Culaba, A., Microplastic degradation as a sustainable concurrent approach for producing biofuel and obliterating hazardous environmental effects: A state-of-the-art review, *Journal of Hazardous Materials*, 418 (2021) 126381.
90. <https://www.toppr.com/guides/biology/microorganisms/colony-forming-unit-cfu-in-microbiology/> (pristup 16. 6. 2022.)
91. Jaishankar, J., Srivastava, P., Molecular Basis of Stationary Phase Survival and Applications. *Frontiers in Microbiology*, 8 (2017).
92. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Cell_and_Molecular_Biology/Book%3A_Investigations_in_Molecular_Cell_Biology_\(O'Connor\)/04%3A_Working_with_Yeast/4.03%3A_Yeast_growth_phases](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Cell_and_Molecular_Biology/Book%3A_Investigations_in_Molecular_Cell_Biology_(O'Connor)/04%3A_Working_with_Yeast/4.03%3A_Yeast_growth_phases) (pristup 16. 6. 2022.)
93. Prosser, J.I., Growth kinetics of mycelial colonies and aggregates of ascomycetes, 97(5) (1993) 513–528.
94. Moore, D., Robson, G. D., P. J. Trinci, A., *Whole organism biotechnology, 21st Century Guidebook to Fungi*, Second edition, (2011).
95. Paul K Herman. Stationary phase in yeast, 5(6) (2002) 0–607.
96. Jung, M. R., Horgen, F. D., Orski, S. V., Rodriguez, C. V., Beers, K. L., Balazs, G. H., Jones, T. T., Work, T. M., Brignac, K. C., Royer, S.-J., Hyrenbach, K. D., Jensen, B. A., Lynch, J. M., Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms, *Marine Pollution Bulletin*, 127 (2018) 704–716.

97. Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., Ragadhita, R., How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material, Indonesian Journal of Science & Technology, 4(1) (2019) 97-118.
98. [https://chem.libretexts.org/Courses/Purdue/Purdue%3A_Chem_26505%3A_Organic_Chemistry_I_\(Lipton\)/Chapter_1._Electronic_Structure_and_Chemical_Bonding/1.10%3A_Pi_Conjugation](https://chem.libretexts.org/Courses/Purdue/Purdue%3A_Chem_26505%3A_Organic_Chemistry_I_(Lipton)/Chapter_1._Electronic_Structure_and_Chemical_Bonding/1.10%3A_Pi_Conjugation) (pristup 20. 6. 2022.)
99. Lvab, Y., Liua, J., Luoa, Z., Wanga, H., Wei, Z., Construction of chain segment structure models, and effects on the initial stage of the thermal degradation of poly(vinyl chloride), RSC Adv., 7, (2017) 37268-37275.
100. Webb, J. S., Nixon, M., Eastwood, I. M., Greenhalgh, M., Robson, G. D., Handley, P. S., Fungal Colonization and Biodeterioration of Plasticized Polyvinyl Chloride, Applied and Environmental Microbiology, 66(8) (2000) 3194–3200.
101. Giacomucci, L., Raddadi, N. Soccio, M., Lotti, N., Fava, F., Biodegradation of polyvinyl chloride plastic films by enriched anaerobic marine consortia. Marine Environmental Research, 158 (2020) 104949.
102. Zhe, Z., Peng, H., Yang, D., Zhang, G., Zhang, J., Ju, F., Polyvinyl Chloride Degradation by *Intestinal Klebsiella* of Pest larvae, Biorxiv, (2021)
103. Geyer, K.M., Kyker-Snowman, E., Grandy, A.S. et al. Microbial carbon use efficiency: accounting for population, community, and ecosystem-scale controls over the fate of metabolized organic matter, Biogeochemistry, 127 (2016) 173–188.
104. Bisutti, I., Hilke, I., Raessler, M., Determination of total organic carbon – an overview of current methods, TrAC 23 (2004) 10 – 11.
105. Kratofil Krehula, Lj., Degradacija i modifikacija polimera, 4. Predavanje: Modifikacija polimera, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016/2017.
106. Li, J., Zhang, K., Zhang, H., Adsorption of antibiotics on microplastics, Environmental Pollution 237 (2018) 460–467.
107. LC-MS Contaminants: Avoid, identify, minimize, Merck
108. <https://www.webmd.com/vitamins-and-supplements/dmsso-uses-and-risks> (pristup 10. 6. 2022.)
109. <https://zenodo.org/record/2658140#.Yq278XZBxPY> (pristup 10. 6. 2022.)
110. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2010.1837> (pristup 10. 6. 2022.)

111. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Didecyldimethylammonium-chloride#section=Uses> (pristup 10. 6. 2022.)
112. Wenande, E., Garvey, L. H., Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review, *Clinical and Experimental Allergy* 46(7) (2016) 907–22.
113. Xie, M., Liu, X., Li, H., Influence of poly(ethylene glycol)-containing additives on extrusion of ultrahigh molecular weight polyethylene/polypropylene blend., 100(2) (2006) 1282–1288.
114. <http://polymerdatabase.com/Polymer%20Brands/Polyethers.html> (pristup 6. 6. 2022.)
115. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557652/> (pristup 6. 6. 2022.)
116. <https://www.industrialchemicals.gov.au/sites/default/files/Diisooctyl%20phthalate%20DIOP.pdf> (pristup 6. 6. 2022.)
117. Wadey, B. L., *Encyclopedia of Physical Science and Technology, Plasticizers*, 16 (2004) 441–456.
118. Gilbert, M., *Brydson's Plastics Materials*, (2017) 75-102.
119. <https://info.gbiosciences.com/blog/whats-the-difference-between-tween-20-and-tween-80> (pristup 6. 6. 2022)
120. Park, E. J., Lee, S. Y., Canlier, A., & Hwang, T. S., Controlled Dehydrochlorination of Poly(vinyl chloride) for Fabrication of Membranes with Polyacetylene-Like Structure: XPS Analysis and Ion Exchange Membrane Discussion. *Macromolecular Research*, (2018).
121. Halmi, M.I.E, Shukor, M.S. Johari, W.L.W., Shukor, M.Y., Mathematical modelling of the degradation kinetics of *Bacillus cereus* grown on phenol, *Journal of Environmental Bioremediation and toxicology*, 2(1) (2014) 1-5.
122. Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J.H., Abu-Omar, M., Scott, S.L., Suh, S., Degradation rates of plastics in the environment, *ACS Sustain. Chem. Eng* 8 (2020) 3494–3511.
123. Baldera-Moreno, Y., Pino, V., Farres, A., Banerjee, A., Gordillo, F., Andler, R., *Biotechnological Aspects and Mathematical Modeling of the Biodegradation of Plastics under Controlled Conditions*, *Polymers (Basel)*, 14(3) (2022) 375.

Sažetak

Autorice: Marija Kuštro i Dubravka Tavra

Primjena kvasca *Candida parapsilosis* u bioremedijaciji vode onečišćene mikroplastičnim česticama poli(vinil-klorida) i određivanje optimalnih uvjeta biorazgradnje

Biorazgradnja mikroplastike (MP) postala je jedna od glavnih briga znanstvenika zbog kontinuiranog nakupljanja u svim sastavnicama okoliša. Mikroorganizmi koji se koriste u bioremedijaciji vode onečišćene MP-om izolirani su iz okoliša s ciljem oponašanja okolišnih uvjeta. MP-e su čestice manje od 5 mm i imaju toksičan učinak na abiotičke i biotičke sastavnice okoliša. U ovom radu ispitivana je biorazgradnja polistirena (PS) i poli(vinil-klorida) (PVC) primjenom pet kvasaca, *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. i *Candida parapsilosis*. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti najučinkovitiji kvasac za biorazgradnju MP-a te ispitati optimalne uvjete biorazgradnje PVC-a primjenom dizajna punog faktorskog plana. Utvrđeno je da je *Candida parapsilosis* najučinkovitije biorazgradila PVC. U cilju određivanja optimalnih uvjeta procesa ispitala su se tri pokazatelja, broj okretaja u minuti, optička gustoća (OG) i pH – vrijednost. Tijekom 30 dana provedbe pokusa biorazgradnje, pratile su se promjene OG-a, te ukupni broj izraslih kolonija kvasca (CFU). Kako bi se proces biorazgradnje bolje opisao, odredile su se i vrijednosti ukupnog (TC), organskog (TOC) i anorganskog (TIC) ugljika, otpušteni aditivi s MP-a primjenom HPLC/MS analize, strukturne promjene te novonastale funkcionalne skupine PVC-a (FTIR-ATR analiza). Naposljetku odredila se toksičnost filtrata primjenom bakterije *Vibrio fischeri*. Eksperimentalni rezultati obrađeni su korištenjem statističke analize varijance (ANOVA). Rezultati pokusa ukazuju da su optimalni uvjeti za biorazgradnju PVC-a kvascem *Candida parapsilosis* postignuti pri manjim okretajima u minuti i većoj OG.

