

Primjena kvasca u biorazgradnji mikročestica polistirena i poli(vinil-klorida)

Krajnik, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:999538>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Petra Krajnik

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja **Petra Krajnik**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 13. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Šime Ukić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije
Doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije
Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 18. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Petra Krajnik

**PRIMJENA KVASCA U BIORAZGRADNJI MIKROČESTICA
POLISTIRENA I POLI(VINIL-KLORIDA)**

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Šime Ukić
2. doc. dr. sc. Matija Cvetnić
3. izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, rujan 2023.



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

Zahvala

Zahvaljujem se mentoru, prof. dr. sc. Šimi Ukiću, na savjetima prilikom pisanja ovog rada.

Veliko hvala asistentici Kristini Bule Možar, mag. ing. oecoing., na uloženom trudu, motivaciji, pomoći i savjetima koji su mi uvelike olakšali provedbu i pisanje ovog rada.

Najveće hvala mojoj obitelji, dečku Marku, baki, djedu i sestrični Martini na velikoj podršci, razumijevanju i vjeri u mene. Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima na omogućenom bezbrižnom školovanju i studiranju, razumijevanju i bezuvjetnoj ljubavi koju su mi pružili u svakom trenutku mog školovanja i bilo kojoj životnoj situaciji. Hvala vam za sve.

SAŽETAK

Masovna proizvodnja, stalna uporaba i nepropisno zbrinjavanje plastičnih proizvoda rezultiraju sve znatnijim onečišćenjem okoliša. Veće plastične čestice postupno se razgrađuju u okolišu na manje čestice od kojih se one sitnije od 5 mm nazivaju mikroplastikom (MP). Iako glavina komercijalne plastike još uvijek otpada na polimere koji su postojani u okolišu i nisu skloni biorazgradnji, identificiran je niz mikrobnih sojeva s potencijalom biorazgradnje MP-a u prirodnom okolišu. Mikroorganizmi, kao što su bakterije, gljivice ili alge, nalaze se posvuda u prirodi i sposobni su prilagoditi se različitim uvjetima okoliša, pa nije čudno što neki od njih mogu razgrađivati i plastične polimere.

U ovom radu ispitala se biorazgradnja predtretiranih mikročestica polistirena i poli(vinil-klorida) primjenom okolišno prisutnog kvasca *Candida parapsilosis* s ciljem određivanja optimalnih uvjeta procesa biorazgradnje. MP se karakterizirala FTIR-ATR spektroskopijom, a tijekom eksperimenta određivao se broj živih stanica kvasca (CFU) koji se zatim koristio kao odziv pri određivanju optimalnih uvjeta biorazgradnje. Eksperimenti su provedeni prema potpunom faktorskom dizajnu pri čemu se ispitao utjecaj pH, optičke gustoće i broj okretaja tresilice; svaki od ovih faktora ispitan je na tri razine. Uz određivanje CFU, provedene su i TOC i HPLC/MS analize. Na kraju, ispitana je toksičnost profiltrirane otopine nakon procesa biorazgradnje primjenom bakterije *Vibrio fischeri*.

Ključne riječi: mikroplastika, polistiren, poli(vinil-klorid), biorazgradnja, *Candida parapsilosis*

ABSTRACT

Mass production, constant use, and improper disposal of plastic products are leading to ever-increasing environmental pollution. Larger plastic particles gradually break down in the environment into smaller particles, of which those smaller than 5 mm are called microplastics (MP). The main commercial plastics are stable in the environment and cannot be biodegraded, but a number of microbial strains have been identified that have the potential to biodegrade MP in the natural environment. Microorganisms such as bacteria, fungi or algae are found everywhere in nature and are able to adapt to different environmental conditions, so it is not surprising that some of them can also degrade plastic polymers.

In this work, the biodegradation of pretreated microparticles of polystyrene and poly(vinyl chloride) was investigated using the environmentally occurring yeast *Candida parapsilosis* to determine the optimal conditions for the biodegradation process. MP was characterized by FTIR-ATR spectroscopy, and the number of live yeast cells (CFU) was determined during the experiment, which was then used as a response in determining the optimal biodegradation conditions. The experiments were performed according to a full factorial experimental design in which the influence of pH, optical density, and the rpm of the shaker were studied; each of these factors was investigated in three stages. In addition to the determination of CFU, TOC and HPLC/MS analyzes were also performed. Finally, the toxicity of the filtered solution after the biodegradation process was tested with the bacterium *Vibrio fischeri*.

Key words: microplastics, polystyrene, poly(vinyl-chloride), biodegradation, *Candida parapsilosis*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Plastika.....	2
2.1.1. Vrste plastike	2
2.1.1.1. Poli(vinil-klorid).....	3
2.1.1.2. Polistiren.....	5
2.2. Mikroplastika	6
2.2.1. Svojstva mikroplastike	7
2.2.2. Aditivi u mikroplastici	7
2.2.3. Mikroplastika u okolišu.....	9
2.2.4. Toksični utjecaj mikroplastike na organizme.....	10
2.3. Postupci uklanjanja mikroplastike iz okoliša	12
2.3.1. Napredni oksidacijski procesi	15
2.3.2. Biorazgradnja mikroplastike	17
2.3.3. Biorazgradnja primjenom kvasaca	19
2.3.3.1. <i>Candida parapsilosis</i>	19
2.4. Testovi toksičnosti.....	20
2.4.1. Test toksičnosti s bakterijom <i>Vibrio fischeri</i>	21
2.5. Statističko planiranje eksperimenta	22
2.5.1. Potpuni faktorski plan	23
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	25
3.1. Materijali	25
3.1.1. Mikroplastika	25
3.1.2. Kvasac <i>Candida parapsilosis</i>	25
3.1.3. Kemikalije	26
3.2. Mjerni instrumenti i oprema.....	27
3.3. Metode rada.....	28
3.3.1. Priprema mikroplastike	28
3.3.2. Predtretman mikroplastike	29

3.3.3. Provođenje sterilizacije mikroplastike	29
3.3.4. Preduzgoj kvasca.....	29
3.3.5. Provedena mjerenja tijekom eksperimenta biorazgradnje	30
3.3.5.1. FTIR-ATR spektroskopija.....	30
3.3.5.2. Određivanje CFU vrijednosti	31
3.3.5.3. TOC analiza.....	32
3.3.5.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	33
3.3.5.5. Mikroskopska analiza kvasca <i>Candida parapsilosis</i>	33
3.3.5.6. Određivanje toksičnosti filtrata	33
3.4. Priprema baždarnog dijagrama.....	34
3.5. Određivanje optimalnih uvjeta biorazgradnje	35
 4. REZULTATI.....	37
4.1. Baždarni dijagram za <i>Candidu parapsilosis</i>	37
4.1.1. FTIR-ATR spektroskopija mikroplastike prije biorazgradnje	37
4.1.2. Dizajn eksperimenta i statistička analiza	39
4.2. Rezultati dobiveni pri optimalnim uvjetima biorazgradnje.....	43
4.2.1. Praćenje CFU vrijednosti	43
4.2.2. FTIR-ATR spektroskopija.....	44
4.2.3. TOC analiza.....	45
4.2.4. HPLC/MS analiza.....	46
4.2.5. Mikroskopska analiza kvasca <i>Candida parapsilosis</i>	48
4.2.6. Određivanje toksičnosti filtrata bakterijom <i>Vibrio fischeri</i>	49
 5. RASPRAVA.....	51
5.1. FTIR-ATR spektroskopija mikroplastike prije biorazgradnje	51
5.1.2. Dizajn eksperimenta i statistička analiza	52
5.2. Optimalni uvjeti biorazgradnje.....	54
5.2.1. Logaritamska promjena CFU	54
5.2.2. FTIR-ATR spektroskopija.....	55
5.2.3. TOC analiza.....	55
5.2.4. HPLC/MS analiza.....	57
5.2.5. Mikroskopska analiza kvasca <i>Candida parapsilosis</i>	58
5.2.6. Određivanje toksičnosti filtrata	58

6. ZAKLJUČAK	60
7. LITERATURA.....	61
Životopis.....	68

1. UVOD

Plastični otpad ekološki je problem koji izaziva veliku zabrinutost čovječanstva.[1] Razlog tome je neadekvatno zbrinjavanje plastičnog otpada. Nepravilno upravljanje i odlaganje plastičnog otpada rezultiralo je sveprisutnošću plastike u cijeloj biosferi.[2] Osim problema koje veliki komadi plastike stvaraju za okoliš i ljude, javlja se zabrinutost oko manjih plastičnih čestica koje mogu poslužiti kao sredstvo za potencijalnu kolonizaciju patogena i apsorbirati postojeće organske onečišćujuće tvari te biti nositelj gena otpornosti na antibiotike. U konačnici manje čestice predstavlja gotovo nevidljivu, ali veliku prijetnju živim organizmima te je to postupno postao globalni problem koji izaziva široku pozornost kako u zaštiti okoliša tako i u javnom zdravlju.[3] Mikroplastika (MP) su plastične čestice ili ostaci plastike veličine manje od 5 mm, koje najčešće nastaju razgradnjom većih komada plastike. Unatoč tome što se MP djelomično uklanja procesima obrade otpadnih voda, veliki broj čestica MP-a ipak dospijeva u okoliš i to najčešće rijekama koje se ispuštaju zajedno s pročišćenom otpadnom vodom u mora i oceane.[4] MP se u različitim sastavnicama okoliša može otkriti raznim tehnikama, kao što su mikroskopska analiza, odvajanje gustoćom i infracrvena spektrometrija s Fourierovom transformacijom. Najpoznatije vrste MP-a, nazvane sintetskim polimerima, koje su prisutne u okolišu su: polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), poli(vinil-klorid) (PVC), poliamid (PA, npr. najlon), poliester (PES) i akril (AC).[6] MP kao i ostale plastične čestice sadrže plastifikatore, kemikalije i druge aditive koje ih čine otpornima na različite procese razgradnje. Zbog toga klasične metode obrade voda i tla nisu dovoljno učinkovite za uklanjanje MP-a iz okoliša.[5] Povećano nakupljanje MP-a ili čak nanoplastičnih čestica u vodenom, kopnenom i atmosferskom okolišu ima značajan utjecaj na život u vodi i na kopnu.[3] MP svojim svojstvima negativno utječe na žive organizme, a toksičnost se povećava sa smanjenjem veličine čestica. Javlja se potreba za pronalaskom učinkovitijih te ekološki i ekonomski prihvatljivijih metoda za uklanjanje MP-a iz okoliša. U posljednje vrijeme, ispituju se sve češće napredni oksidacijski procesi (eng. *advanced oxidation processes*, AOP) i biorazgradnja. S obzirom da niti jedan proces nije učinkovit u potpunosti, razmatra se i kombinacija ovih procesa. AOP-i se smatraju dobrim predtretmanom biorazgradnji MP-a jer razarajući površinu plastike pospješuju kasniju kolonizaciju mikroorganizma te time i učinkovitost procesa biorazgradnje.[7]

U ovom radu ispitana je biorazgradnja PS i PVC mikročestica kulturom kvasca *Candida parapsilosis*. Cilj rada bio je odrediti optimalne uvjete procesa biorazgradnje.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Plastika

Plastika je polimerni materijal koji ima sposobnost prelijevanja i/ili oblikovanja, obično primjenom topline i uz odgovarajući tlak. Plastika se odlikuje dobrim svojstvima, a posebno je važno svojstvo plastičnosti, koje se često nalazi u kombinaciji s drugim svojstvima kao što su niska gustoća, niska električna vodljivost, prozirnost i žilavost. Navedena svojstva omogućuju izradu i proizvodnju raznih proizvoda od plastike.[8] To primjerice uključuje čvrste i lagane boce za piće od polietilen tereftalata (PET), savitljiva vrtna crijeva od PVC-a, izolacijske posude za hranu od pjenastog PS-a i prozore otporne na udarce izrađene od poli(metil-metakrilata) (PMMA). Plastika je sintetski polimer poznata potrošačima po svojim kraticama ili trgovačkim nazivima. Tako su primjerice, pjenasti PS i PMMA poznati pod svojim zaštićenim imenima, stiropor i pleksiglas. Plastika se može podijeliti u dvije različite kategorije na temelju kemijskog sastava. Jedna kategorija je plastika koja se sastoji od polimera koji imaju samo alifatske (linearne) ugljikove atome u svojim glavnim lancima, dok drugu kategoriju plastike čine heterolančani polimeri. Heterolančani polimeri sadrže atome kao što su kisik, dušik ili sumpor u svojim glavnim lancima, uz ugljik. Većina navedene inženjerske plastike sastoji se od heterolančanih polimera.[8] Plastika se najčešće proizvodi procesom polimerizacije.[9] Najčešće se plastične smole isporučuju proizvođaču kao cilindrične kuglice (promjera nekoliko milimetara) ili u obliku pahuljica i praha. Ostali oblici uključuju viskozne tekućine, otopine i suspenzije. Sve vrste plastike su gotovo nerazgradive u okolišu što stvara veliki problem za čovječanstvo. Ipak, neki znanstvenici i ekolozi u biorazgradivoj i fotorazgradivoj plastici vide rješenje problema otpadne plastike. Bioplastika je razvijena, ali zbog visokih troškova proizvodnje i problema stabilnosti tijekom obrade i upotrebe ne koristi se u velikim razmjerima.[9] Osim kemijskog sastava, plastika se dijeli prema vrsti, obliku, podrijetlu i veličini čestica.[10]

2.1.1. Vrste plastike

Plastika je jedna od najvećih inovacija 20. stoljeća i sveprisutan je materijal. Zbog proizvodnih procesa, komunalnog krutog plastičnog otpada i uslužnih djelatnosti stvara se ogromna količina otpadnog materijala. Zadnjih nekoliko godina može se primijetiti značajan rast potrošnje plastike diljem svijeta.[11]

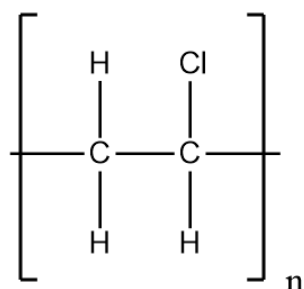
Međutim, nije sva plastika jednaka. Proizvođači koriste niz različitih plastičnih materijala i spojeva od kojih svaki ima jedinstvena svojstva. Najpoznatije i najčešće korištene vrste plastika su: PMMA, polikarbonat (PC), PE, PP, PET, PVC, PS i akrilonitril-butadienstiren (ABS) koje su uglavnom dobivene iz fosilnih goriva poput nafte, prirodnog plina i ugljena koji se koriste u petrokemijskoj industriji.[12] Spomenute vrste plastika prisutne su u svakom aspektu modernog svakodnevnog života, od mikročipova u računalima do vrećica koje se koriste za kupovinu. Glavni razlog svestranosti plastike je upravo taj što plastika zapravo nije samo jedan materijal, već skupina materijala koja se kombinira tijekom proizvodnje kako bi se dobila željena svojstva konačnog produkta.[13] U tablici 1 prikazane su najčešće korištene vrste plastika i njihova upotreba u svakodnevnom životu.[14]

Tablica 1. Vrste plastika i njihova upotreba u svakodnevnom životu.[14]

VRSTA PLASTIKE	UPOTREBA
PVC	folija za hranu, omoti za slatkiše
PS	igračke, ambalaža za CD-e
PP	igračke, bijela tehnika
PET	boce za sokove, vodu, ulje
PE	vrećice za kupovinu, ambalaža za pakiranje

2.1.1.1. Poli(vinil-klorid)

Plastični polimeri jedni su od najvažnijih materijala na bazi nafte i daju veliki doprinos modernom društvu. Kao druga najčešće korištena plastika opće namjene nakon PE-a je upravo PVC.[15]

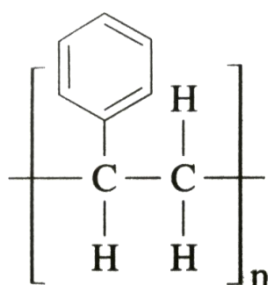


Slika 1. Prikaz strukture PVC-a.[17]

PVC je vrsta termoplastičnog polimera koji trenutno obuhvaća mnoge aspekte života svojom širokom upotrebom i postao je univerzalni polimer. PVC je fleksibilan ili kruti materijal koji je kemijski nereaktivan. PVC nastaje polimerizacijom vinil-klorida, a kemijska formula mu glasi $(-\text{CH}_2-\text{CHCl}-)_n$ (slika 1). PVC se proizvodi u tri koraka koristeći sol, naftu ili prirodni plin u omjeru od 57% klora prema 43% ugljika.[16] Klor se zatim kombinira s etilenom da se dobije etilen diklorid. Drugi korak u procesu polimerizacije PVC-a uključuje taljenje etilen diklorida na vrlo visokoj temperaturi u peći ili reaktoru kako bi se nakon oksikloriranja formirao monomer vinil klorida. Treći korak uključuje aditivnu polimerizaciju. U ovom koraku otvaraju se dvostruke veze kako bi se omogućilo susjednim molekulama da tvore dugolančane molekule.[16] Čvrsti PVC lako se obrađuje, toplinski oblikuje i zavaruje. PVC se također može strojno obrađivati pomoću standardnih alata za obradu metala i bez većih poteškoća dovesti do završnog proizvoda. PVC smole obično se miješaju s drugim aditivima kao što su modifikatori udarca i stabilizatori kako bi se dobili materijali na bazi PVC-a s različitim tehničkim svojstvima. PVC se može i reciklirati ako nije identificiran kao opasni otpad.[16] Velik broj plastifikatora koristi se pri proizvodnji PVC-a za smanjenje krutosti, a najčešća skupina su ftalati, posebno di(2-etilheksil) ftalat (DEHP). Ponekad se naziva dioktil ftalat ili skraćeno DOP. Navedeni plastifikatori se ugrađuju u strukturu PVC-a u količinama u rasponu od 40% do 65%.[17] Postoje mnogi drugi plastifikatori koji se koriste u medicini. Stabilizatori topline obično se koriste u medicinskom PVC-u kako bi ga zaštitili ne samo od visokih temperatura koje smola može osjetiti tijekom obrade, već i od visoke topline s kojom se može susresti tijekom skladištenja ili autoklaviranja. Aditivi poput barij-cink vrlo su učinkoviti stabilizatori topline za PVC, ali su u nekim zemljama ograničeni za medicinsku primjenu. Alternative poput formulacija kalcija i cinka često se koriste za stabilizaciju PVC-a medicinske kvalitete. Toplinski stabilizatori zadržavaju klorovodik koji nastaje kada se PVC raspada na visokim temperaturama. Time se sprječava promjena boje i razgradnja. Čvrsti PVC može sadržavati do 15% težine toplinskih stabilizatora.[17] Drugi aditiv, Tinuvin[®] P, 2-(2H-benzotriazol-2-il)-*p*-krezol, koristi se za osiguranje stabilnosti od izlaganja UV svjetlu. PVC ima široku paletu primjena, od velikih građevinskih proizvoda do jednostavne izolacije i premaza za električne žice. PVC ima veliku površinu, vrhunsku fizikalno-kemijsku stabilnost, osobito u bazičnim medijima, te koncentriranim kiselim i organskim otapalima tijekom određenog vremenskog razdoblja. Osim toga, površina PVC-a može se prilagoditi sorbensom kako bi se postiglo reverzibilno i učinkovito obogaćivanje metalnih iona.[17]

2.1.1.2. Polistiren

PS je polimer sastavljen od monomera stirena, tekućeg aromatskog ugljikovodika koji se komercijalno proizvodi iz nafte. Na sobnoj temperaturi, PS je obično čvrsti termoplast, ali se može rastopiti na višim temperaturama za oblikovanje ili ekstruzijom, a zatim ponovno skrutiti. PS je prvi proizveo BASF 1930-ih i od tada se koristi u brojnim plastičnim proizvodima. PS se lako proizvodi polimerizacijom stirena uz upotrebu inicijatora slobodnih radikala. Stiren sa ili bez razrjeđivača miješa se s inicijatorom slobodnih radikala poput dibenzoil peroksida i zagrijava do temperature od 120 °C. Nekoliko faza polimerizacije rezultira polimerom otopljenim u monomeru ili otopini razrjeđivača. Neizreagirani monomer i razrjeđivač ispare pod vakuumom dajući PS visoke molekularne težine. S druge strane, PS visoke otpornosti proizvodi se dodavanjem gume poput polibutadiena tijekom polimerizacije. Tijekom polimerizacije, polibutadien se inkapsulira u PS. Također može se dogoditi cijepjenje i djelomično umrežavanje butadiena što utječe na svojstva konačnog polimera. PS je dugolančani ugljikovodik s izmjeničnim ugljikovim centrima povezanim s fenilnim skupinama (derivat benzena). Kemijska formula PS-a je $(C_8H_8)_n$ (slika 2).[18]



Slika 2. Prikaz strukture PS-a.[19]

Najčešći oblik PS-a koji se koristi u industriji je ekspanzirani PS, koji je mješavina od oko 5% PS-a i 95% zraka. Ovo je lagani materijal u kojem šupljine ispunjene zarobljenim zrakom daju ekspanziranom PS-u nisku toplinsku vodljivost. PS se koristi kao izolator u građevinskim konstrukcijama, a za arhitektonske i inženjerske primjene može se ekstrudirati u oblike standardnih poprečnih presjeka ili u ploče s različitim uzorcima. Ekspanzirani PS prije je sadržavao klorofluorouglikove, ali sada se koriste druga, ekološki sigurnija sredstva za ekspanziranje. PS nije otporan na aromatska, alifatska i klorirana organska otapala, cikličke etere, ketone, kiseline i baze. PS je umjereno otporan na alifatske alkohole veće molekularne težine, razrijeđene vodene otopine kiselina i baza te izbjeljivače. Otporan je na alkohole male molekularne težine, etilen oksid, oksidirajuća i dezinfekcijska sredstva.

Nadalje, PS može biti kopolimeriziran ili pomiješan s drugim polimerima, kako bi se dobila bolja tvrdoća i krutost za proizvodnju plastičnih i gumenih proizvoda. [18] Budući da čvrsti PS nije iznimno fleksibilan, može se koristiti i za izolaciju koaksijalnog kabela, ali u obliku namotane trake ili perle.[20]

2.2. Mikroplastika

Osim prema vrsti, plastika se dijeli i prema veličini čestica na nanoplastiku, mikroplastiku i makroplastiku, koja se pak dijeli na mezoplastiku i megaplastiku. Tablica 2 prikazuje raspon veličina čestica sukladan navedenoj podjeli.

Tablica 2. Podjela plastike prema veličini čestica. [21]

TIP PLASTIKE		RASPON VELIČINE ČESTICA
Nanoplastika		0,001 μm – 0,1 μm
Mikroplastika		0,1 μm – 5 mm
Makroplastika	Mezoplastika	5 mm – 5 cm
	Megaplastika	> 5 cm

MP se službeno definira kao plastika promjera manjeg od 5 mm. Postoje dvije kategorije: primarna i sekundarna MP. Primarna MP dizajnirana je za komercijalnu upotrebu, kao primjerice u tekstilnoj industriji gdje se plastična mikrovlakna koriste u proizvodnji odjeće. Sekundarna MP nastaje razgradnjom većih plastičnih predmeta, poput plastičnih boca za piće, vrećica, jednokratnog pribora za jelo i slično. Uslijed djelovanja čimbenika iz okoliša, uglavnom sunčevog zračenja i valova dolazi do razgradnje većih plastičnih predmeta pri čemu nastaje MP. Budući je vrlo otporna na razgradnju, može se zadržati u okolišu stotinama ili tisućama godina. U vodenim ekosustavima morske životinje često konzumiraju prisutnu MP misleći da je hrana. Stoga ne čudi da je MP otkrivena u morskim organizmima od planktona do kitova, pa tako i u komercijalnoj morskoj hrani. Zabrinjavajuće je da standardni uređaji za pročišćavanje voda ne mogu ukloniti MP u potpunosti. Da bi se stvari dodatno pogoršale, MP u vodenom mediju može na sebe vezati razne štetne tvari čime postaje još opasniji po organizme. Dokazano je da MP izaziva brojne štetne učinke na žive organizme, ali još uvijek nije poznato u kojoj koncentraciji je opasna za ljude.