Ključne riječi: mikroplastika, biorazgradnja, *Candida parapsilosis*, puni faktorski plan, optimalni uvjeti

Abstract

Author's: Marija Kuštro and Dubravka Tavra

Application of yeast *Candida parapsilosis* in bioremediation of water polluted with microplastic particles of poly(vinyl chloride) and determination of optimal biodegradation conditions

Biodegradation of microplastics (MP) has become one of the main concerns of scientists, as it continuously accumulates in all components of the environment. Microorganisms used for bioremediation of water polluted with MP have been isolated from the environment to mimic environmental conditions. MP are particles smaller than 5 mm that have toxic effects on abiotic and biotic components of the environment. In this paper, the biodegradation of polystyrene (PS) and poly(vinyl chloride) (PVC) was studied using five yeasts: *Rhodotorula glutinis*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon* sp. and *Candida parapsilosis*. The objective of this study was to determine the most efficient yeast for biodegradation of MP and to investigate the optimal conditions for biodegradation of PVC by applying a full factorial design. *Candida parapsilosis* was found to be the most efficient yeast for biodegradation of PVC. To determine the optimal process conditions, three parameters were studied: the number of revolutions per minute, optical density (OG) and pH. During the 30-day biodegradation experiment period, the changes of OG and the total number of grown yeast colonies (CFU) were monitored. To better describe the biodegradation process, the concentration of total carbon (TC), organic carbon (TOC) and inorganic carbon (TIC), the released additives of MP (HPLC/MS analysis) and the structural changes of PVC (FTIR-ATR analysis) were monitored. Finally, the toxicity of the filtrate with *Vibrio fischeri* was determined. The experimental results were evaluated by statistical analysis of variance (ANOVA). The experimental results show that the optimal conditions for biodegradation of PVC by the yeast *Candida parapsilosis* were achieved at lower rpm and higher OG.

Key words: microplastics, biodegradation, *Candida parapsilosis*, full factorial plan, optimal conditions

Životopis

Marija Kuštro rođena je u Zagrebu, 27. studenog 1998. godine. Godine 2013. završila je osnovnu školu Ivane Brlić Mažuranić u Prigorju Brdovečkom te je nakon toga upisala strukovnu školu „Prirodoslovna škola Vladimira Preloga“ te je stekla strukovno zanimanje ekološki tehničar. Nakon završetka srednje škole, upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, preddiplomski studij Ekoinženjerstvo. Stručnu studentsku praksu na 3. godini preddiplomskog studija odradila je u tvrtki Messer Croatia Plin d.o.o. (Zaprešić). Završni rad radila je u Zavodu za industrijsku ekologiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Dajane Kučić Grgić na temu „Utjecaj veličine čestica mikroplastike na toksičnost mikroalge *Scenedesmus* sp.“ kojeg je obranila 2021. godine te stekla naziv sveučilišne prvostupnice inženjerske ekoinženjerstva. Po završetku preddiplomskog studija, 2021. godine upisala je diplomski studij Ekoinženjerstvo na istoimenom Fakultetu. Od 2020. godine je članica Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa te svojim doprinosom sudjeluje u organizaciji projekata (Boje inženjerstva, Eko globus, Žene u znanosti, *Innovation for you*, Zdrastveni rizici pri radu s kemikalijama, Reaktor ideja). Bila je voditeljica projekta *Business week* 2022. te sudjelovala u organizaciji Dana karijera na FKIT-u u sklopu CeSaR projekta, 2021. i 2022. godine. Aktivno sudjeluje na stručnim skupovima i konferencijama (SiSB – Simpozij studenata bioloških usmjerenja, 27. HSKIKI - Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 3. ZORH – Zaštita okoliša u Republici Hrvatskoj, Tehnologijada 2022. sa znanstvenim radom). Svojim radom doprinosi znanstvenim istraživanjima koji se provode u Zavodu za industrijsku ekologiju.

Dubravka Tavra rođena je u Zagrebu, 8. kolovoza 1998. godine. Godine 2013. završila je osnovnu školu Sesevski Kraljevec te je nakon toga upisala prirodoslovno-matematički smjer u 3. gimnaziji u Zagrebu. Po završetku srednje škole upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, preddiplomski studij Ekoinženjerstvo. Godine 2021. obranila je završni rad na temu „Primjena slatkovodne mikroalge *Scenedesmus* sp. za određivanje toksičnosti mikroplastičnih čestica polipropilena“ te je stekla naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke ekoinženjerstva. Od 2019. godine članica je Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa te aktivno sudjeluje u projektima Studentske sekcije i Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije poput „1. konferencija o europskoj tranziciji čiste energije“ i „Dan karijera na FKIT-u“ 2021. i 2022. godine. Od 2020. godine obnaša dužnost glavne urednice znanstveno popularnog časopisa Reaktor ideja.

U slobodno vrijeme volontira te je kao volonter sudjelovala na 27. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera (HSKIKI). Aktivno sudjeluje na stručnim skupovima i konferencijama (SiSB – Simpozij studenata bioloških usmjerenja, 27. HSKIKI - Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 3. ZORH – Zaštita okoliša u Republici Hrvatskoj). Svojim radom doprinosi znanstvenim istraživanjima koji se provode u Zavodu za industrijsku ekologiju.