Usprkos tome, mnoge zemlje poduzimaju mjere za smanjenje MP-a u okolišu.[22] Prema tome, neophodno je usvojiti globalnu klasifikaciju kategorija razreda veličina i drugih osnovnih parametara MP-a kako bi se time olakšala usporedba rezultata sadašnjih i budućih istraživanja.[21]

2.2.1. Svojstva mikroplastike

MP posjeduje određena fizička i kemijska svojstva. Fizička svojstva uključuju raspodjelu veličine MP-a te gustoću, oblik i boju.[23] Kemijska svojstva važna su pri istraživanju sastava MP-a te se određuju pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR), Raman spektroskopijom, pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) ili plinskom kromatografiju uz spektrometriju masa (GC/MS). Međutim, MP je u okolišu izložena djelovanju Sunčevog zračenju i oksidaciji, što dovodi do njezine razgradnje odnosno promjene fizičkih i kemijskih svojstava poput boje, morfološke površine, kristalne strukture, veličine čestica i gustoće.[24] MP uglavnom ima manju gustoću od vode i nije biološki razgradljiva, ali u vodenoj sredini mikroorganizmi je koloniziraju i stvaraju biofilm. Nastali biofilm ima važnu ulogu u raspodjeli MP-a u vodi jer povećava njezinu gustoću i zbog težine ona tone na dno gdje se istaloži na sediment. Sama gustoća MP-a, ali i kolonizacija mikroorganizama, utječu na njezinu raspodjelu kroz vodeni stupac zbog čega su zapravo svi vodeni organizmi od površine do sedimenta izloženi MP-u.

Nadalje, čestice MP-a imaju mali promjer, ali veliku aktivnu površinu i zbog toga na sebe vežu brojne onečišćujuće tvari, što uz već prisutne aditive čini MP još toksičnijom.[24]

2.2.2. Aditivi u mikroplastici

MP se proizvodi od složene kombinacije kemikalija, uključujući aditive koji joj daju čvrstoću i fleksibilnost. Aditivi koji se dodaju MP-u imaju brojne funkcije. Mogu se naći u tragovima (< 1%) ili kao glavne komponente (> 50%) i obično su ugrađeni u strukturu polimera.[25] MP-u se može dodati više aditiva, ovisno o njihovoj namjeni. Jedno istraživanje pokazalo je da bilo koji nasumično odabrani plastični proizvod sadrži oko 20-ak aditiva, što ukazuje na njihovu široku upotrebu.[25]

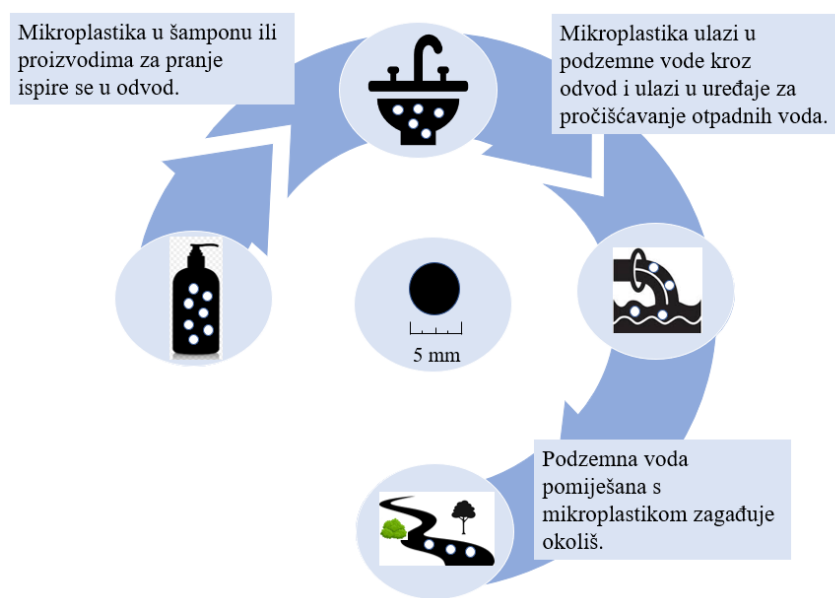
Zbog činjenice da su aditivi slabo vezani za MP, mogu se otpustiti prilikom njezine upotrebe ili prilikom odlaganja. Osim toga, aditivi povezani s plastičnim proizvodima nakon njihovog ispiranja, mogli bi se razgraditi i stvoriti toksične spojeve, potencijalno dospjeti u okoliš i (bio)akumulirati u bioti. Potencijalne opasnosti povezane s aditivima nastavljaju se tijekom životnog ciklusa MP-a. Budući da ih je teško ukloniti, kada se MP reciklira, vrlo je vjerojatno da će ti spojevi biti integrirani u novoproduzvedeni proizvod. Aditivi kao primjerice, bromirani usporivači gorenja, endokrini disruptori, ugrađeni su u reciklirane proizvode, uključujući kućanske predmete i igračke korištene u svakodnevnom životu što predstavlja značajan zdravstveni rizik. Vrste aditiva koji se pojavljuju u okolišu, bilo da su izolirani ili povezani s MP-om, uvelike ovise o svom izvoru. Iako je većina tih aditiva pronađena daleko od svojih izvora (npr. u morskim ekosustavima), procjena tih istih aditiva je izuzetno teška, budući da se većina ne koriste samo kao aditivi. Na primjer, bisfenol A se ne koristi samo u proizvodnji plastičnih boca, već je i ključna komponenta u proizvodnji termalnog papira i koristi se u proizvodnji konzerva za hranu. Također, bisfenol A je klasificiran kao ksenoestrogen zbog toga što pokazuje svojstva slična hormonima koja oponašaju učinke estrogena u tijelu. Bisfenol A je pronađen u uzorcima morske vode, sedimenta i atmosfere, gdje se njegova prisutnost povezuje s izgaranjem MP-a. Slično tome, perfluorirani spojevi (PFC), pokazuju svojstva otpornosti na vodu i ulje te se koriste u pakiranju hrane i za tekstil, i koji su postojani u okolišu, također su pronađeni u vodi, sedimentu, tlu i bioti, kao i u atmosferi.[25] Kemijske tvari, odnosno aditivi, dodani plastici imaju potencijal migrirati iz plastičnog materijala u okoliš (voda, tlo, hrana ili drugo), ali i unutar same plastike ili na površinu. U nekim slučajevima migracija je projektirana i poželjna, u skladu s željenom funkcijom materijala. Jedan takav primjer je postupno i kontinuirano otpuštanje sredstava za odvajanje kalupa na površinu što rezultira poboljšanim antistatičkim, mehaničkim, optičkim svojstvima ili sprječavanjem oksidacije srebra čime se produžuje vijek očuvanje hrane. S druge strane, u većini slučajeva, oslobađanje aditiva proizlazi iz nekontrolirane i neplanirane migracije koja može imati velike zdravstvene i ekološke posljedice. Općenito, migracija se može podijeliti na četiri segmenta: 1) difuzija kroz polimer; 2) desorpcija (s površine polimera); 3) sorpcija na granici plastika-matrica i 4) apsorpcija/disperzija na matrici. Brzina migracije određenih kemijskih tvari, kao što su plastični aditivi, ovisi o veličini. Obično će manje molekule, poput monomera, s nižim vrelištem, pokazati tendenciju brže migracije. Monomeri poput formaldehida, etilena, butadiena ili vinil klorida brže će migrirati čak i na sobnoj temperaturi.[25]

2.2.3. Mikroplastika u okolišu

Nakon što dospije u okoliš, MP se ne razgrađuje, već se akumulira u životinjama, uključujući ribe i školjkaše, i na taj način završava u ljudskoj prehrani. Kontinuirano i nekontrolirano ispuštanje MP-a u okoliš uzrokuje trajno onečišćenje ekosustava i prehrambenih lanaca. Istraživanja provedena u laboratoriju pokazala su da je izlaganje MP-u povezano s brojnim negativnim (eko)toksičnim i fizičkim učincima na žive organizme. Upravo zbog toga javlja se sve veća zabrinutost za okoliš i zdravlje ljudi te je nekoliko država članica Europske Unije (EU) donijelo ili predložilo zabranu ciljane uporabe MP-a u potrošačkim proizvodima na nacionalnoj razini. Zabrane se uglavnom odnose na mikrokuglice koje se koriste u kozmetici (deterdženti, proizvodi za „piling“ lica ili tijela, itd.) te se nakon uporabe ispiru u otpadne i/ili prirodne vode i na MP-u koja se upotrebljava kao abrazivno sredstvo i sredstvo za poliranje. Svake godine u okolišu završi oko 42 000 tona MP-a zbog upotrebe proizvoda koji ju sadržavaju. Jedan od najvećih izvora onečišćenja je granularni materijal koji se koristi za ispunu sportskih terena s umjetnom travom, iz kojeg se ispusti i do 16 000 tona MP-a. Osim toga, procjenjuje se da se u europske površinske vode godišnje ispusti oko 176 000 tona sekundarnog MP-a.[26] U okolišu se postupno povećava MP otpad u posljednjim desetljećima, u skladu s rastućom svjetskom proizvodnjom plastike, a očekuje se da će nastaviti rasti i u budućnosti. Istraživanje je pokazalo da je 2016. globalna godišnja proizvodnja plastičnih proizvoda iznosila otprilike 322 milijuna tona, od kojih se većina lako pretvara u MP. Osim toga, do 10% čestica MP-a završi u morskom okolišu zbog raširene upotrebe i rastuće proizvodnje proizvoda od MP-a, kao i zbog lošeg upravljanja plastičnim otpadom.[27] Stoga, MP predstavlja globalnu prijetnju zbog svoje raširene distribucije i ekoloških posljedica.

Očito je da će plastični i mikroplastični otpad vjerojatno u sve većoj mjeri ugroziti zdravlje ljudi i utjecati na gubitak bioraznolikosti uz smanjenje estetske vrijednosti vodenog i drugog okoliša.[27] Utvrđeno je da plodovi mora, med, sol, pivo, šećer također sadrže MP. Većina plastičnog otpada koji se nalazi u oceanima rezultat je ljudske aktivnosti, uključujući korištenje plastike i na kopnu. Na MP se gleda kao na sve veću opasnost i za kopnene ekosustave, pri čemu tlo potencijalno sadrži više MP-a nego more. MP koja se unese u tlo zadržava se, transportira, erodira, razgrađuje i ispušta u podzemne vode, što predstavlja značajnu štetu živim bićima i utječe na ljudsko zdravlje. Na nakupljanje tj. akumulaciju MP-a može utjecati biota tla. Sisavci na primjer, mogu konzumirati tj. progutati MP i pretvoriti ju u sitnije komadiće u svojim crijevima.

Sisavci koji kopaju, kao što su krtice, mogu slučajno doprinijeti prijenosu MP-a. Akumulacija i onečišćenje tla MP-om potencijalno štetiti i organizmima prisutnima u tlu.[25] Slika 3 prikazuje jedan od mogućih načina dospijevanja MP-a u okoliš korištenjem proizvoda koji ju sadrže.



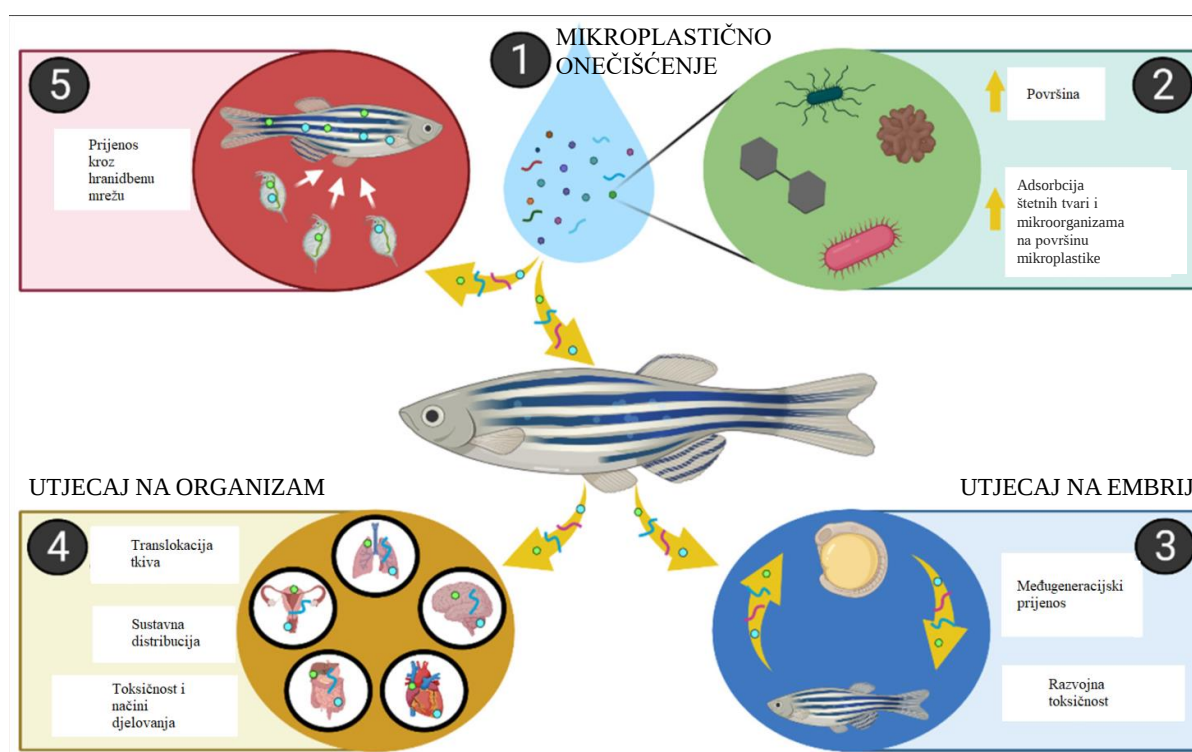
Slika 3. Jedan od načina dospijevanja MP-a u okoliš.

2.2.4. Toksični utjecaj mikroplastike na organizme

MP se smatra globalnim problemom zbog svojih toksičnih učinaka na sva živa bića. Iako MP-a sama po sebi nije toksična i uglavnom se sastoji od vlakana i fragmenata PA, PE i PET, prilikom dugotrajne izloženosti MP-u može doći do trovanja organizma zbog otpuštanja aditiva iz MP-a poput plastifikatora (ftalati), pigmenta, stabilizatora i antioksidansa (bisfenol A, spojevi kadmija i olova), sredstava protiv klizanja (amidi masnih kiselina), biocida (spojevi arsena) i drugih.[29] Istraživanja na životinjama pokazala su da su se brojevi i rizici za životinje pogoršali. Više od 700 vrsta ugroženo je zbog plastičnog i mikroplastičnog onečišćenja.[30] Izlaganje riba i drugih vodenih organizama MP-u predstavlja veliku opasnost koja zahtijeva posebnu pozornost. Nakon izlaganja MP-u ili u kombinaciji s drugim onečišćujućim tvarima, ribe mogu doživjeti niz zdravstvenih problema. MP može uzrokovati oštećenje tkiva i organa, oksidativni stres i promjene u ekspresiji gena.

Nakon izlaganja MP-u, kod riba su uočeni neurotoksični problemi, usporen rast, smanjena reproduktivnost i abnormalnosti u ponašanju.[28,30] MP kod ptica uzrokuje poremećaje u radu endokrinog sustava.[30] Kako bi se utvrdio konkretan toksični utjecaj MP-a na organizme potrebno je provesti ekotoksikološka ispitivanja. Ispitivanja se provode radi utvrđivanja štetnih i negativnih utjecaja koje ispitivana tvar ima na organizam, populaciju, ekosustav i biosferu. U laboratoriju se provode na organizmima koji su jednostavni za održavanje te imaju jednostavniji razvojni mehanizam koji se može primijeniti i na složenije mikroorganizme.[31] Provedena su ispitivanja na algi *Raphidocelis subcapitata*, raku *Ceriodaphnia dubia* i bentoskom ostrakodu *Heterocypris incongruens*. Rezultati ispitivanja pokazali su negativan utjecaj MP-a na mikroorganizme i povećanu proizvodnju reaktivne vrste kisika koja je toksična.[32] Istražen je i potencijal MP-a za prijenos patogenih bakterija. Promatrani su sojevi bakterije *Vibrio parahaemolyticus* na česticama PE, PP i PS MP-a prikupljenih iz Sjevernog mora. Uočeno je kako je tijekom desetodnevnog izlaganja spomenutim vrstama MP-a veličine $\approx 70 \mu\text{m}$ dovelo do oštećenja crijeva riba. Istraživanje je također pokazalo da se tijekom dvodnevne izloženosti MP-u od $5,0 \text{ mg/m}^2$ značajno smanjila razina kalcija i stopa preživljavanja sojeva bakterija te inhibirala duljina rasta i reprodukcija. Uočeno je da su oksidativni stres i crijevna oštećenja glavni toksični učinci MP-a na morske organizme. Biota i ljudi izloženi su toksičnim učincima MP-a putem različitih mehanizama što uključuje agregaciju MP-a u različitim organima, gutanje MP-a te sve to uzrokuje fizička oštećenja i poremećaje u organizmu. Međutim, toksičnost MP-a na žive organizme ovisi o vrsti, veličini i obliku te prisutnosti aditiva u MP-u.[33] Na slici 4 prikazan je toksični učinak MP-a na organizme koji žive u moru i konzumiraju MP-u, te ona kroz prehrambeni lanac dopijeva u njihov organizam i uzrokuje probleme u tkivima. Posljedice MP-a na ljudsko zdravlje slabo su poznate, ali sigurno je da su ljudi izloženi MP-u konzumiranjem hrane i pića, udisanjem ili preko kontakta MP-a s kožom. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su mogući utjecaji na ljude oksidativni stres, citotoksičnost, neurotoksičnost, poremećaj imunološkog sustava i prijenos MP-a u druga tkiva nakon što su im bili izloženi.[28] Prema jednom provedenom istraživanju čestice MP-a mogu utjecati na ljudski organizam na sljedeće načine: fizički, kemijski i mikrobiološki. Iako je utjecaj MP čestica na ljudski organizam relativno neispitano područje istraživanja, prethodna istraživanja pokazala su da čestice MP-a pronađene u ljudskoj stolici mogu dovesti do karcinoma i kod trudnica predstavljaju rizik za trudnoću, embrij, razvoj i zdravlje općenito.[21]

Važno je naglasiti kako se čestice MP-a razgrađuju u tijelu što rezultira nizom štetnih učinaka uključujući oksidativni stres, formiranje granuloma, itd. Štoviše, osim samih čestica MP-a, postoji opasnost i od štetnih učinaka bakterijskih patogena koji se mogu nalaziti u biofilmu kojim su čestice MP-a često obložene. S obzirom da su veličine čestica MP-a uključuju i one manje od 10 μm (što je manje od bakterija) ili 0,3 μm (što je manje čak i od virusa), utvrđeno je da mogu ulaziti u krvotok, mozak i druga tkiva i organe, što može dovesti do mnogih kroničnih bolesti, ali također uzrokovati brojne upale, oštećenja stanica i DNA.[21]



Slika 4. Prikaz toksičnog utjecaja MP-a na organizme koji žive u moru.[34]

2.3. Postupci uklanjanja mikroplastike iz okoliša

Posljednjih godina razvijen je veliki broj postupaka za uklanjanje MP-a u vodenim sustavima, koji se mogu podijeliti na fizikalne, kemijske i biološke postupke prema principima adsorpcije i uklanjanja. Ovisno o postupcima uklanjanja pojedinih kemikalija ili materijala, MP se odvaja od vode, a zatim se koncentracije MP-a smanjuju na prihvatljivu razinu. Različiti postupci uklanjanja MP-a temeljeni na mehanizmu adsorpcije pokazali su se kao učinkoviti za uklanjanje MP-a i nanoplastike (NP) u vodenom okolišu.

Kemijski sintetizirani spužvasti materijali, grafenski materijali i biougljen mogu se koristiti za uklanjanje MP i NP čestica u prirodnim vodama. Mehanizmi adsorpcije MP-a kemijski sintetiziranim spužvastim materijalima većih dimenzija čestica temelje se na vodikovim vezama, elektrostatskom privlačenju između MP-a i spužvastih materijala, odnosno π - π interakcijama. Većina MP-a u vodenom okolišu ima negativan naboj površine i zbog toga lako stupa u interakcije s pozitivno nabijenim tvarima. Mnogi čimbenici utječu na učinkovitost uklanjanja MP-a primjenom adsorpcije. Temperatura i pH su najvažniji, ali i drugi čimbenici kao što je prisutnost drugih organskih tvari i iona mogu utjecati na promjenu naboja površine MP-a i adsorbensa i samim time i na adsorpciju. Temperatura može utjecati na brzinu difuzije adsorbata i ravnotežni kapacitet, a pri višim temperaturama postiže se veća adsorpcija MP-a. Općenito, adsorpcijsko uklanjanje MP-a ima prednosti visokog adsorpcijskog kapaciteta, visoke učinkovitosti uklanjanja, male potrošnje energije i mogućnosti ponovne upotrebe. Međutim, ovom metodom se MP samo izdvaja iz onečišćenog okoliša što predstavlja potencijalni rizik da bi MP ponovno mogla dospjeti u okoliš.

Jedan od važnih postupaka uklanjanja MP-a iz okoliša je filtracija. Filtracija se prvenstveno primjenjuje za uklanjanje MP-a u vodenom okolišu. Kod postupka filtracije koristi se biofiltrar, koji ne samo da uklanja hranjive tvari i teške metale iz kišnice, već uklanja i MP-u. Također, proizveden je pepeo od ljuske gvinejskog kukuruza, koji podržava membrane od tankog filma kompozita i može se koristiti za uklanjanje MP-a iz vodenih otopina.[35] Za uklanjanje MP-a iz okoliša često se koristi i brza filtracija pijeskom. Ova metoda pokazala je određenu učinkovitost uklanjanja MP-a većih veličina čestica iz vode. Nedavna studija pokazala je da je učinkovitost uklanjanja MP-a bila u rasponu od 29,0 do 44,4% nakon postupka pješčane filtracije, ali ne i za MP male veličine, posebno $< 10 \mu\text{m}$. [36] S druge strane, filtracija aktivnim ugljenom često se koristila kao napredni pristup za uklanjanje MP-a. Zabilježena je učinkovitost uklanjanja MP-a od 56,8 do 60,9% nakon postupka filtracije s aktivnim ugljenom, a posebno je relativno visoka učinkovitost uklanjanja, od 73,7 do 98,5%, za čestice MP-a u rasponu od 1 do 5 μm .

Tehnologija membranske filtracije obično se povezuje s primjenom bioloških katalizatora, a naziva se membranskim bioreaktorima (MBR). Pokazalo se da je MBR učinkovitiji od pojedinačnog tretmana biorazgradnje ili dinamičke membranske tehnologije za uklanjanje MP-a. MBR uključuje višestruke postupke, kao što je predtretman, bioreaktor i membranska filtracija.

U nedavnom istraživanju provedenom na tri postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, najveća učinkovitost uklanjanja MP-a dobivena je primjenom MBR-a, tj. iznosila je 99,4%. [36] Prema ukupnoj količini MP-a, primjenom MBR-a postiže se relativno visoka učinkovitost uklanjanja, čak do 99,9%, što je učinkovito u usporedbi s drugim postupcima uklanjanja kao što je primjerice brza filtracija pijeskom. [36] Osim spomenutih adsorpcije i filtracije, neki drugi postupci također imaju veliku primjenu u uklanjanju MP-a. Elektrokoagulacija (EK) uklanja MP nizom fizikalno-kemijskih reakcija, koje obično slijede tri uzastopna koraka. U prvom koraku, metalna anoda proizvodi metalne katione i stvara mikrokoagulate u prisutnosti električnog polja. Zatim, nabijeni mikrokoagulansi adsorbiraju suspendirane čestice, te takve čestice formiraju flokule koje se sudaraju. U trećem koraku, veličina mikroflokula nastavlja se povećavati s više sudara i konačno se postiže uklanjanje MP-a putem fizičkih i/ili kemijskih reakcija. Nasuprot tome, biološki postupci, uključujući fotokatalizu i tretman biorazgradnjom koji mogu pretvoriti MP-u u jednostavne i bezopasne tvari, pa čak i potpuno mineralizirati polimere. Fotokatalitička razgradnja (fotokataliza) u abiotičkoj razgradnji MP-a široko je proučavana tehnologija razgradnje, koja ima relativno visoku katalitičku učinkovitost. Fotokatalitička razgradnja i mineralizacija MP-a ima prednosti male potrošnje energije. Biorazgradnja MP-a u najvećoj mjeri je potaknuta djelovanjem bakterija i mikrobnih organizama izoliranih iz okoliša. Međutim, većina istraživanja biorazgradnje MP-a još je u fazi laboratorijskih eksperimenata. [35] Navedeni procesi pokazuju određene mane tijekom uklanjanja MP-a iz okoliša. Glavni problemi koji se mogu uočiti kod fizikalnih metoda su začepljene membrane koje uzrokuju dodatne financijske troškove. Isto tako, MP se uklanja iz vode, pri čemu zaostaje u otpadnom mulju koji se zatim ponovno mora tretirati i pročititi. Zbog različitih veličina čestica MP-a fizikalne metode pokazuju učinkovitost samo za određene vrste i veličine čestica. Tijekom uklanjanja MP se može raspasti na vrlo male fragmente što otežava njeno uklanjanje fizikalnim metodama jer nisu učinkovite za uklanjanje tako sitnih čestica.

Kod kemijskih metoda pojavljuje se problem uklanjanja zaostalih kemikalija nakon tretmana koje mogu akumulirati u okoliš. Kemijske metode mogu doći u doticaj s drugim kemijskim spojevima prisutnim u okolišu te tako stvoriti nove spojeve koji mogu imati negativne učinke na okoliš. Također MP može biti otporna na kemijske procese razgradnje te je potrebno duže vrijeme kako bi se uklonila kemijskim metodama. Važno je spomenuti da kemijske metode uklanjanja MP-a rezultiraju stvaranjem novih razgradnih produkata i opasnih tvari.

Kod bioloških metoda jedan od glavnih nedostataka je vremenski faktor, odnosno potrebno je duže vrijeme da dođe do razgradnje MP-a u odnosu na druge metode. Osim toga, biološki postupci u velikoj mjeri uklanjaju MP, a također se paralelno mogu primijeniti koagulacija, sedimentacija, filtracija i drugi postupci.[36]

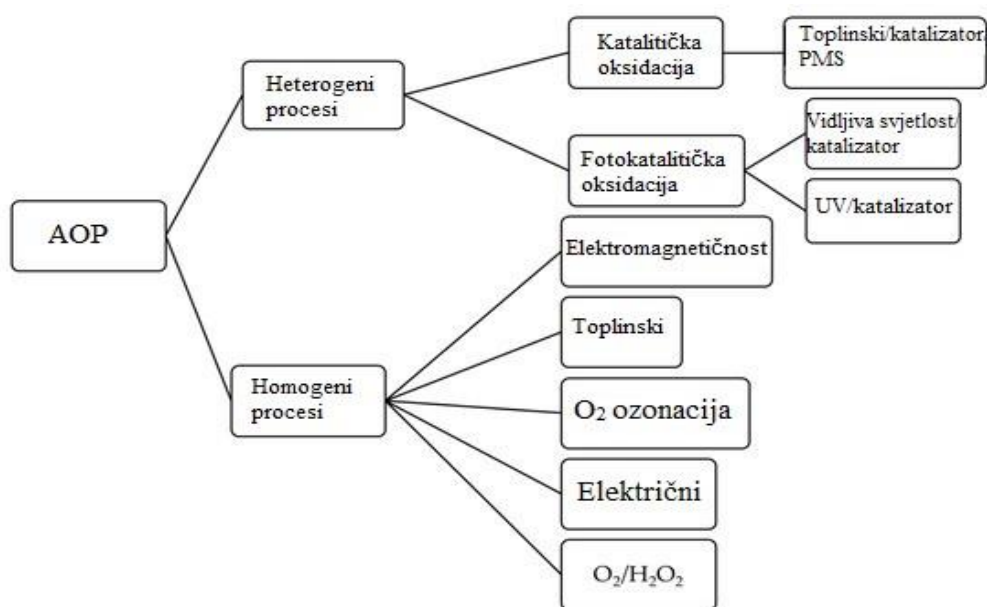
Zbog spomenutih nedostataka klasičnih metoda traže se ekološki i ekonomski isplativije metode te se sve češće proučavaju AOP-i u kombinaciji s biorazgradnjom gdje se MP može potpuno mineralizirati bez nastajanja štetnih nusprodukata. S druge strane, AOP-i sami za sebe nisu pretjerano učinkoviti jer često uzrokuju površinsku razgradnju te se zbog toga kombiniraju s drugim metodama kako bi im se učinkovitost poboljšala.[36]

2.3.1. Napredni oksidacijski procesi

AOP-i spadaju u moderne tehnologije obrade koje se baziraju na stvaranju slobodnih radikala pomoću kojih se oksidiraju različite organske tvari do netoksičnih produkata. Postupak kemijske oksidacije temelji se na razgradnji MP-a na čestice manjih veličina ili mineralizaciji. AOP-i uključuju tehnologije temeljene na Fentonovoj reakciji i postupak fotokatalize za uklanjanje MP-a. Fentonova reakcija je kemijska reakcija koja uključuje generiranje slobodnih radikala pomoću oksidacije vodikovog peroksida u prisutnosti željeza kao katalizatora. Zapravo, AOP-i se široko koriste za mineralizaciju različitih organskih onečišćujućih tvari kroz oksidacijsko djelovanje radikala, kao što su sulfatni i hidroksil radikali.[36] Sulfatni radikal ($\text{SO}_4^{\bullet-}$, $E^0 = 2,4 \text{ V}$) i hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$, $E^0 = 2,7 \text{ V}$) dva su radikala s visokim standardnim redukcijskim potencijalima koji se koriste kod AOP-a tijekom uklanjanja organskih onečišćujućih tvari.[37]

U posljednje vrijeme bilo je mnogo proučavanja i korištenja AOP-a za uklanjanje širokog spektra otpornih onečišćujućih tvari iz okoliša. S obzirom da MP spada pod organske onečišćujuće tvari, pretpostavlja se da bi AOP-i mogli biti učinkoviti i za njihovo uklanjanje iz vodenih medija. Na primjer, razvijena je tehnologija slična Fenton reakciji, koja se uglavnom temelji na TiO_2 /grafitnim (TiO_2/C) katodama za razgradnju PVC-a. Rezultati su pokazali da se PVC može razgraditi i katodnom redukcijom dekloriranja i oksidacijom hidroksilnih radikala, te učinkovitost uklanjanja iznosi 75%.[38] Nakon oksidacijskog tretmana, više vrsta kratkolančanih organskih spojeva, kao što su alkeni, alkohol, monokarboksilne kiseline, dikarboksilne kiseline i esteri pronađeni su u otopini.

Osim toga, visoka koncentracija MP-a može se uhvatiti za radnu elektrodu, ometati prijenos mase, blokirati aktivna mjesta na TiO_2/C katalizatoru i time smanjiti učinkovitost uklanjanja. Slično, elektrooksidacijska tehnologija primijenjena je za razgradnju PS-a, čime je postignut omjer uklanjanja od $58 \pm 21\%$ za 1 sat tretmana. Prema prethodnim istraživanjima, na učinkovitost uklanjanja ciljane tvari uvelike utječu intenzitet struje, anodni materijali, vrste elektrolita i koncentracija elektrolita. Nakon obrade, MP se može izravno mineralizirati u plinovite anorganske proizvode, kao što je CO_2 , bez drugih međuprodukata u reakcijskoj otopini što ove metode čini ekološki prihvatljivima. Međutim, istraživanja su pokazala neke nedostatke ove metode, poput velike potrošnje energije i potrebe za složenim reakcijskim uređajima.[36] Fotokatalitička razgradnja organskih onečišćujućih tvari redovita je praksa zadnjih nekoliko godina. MP različitih veličina može se djelomično razgraditi, a u rijetkim slučajevima i mineralizirati širokim rasponom procesa, uključujući UV fotolizu, $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$, O_3 , fotokatalizu izazvanu UV/vidljivim svjetlom, toplinski aktivirane PS MP-a te plazmu. AOP-i se mogu podijeliti na homogene i heterogene procese koji su prikazani na slici 5. Elektromagnetski, toplinski, ozonacijski, električni i $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3$ procesi su homogeni procesi, dok su fotokatalitička oksidacija i katalitička oksidacija heterogeni procesi. Razgradnja fotokatalitičkim AOP-ima može se postići izlaganjem UV ili vidljivoj svjetlosti uz prisutnost katalizatora. Toplinske/katalizatorske/PMS (eng. *Physical, Mechanical and Chemical Separation*) metode uključene su u razgradnju MP-a putem katalitičke oksidacije. Za svaku organsku onečišćuju tvar potrebno je ispitati različite AOP-ove jer nisu svi jednako učinkoviti u razgradnji različitih organskih tvari.[38]



Slika 5. Podjela AOP-a koji se koriste za razgradnju MP-a.[38]

2.3.2. Biorazgradnja mikroplastike

Biorazgradnja je proces u kojem mikroorganizmi razgrađuju organsku tvar. Ovisno o materijalu, to može trajati danima, tjednima ili čak godinama, a naravno da su poželjniji proizvodi koji se brže biorazgrađuju. Biorazgradnja je ekonomična i ekološki prihvatljiva tehnologija za uklanjanje MP-a. Unatoč tome što je većina komercijalno zastupljenih plastičnih polimera slabo biorazgradiva, pokazalo se da ih neke vrste organizama ipak u određenoj mjeri mogu razgraditi.[39] Istraživači su uspješno izolirali i uzgojili bakterije i gljive iz sedimenta, otpadnih voda i mulja, a neke su dobivene iz crijeva kopnenih insekata. Mikroorganizmi mogu kolonizirati površinu MP-a, a zatim izlučuju izvanstanične enzime koji imaju ključnu ulogu u depolimerizaciji MP-a. Jedno istraživanje pokazalo je da su bakterije *Bacillus cereus* i *Brevibacillus borstelensis* izolirani s odlagališta otpada i mogli su razgraditi PE prah i film niske gustoće. Nakon inkubacije od 16 tjedana, najveći učinak biorazgradnje iznosio je 35,7% za *Bacillus cereus* odnosno 20,4% za *Brevibacillus borstelensis*. [36] Također *Bacillus cereus* i *Bacillus gottheilii* postigli su različitu učinkovitost biorazgradnje za različite vrste MP-a. Učinak razgradnje *Bacillus cereus* iznosio je 1,6% za PE, 6,6% za PET te 7,4% za PS nakon 40 dana, dok je *Bacillus gottheilii* razgradila 6,2%, 3,6%, i 5,8% PE, PET odnosno PS MP-a, u istom vremenskom razdoblju.[36] U procesu biorazgradnje uočene su morfološke promjene uključujući pukotine i brazde na površini MP-a što ukazuje da je došlo do biorazgradnje djelovanjem spomenutih mikroorganizama.

Sljedeća studija dokazala je da bakterija roda *Bacillus* može razgraditi samo 23% plastične folije, ali je gotovo potpuno razgradila bromiranu visokootpornu emulziju PS-a unutar 30 dana.[36] Osim toga, učinkovitosti biorazgradnje varirale su između različitih veličina MP-a. Ispitana je biorazgradnja MP-a veličine čestica $< 10 \mu\text{m}$ te $1-5 \mu\text{m}$. Učinkovitija biorazgradnja je uočena kod veličine čestica $1-5 \mu\text{m}$. Trenutačno se većina istraživača usredotočila na bakterijsku razgradnju MP-a, a malo ih je se bavi gljivičnom razgradnjom.[36] Do biorazgradnje MP-a dolazi u trenutku kada je mikroorganizmi poput bakterija i gljiva svojim enzimskim djelovanjem pretvaraju u metaboličke produkte kao što su metan (CH_4), ugljikov dioksid (CO_2), voda (H_2O) i nova biomasa. Biološko propadanje onečišćujućih tvari ovisi o nekoliko važnih čimbenika, uključujući površinu čestice, molekularnu težinu, hidrofilnost ili hidrofobnost, kristalnost, funkcionalne skupine, kemijsku strukturu, itd. S povećanjem molekularne težine dolazi do smanjenja stope razgradnje, budući da se smanjuje i topljivost, čineći plastiku manje osjetljivom na napade mikroba jer mikrobima postaje teško asimilirati plastiku kroz staničnu membranu.

Isto tako, kristalnost je još jedan važan čimbenik koji utječe na biorazgradivost MP-a, pri čemu su polimeri koji sadrže amorfne dijelove osjetljiviji na enzime koje proizvode mikroorganizmi. Štoviše, hidrofobna priroda plastike inhibira njezinu osjetljivost na mikrobne napade sprječavanjem apsorpcije vode, iako se ovaj problem može riješiti i stvaranjem biofilma na površini plastike i MP-a.[40] Nadalje, biorazgradnja MP-a može se odvijati aerobno ili anaerobno. Aerobna biorazgradnja uključuje prisutnost kisika što je također poznato kao aerobno disanje. Aerobni mikroorganizmi koriste kisik kao akceptor elektrona, a razgradnja složenih organskih spojeva u manje organske spojeve često rezultira proizvodnjom CO₂ i H₂O kao krajnjim produktima. Kao što je već spomenuto stvaranje CO₂ (Sturmov test) dobar je pokazatelj za razgradnju polimera i jedna od najčešće korištene metode mjerenja biorazgradnje u laboratorijskim ispitivanjima. Anaerobna biorazgradnja događa se bez prisutnosti kisika. Anaerobni mikroorganizmi u nedostatku kisika (O₂) koriste druge izvore kao akceptore elektrona, poput sulfata, nitrata, željeza, mangana i CO₂ za biorazgradnju. Uočeno je da dva izolata *Pestalotiopsis microspora* rastu na PUR-u kao jedinom izvoru ugljika u aerobnim i anaerobnim uvjetima te je učinkovita aktivnost razgradnje primijećena u anaerobnom rastu pomoću PUR-a.[41] Većina bakterijskih vrsta koje imaju sposobnost biorazgradnje MP-a su Gram-negativni bacili, a među njima se ističe *Pseudomonas* spp. koji ima najveću sposobnost biorazgradnje MP-a. Primjerice za razgradnju PE-a, *Pseudomonas* spp. izoliran je iz tri različita izvora. *Pseudomonas* spp. izoliran iz odlagališta kanalizacijskog mulja pokazao se kao najučinkovitiji u biorazgradnji prirodnog i sintetičkog PE-a. U usporedbi s drugim vrstama, *Pseudomonas* spp. stvara najviskoznije i najflokulentnije biofilmove na površini MP-a u razdoblju od tri tjedna. Osim spomenute bakterije *Pseudomonas* spp., drugi rodovi bakterija sposobnih za biorazgradnju MP-a su *Ideonella*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Escherichia* i *Azotobacter*. [40] Zajedno s bakterijama, gljive su također uključene u biorazgradnju MP-a, jer ubrzavaju proces biorazgradnje dijeljenjem metaboličkih intermedijera. Kada govorimo o mikroorganizmima, gljive se dijele na kvasce i plijesni, a plijesni su puno više ispitani u biorazgradnji MP-a. Plijesni roda *Penicillium* i *Aspergillus* imaju sposobnost razgradnje PE stvaranjem biofilmove koji smanjuju hidrofobnost površine PE. *Aspergillus* spp. ima sposobnost razgradnje LDPE-a, dok *Penicillium* spp. može razgraditi i LDPE i HDPE (polietilen visoke gustoće). Među različitim vrstama plijesni roda *Aspergillus* spp., *Aspergillus niger* ima najveću sposobnost razgradnje PE-a, čak 38% u razdoblju od 60 dana, a *Aspergillus flavus* je u istom razdoblju razgradio 31% PE-a. [42] Enzimi iz različitih mikroorganizama sposobni su razgraditi različite sintetičke plastične polimere. Hidrolaze, uključujući esteraze, kutinaze i lipaze pokazuju važnu ulogu u razgradnji MP-a. [42]

2.3.3. Biorazgradnja primjenom kvasaca

Kvasci su još uvijek gotovo neistraženi u području biorazgradnje plastike i MP-a, ali s obzirom da i oni imaju bogati enzimatski sastav među kojima su hidrolaza i oksidaza za koje je dokazano da razgrađuju MP-u, potencijal zasigurno postoji.[40] Kvasci koji proizvode lipazu izolirani su iz različitih staništa kao što su onečišćena tla, otpad i pokvarena hrana. Glavni rodovi kvasaca koji proizvode lipazu su *Beauveria*, *Candida*, *Eremothecium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Rhizomucor* i *Rhizopus*. [43] Kvasci *Rhodotorula aurantiaca* i *Kluyveromyces* spp. pokazuju potencijal za razgradnju PVC-a s obzirom na provedeno istraživanje.[41] Među kvascima koji se ističu u biorazgradnji MP-a valja spomenuti kulturu *Candida parapsilosis* koja je identificirana i izolirana iz uzoraka koji su sadržavali MP. Dokazano je da ovaj kvasac sadrži enzim lipazu koji je karakterističan za razgradnju MP-a što samim time znači da ima veliki potencijal za biorazgradnju MP-a.[44]

2.3.3.1. *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis je oportunistički patogeni kvasac koji se često kolonizira na plastičnoj bolničkoj opremi, a prvenstveno pogađa bolesnike s oslabljenim imunitetom u bolnicama.[45] S obzirom da *Candida parapsilosis* može stvarati biofilm na komercijalnoj plastici, a to je prvi korak kada govorimo o biorazgradnji plastike i MP-a, dolazi se do zaključka da bi ovaj kvasac mogao imati veliki potencijal za biorazgradnju MP-a. *Candida parapsilosis* otkrio je Ashford u Puerto Ricu 1928. godine iz stolice s proljevom i nazvao ju je *Monilia parapsilosis* te se prvobitno smatralo da je nepatogena, no kasnije je uzrokovala sepsu kod intravenskog korisnika droga.[46] Kasnije je izolirana iz kukaca, životinja i tla ispitana u laboratorijskim uvjetima kako bi se što bolje razumijela patogeneza ovog kvasca. Kvasci vrste *Candida* pogoduju biorazgradnji MP-a pa se osim *Candida parapsilosis* mogu koristiti i *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida metapsilosis* i *Candida orthopsilosis*. [47]

2.4. Testovi toksičnosti

MP se nakuplja u prirodnim okruženjima diljem svijeta, ugrožavajući biotu, funkcije i svojstva ekosustava. U posljednjem desetljeću došlo je do znatnog povećanja broja laboratorijskih ispitivanja o toksičnosti koja se bave potencijalnim učincima MP-a, uključujući njezine plastifikatore i adsorbirane opasne tvari. U testovima toksičnosti MP-a, karakterizacija čestica često je ograničena na kemijski sastav, koncentraciju, raspodjelu veličina i oblik. Unatoč tome, čini se da drugi parametri kao što su površina čestica, raspodjela veličine, površinska svojstva (npr. oksidacija, stvaranje biofilma) i svojstva čestica (npr. agregacija/disperzija) igraju važnu ulogu u bioraspoloživosti čestica u okolišu i posljedično njihovoj toksičnosti. Na primjer, mala je vjerojatnost da će se MP od čistog PS-a slične veličine agregirati među sobom u slatkovodnim sredinama (tj. jezerima i rijekama), za razliku od slanih vodenih okolina (tj. estuarija). Veće koncentracije MP-a pogoduju povećanoj učestalosti fizičkih interakcija između čestica i olakšavaju stvaranje agregata i sedimentaciju čestica. Isto tako formiranje biofilma u procesima starenja (prije i tijekom izlaganja) također ima utjecaj na unos, staničnu internalizaciju, biodistribuciju i eliminaciju MP-a u biološkim sustavima. Stoga se toksikologija MP-a suočava s velikim izazovom pri procjeni i predviđanju učinaka takvih čestica na vrste i ekosustave, pri čemu je dio tih izazova povezan s metodološkom pristranošću koja proizlazi iz različitih laboratorijskih ispitivanja i nedostatka odgovarajuće analitičke karakterizacije ispitivanih čestica.[48] Postoji široki raspon potencijalnih toksikoloških eksperimenata s MP-a, kao što su *in vitro* studije s jednom vrstom stanice ili složenim 3-D konstruktima tkiva, *in vivo* studije na sisavcima i eksperimenti toksičnosti koji testiraju pelagične, sedimentne i zemljišne organizme. Uključivanje ovih kontrolnih eksperimenata može smanjiti vjerojatnost lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata i točnije objasniti potencijalne ekološke i zdravstvene rizike MP-a.[49] Toksikološke studije na MP-u mogu se razlikovati prema ispitivanim organizmima, vrsti, obliku i veličini polimera i mjestu analize (*in situ* ili u laboratoriju). Brojni su organizmi koji se mogu koristiti u toksikološkoj procjeni MP-a; međutim, > 75% studija provedeno je na morskim mikroorganizmima. Rezultati toksikoloških testova obično se izražavaju kao koncentracija koja uzrokuje 50% štetnih učinaka u testiranoj populaciji (EC₅₀), iako se po potrebi mogu primijeniti i druge razine (tj. EC₁₀ ili EC₂₀). Efektivne i letalne vrijednosti mogu se izraziti po masi testiranog uzorka.[50] Korištenje testova toksičnosti pokazalo se kao osjetljiv, brz i pouzdan alat za procjenu potencijalne toksičnosti tijekom pročišćavanja otpadnih voda.

Zbog dostupnosti, učinkovitosti, jednostavnosti izvođenja i brzine samog testa, najčešće se testovi toksičnosti provode s *Daphnia magna* i *Vibrio fischeri*. *Daphnia magna* predstavlja jedan od najčešće korištenih toksikoloških testova zbog visoke osjetljivosti modelnog organizma prema širokom spektru kemikalija, ali i zbog činjenice da zauzima središnje mjesto u lancu ishrane.

Također, bioluminiscentna bakterija *Vibrio fischeri* obično se prihvaća kao model organizma u testovima toksičnosti koji je međunarodno priznat i standardiziran kao ISO te su rezultati testa akutne toksičnosti *V. fischeri* osjetljivi, ponovljivi i posjeduju veliku diskriminirajuću moć za organske i anorganske onečišćujuće tvari. Osim navedenih, biotest inhibicije rasta sa slatkovodnom mikroalgom *Pseudokirchneriella subcapitata* često se koristi kao bioindikator za toksične tvari, uključujući mikro i nanočestice.[51] Prvi testovi stanične toksičnosti poznati su još od otkrića bioluminiscentne morske bakterije *V. fischeri* 1979. Promatranje promjena u okolišu omogućeno je izlaganjem *V. fischeri* toksičnim tvarima, a smanjenje bioluminiscencije uzrokovano je smrću stanica ili padom metaboličke aktivnosti. Takvi testovi su vremenom komercijalizirani (npr. Microtox, ToxAlert, Mutatox).[52] Upotreba bakterije *V. fischeri* nije bila prikladna za sve studije procjene toksičnosti za okoliš jer je riječ o morskom organizmu te su umjesto toga korišteni ekološki prikladniji organizmi. U tu svrhu korišteni su i konstruirani višestruki modelni organizmi (npr. *Escherichia coli* i *Pseudomonas fluorescens*) za ekspresiju konstitutivnih gena luminescencije prilagođenih iz luxCDABE operatora *V. fischeri*. Takvi biosenzori korišteni su za praćenje promjena u okolišu na razne anorganske (npr. metaloidi, nanomaterijali) ili organske (npr. aromatski spojevi) onečišćujuće tvari.[52]

2.4.1. Test toksičnosti s bakterijom *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri je nepatogena, bioluminiscentna, Gram-negativna morska bakterija koja se može pronaći i u zajednici s određenim lignjama i ribama. Tijekom proteklih desetljeća, proučavanje *V. fischeri* dovelo je do važnih otkrića o bioluminiscenciji, senzoru kvoruma i mehanizmima koji leže u osnovi korisnih i važnih interakcija između domaćina i mikroba. Test toksičnosti s *V. fischeri* smatra se jednostavnim, relativno brzim i isplativim. Upravo zbog toga, unatoč činjenici da je *V. fischeri* morska bakterija, ovaj test se često primjenjuje za toksikološku analizu nemorskih uzoraka poput otpadnih voda, slatkih voda, procjednih voda i drugih.

Test se temelji na mjerenju intenziteta luminiscencije svjetlosti budući da *V. fischeri* ima sposobnost bioluminiscencije što je povezano s prisutnošću enzima luciferaze.[53] Njegova široka primjenjivost uključuje različite testirane uzorke koji imaju štetne učinke na vodeni okoliš kao što su metali, plastika, antibiotici, herbicidi i drugi organski i anorganski spojevi. Ipak, samo u nekim istraživanjima se koristi *V. fischeri* za određivanje toksikoloških učinaka MP-a, vjerojatno zbog nedovoljne osjetljivosti. Osim osjetljivosti, MP-i su krute tvari koje mogu ometati mjerenje bioluminiscencije i zato krute čestice nisu prikladne za ovaj test. Posljednji problem je vrijeme trajanja testa koje iznosi 15-30 min (ISO 11348-3) što je prilično kratko izlaganje za određivanje stvarnih MP učinaka na *V. fischeri*. MP se može otopiti u odgovarajućem otapalu, ali se također mora uzeti u obzir interferencija otapala s toksičnim učinkom. Drugi pristup je korištenje *V. fischeri* u određivanju toksičnih učinaka segmenata MP-a (monomera, aditiva i slično), koji se mogu isprati tijekom djelomične razgradnje MP-a. U ovom slučaju, uzorke je potrebno profiltrirati prije testa radi uklanjanja krutih čestica. Kompatibilnost uređaja za provođenje testa toksičnosti u laboratorijskim razmjerima s okolišem testirana je izlaganjem uzoraka MP-a bakteriji *V. fischeri*. Test mjeri akutnu toksičnost, promatrana krajnja točka predstavljena je postotkom inhibicije luminiscencije (u odnosu na kontrolni uzorak) bakterije *V. fischeri*. Usvojen je komercijalni način rada prema UNI EN ISO 11348-3 2019 test protokolu.[50]

2.5. Statističko planiranje eksperimenta

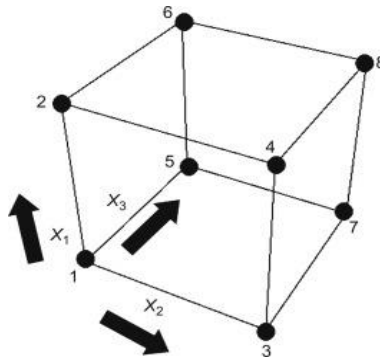
Statističko planiranje eksperimenta, odnosno dizajn eksperimenata (eng. *design of experiments*, DOE), je učinkovit postupak planiranja eksperimenata, a provodi se u svrhu dobivanja podataka koji se dalje mogu analizirati i dobiti valjanih i objektivnih zaključci.[54] DOE započinje određivanjem ciljeva eksperimenta i odabirom faktora procesa čiji utjecaj nas zanima uz izradu detaljnog eksperimentalnog plana prije izvođenja eksperimenta. Dobro odabrani eksperimentalni dizajni povećavaju količinu željenih informacija koje se mogu dobiti uz određenu količinu eksperimentalnog napora. Statistička teorija na kojoj se temelji DOE općenito započinje s konceptom modela procesa.[54] U eksperimentu se namjerno mijenja jedna ili više procesnih varijabli (ili faktora) kako bi se promatrao učinak promjena na jednu ili više varijabli.

Bit eksperimentalnog dizajna i možda najvažniji razlog zašto se istraživači odlučuju za dizajn i provođenje eksperimenata je preciznost s kojom se može analizirati odnos između zavisnih i nezavisnih varijabli i učiniti tu analizu što objektivnijom. Može se zaključiti da se eksperimentalni dizajn oslanja na testiranje odnosa između varijabli, odnosno, jedna nezavisna varijabla se kontrolira kako bi se izmjerio njen učinak na druge zavisne varijable. Dakle ako se eksperimentalni dizajn ispravno primijeni, tada se može uspostaviti uzročna veza između nezavisne varijable i zavisne varijable.

Bitno je spomenuti da postoji nekoliko koraka u razvoju eksperimenta. Istraživač mora generirati istraživačko pitanje, postaviti hipotezu koju je kasnije moguće provjeriti, odrediti kako kontrolirati varijabilnost tijekom eksperimentalnog procesa, odabrati ili razviti uvjete intervencije, uzorkovati populaciju kako bi ih dodijelili eksperimentalnim uvjetima i odrediti koje će se empirijske mjere poduzeti te na kraju kako će podaci biti zabilježeni. Zbog svega navedenog često postoji važan i blizak odnos između eksperimentalnog dizajna i vrste podataka koji se prikupljaju i statističkog pristupa koji će se koristiti za analizu podataka.[55]

2.5.1. Potpuni faktorski plan

Potpuni faktorski plan korisna je tehnika za istraživanje glavnih i interakcijskih učinaka varijabli odabranih u bilo kojem dizajnu eksperimenta. Ova tehnika je korisna u istraživanju učinaka interakcije različitih nezavisnih varijabli na zavisne varijable ili u konačnici na rezultate procesa.[56] Potpuni faktorski plan eksperimenta omogućava uvid i daje najviše informacija o proučavanom sustavu u usporedbi sa nekim drugim dizajnima eksperimenata. Prednost potpunog faktorskog plana je izvedba svih mogućih kombinacija razina ispitivanih čimbenika uz istovremeno određivanje neograničenog broja čimbenika i utvrđivanje utjecaja osjetljivosti pojedinih čimbenika i utjecaj međudjelovanja. Najjednostavniji i zbog toga najviše korišten je faktorski plan s varijacijom čimbenika na dvije razine. Spomenuti faktorski plan osigurava mali broj eksperimenata (N) čiji je ukupni broj definiran s $N = 2^k$, gdje k predstavlja broj čimbenika. Matrica eksperimentalnih uvjeta faktorskog plana, pri čemu su istovremeno varirana tri čimbenika na dvije razine daje zajedno 8 kombinacija ispitivanih čimbenika eksperimenta.[57] Matrica faktorskog plana s tri čimbenika može se geometrijski prikazati kao kocka, gdje rubovi kocke čine točke pojedinih uvjeta što je prikazano na slici 6.[58]



Slika 6. Prikaz potpunog faktorskog plana s tri čimbenika na dvije razine.[58]

Dakle može se zaključiti da se u potpunom faktorskom dizajnu izvodi eksperimentalni rad za svaku kombinaciju odnosno razinu faktora. Nažalost, to je razlog da je potpuni faktorski plan često financijski i vremenski neisplativ za izvođenje. Stoga se nerijetko koriste neki drugi dizajni eksperimenta.[59]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroplastika

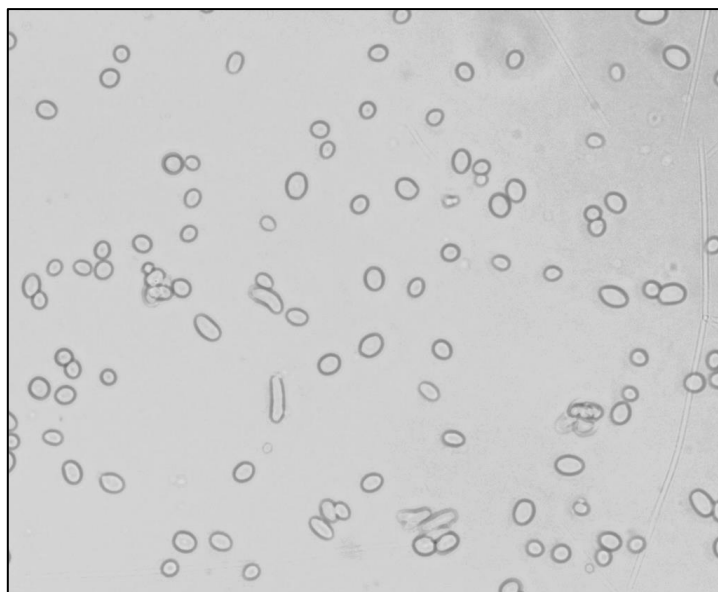
Za ispitivanje biorazgradnje kvascem *Candida parapsilosis* korištene su PS i PVC MP dobivene usitnjavanjem plastičnih granula u kriomlinu. Veličine MP čestica u rasponu 25-100 µm dobivene su vakuum filtracijom korištenjem sita veličine pora 25 odnosno 100 µm.

3.1.2. Kvasac *Candida parapsilosis*

Za eksperiment biorazgradnje PS i PVC MP-a korištena je kultura kvasca izoliranog iz biootpada onečišćenog MP-om, *Candida parapsilosis*. Korišteni kvasac pohranjen je u zbirci mikroorganizama u Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Precijepljena kultura kvasca, uzgajana je na hranjivoj podlozi malt agaru, što je prikazano na slici 7. Na slici 8 prikazana je morfologija kulture kvasca snimljena pod svjetlosnim mikroskopom pri uvećanju 400×.



Slika 7. Kultura kvasca *Candida parapsilosis* dobivena tehnikom iscrpljivanja na malt agaru.



Slika 8. Mikrofotografija kulture kvasca *Candida parapsilosis* dobivena pod svjetlosnim mikroskopom pri uvećanju 400×.

3.1.3. Kemikalije

Hranjiva podloga za uzgoj kvasaca naziva se malt agar. Podloga se pripremala na način da se na analitičkoj vagi izvagalo 47 g malt agara u 1 L destilirane vode u Erlenmayerovoj tikvici od 2 L. Zatim se otopina dobro homogenizirala i ostavila da nabubri 15 minuta te se nakon toga stavljala na plamenik gdje se zagrijavala do vrenja tri puta nakon čega je slijedila sterilizacija u autoklavu pri 121 °C i 1,1 atm u vremenu od 15 minuta. Prije korištenja u eksperimentima, u još tekuću podlogu dodao se antibiotik kako bi se suzbio rast bakterija.

Za podešavanje pH, korištena su 0,1 molarna razrjeđenja natrijevog hidroksida, NaOH, p.a. (Lach-Ner s.r.o., Češka) i sumporne kiseline, H₂SO₄, p.a., (Kemika, Hrvatska).

Za sterilizaciju MP-a koristio se 70%-tni etanol koji se dobio razrjeđenjem 96%-tnog etanola sterilnom destiliranom vodom u odmjernoj tikvici od 1 L.

U svim eksperimentima koristio se mineralni medij (MM) pogodan za rast i razvoj *Candida parapsilosis*. Medij se pripremao prema Gong i sur.[60], a korištene soli prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Sastav mineralnog medija.[60]

KEMIČKE	MASA/ g/L
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
NH ₄ NO ₃	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,005
NaCl	0,5
CaCl ₂	0,02

Tijekom eksperimentata pratio se broj živih stanica kvasca pripremom decimalnih razrjeđenja. Za pripremu decimalnih razrjeđenja korištena je 0,9%-tna fiziološka otopina koja se pripremala otapanjem 9 g NaCl u 1 L destilirane vode te se zatim u epruvete otpipetiralo 9,0 i 9,9 mL pripremljene fiziološke otopine. Epruvete su zatim zajedno sa fiziološkom otopinom sterilizirane u autoklavu pri 121 °C i 1,1 atm u vremenu od 15 minuta.

Za određivanje toksičnosti s bakterijom *Vibrio fischeri* bilo je potrebno pripremiti otopinu za resuspenziju. To je hranjiva izoosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture koja se pripremala tako da se u 1 L deionizirane vode otopilo 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. Otopina se na kraju prokuhala i ohladila te je pH otopine namješten između 6,8 i 7,2. Za ovaj test bilo je potrebno pripremiti i 2%-tnu otopinu NaCl koja je služila kao radna otopina za pripremu niza razrjeđenja. Ova otopina pripremala se vaganjem 2 g NaCl u odmjernu tikvicu od 100 mL koja se zatim nadopunila deioniziranom vodom do oznake. pH otopine se namjestio između 6,8 i 7,2.

3.2. Mjerni instrumenti i oprema

Granule PS-a i PVC-a usitnjavale su se na kriomlinu Retsch GmbH, CryoMill, Njemačka. Analitička vaga Sartorius AG, Njemačka, koristila se za vaganje uzoraka MP-a. Za prosijavanje MP-a korištena su vakuum sita Retsch GmbH, veličine pora 25 i 100 µm, Njemačka. Eksperimenti biorazgradnje i sterilizacija MP-a provodila se na Biosan magnetskoj miješalici, MS-3000.

pH metar pH 50 + DHS[®] XS uređaj, Italija, koristio se za podešavanje pH otopine. Tijekom filtracije suspenzija MP-a korišteni su Sartorius ljevak, Njemačka i KNF vakuumaska pumpa, Francuska. Uređaj FTIR-8400S, Shimadzu korišten je za provođenje FTIR-ATR spektroskopije. TOC-V_{CSH} uređaj, Shimadzu koristio se za provođenje TOC analize. LC-MS uređaj, Shimadzu 2020 korišten je za HPLC-MS analizu, a programski paket *Design Expert* 7.1.5, StatEase, SAD koristio se za provedbu dizajna eksperimenta te određivanje optimalnih uvjeta za biorazgradnju MP-a. LUMIS_{tox} 300, luminometar proizvođača *Dr Lange* korišten je u kombinaciji s LUMIS_{therm}, termostatiranim inkubacijskim blokom proizvođača *Dr Lange* za mjerenje luminiscencije s bakterijom *V. fischeri*. Termostat Termomedicinski aparati, Hrvatska koristio se za uzgajanje bakterijske kulture *V. fischeri*. Pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan s ugrađenom kamerom Olympus DP 10 kamera snimljene su mikrofotografije kvasca.

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprema mikroplastike

U prethodnim eksperimentima za određivanje učinkovitosti AOP-a kao i u eksperimentima biorazgradnje koristile su se granule PS i PVC. Granule su usitnjavane tijekom 6 ciklusa pri frekvenciji od 25 Hz u kriomlinu (slika 9) pomoću tekućeg dušika na radnoj temperaturi od –196 °C. Usitnjavanjem granula dobiven je bijeli praškasti uzorak koji se zatim primjenom vakuum sita prosijavao kako bi se dobila PS i PVC MP-a dimenzija između 25 i 100 µm koja se koristila u svim eksperimentima.



Slika 9. Kriomlin Retsch GmbH, CryoMill, Njemačka.

3.3.2. Predtretman mikroplastike

U prethodnim istraživanjima provedenim u sklopu projekta „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ ispitani su različiti AOP-i u razgradnji MP-a. Međutim, dobiveni rezultati nisu pokazali potpunu mineralizaciju MP-a već samo djelomičnu razgradnju. Stoga je odlučeno ispitati biorazgradnju AOP-om predtretirane MP-e s ciljem povećanja učinkovitosti biorazgradnje. Predtretman MP-a primjenom AOP-a prije procesa biorazgradnje rezultira pojavom pukotina i udubina na površini MP-a te na taj način površina postaje lakše dostupna mikroorganizmima što uzrokuje učinkovitiju biorazgradnju. PS i PVC MP je prije eksperimenta biorazgradnje izložena UV/S₂O₈²⁻ tretmanu.

3.3.3. Provođenje sterilizacije mikroplastike

Sterilizacija MP-a provodila se s ciljem uklanjanja mogućih prisutnih nečistoća i mikroorganizama na površini čestica. 60 mg MP-e izvagano je na analitičkoj vagi direktno u Erlenmayerove tikvice od 100 mL te se dodao 70%-tni etanol u količini koja je prekrila svu MP-u. Tako priređene tikvice postavile su se na tresilicu pri 150 o/min u vremenu od 10 minuta. Nakon sterilizacije slijedila je vakuum filtracija pri čemu se MP-a filtrirala kroz membranski filtar veličine pora 0,45 µm i odvajala u sterilne Erlenmayerove tikvice od 200 mL u kojima se provodio eksperiment biorazgradnje. Sterilizacija MP-a provodila se primjenom sterilne tehnike rada.

3.3.4. Preduzgoj kvasca

Candida parapsilosis je za eksperiment biorazgradnje PS i PVC MP-a uzgojena na krutoj podlozi malt agar. Nakon precijepljivanja na malt agaru, *Candida parapsilosis* se ostavila 5 dana u termostatu na optimalnoj temperaturi za rast i razmnožavanje od 28°C. Izrasli kvasac koristio se za pripremu guste suspenzije koja se koristila za postavljanje eksperimenta. Gusta suspenzija *Candida parapsilosis* pripremala se na način da se izrasla kultura s Petrijevih zdjelica nakon inkubacije prenijela pomoću sterilne Pasteur pipete u sterilnu Erlenmayerovu tikvicu koja je sadržavala 100 mL sterilnog MM. Suspenzija *Candida parapsilosis* pripremala se primjenom sterilne tehnike rada.

3.3.5. Provedena mjerenja tijekom eksperimenta biorazgradnje

3.3.5.1. FTIR-ATR spektroskopija

Početna PS i PVC MP-a kao i MP-a dobivena nakon provedbe biorazgradnje primjenom *Candida parapsilosis* analizirana je FTIR-ATR spektroskopijom. FTIR-ATR spektroskopija provodila se prije (kako bi se potvrdilo da se radi o navedenim MP-a) i nakon eksperimenta biorazgradnje radi utvrđivanja promjena u funkcionalnoj strukturi MP-a. Svi FTIR spektri snimljeni su u području od 4000-500 cm^{-1} koje je karakteristično za sve polimere.[61,62] Nakon snimanja obrađeni su u programu *IR Solution*. Promatrane funkcionalne skupine (odnosno karakteristični pikovi) za PS i PVC prikazani su u tablici 4.

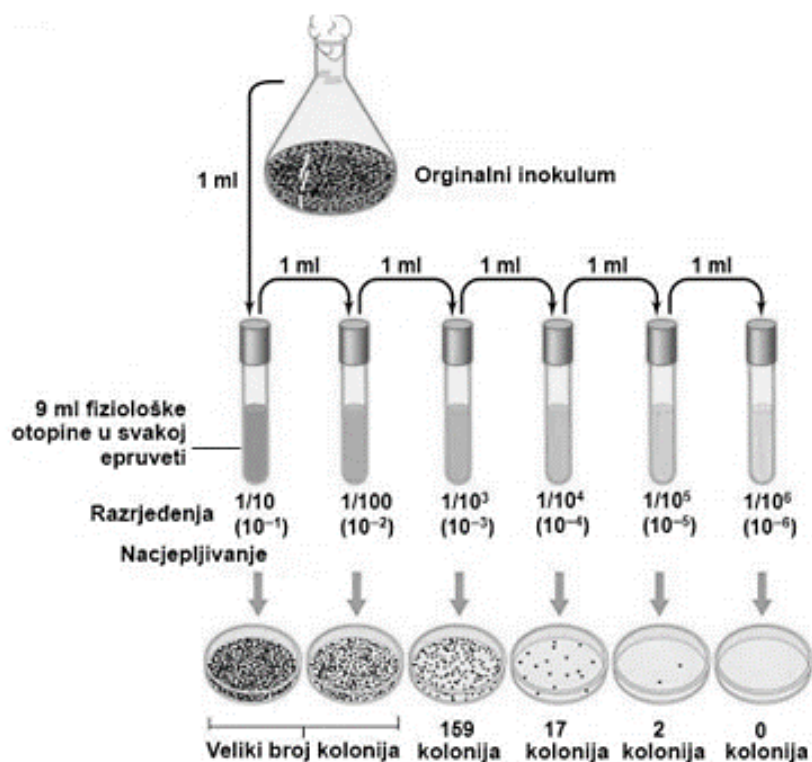
Tablica 4. Karakteristični pikovi PS i PVC MP-a promatrani FTIR-ATR-om. [63,64]

MIKROPLASTIKA	Karakteristična veza	Valni broj / cm^{-1}
PS	C–H istezanje u aromatskoj skupini	3061 i 3026
	C–H istezanje	2847
	istezanje aromatskog prstena	1601 i 1492
	CH ₂ savijanje	1451
	C–H u aromatskom prstenu	1027
	savijanje C–H veze izvan ravnine aromatskog prstena	694
	savijanje aromatskog prstena izvan ravnine	537
PVC	C–H istezanje	2920, 2849 i 1736
	CH ₂ savijanje	1427
	C–H deformacija u ravnini	1255
	C–C istezanje	1099
	CH ₂ njihanje	966
	C–Cl istezanje	616

Na temelju dobivenih FTIR spektara prije biorazgradnje i usporedbom s bazom podataka potvrđeno je da se radi o PS i PVC MP-a. FTIR spektri snimljeni nakon eksperimenta biorazgradnje uspoređivali su se sa početnim FTIR spektrima kako bi se uočile promjene u intenzitetima pojedinih pikova. Na temelju razlika u FTIR spektrima zaključilo se da li je došlo do biorazgradnje MP-a. Osim promjena u postojećim pikovima, pratio se i nastanak novih pikova i eventualni nestanak postojećih pikova. Analiza se provodila na uređaju za FTIR-ATR spektroskopiju tako da se na dijamantu prizmu stavila količina MP-e koja je prekrila cijelu površinu prizme. Prije početka analize bilo je potrebno provesti inicijalizaciju uređaja, a nakon inicijalizacije i prije svakog novog mjerenja uzorka snimljena je čista površina prizme kako bi se uklonili pozadinski šumovi.

3.3.5.2. Određivanje CFU vrijednosti

Tijekom određivanja broja živih stanica kvasca (eng. *Colony Forming Units*, CFU) bilo je potrebno raditi sterilnom tehnikom rada tj. u laminaru ili u blizini plamenika. Iz početne suspenzije izuzeto je 100 μL poluautomatskom pipetom koristeći sterilne nastavke i preneseno je u 9,9 mL sterilne fiziološke otopine kako bi se dobilo razrjeđenje 10^{-2} . Zatim se iz razrjeđenja 10^{-2} ponovno izuzelo 100 μL i prenijelo na isti način u novih 9,9 mL sterilne fiziološke otopine kako bi se dobilo razrjeđenje 10^{-4} . Razrjeđenje 10^{-5} priredilo se izuzimanjem 1 mL uzorka iz razrjeđenja 10^{-4} i prenošenjem u 9,0 mL sterilne fiziološke otopine, a postupak se ponovio za dobivanje razrjeđenja 10^{-6} . Nakon priprave razrjeđenja inokuliralo se 1 mL određenih razrjeđenja u sterilne Petrijeve zdjelice u blizini plamenika, kako bi bili osigurani sterilni uvjeti rada. Zatim su se inokulumi zalijevali prethodno otopljenim malt agarom i uz kružno pokretanje Petrijevih zdjelica u obliku broja 8 radi homogeniziranja sadržaja. Postupak priprave razrjeđenja prikazan je na slici 10. Tako priređene Petrijeve zdjelice stavile su se na inkubaciju u termostatu tijekom 5 dana na temperaturu od 28 °C. Nakon inkubacije brojale su se Petrijeve zdjelice na kojima je izraslo između 30 i 300 kolonija kvasca kako bi se odredio CFU.[65]



Slika 10. Priprava razrjeđenja.[65]

3.3.5.3. TOC analiza

Koncentracije ukupnog organskog ugljika (eng. *total organic carbon*, TOC) određivane su na TOC- V_{CSH} uređaju tvrtke Shimadzu. Uređaj je kalibriran primjenom različitih koncentracija standarda kalijevog hidrogen ftalata (KHP). Postupak se provodio izuzimanjem 0,5 mL uzorka koji se profiltrirao primjenom medicinske šprice kroz okrugli filter (promjer 0,45 μm). Isti je postupak za određivanje TOC-a i ukupnog ugljika (eng. *total carbon*, TC), a zaostali ukupni anorganski ugljik (eng. *total inorganic carbon*, TIC) određivao se iz razlike vrijednosti TC-a i TOC-a.

U staklene bočice stavljalo se 0,5 mL filtrata te se dodalo 9,5 mL deionizirane vode, a 3 kapi koncentrirane H_2SO_4 dodalo se u bočice za TOC kako bi se uklonio anorganski ugljik. Tako pripremljene bočice stavljale su se na uređaj za provođenje analize.

3.3.5.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

U ovom eksperimentu tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC/MS analiza) provodila se kako bi se detektirali mogući novonastali razgradni produkti, kao što su aditivi, koji su dodani u MP. Za analizu je korištena metoda bez kolone budući da sastav uzorka nije u potpunosti poznat. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 10 μL te su prilikom analize korištene dvije mobilne faze 0,1 % mravlje kiseline + MilliQ i acetonitril/metanol pri protoku u vrijednosti 0,5 cm^3/min . Analiza se provodila na LC-MS uređaju, Shimadzu 2020.

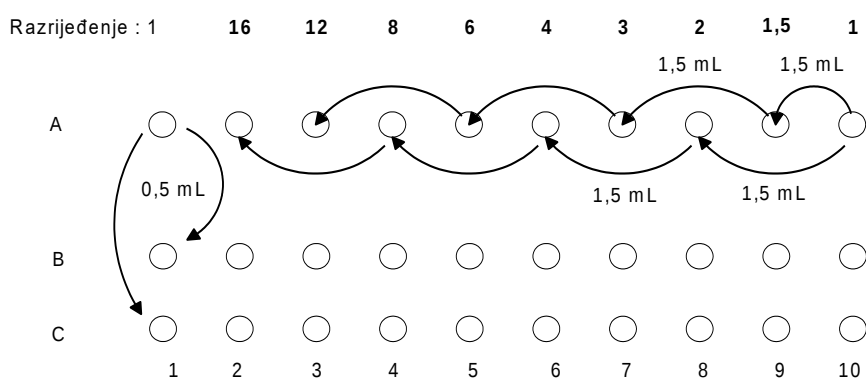
3.3.5.5. Mikroskopska analiza kvasca *Candida parapsilosis*

Mikroskopska analiza primjenom svjetlosnog mikroskopa s ugrađenom kamerom provodila se s ciljem utvrđivanja morfoloških promjena stanica kvasca *Candida parapsilosis* prije i nakon eksperimenta biorazgradnje PS i PVC MP-a. Sadržaj Erlenmeyerove tikvice u kojoj se provodila biorazgradnja prvo se dobro homogenizira, a zatim se pomoću sterilne Pasteur pipete izuzme kapljica suspenzije i prenese na predmetno stakalce te prekrije pokrovnicom. Tako pripremljen preparat mikroskopirao se pri uvećanju od 100 i 400 $\times$.

3.3.5.6. Određivanje toksičnosti filtrata

Test toksičnosti primjenom bakterije *V. fischeri* provodio se na kraju eksperimenta biorazgradnje. Ispitivanje toksičnosti filtrata dobivenog nakon biorazgradnje provodilo se na uređaju Lumistox 300, luminometar proizvođača *Dr Lange*. Prije mjerenja, provjeren je pH filtrata koji se po potrebi podesio s 0,1M NaOH ili H_2SO_4 na vrijednost između 6 i 8,5. Tijekom ispitivanja mjeren je intenzitet luminiscencije na početku testa i nakon 30 minuta. Instrument daje dva rezultata u obliku EC_{20} i EC_{50} koji predstavljaju volumni udio uzorka pri kojemu dolazi do 20%-tnog ili 50%-tnog pada luminiscencije. Prije samog mjerenja pripremljena je otopina suspenzije *V. fischeri*. Epruveta se napuni 2/3 otopinom za resuspenziju, a zatim se pomoću Pasteur pipete biomasa *V. fischeri* stavlja i homogenizira u istoj epruveti. Nakon toga suspenzija se termostatira 15 minuta pri 15°C na termostatu LUMIStherm, proizvođača *Dr Lange*. Početna luminiscencija pripravljene suspenzije mora biti između 1000 i 5000. U ovom radu određivanje toksičnosti provedeno je prema linearnom nizu. Linearni niz obično se koristi kada geometrijski niz nije dovoljno precizan za određivanje toksičnosti, a odvija se u nekoliko koraka.

U prvom koraku se u nizu A u prvu kivetu doda 2/3 2 % NaCl, u zadnju 2/3 uzorka. U predzadnju kivetu doda se 1 mL 2 % NaCl, a preostale kivete napune se s 1,5 mL 2 % NaCl. Zatim se u drugom koraku u istom nizu napravi niz željenih razrjeđenja postupkom prikazanim na slici 11. U zadnjem koraku se u sve ostale kivete B i C niza stavi po 0,5 mL inokuluma *V. fischeri*. Započinje test, te se redom mjeri luminiscencija B1, nakon čega se dodaje 0,5 mL razrjeđenja pripremljenog u nizu A, zatim se postupak ponovi za paralelu C1. Isti postupak ponavlja se za svih 10 nizova B i C. Nakon 30 minuta ponovo se očitava luminiscencija te se mjeri razlika u luminiscenciji na temelju čega uređaj određuje EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti.



Slika 11. Postupak pripreme razrjeđenja kod određivanja toksičnosti bakterijom *V. fischeri*.

3.4. Priprema baždarnog dijagrama

Prije postavljanja eksperimenta biorazgradnje MP-a primjenom kvasca *Candida parapsilosis*, napravljen je baždarni dijagram ovisnosti logaritamskog broja živih stanica kulture kvasca (log CFU) i optičke gustoće (OG). U tu svrhu pripremila se gusta suspenzija kvasca *Candida parapsilosis* te se izmjerila početna OG ($\lambda = 600$ nm). Početna gusta suspenzija kvasca razrjeđivala se više puta u cilju dobivanja različitih OG. Nakon mjerenja OG-a, kako za početnu suspenziju, tako i za sve ostale suspenzije, priređena su razrjeđenja svake suspenzije za određivanje CFU-a postupkom opisanim u poglavlju 3.3.5.2. Nakon 5 dana inkubacije na 28 °C izbrojane su izrasle kolonije kvasca. Iz dobivenih vrijednosti dobila se ovisnost log CFU o OG na temelju koje se mogao postaviti pokus biorazgradnje PS i PVC MP-a.

3.5. Određivanje optimalnih uvjeta biorazgradnje

U ovom radu provedena je biorazgradnja AOP-om predtretiranih PS i PVC mikročestica primjenom kvasca *Candida parapsilosis*. U oba eksperimenta ispitala su se tri parametra (pH, OG i o/min) na tri razine kako bi se odredili optimalni uvjeti. Početni uvjeti eksperimenta biorazgradnje prikazani su u tablici 5, a eksperimenti su provedeni prema potpunom faktorskom dizajnu (tablica 6). Eksperimenti su bili podijeljeni u tri seta s obzirom na broj okretaja rotacijske tresilice (120 o/min, 160 o/min i 200 o/min). Svi eksperimenti provodili su se 30 dana, a za praćenje procesa izuzimali su se uzorci u 0., 3., 7., 14., 21. i 30. danu.

Tablica 5. Početni uvjeti eksperimenata biorazgradnje PS i PVC MP-a primjenom *Candida parapsilosis*.

	1. eksperiment			2. eksperiment			3. eksperiment		
Broj okretaja / o/min	120			160			200		
pH	3	5	7	3	5	7	3	5	7
OG	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0	0,1	0,5	1,0
log CFU	6,60	7,18	7,49	6,38	7,28	7,66	6,95	7,43	7,92
$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	7,22			7,21			7,21		
T / °C	26,6			26,2			27,0		

Tijekom 30 dana pri sobnoj temperaturi uzorci su postavljeni na tresilicu u Erlenmayerovim tikvicama od 200 mL, a radni volumen bio je $V_R = 80$ mL. Svaka tikvica sadržavala je predtretiranu MP, suspenziju *Candida parapsilosis* i MM određene pH. Provodila su se 3 eksperimenta, gdje je u svakome od eksperimenata bilo 27 tikvica, odnosno 9 tikvica za PS MP-a, 9 tikvica za PVC MP-a i 9 tikvica za slijepe probe (SP) pri procesnim parametrima prikazanim u tablici 6. Uvjeti u SP-ima bili su isti kao i u eksperimentalnim tikvicama za PS i PVC MP-a, jedina razlika je bila što SP-i nisu sadržavali MP-a. Tijekom 0. i 30. dana određivani su pH, temperatura i koncentracija otopljenog kisika te je provedena mikroskopska analiza stanica kvasca, a u 0., 3., 7., 14., 21., i 30. danu određivan je CFU te su se provodile TOC i HPLC/MS analiza. Određivanje toksičnosti bakterijom *V. fischeri* i FTIR-ATR spektroskopija provodile su se na kraju eksperimenta, odnosno nakon 30 dana. Nakon provedbe svih eksperimenata, određeni su optimalni uvjeti biorazgradnje PS i PVC MP-a korištenjem kvadratnog modela površine odziva. Odziv je bila log CFU vrijednost dobivena u 30. danu provedbe eksperimenta. Optimalni uvjeti eksperimenata potkrijepljeni su ostalim analizama.

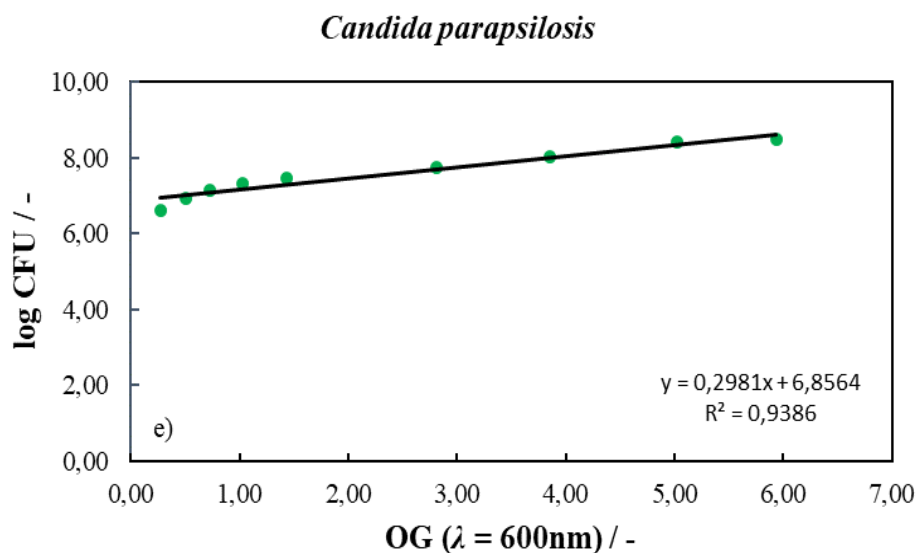
Tablica 6. Dizajn eksperimenta prema potpunom faktorskom planu.

Broj eksperimenta	o/min	pH	OG
1	120	3	0,5
2	120	3	1,0
3	120	3	0,1
4	120	5	0,5
5	120	5	1,0
6	120	5	0,1
7	120	7	0,5
8	120	7	1,0
9	120	7	0,1
10	160	3	0,5
11	160	3	1,0
12	160	3	0,1
13	160	5	0,5
14	160	5	1,0
15	160	5	0,1
16	160	7	0,5
17	160	7	1,0
18	160	7	0,1
19	200	3	0,5
20	200	3	1,0
21	200	3	0,1
22	200	5	0,5
23	200	5	1,0
24	200	5	0,1
25	200	7	0,5
26	200	7	1,0
27	200	7	0,1

4. REZULTATI

4.1. Baždarni dijagram za *Candidu parapsilosis*

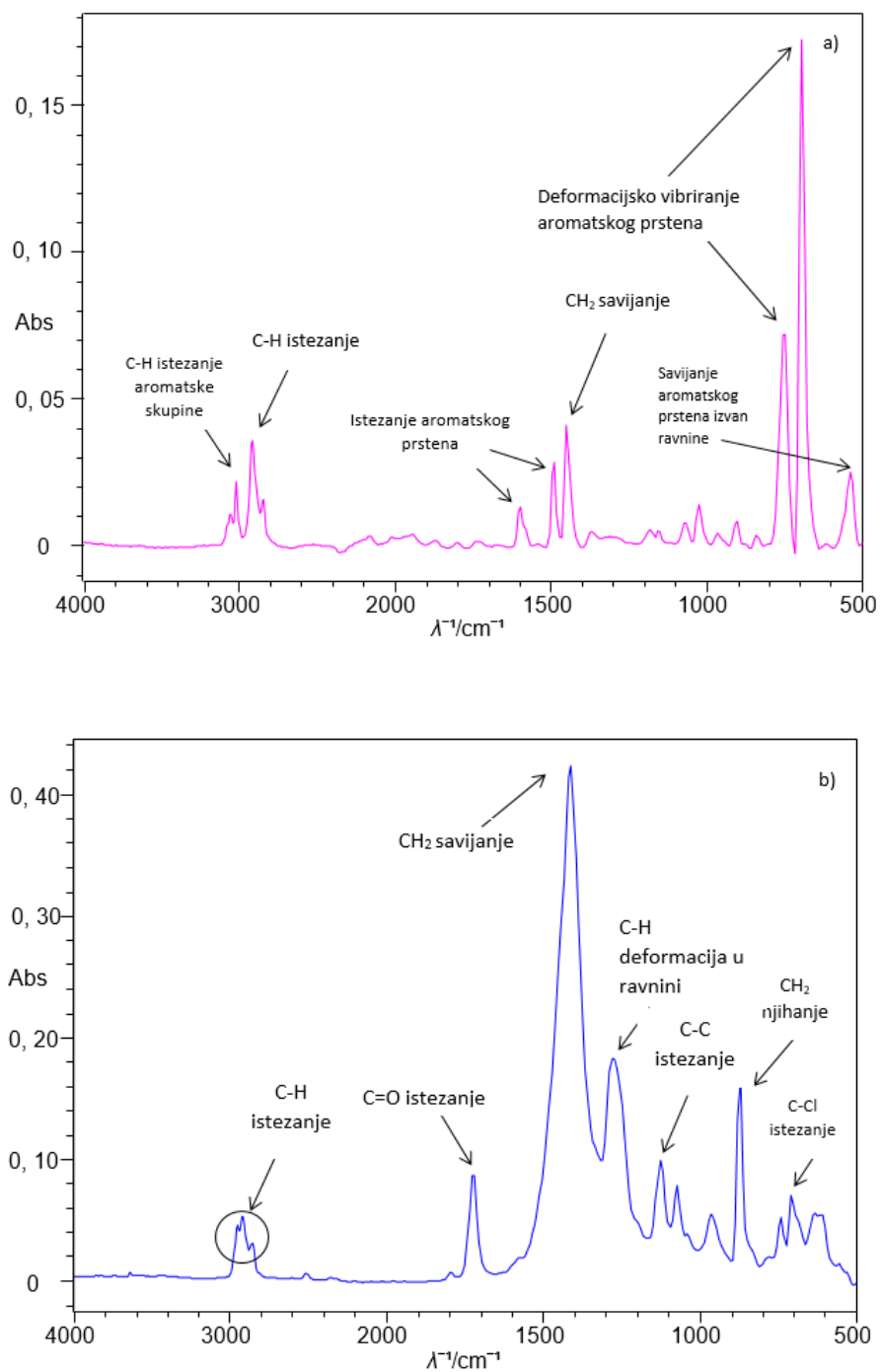
Prije početka eksperimenata biorazgradnje uzgojen je kvasac *Candida parapsilosis*, za koji je bilo potrebno napraviti baždarni dijagram ovisnosti log CFU o OG. Baždarni dijagram prikazan je na slici 12, a postupak je opisan u poglavlju 3.4.



Slika 12. Baždarni dijagram za kvasac *Candida parapsilosis*.

4.1.1. FTIR-ATR spektroskopija mikroplastike prije biorazgradnje

Slika 13 prikazuje početne uzorke MP-a prije predtretmana s AOP-om i biorazgradnje. Na slici je pod a) prikazan je FTIR spektar početnog uzroka PS MP-a s označenim karakterističnim funkcionalnim skupinama, a pod b) prikazan je FTIR spektar početnog uzorka PVC MP-a s označenim karakterističnim funkcionalnim skupinama. U poglavlju 3.3.5.1. opisan je postupak FTIR-ATR spektroskopije te su u tablici 4 u istom poglavlju dani karakteristični pikovi za PS i PVC MP-a.



Slika 13. FTIR spektar s karakterističnim funkcionalnim skupinama za: a) PS i b) PVC.

4.1.2. Dizajn eksperimenta i statistička analiza

U programskom paketu *Desing Expert* 7.1.5. određeni su optimalni uvjeti procesa biorazgradnje PS i PVC MP-a kvascem *Candida parapsilosis*. U tablicama 7 i 8 prikazani su rezultati analize varijance podataka dobivenih za biorazgradnju PS MP-a, odnosno PVC MP-a, dok su u tablici 9 prikazani optimalni uvjeti biorazgradnje PS i PVC MP-a kvascem *Candida parapsilosis*. U tablicama 10 i 11 dani su prikazi odzivnih površina u međuovisnosti o ispitivanim čimbenicima.

Tablica 7. Statistička analiza značajnih procesnih parametara biorazgradnje PS-a kvascem *Candida parapsilosis* uz 95,00%-tnu vjerojatnost.

	Zbroj kvadrata odstupanja	<i>df</i>	Srednja vrijednost sume kvadrata odstupanja	<i>F</i> -vrijednost	<i>p</i> -vrijednost
Model	6,05	9	0,67	24,97	<0,0001
A-o / min	0,11	1	0,11	3,98	0,0623
B-pH / -	0,018	1	0,018	0,66	0,4273
C-OG / -	5,15	1	5,15	191,46	<0,0001
AB	0,031	1	0,031	1,15	0,2981
AC	0,011	1	0,011	0,40	0,5332
BC	$4,899 \cdot 10^{-3}$	1	$4,899 \cdot 10^{-3}$	0,18	0,6750
A²	$2,017 \cdot 10^{-3}$	1	$2,017 \cdot 10^{-3}$	/	0,7876
B²	0,029	1	0,029	/	0,3105
C²	0,95	1	0,95	/	<0,0001
Ostatak	0,46	17	0,027	/	/
Ukupno	6,50	26	/	/	/
R²	0,9297				
R²_{adj}	0,8924				

* *p*-vrijednosti manje od 0,0500 ukazuju na značajnost

Tablica 8. Statistička analiza značajnih procesnih parametara biorazgradnje PVC-a kvascem *Candida parapsilosis* uz 95,00%-tnu vjerojatnost.

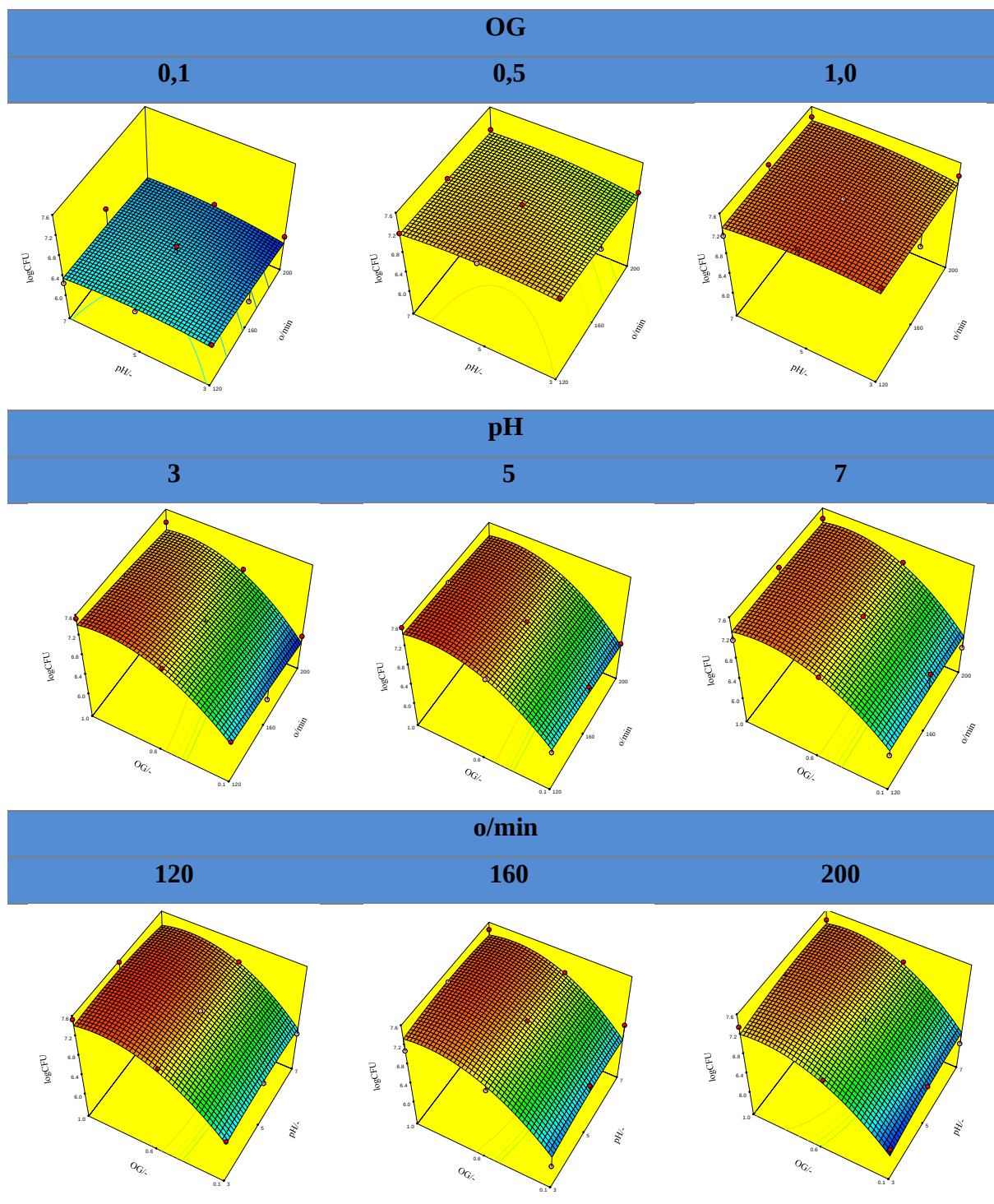
	Zbroj kvadrata odstupanja	<i>df</i>	Srednja vrijednost sume kvadrata odstupanja	<i>F</i> -vrijednost	<i>p</i> -vrijednost
Model	5,66	9	0,63	16,54	<0,0001
A-o / min	0,10	1	0,10	2,66	0,1212
B-pH / -	0,086	1	0,086	2,27	0,1499
C-OG / -	4,74	1	4,74	124,83	<0,0001
AB	0,029	1	0,029	0,76	0,3944
AC	0,13	1	0,13	3,42	0,0818
BC	$9,345 \cdot 10^{-3}$	1	$9,345 \cdot 10^{-3}$	0,25	0,6263
A²	0,011	1	0,011	/	0,5932
B²	0,066	1	0,066	/	0,2045
C²	0,68	1	0,68	/	0,0006
Ostatak	0,65	17	0,038	/	/
Ukupno	6,30	26	/	/	/
R²	0,8975				
R²_{adj}	0,8432				

* *p*-vrijednosti manje od 0,0500 ukazuju na značajnost

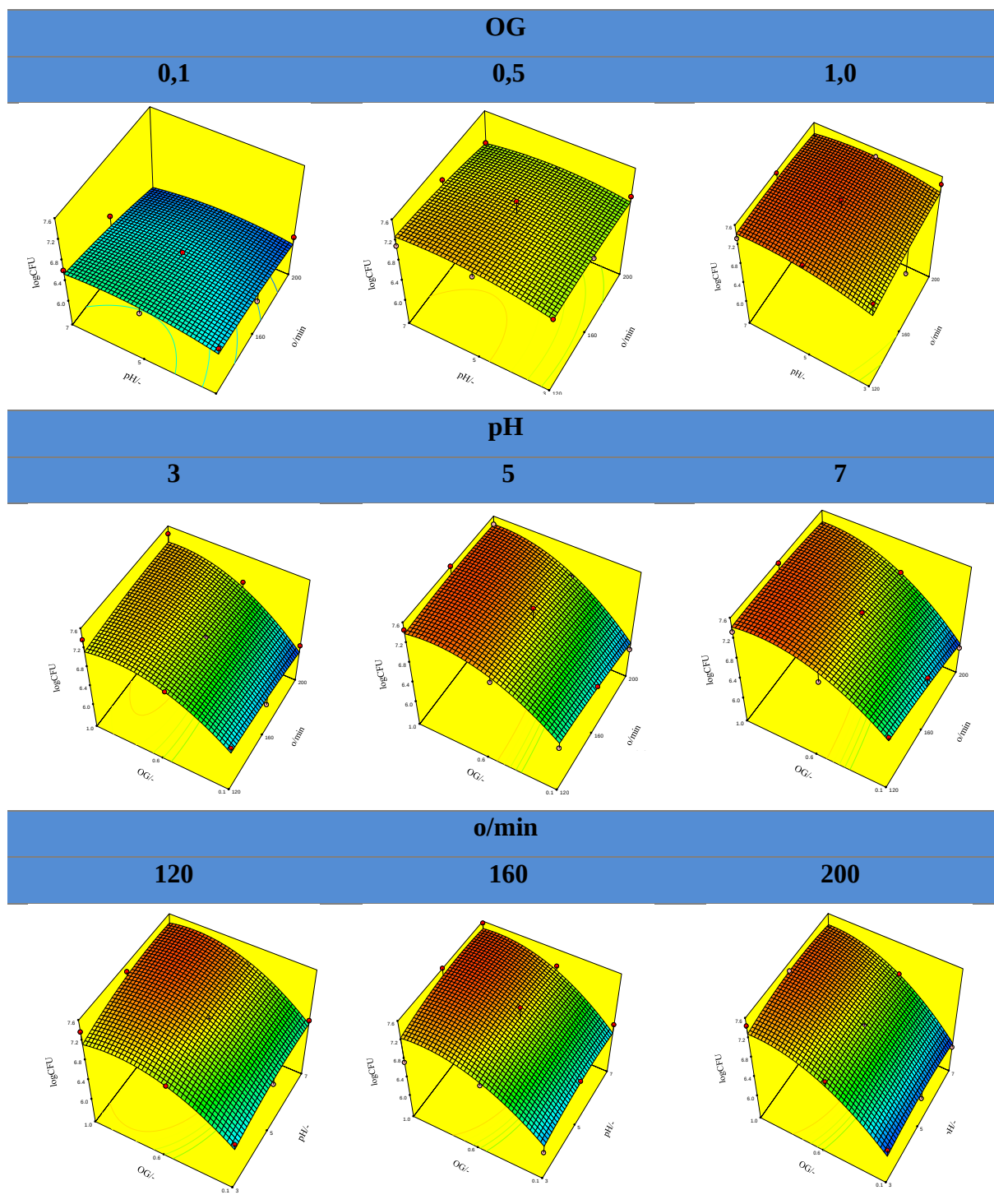
Tablica 9. Optimalni uvjeti za biorazgradnju MP-a kvascem *Candida parapsilosis*.

MP	Broj okretaja / min	pH	OG
PS	120	4,55	0,83
PVC	163	5,90	1,00

Tablica 10. Trodimenzionalni grafički prikaz utjecaja procesnih parametara: broj okretaja i OG, broj okretaja i pH te OG i pH na biorazgradnju PS MP-a.



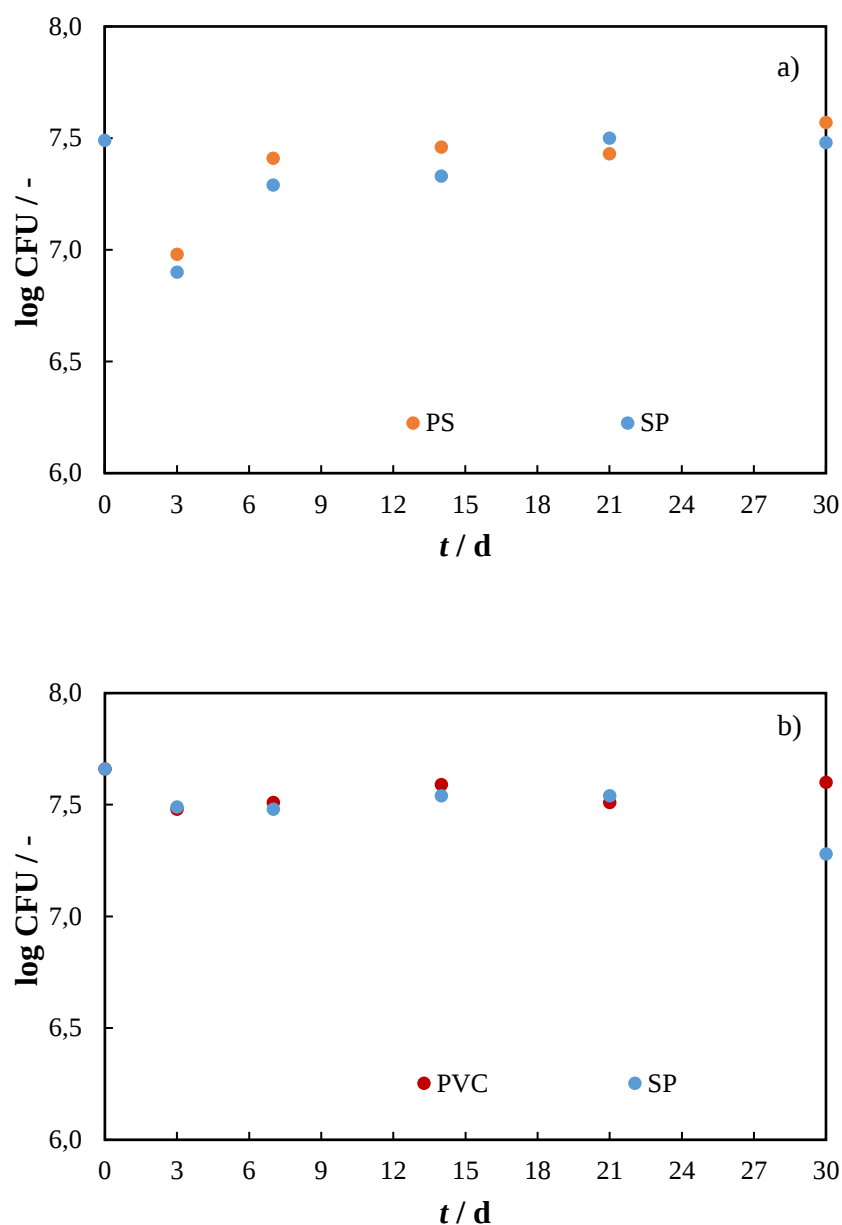
Tablica 11. Trodimenzionalni grafički prikaz utjecaja procesnih parametara: broj okretaja i OG, broj okretaja i pH te OG i pH na biorazgradnju PVC MP-a.



4.2. Rezultati dobiveni pri optimalnim uvjetima biorazgradnje

4.2.1. Praćenje CFU vrijednosti

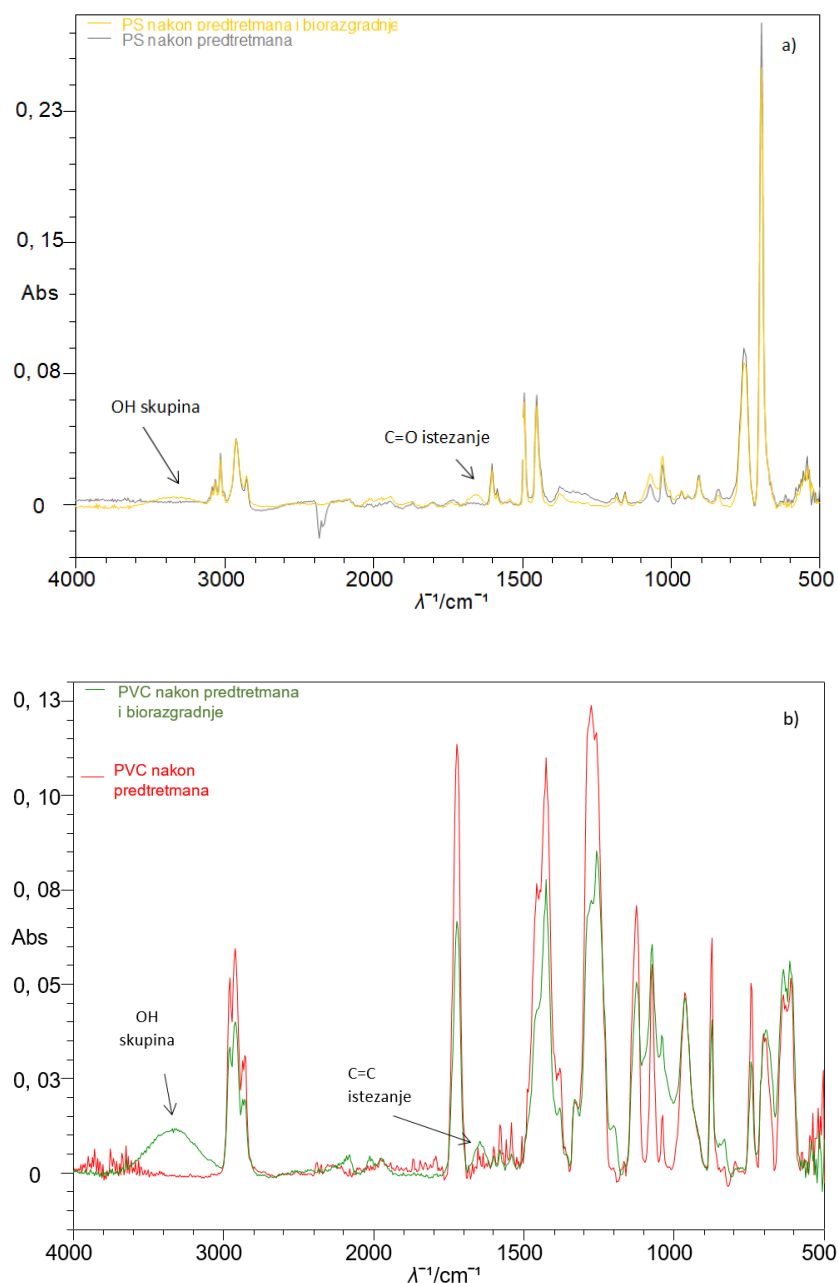
Na slici 14 prikazana je logaritamska promjena CFU tijekom 30 dana pri optimalnim uvjetima (tablica 9) biorazgradnje PS MP-a (slika 14a) i PVC MP-a (slika 14b) u usporedbi sa slijepom probom (SP).



Slika 14. Logaritamska promjena CFU pri optimalnim uvjetima biorazgradnje za pod
a) PS MP-a i b) PVC MP-a tijekom 30 dana.

4.2.2. FTIR-ATR spektroskopija

Na slici 15 prikazani su FTIR spektri snimljeni nakon predtretmana $UV/S_2O_8^{2-}$ procesom u usporedbi sa FTIR spektrima snimljenima nakon predtretmana istim procesom i provedene biorazgradnje PS (slika 15a) i PVC (slika 15b) MP-a pri optimalnim uvjetima (tablica 9).



Slika 15. FTIR spektri snimljeni za pod a) PS MP-a i b) PVC MP-a nakon predtretmana i optimalnih uvjeta biorazgradnje s *Candida parapsilosis* u usporedbi s PS i PVC MP-a nakon samo predtretmana $UV/S_2O_8^{2-}$ procesom.

4.2.3. TOC analiza

U tablici 12 i 13 prikazana je promjena TOC-a, TC-a i TIC-a za PS i PVC pri optimalnim uvjetima biorazgradnje PS i PVC MP-a tijekom 30 dana. Postupak analize opisan je u poglavlju 3.3.5.2.

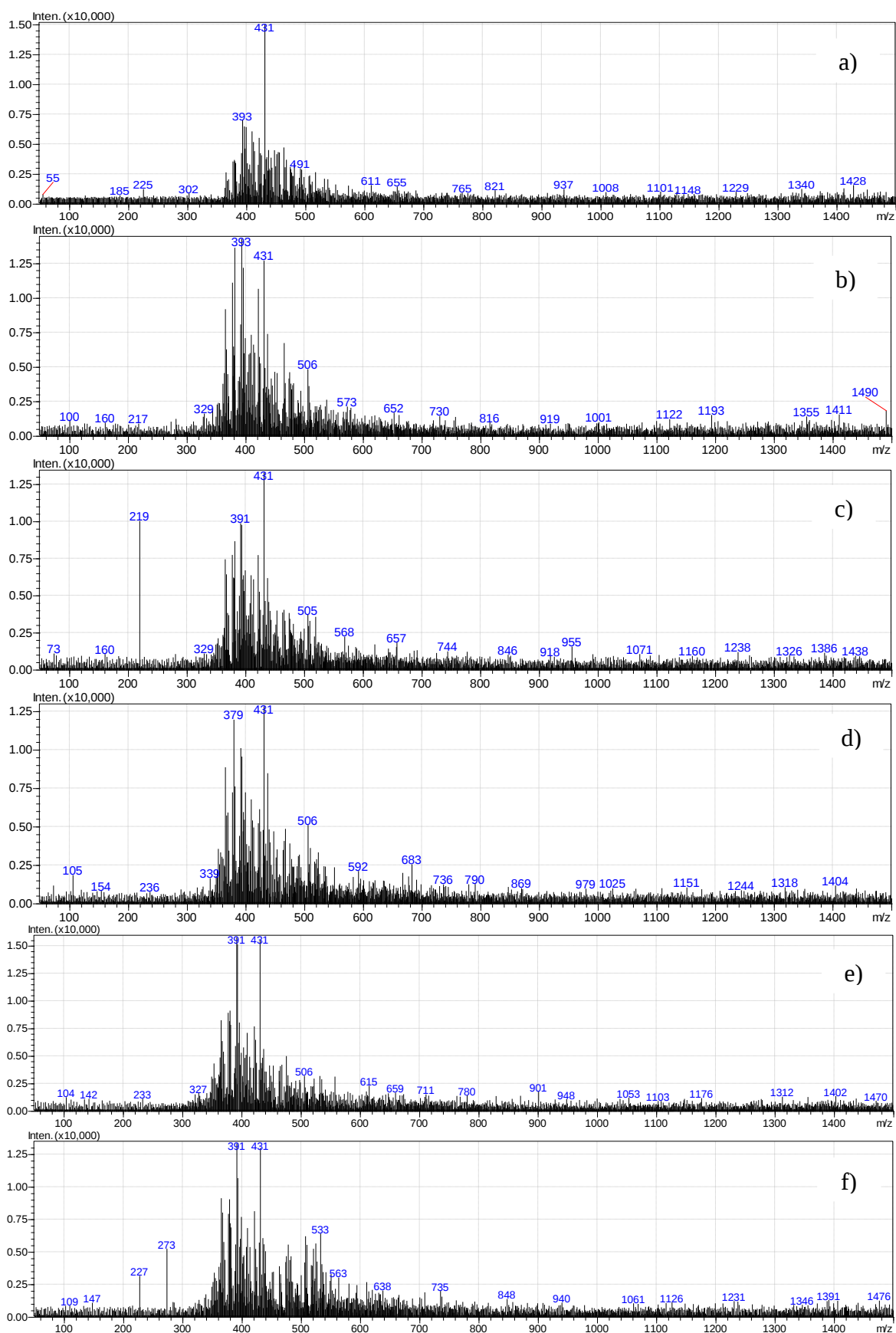
Tablica 12. Rezultati vrijednosti TOC-a, TC-a i TIC-a tijekom 30 dana biorazgradnje PS MP-a pri optimalnim uvjetima.

<i>t / d</i>	$\gamma(\text{TOC}) / \text{mg/L}$		$\gamma(\text{TC}) / \text{mg/L}$		$\gamma(\text{TIC}) / \text{mg/L}$	
	PS	SP	PS	SP	PS	SP
0	1,74	1,74	2,10	2,10	0,36	0,36
3	1,91	0,97	2,00	1,07	0,09	0,10
7	0,60	3,78	0,75	4,25	0,15	0,47
14	2,56	3,38	2,94	3,76	0,38	0,38
21	1,92	2,69	2,97	2,72	1,05	0,03
30	1,37	1,95	2,57	2,22	1,20	0,27

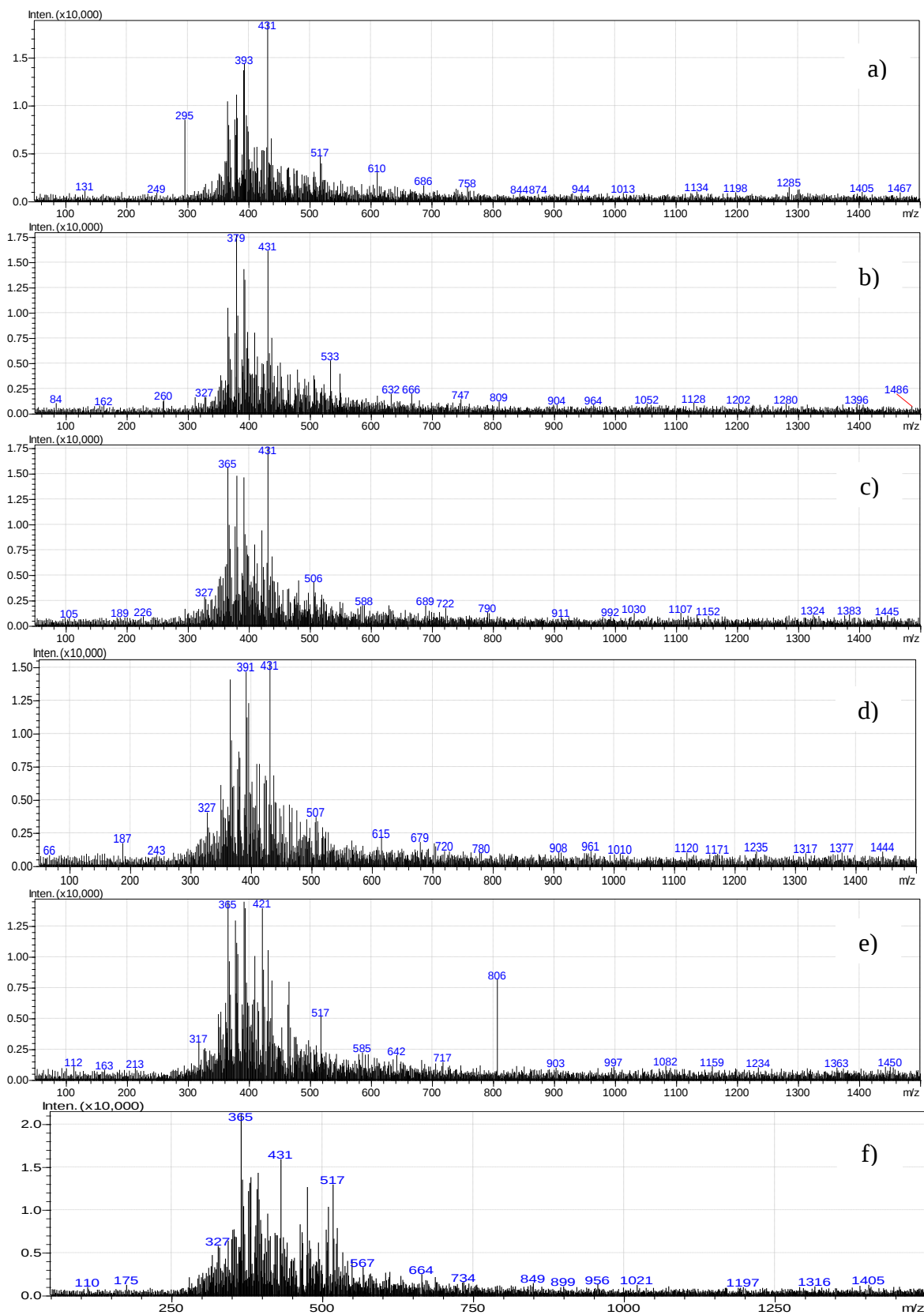
Tablica 13. Rezultati vrijednosti TOC-a, TC-a i TIC-a tijekom 30 dana biorazgradnje PVC MP-a pri optimalnim uvjetima.

<i>t / d</i>	$\gamma(\text{TOC}) / \text{mg/L}$		$\gamma(\text{TC}) / \text{mg/L}$		$\gamma(\text{TIC}) / \text{mg/L}$	
	PVC	SP	PVC	SP	PVC	SP
0	1,89	1,89	2,11	2,11	0,22	0,22
3	1,65	1,54	1,69	1,82	0,04	0,28
7	1,30	1,51	1,43	1,66	0,13	0,15
14	2,54	2,68	2,85	3,37	0,31	0,69
21	3,43	2,94	3,91	3,28	0,48	0,34
30	1,42	2,69	2,49	3,16	1,07	0,47

4.2.4. HPLC/MS analiza



Slika 16. Spektri masa PS-a pri biorazgradnji u a) 0. b) 3. c) 7. d) 14. e) 21. i f) 30. danu.

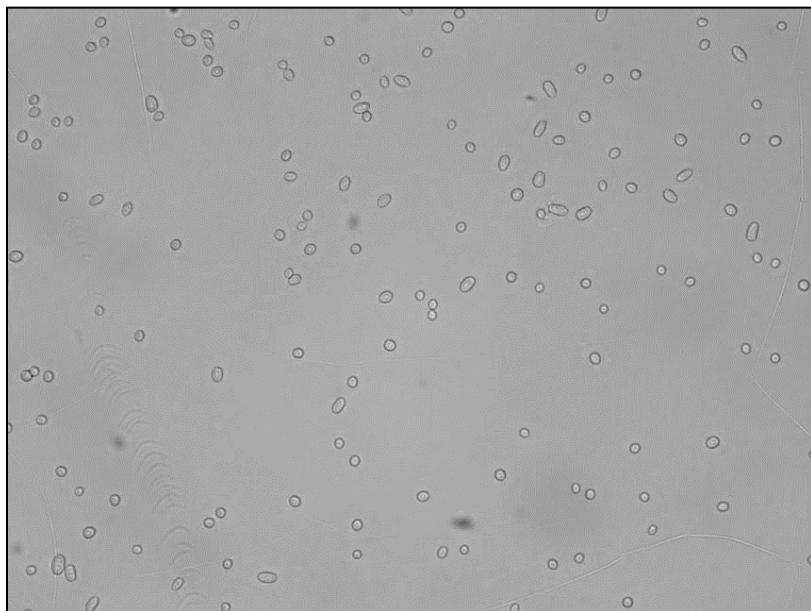


Slika 17. Spektre masa PVC-a pri biorazgradnji u a) 0. b) 3. c) 7. d) 14. e) 21. i f) 30. danu.

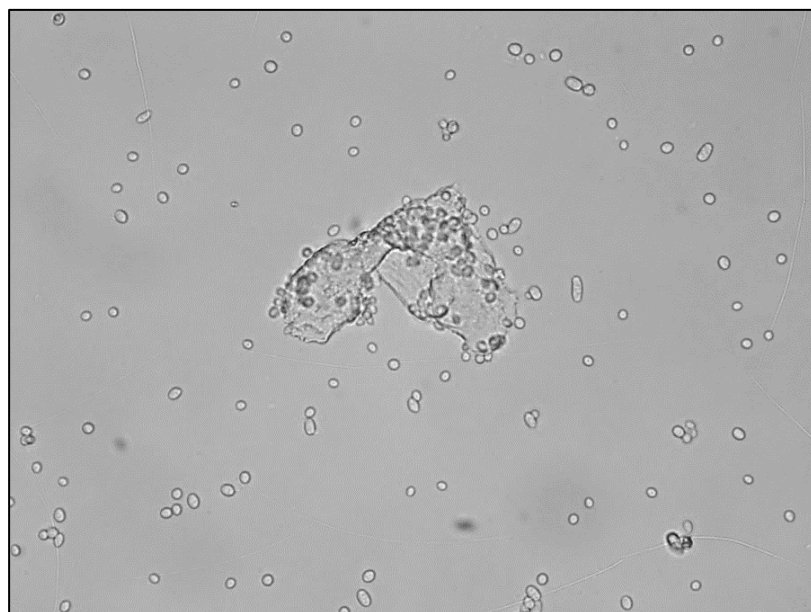
Na slikama 16 i 17 su spektre masa PS i PVC MP-a snimljeni tijekom biorazgradnje pri optimalnim uvjetima.

4.2.5. Mikroskopska analiza kvasca *Candida parapsilosis*

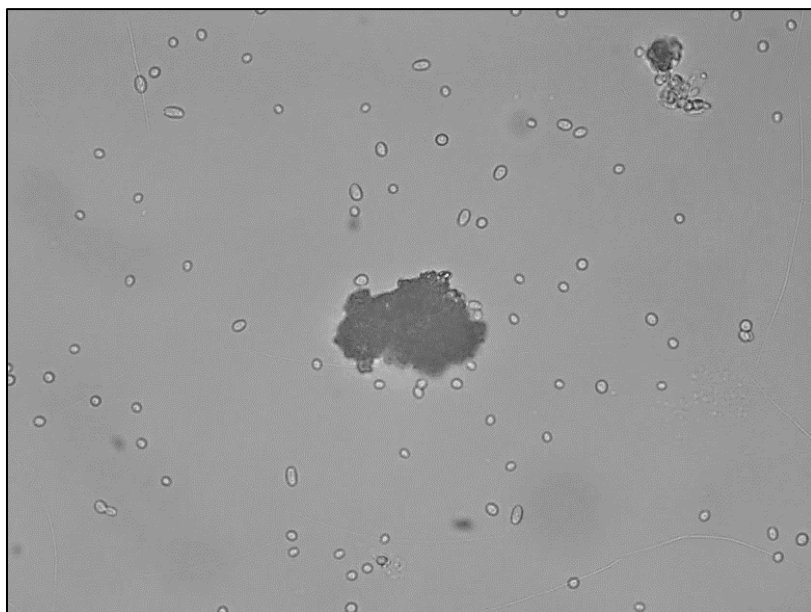
Na slici 18 prikazana je mikrografija *Candida parapsilosis* u uzorku SP, dok slike 19 i 20 prikazuju snimljene mikrografije *Candida parapsilosis* pod svjetlosnim mikroskopom nakon biorazgradnje PS i PVC MP-a pri optimalnim uvjetima.



Slika 18. Mikrografija *Candida parapsilosis* u SP nakon 30. dana biorazgradnje snimljena svjetlosnim mikroskopom pri uvećanju 400×.



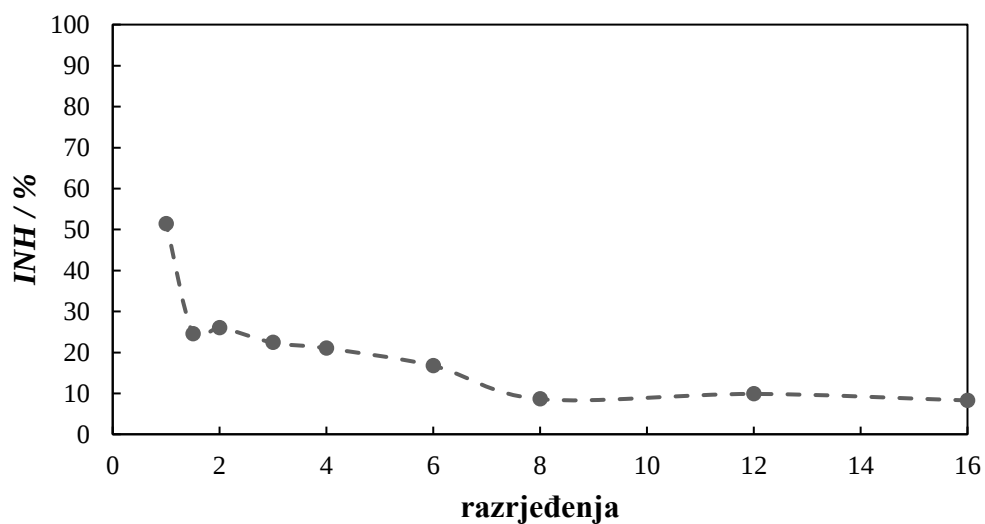
Slika 19. Mikrografija PS MP-a nakon 30. dana biorazgradnje pri optimalnim uvjetima snimljena svjetlosnim mikroskopom pri uvećanju 400×.



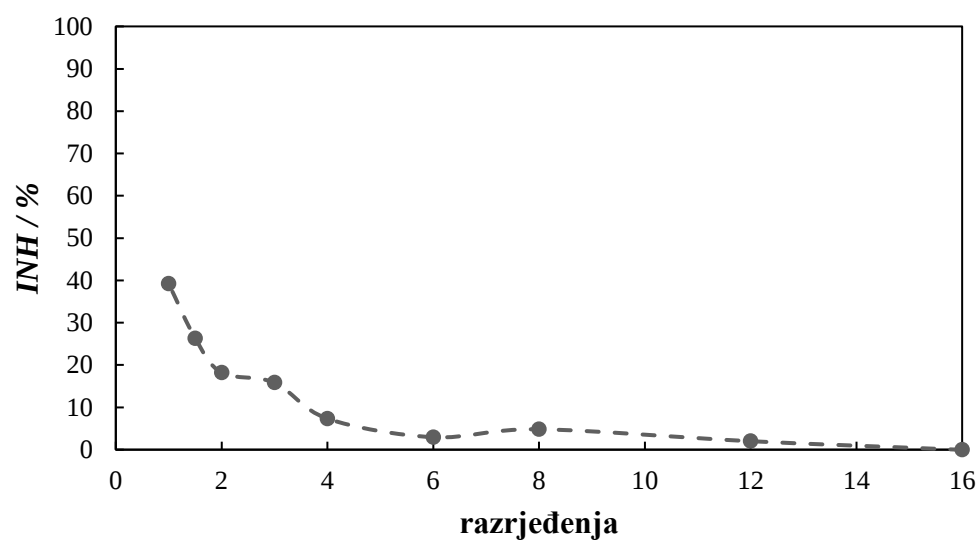
Slika 20. Mikrografija PVC MP-a nakon 30. dana biorazgradnje pri optimalnim uvjetima snimljena svjetlosnim mikroskopom pri uvećanju 400×.

4.2.6. Određivanje toksičnosti filtrata bakterijom *Vibrio fischeri*

Na slikama 21 i 22 prikazani su rezultati testa toksičnosti filtrata na kraju eksperimenta biorazgradnje MP-a pri optimalnim uvjetima primjenom kvasca *Candida parapsilosis*.



Slika 21. Toksičnost filtrata nakon biorazgradnje PS MP-a pri optimalnim uvjetima primjenom kvasca *Candida parapsilosis*.



Slika 22. Toksičnost filtrata nakon biorazgradnje PVC MP-a pri optimalnim uvjetima primjenom kvasca *Candida parapsilosis*.

5. RASPRAVA

Onečišćenje plastikom, a osobito MP-om, postalo je jedan od najvećih ekoloških problema, budući da brzo rastuća proizvodnja jednokratnih plastičnih proizvoda nadmašuje sposobnost svijeta da se s time nosi. Plastika napravljena od fosilnih goriva proizvodi se nešto više od jednog stoljeća. Proizvodnja i razvoj tisuće novih plastičnih proizvoda ubrzani su nakon Drugog svjetskog rata, te je život bez nje danas gotovo nezamisliv. Posebnu prijetnju za okoliš predstavlja MP-a, nedavno klasificirana kao onečišćujuća tvar koja izaziva zabrinutost čovječanstva.[50] MP-a, kao i plastika, često sadrži aditive koji je čine čvršćom, fleksibilnijom i izdržljivijom. Mnogi od tih aditiva mogu produžiti vijek trajanja proizvoda, a prema nekim procjenama potrebno je najmanje 400 godina da se razgrade.[66] Unatoč činjenici da je većina plastike i MP-e teško biorazgradiva, biorazgradnja se i dalje proučava za uklanjanje MP-a iz okoliša jer je ekološki i ekonomički prihvatljiva. Biorazgradnja se može provesti primjenom pojedinačnih ili kombiniranih kultura kao što su bakterije, plijesni, kvasci i alge.[67] Osim loše biorazgradivosti MP-a, nedostaju standardizirane metode uzorkovanja i analitičke metode, pa čak i ako se broj istraživanja povećava, distribucija MP-e ne može se procijeniti na globalnoj razini pa se javlja potreba za identifikacijom MP čestica za procjenu rizika za okoliš i zdravlje ljudi.[68]

U ovom radu ispitana je biorazgradnja PS i PVC MP-a primjenom kvasaca *Candida parapsilosis* s ciljem određivanja optimalnih uvjeta procesa. Statističkom obradom u programu *Desgin Expert* 7.1.5. prema punom faktorskom planu određeni su optimalni uvjeti biorazgradnje MP-a. Tijekom 30 dana, odnosno u 0., 3., 7., 14., 21. i 30. danu, izuzimali su se uzorci i provodile su se sljedeće analize: CFU, TOC i HPLC/MS analiza, dok su se FTIR-ATR spektroskopija, određivanje toksičnosti filtrata i mikroskopska analiza stanica kvasca *Candida parapsilosis* proveli prije i nakon provedbe eksperimenata biorazgradnje.

5.1. FTIR-ATR spektroskopija mikroplastike prije biorazgradnje

Prije predtretmana MP-a UV/S₂O₈²⁻ procesom i određivanja optimalnih uvjeta biorazgradnje provedena je FTIR-ATR spektroskopska analiza početnih uzoraka MP-a kako bi se usporedbom s bazom podataka potvrdilo da je zaista riječ o odabranim polimerima PS i PVC. Na slici 13 prikazani su dobiveni FTIR spektri s označenim karakterističnim pikovima.

Prije predtremana i provedbe eksperimenta biorazgradnje analizirani su početni uzorci PS i PVC MP-a kako bi se odredile karakteristične funkcionalne skupine čije promjene su se promatrale nakon razgradnje. Tipične veze za karakterizaciju PS i PVC MP-a prikazane su u tablici 4, a svi spektri snimljeni su u području karakterističnom za sve polimere u rasponu 4000–500 cm^{-1} . [61,62] Za PS karakteristični pikovi pojavljuju se na 3061 i 3026 cm^{-1} koji odgovaraju C–H istezanju aromatske skupine. Karakterističan je i pik pri 2847 cm^{-1} koji odgovara C–H istezanju, dok se pri valnim brojevima 1601 i 1492 cm^{-1} pojavljuju pikovi koji odgovaraju istezanju aromatskog prstena. Pri 1451 cm^{-1} pojavljuje se pik koji odgovara CH_2 savijanju. Na 1451 cm^{-1} nalazi se pik koji odgovara C–H vezi u aromatskom prstenu. Pik na 694 cm^{-1} odgovara savijanju C–H veze izvan ravnine aromatskog prstena dok pik na 537 cm^{-1} odgovara savijanju aromatskog prstena izvan ravnine. [64] S druge strane, PVC spektar karakteriziraju pikovi na 2920 cm^{-1} , 2849 cm^{-1} i 1736 cm^{-1} koji odgovaraju simetričnom C–H istezanju te pik pri 1427 cm^{-1} koji odgovara CH_2 uvijanju dok je pri valnom broju od 1255 cm^{-1} pik koji odgovara C–H deformaciji u ravnini. Pik na 1099 cm^{-1} odgovara istezanju C–C veze, a pik na 996 cm^{-1} odgovara njihanju CH_2 . Na valnoj duljini 616 cm^{-1} nalazi se pik koji predstavlja istezanje C–Cl veze. [69]

5.1.2. Dizajn eksperimenta i statistička analiza

Na rezultatima eksperimenata provedenih sukladno potpunom faktorskom planu određeni su optimalni uvjeti biorazgradnje PS i PVC MP-a kvascem *Candida parapsilosis*. Za opis odzivnih površina koristio se kvadratni model. Kod kvadratnog modela važna je vrijednost koeficijenata determinacije (R^2 i R^2_{adj}) koji u idealnom slučaju iznose 1, a pokazuju slaganje eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka. Visoke vrijednosti koeficijenata determinacije pokazatelji su dobrog odabira modela prilikom analize. Dobivene vrijednosti R^2 0,9297 i R^2_{adj} 0,8924 za PS MP-a i 0,8975 te 0,8432 za PVC MP-a pokazatelji su dobrog odabira modela za opis realnog sustava. Veće vrijednosti R^2 i R^2_{adj} za PS pokazuju da je statistička analiza bliža eksperimentalnim podacima u usporedbi s dobivenim vrijednostima za PVC. U tablicama 7 i 8 prikazani su dobiveni statistički podaci za PS i PVC MP-a te značajni procesni parametri modela. Provedena je analiza varijance (ANOVA) za procjenu značajnosti parametara, odnosno o/min, pH i OG uz 95,00%-tnu vjerojatnost. To znači da su parametri modela značajni ako im je p -vrijednost manja od 0,05.

Na temelju dobivenih *p*-vrijednosti iz tablica 7 i 8 nakon provedbe eksperimenta biorazgradnje MP-a samo je OG utvrđen kao značajni parametar. Trodimenzionalni (3D) prikaz odzivnih površina prikazuje površinu prema kojoj se može vidjeti utjecaj procesnih parametara na odziv modela, koji je u ovome slučaju bio logaritamska vrijednost CFU-a. U tablici 10 prikazan je utjecaj broja okretaja, pH i OG na log CFU u eksperimentu biorazgradnje PS MP-a, a u tablici 11 prikazane su odzivne površine utjecaja istih parametara na biorazgradnju PVC MP-a. Crvena boja na grafovima označava maksimalan utjecaj parametara na log CFU, odnosno najučinkovitiju biorazgradnju, dok plava boja prikazuje područje s najmanjim utjecajem parametara na log CFU, odnosno najlošije uvjete za biorazgradnju. U tablici 10 prikazani su 3D prikazi odzivne površine u međuovisnosti čimbenika za biorazgradnju PS MP-a kvascem *Candida parapsilosis*. Može se uočiti da najmanji utjecaj na biorazgradnju imaju pH i broj okretaja što se podudara sa statističkom analizom (tablica 7) gdje se kao jedini značajni parametar (s obzirom na *p*-vrijednost) pokazao OG. Dakle, najbolji odziv je dobiven pri eksperimentima provedenim s OG=1,0, dok je najniža vrijednost log CFU dobivena pri OG=0,1. S druge strane, crvena područja dobivena su pri pH 5 i pri 120 o/min. Najveći odziv log CFU dobiven je pri OG oko vrijednosti 1,0 te pri 120 o/min. Pri pH 5 log CFU povećava se s povećanjem OG i smanjenjem broja okretaja. Dakle s obzirom na crveno područje na 3D grafu, OG ima najznačajniji utjecaj na biorazgradnju PS-a u odnosu na ostale parametre. U tablici 11 prikazani su 3D prikazi odzivne površine u međuovisnosti čimbenika za biorazgradnju PVC MP-a kvascem *Candida parapsilosis*. Može se uočiti da najmanji utjecaj na biorazgradnju imaju pH i broj okretaja, što je vidljivo u tablici 7. Jedini značajni utjecaj na proces ima OG što je potvrđeno i tablicom 11 gdje se najznačajnija promjena vidi pri promjeni OG, odnosno bez obzira na promjenu pH i o/min jedino crveno područje uočava se pri OG = 1,0. Dakle, najbolji odziv je dobiven pri eksperimentima provedenim s OG = 1,0, dok je najniža vrijednost log CFU dobivena pri OG = 0,1. Što se tiče ostalih prikaza može se uočiti da je najviši odziv dobiven pri 160 o/min i pH 5. Najveći odziv log CFU dobiven je pri OG = 1,0 te pri 160 o/min. Dakle s obzirom na crveno područje na 3D grafu, OG ima najznačajniji utjecaj na biorazgradnju PVC-a u odnosu na ostale parametre. Optimalni uvjeti biorazgradnje MP-a primjenom kvasca *Candida parapsilosis* prikazani su u tablici 9. Optimalni uvjeti za biorazgradnju PS MP-a su 120 o/min, pH 4,55 i OG koja iznosi 0,83. S druge strane optimalni uvjeti za biorazgradnju PVC MP-a su 163 o/min, pH 5,90 i OG koja iznosi 1,00.

5.2. Optimalni uvjeti biorazgradnje

U daljnjem tekstu razjašnjeni su rezultati eksperimenata biorazgradnje PS i PVC MP-a primjenom kvasca *Candida parapsilosis* provedenih pri optimalnim uvjetima procesa prikazanima u tablici 9.

5.2.1. Logaritamska promjena CFU

Na slici 14 prikazana je promjena log CFU vrijednosti tijekom biorazgradnje pri optimalnim uvjetima PS i PVC MP-a primjenom kvasca *Candida parapsilosis*. Promjene su praćene tijekom 30 dana. Broj živih stanica kvasca u 0. danu za PS pri optimalnim uvjetima biorazgradnje iznosio je $3,10 \cdot 10^7$ stanica/mL, a broj živih stanica kvasca za PVC pri optimalnim uvjetima iznosio je $4,60 \cdot 10^7$ stanica/mL, SP su u oba slučaja iznosile isti broj živih stanica kvasca u 0. danu kao i uzorci s MP-a. Na slici 14a vidljivo je kako je broj živih stanica kvasca u 3. danu naglo pao kako za uzorak s PS MP-a tako i za SP što se može pripisati fazi prilagodbe, jer je već u 7. danu broj živih stanica ponovno porastao. Nakon porasta u 7. danu, broj živih stanica kvasca do 30. dana nije previše odstupao odnosno nastupila je stacionarna faza rasta kvasca. Međutim, broj živih stanica kvasca je bio veći u uzorku s PS MP-a u usporedbi s SP što ukazuje na to da *Candida parapsilosis* koristi PS MP-a kao dodatni izvor supstrata za rast i razvoj. Samim time može se zaključiti da ovaj kvasac može razgrađivati PS MP-a. Kod biorazgradnje PVC MP-a pri optimalnim uvjetima (slika 14b) u 3. danu također dolazi do pada log CFU. U ovome slučaju nije očit nagli porast log CFU tijekom ostatka eksperimenata. Osim toga, nije velika razlika u broju živih stanica kvasca u uzorcima s PVC MP-a i SP. Najveća razlika može se uočiti u 30. danu gdje je log CFU SP naglo pao, dok je log CFU uzorka s PVC MP-om ostao gotovo nepromijenjen u odnosu na ostatak eksperimenta. Može se pretpostaviti da je u SP-u ponestalo hranjivih tvari u MM za rast i razvoj kvasca, a log CFU u tikvici s MP-om nije pao jer je *Candida parapsilosis* nastavila koristiti PVC MP-a kao izvor supstrata za rast i razvoj.

U niti jednom eksperimentu pri optimalnim uvjetima biorazgradnje PS i PVC MP-a nije uočena potpuna mineralizacija MP-a, ali zaključeno je da ispitivani kvasac ima potencijal za biorazgradnju navedenih MP-a. Razgradnja je potvrđena i dodatnim analizama.

5.2.2. FTIR-ATR spektroskopija

FTIR-ATR spektroskopska analiza provedena je nakon provedbe eksperimenta biorazgradnje MP-a pri optimalnim uvjetima. Analiza se provodila kako bi se utvrdile moguće nastale promjene u funkcionalnim skupinama koje karakteriziraju kemijske strukture ispitivanih PS i PVC MP-a. Na slici 15 prikazani su dobiveni FTIR spektri snimljeni nakon predtretmana $UV/S_2O_8^{2-}$ procesom u usporedbi s FTIR spektrima nakon predtretmana i biorazgradnje MP-a pri optimalnim uvjetima. Usporedbom FTIR spektara može se uočiti da je u slučaju obje vrste MP-a došlo do smanjenja intenziteta gotovo svih karakterističnih pikova nakon provedbe eksperimenta biorazgradnje pri optimalnim uvjetima. Osim smanjenja intenziteta pikova, uočena je i pojava novih pikova koji također ukazuju na razgradnju MP-a. Na slici 15a naznačena je pojava O–H skupine ($\approx 3450\text{ cm}^{-1}$) i C=O skupine ($\approx 1700\text{ cm}^{-1}$) u FTIR spektru PS MP-a, dok je kod PVC MP-a (slika 15b) uz O-H skupinu uočen nastanak C=C skupine ($\approx 1650\text{ cm}^{-1}$). Svi navedeni pikovi indikatori su razgradnje PS i PVC MP-a. Kao što je već spomenuto, PS i PVC sadrže veliki udio aditiva, plastifikatora (poput bisfenola A, dioktil ftalata, itd.) u svom sastavu. Uz bakterije i gljive, kvasci mogu isto kolonizirati MP-e čestice PS-a i PVC-a. Prema literaturi [70] na temelju kemijske strukture PS-a, β -ugljik lanca ili aromatski prsten, mogu biti napadnuti funkcionalnim enzimima kao što je PETaza te se dalje razgraditi na kratkolančane ugljikovodike. To pokazuje da je došlo do biorazgradnje PS-a pomoću enzima. Što se tiče PVC-a, prema literaturi [71] enzim lakaza sa sposobnošću oksidacije fenolnih spojeva može razbiti PVC dvostruke veze i stvoriti nove C=O veze. U ovom slučaju to je jedan od pokazatelja da je došlo do biorazgradnje PVC-a. Također C–Cl veze u strukturi PVC MP-a imaju relativno nižu energiju vezanja od C–C i C–H veza te zbog toga dolazi do smanjenja C-Cl veze. Upravo to je prvi korak razgradnje PVC MP-a i prilikom razgradnje nastaje C=C veza.[72]

5.2.3. TOC analiza

Rezultati dobiveni TOC analizom prilikom biorazgradnje PS i PVC MP-a pri optimalnim uvjetima prikazani su u tablicama 12 i 13. Rezultati pokazuju promjenu vrijednosti ukupnog ugljika (TC), organskog ugljika (TOC) i anorganskog ugljika (TIC) tijekom eksperimenta biorazgradnje MP-a pri optimalnim uvjetima primjenom kvasca *Candida parapsilosis* u usporedbi s SP.

Koncentracija TOC-a tijekom biorazgradnje PS MP-a pri optimalnim uvjetima u 0. danu pokazuje vrijednost u iznosu od 1,74 mg/L, a za PVC MP-a 1,89 mg/L. U 3. danu je kod PS-a vrijednost TOC-a porasla na 1,91 mg/L. Zatim u 7. danu dolazi do pada TOC vrijednosti, koja se ponovno povećava u 14. danu na vrijednosti od 2,56 mg/L. U 21. i 30. danu ponovno se javlja pad vrijednosti TOC-a. U slučaju PVC-a u 3. danu zabilježen je pad TOC vrijednosti na 1,65 mg/L te se pad nastavio i u 7. danu nakon čega je u 14. i 21. danu zabilježen rast te je u 21. danu zabilježena najveća vrijednost TOC-a od 3,43 mg/L. U 30. danu zabilježen je pad vrijednosti TOC-a na 1,42 mg/L. Mikroorganizmi za svoj rast i razmnožavanje koriste ugljik kao izvor hranjivih tvari što je u skladu sa dobivenim CFU vrijednostima gdje je do porasta za PS MP-a došlo u 30. danu čime je potvrđeno da povećanjem CFU vrijednosti dolazi do pada koncentracije TOC-a.[73] U 21. danu je kod PVC-a, uočena veća vrijednost TOC-a u uzorku s PVC-om od uzorka SP-a te se pretpostavlja da je tu započela biorazgradnja PVC MP-a. Do porasta vrijednosti TOC-a dolazi jer nastaju organske tvari kao nusprodukti biorazgradnje. Zbog toga se provode daljnje analize kao što je HPLC/MS analiza kako bi se potvrdilo nastajanje ovih produkata. Kod PS-a najviša vrijednost TC-a postignuta je u 21. danu i iznosi 2,97 mg/L, dok je najveći porast TIC-a postignut u 30. danu i iznosi 1,20 mg/L. Kod PVC-a najviša vrijednost TC-a je postignuta u 21. danu i iznosi 3,91 mg/L, dok je najveći porast TIC-a postignut u 30. danu i iznosi 1,07 mg/L. Vrijednost TIC-a je u 0. danu za uzorak PS-a pri optimalnim uvjetima biorazgradnje iznosio 0,36 mg/L, dok je u 0. danu za uzorak PVC-a pri optimalnim uvjetima biorazgradnje iznosio 0,22 mg/L. Do najveće promjene TIC-a u uzorku PS-a i SP-a došlo je u 21. danu, dok je u uzorku PVC-a i SP-a došlo u 30. danu. TIC označava anorganski ugljik odnosno u našem slučaju CO₂ nastao biorazgradnjom MP-a, stoga je i za očekivati da će se njegova koncentracija povećavati tek pri kraju procesa biorazgradnje. Također može se uočiti da su vrijednosti TOC-a i TIC-a u pojedinim danima bile veće u uzorcima s česticama PS-a u odnosu na PVC. Isto tako povećanje koncentracije TOC-a u uzorku može ukazivati na stvaranje novih produkata razgradnje i oslobađanje aditiva s površine PS i PVC MP-a. Više vrijednosti TOC-a i TIC-a ukazuju na učinkovitiju biorazgradnju MP-a te se TIC veže uz razvijanje CO₂ kao jednog od mogućih produkata biorazgradnje, pa se može pretpostaviti da je u 30. danu došlo do najučinkovitije biorazgradnje pomoću kvasca *Candida parapsilosis*.

5.2.4. HPLC/MS analiza

Provođenjem HPLC/MS analize dobiveni su spektri masa filtrata dobivenih nakon biorazgradnje PS i PVC MP-a pri optimalnim uvjetima kvascem *Candida parapsilosis*. Na slici 16 prikazani su rezultati dobiveni tijekom biorazgradnje PS-a pri optimalnim uvjetima, a na slici 17 prikazani su rezultati dobiveni tijekom biorazgradnje PVC-a pri optimalnim uvjetima.

Prema literaturi [73] prilikom izloženosti kvasca *Candida parapsilosis* PS MP-a u vodenoj fazi može doći do otpuštanja aditiva koji su dodani MP-i tijekom proizvodnje, a to je praćeno HPLC/MS analizom. Kod uzorka PS-a tijekom biorazgradnje pri optimalnim uvjetima u 0. i 3. danu ne pojavljuju se pikovi na kromatogramu sa m/z omjerima karakterističnim za aditive čime se može pretpostaviti da nije došlo do otpuštanja aditiva s površine PS-a. U 7. danu pojavili su se pikovi na kromatogramu (slika 16c) što zapravo ukazuje da je došlo do otpuštanja aditiva s površine PS-a. U 7. danu vidljiva je prisutnost aditiva na m/z vrhuncu od 219 u obliku $[M+H]^+$ koji može predstavljati 4-(cikloheksoksi)-benzoat koji ima ulogu stabilizatora koji sprječava razgradnju uzrokovanu UV zračenjem. U 14. danu vidljiva je prisutnost aditiva na m/z vrhuncu od 105 u obliku $[M+H]^+$ koji može predstavljati formilfenil koji djeluje kao plamenootporni aditiv. U 21. danu uočen je aditiv u omjeru m/z od 233 u obliku $[M+H]^+$ koji predstavlja 4-(cikloheksilmetoksi)-benzoat koji djeluje kao migracijski aditiv, odnosno postepeno se oslobađa iz MP-a.[74] Na kraju u 30. danu uočen je aditiv u omjeru m/z od 227 u obliku $[M-H]^-$ koji predstavlja bisfenol A koji ima ulogu povećanja čvrstoće, tvrdoće i otpornosti MP-a na udarce.[75] Također je nastao i aditiv u omjeru m/z od 273 koji predstavlja DHB (2,5-dihidroksibenzojeva kiselina).[76] Tijekom biorazgradnje PVC-a pri optimalnim uvjetima u 0., 3. i 7. danu ne pojavljuju se pikovi na kromatogramu čime se može pretpostaviti da nije došlo do otpuštanja aditiva s površine PVC-a. U 14. danu vidljiva je prisutnost aditiva na m/z vrhuncu od 187 u obliku $[M+Na]^+$ koji predstavlja trietoksimetanol koji se koristi kao aditiv za stabilizaciju boje.[77] U 21. danu uočen je aditiv u omjeru m/z od 806 u obliku $[M_2+NH_4]^+$ koji predstavlja diizooktil ftalat koji ima ulogu povećanja fleksibilnosti MP-a. U 30. danu uočen je aditiv u omjeru m/z od 175 u obliku $[A_{13}B+Na]^+$ koji predstavlja polietilen glikol koji u prvom redu ima ulogu plastifikatora tj. utječe na povećanje fleksibilnosti i savitljivosti MP-a.[78] Spomenuti spojevi, kao i drugi aditivi, poboljšavaju svojstva MP-a, ali mogu uzrokovati ozbiljne ekotoksikološke probleme.[73]

5.2.5. Mikroskopska analiza kvasca *Candida parapsilosis*

Na slici 18 prikazana je mikrografija kvasca *Candida parapsilosis* u uzorku SP-e snimljena prije početka provedbe eksperimenata biorazgradnje. Na slikama 19 i 20 prikazane su mikrografije kvasca *Candida parapsilosis* u 30. danu procesa biorazgradnje MP-a pri optimalnim uvjetima. Postupak analize opisan je u poglavlju 3.3.5.6. Na slici 19 pri uvećanju 400× može se uočiti da je površina ispitivane PS MP prekrivena stanicama kvasca *Candida parapsilosis*, odnosno došlo je do adsorpcije kvasca na površinu MP-a.

Time je dokazana sposobnost *Candida parapsilosis* da stvara biofilm na površini MP-a, a to je prvi korak u biorazgradnji MP-a što je još jedan pokazatelj da *Candida parapsilosis* ima mogućnost biorazgradnje MP-a. Isto tako, na slici 20 pri uvećanju 400× može se uočiti prijanjanje stanica kvasca *Candida parapsilosis* na površinu PVC-a. Usporedbom slika 19 i 20 sa slikom 18, može se zaključiti kako nije došlo do morfoloških promjena kod stanica *Candida parapsilosis* koje su tipičnog ovalnog, jajolikog izduženog oblika što je u skladu sa minimalnom toksičnošću MP-a.[79] Kako je došlo do adsorpcije kvasca na površini MP-a i stvaranja biofilma tijekom biorazgradnje pri optimalnim uvjetima primjenom kvasca *Candida parapsilosis* pretpostavlja se da je došlo do djelomične biorazgradnje površine MP-a.

5.2.6. Određivanje toksičnosti filtrata

Na kraju eksperimenta biorazgradnje MP-a pri optimalnim uvjetima kvascem *Candida parapsilosis* provedeno je ispitivanje toksičnosti filtrata pomoću bakterije *V. fischeri*. Test toksičnosti provodio se kako bi se utvrdili mogući štetni učinci na bakteriju 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 3.3.5.5. Na slikama 21 i 22 prikazani su grafovi koji prikazuju toksičnost filtrata dobivenih nakon biorazgradnje MP-a pri optimalnim uvjetima. Vrijednosti EC_{20} i EC_{50} procijenjene su iz grafova. EC_{20} i EC_{50} su koncentracija tvari koje rezultiraju 20%-tnim, odnosno 50%-tnim štetnim učinkom na ispitivani organizam.[80] Uočeno je da što je vrijednost manja, štetni učinak je veći. Rezultati ispitivanja toksičnosti filtrata pokazuju da tijekom biorazgradnje PS-a pri optimalnim uvjetima vrijednost inhibicije (*INH*) vodene faze iznosi 51,43%, dok tijekom biorazgradnje PVC-a pri optimalnim uvjetima inhibicija vodene faze iznosi 39,23%.

Viša vrijednost inhibicije PS-a ukazuje na veću toksičnost uzorka dobivenog nakon biorazgradnje pri optimalnim uvjetima primjenom *Candida parapsilosis* u usporedbi s PVC-om. Vrijednost EC_{20} tijekom biorazgradnje PS-a pri optimalnim uvjetima iznosi 15,39%, a EC_{50} iznosi 55,30%. Tijekom biorazgradnje PVC-a pri optimalnim uvjetima EC_{20} iznosi 19,67%, dok se vrijednost EC_{50} nije mogla procijeniti iz grafa. Također, niža vrijednost EC_{20} ukazuje na veću toksičnost MP-a što je u ovom slučaju PS. Iz svega navedenog, izmjerene visoke vrijednosti EC_{20} i EC_{50} tijekom biorazgradnje MP-a ukazuju da je njihov toksični utjecaj zanemariv.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivala se biorazgradnja PS i PVC MP-a primjenom kvasca *Candida parapsilosis* s ciljem određivanja optimalnih uvjeta biorazgradnje. Za provođenje ovog eksperimenta prema literaturi su odabrani potencijalno najznačajniji čimbenici, te je njihov utjecaj ispitan. Također, određeni su značajni parametri procesa biorazgradnje MP-a. Za proces razgradnje PS i PVC MP-a kao značajni čimbenik određen je OG, a optimalnim uvjetima biorazgradnje za PS pokazali su se pH 4,55, 120 o/min i OG = 0,83, a za PVC pH 5,90, 163 o/min i OG = 1,00. Pri optimalnim uvjetima provedene su brojne analize. FTIR-ATR spektroskopijom uočeno je smanjenje intenziteta svih pikova, te pojava OH, C=C, C=O veza koji su dokaz razgradnje MP-a. Određivala se CFU vrijednost prilikom rasta bakterija te su CFU promjene u korelaciji s TOC vrijednostima. Tijekom biorazgradnje MP-a pri optimalnim uvjetima uočen je porast TOC-a zbog oslobađanja aditiva s površine PS-a i PVC-a. To je u skladu s rezultatima dobivenim provedbom HPLC/MS analize. Prema *m/z* vrhovima identificirani su različiti aditivi prisutni u MP-i kao što su plastifikatori koji se dodaju prilikom proizvodnje s ciljem poboljšanja njihovih svojstava. S druge strane, porast vrijednosti TIC-a ukazuje na stvaranje CO₂ koji potvrđuje da je došlo do biorazgradnje MP-a primjenom *Candida parapsilosis*. Određivanjem toksičnosti filtrata dobivene vrijednosti EC₂₀ i EC₅₀ pokazuju da je toksični utjecaj ispitivanih MP-a tijekom biorazgradnje pri optimalnim uvjetima zanemariv, odnosno gotovo ga ni nema. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da potpuna mineralizacija MP-a nije uočena niti u jednom eksperimentu, ali potencijal *Candida parapsilosis* za biorazgradnju MP-a zasigurno postoji te je potrebno provesti nova istraživanja kako bi se dobili konkretni zaključci kako *Candida parapsilosis* djeluje i koje vrste MP-a može razgraditi. Važno je napomenuti da se samom biorazgradnjom MP-a neće riješiti problem onečišćenja okoliša te je potrebno poduzeti nužne strategije upravljanja otpadom za smanjenje ukupne količine plastike koja je prisutna u okolišu.

7. LITERATURA

1. Gouin, T., A. Becker, R., Collot, A.-G., W. Davis, J., Howard, B., Inawaka, K., Lampi, M., Serrano Ramon, B., Shi, J., Hopp, P.W., Toward the Development and Application of an Environmental Risk Assessment Framework for Microplastic, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **38** (2019), 2087-2100.
2. Tian, W., Song, P., Zhang, H., Duan, X., Wei, Y., Wang, H., Wang, S., Microplastic materials in the environment: Problem and strategical solutions, *Progress in Materials Science*, **132** (2022), 101035.
3. Miri, S., Saini, R., Davoodi, S.M., Pulicharla, R., Brar, S.K., Magdouli, S., Biodegradation of microplastics: Better late than never, *Chemosphere*, **286** (2022), 131670.
4. Xu, N., Jiang, L., Zhang, Y., Shen, Y., Wang, Y., Wang, S., Yuan, Q., Microplastic pollution in the offshore sea, rivers and wastewater treatment plants in Jiangsu coastal area in China, *Marine Environmental Research*, **188** (2023), 105992.
5. Ray, S.S., Lee, H.K., Huyen, D.T.T., Chen, S.-S., Kwon, Y.-N., Microplastics waste in environment: A perspective on recycling issues from PPE kits and face masks during the COVID-19 pandemic, *Environmental Technology & Innovation*, **26** (2022), 102290.
6. URL: <https://pollutiontracker.org/contaminants/microplastics/> (pristup 04.05.2023.)
7. Thakur, B., Singh, J., Singh, J., Angmo, D., Vig, A.P., Biodegradation of different types of microplastics: Molecular mechanism and degradation efficiency, *Science of The Total Environment*, **877** (2023), 162912.
8. URL: <https://www.britannica.com/science/plastic/The-processing-and-fabrication-of-plastics> (pristup 04.05. 2023.)
9. URL: <https://www.britannica.com/science/plastic/Injection-molding> (pristup 05.05.2023.)
10. URL: <https://www.britannica.com/technology/microplastic> (pristup 05.05.2023.)
11. Tayeh, B.A., Almeshal, I., Magbool, H.M., Alabduljabbar, H., Alyousef, R., Performance of sustainable concrete containing different types of recycled plastic, *Journal of Cleaner Production*, **328** (2021), 129517.
12. URL: <https://www.acplasticsinc.com/informationcenter/r/7-different-types-of-plastic-and-how-they-are-used> (pristup 05.05.2023.)

13. URL: <https://www.cutplasticsheeting.co.uk/the-5-most-common-plastics-their-everyday-uses/> (pristup 05.05.2023.)
14. URL: <https://www.rajras.in/types-of-plastic/> (pristup 06.05.2023.)
15. Peng, Y., Dai, L., Dai, A., Wu, Q., Zou, R., Liu, Y., Ruan, R., Wang, Y., Catalytic process toward green recycling of polyvinyl chloride: A study on thermodynamic, kinetic and pyrolysis characteristics, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **168** (2022), 105719.
16. Boyd, M.B., Polymer basics for polyvinyl chloride, (2021) URL: <https://boydbiomedical.com/articles/polymer-basics-for-polyvinyl-chloride-1> (pristup 06.05.2023.)
17. Mohammed, A.A., 6 – Mechanical strength of concrete with PVC aggregates, *Woodhead Publishing Series in Civil and Structural Engineering*, (2019), 115-135.
18. Koerner, G.R., Hsuan, Y.G., Koerner, R.M., 3 – The durability of geosynthetics. *Woodhead Publishing Series in Textiles*, 2007, str.36-65.
19. URL: <https://www.doubtnut.com/question-answer-chemistry/write-the-structure-of-polystyrene-and-give-its-uses-structure--119574572> (pristup 07.05.2023.)
20. URL: <https://assignmentpoint.com/polystyrene-ps-structure-properties-and-uses/> (pristup 07.05.2023.)
21. Margeta, A., Šabalja, Đ., Đorđević, M., The presence and danger of microplastics in the oceans, *Multidisciplinary Scientific Journal of Maritime Research*, **35** (2021), 224-230.
22. URL: <https://education.nationalgeographic.org/resource/microplastics/> (pristup 07.05.2023.)
23. Chubarenko, I., Bagaev, A., Zobkov, M., Esiukova, E., On some physical and dynamical properties of microplastic particles in marine environment, *Marine Pollution Bulletin*, **108** (2016), 105-112.
24. Bule Možar, K., Zadro, K., Tolić, A., Radin, E., Miloloža, M., Ocelić Bulatović, V., Kučić Grgić, D., MPikroplastika u morskom okolišu Jadrana, *Kemija u industriji*, **69** (2020), 303-310.
25. Costa, J.P.D., Avellan, A., Mouneyrac, C., Duarte, A., Rocha-Santos, T., Plastic additives and microplastics as emerging contaminants: Mechanisms and analytical assessment, *Trends in Analytical Chemistry*, **158** (2022), 116898.
26. URL: <https://echa.europa.eu/hr/hot-topics/microplastics> (pristup 09.05.2023.)

27. Priya, A.K., Jalil, A.A., Dutta, K., Rajendran, S., Vasseghian, Y., Qin, J., Soto-Moscoso, M., Microplastics in the environment: Recent developments in characteristic, occurrence, identification and ecological risk, *Chemosphere*, **298** (2022), 134161.
28. Bhuyan, S., Effects of Microplastics on Fish and in Human Health, *Toxicology, Pollution and the Environment*, **10** (2022), 827289.
29. URL: <https://ideje.hr/MP-jadran-je-u-europi-jedno-od-tri-mora-najoneciscenija-plasticnim-otpadom/> (pristup 10.05.2023.)
30. Parker, L., Microplastics are in our bodies, *National Geographic*, 2023. URL: <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/microplastics-are-in-our-bodies-how-much-do-they-harm-us> (pristup 12.05.2023)
31. Worth, A.P., Balls, M., Combes, R., Types of Toxicity and Applications of Toxicity Testing, *The History of Alternative Test Methods in Toxicology*, 2019, str. 7–10.
32. Nugnes, R., Lavorgna, M., Orlo, E., Russo, C., Isidori, M., Toxic impact of polystyrene microplastic particles in freshwater organisms, *Chemosphere*, **299** (2022), 134373.
33. Padervand, M., Lichtfouse, E., Robert, D., Wang, C., Removal of microplastics from the environment, *Environmental Chemistry Letters*, **18** (2020), 807-828.
34. Trevisan, R., Ranasinghe, P., Jayasundara, N., Giulio, R.T.D., Nanoplastics in Aquatic Environments: Impacts on Aquatic Species and Interactions with Environmental Factors and Pollutants, *Toxics*, **10** (2022), 10060326.
35. Pan, Y., Gao, S.-H., Ge, C., Gao, Q., Huang, S., Kang, Y., Luo, G., Zhang, Z., Fan, L., Zhu, Y., Wang, A.-J., Removing microplastics from aquatic environments, *Environmental Science and Ecotechnology*, **13** (2022), 100222.
36. Gao, W., Zhang, Y., Mo, A., Jiang, J., Liang, Y., Cao, X., He, D., Removal of microplastics in water: Technology progress and green strategies, *Green Analytical Chemistry*, **3** (2022), 100042.
37. Armstrong, D.A., Huie, R.E., Koppenol, W.H., Lyman, S.V., Merényi, G., Neta, P., Ruscic, B., Stanbury, D.M., Steenken, S., Wardman, P., Standard electrode potentials involving radicals in aqueous solution: Inorganic radicals (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2015, **87**, 1139–1150.
38. Mahmud, A., Wasif, M.M., Roy, H., Mehnaz, F., Ahmed, T., Pervez, N., Naddeo, V., Islam, S., Aquatic Microplastic Pollution Control Strategies: Sustainable Degradation Techniques, Resource Recovery, and Recommendations for Bangladesh, *Water*, **2** (2022), 14233968.

39. URL: <https://www.stahl.com/beyond-chemistry-from-a-to-z/what-is-biodegradation> (pristup 17.05.2023.)
40. Thakur, S., Mathur, S., Patel, S., Paital, B., Microplastic Accumulation and Degradation in Environment via Biotechnological Approaches, *Water*, **14** (2022), 14244053.
41. Srikanth, M., Sandeep, T. S. R. S., Sucharitha, K., Godi, S., Biodegradation of plastic polymers by fungi, *Bioresources and Bioprocessing*, **9** (2022), 406430.
42. Delač, M. (2021) *Biodegradacija polimera: uloga bakterija i njihovih enzima*. Završni rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
43. Temporiti, M.E.E., Nicola, L., Nielsen, E., Tosi, S., Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation, *Microorganisms*, **10** (2022), 100611.
44. Oliveira, M.M., Proenca, A.M., Moreira-Silva, E., Santos, F.M.D., Marconatto, L., Castro, A.M.D., Medina-Silva, R., Biochemical features and early adhesion of marine *Candida parapsilosis* strains on high-density polyethylene, *Journal of Applied Microbiology*, **132** (2021), 1954-1966.
45. Welsh, R.M., Bentz, M.L., Shams, A., Houston, H., Lyons, A., Rose, L.J., Litvintseva, A.P., Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface, *Journal of Clinical Microbiology*, **55** (2017), 101128.
46. 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.
47. Tóth, R., Cabral, V., Thuer, E., Bohner, F., Németh, T., Papp, C., Nimrichter, L., Molnár, G., Vágvolgyi, C., Gabaldón, T., Nosanchuk, J.D., Gácsér, A., Investigation of *Candida parapsilosis* virulence regulatory factors during host-pathogen interaction, *Scientific Reports*, **8** (2018), 101038.
48. Silva, A.L.P., Silva, S.A.M., Duarte, A., Barceló, D., Rocha-Santos, T., Analytical methodologies used for screening micro(nano)plastics in (eco)toxicity tests, *Green Analytical Chemistry*, **3** (2022), 100037.
49. Petersen, E.J., Barrios, A.C., Henry, T.B., Johnson, M.E., Koelmans, A.A., Montoro Bustos, A.R., Matheson, J., Roesslein, M., Zhao, J., Xing, B., Potential Artifacts and Control Experiments in Toxicity Tests of Nanoplastic and Microplastic Particles, *Environmental Science & Technology*, **56** (2022), 101021.

50. Miloloža, M., Kučić Grgić, D., Bolanča, T., Ukić, Š., Cvetnić, M., Ocelić Bulatović, V., Dionysiou, D.D., Kušić, H., Ecotoxicological Assessment of Microplastics in Freshwater Sources, *Water*, **13** (2020), 13010056.
51. Veronica Piazza, V., Uheida, A., Gambardella, C., Garaventa, F., Faimali, M., Dutta, J., Ecosafety Screening of Photo-Fenton Process for the Degradation of Microplastics in Water, *Marine Pollution*, **8** (2022), 791431.
52. Haciosmanoğlu, N., Köse, S., Ostaku, J., Köksaldi, I.C., Saltepe, B., Şeker, U.O.S., Design of synthetic biological devices for detection and targeting human diseases, u Singh, V., *New Frontiers and Applications of Synthetic Biology*, Elsevier Inc. United States, 2022, str. 251-269.
53. Dunn, A.K., *Vibrio fischeri* Metabolism: Symbiosis and Beyond, *Advances in Microbial Physiology*, **61** (2012), 37-68.
54. URL: <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section1/pri11.htm> (pristup 29.05.2023.)
55. Bell, S., Experimental Design, *International Encyclopedia of Human Geography*, University of Saskatchewan, Canada, 2009, str. 672-675.
56. Rahman, A.S., Effects of nanofibers on properties of geopolymer composites, u Pacheco-Torgal, F., Diamanti, M.V., Nazari, A., Granqvist, C.G., Pruna, A., Amirkhanian, S., *Woodhead Publishing Series in Civil and Structural Engineering*, Vol. 2, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2019, str. 123-140.
57. Ukrainczyk, M., Planiranje pokusa u industriji, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **5** (2010), 96-105.
58. Antony, J., Full Factorial Designs, *Design of Experiments for Engineers and Scientists*, 2. izd., School of Management and Languages, Heriot-Watt University, Edinburgh, Škotska, UK, 2014, str. 63-85.
59. URL: <https://www.jmp.com/support/help/en/17.1/index.shtml#page/jmp/overview-of-full-factorial-design.shtml> (pristup 31.05.2023.)
60. 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, *Journal of Environmental Management*, **289** (2021), 112525.
61. Campanale, C., Savino, I., Massarelli, C., Uricchio, V.F., Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Assess the Degree of Alteration of Artificially Aged and Environmentally Weathered Microplastics, *Polymers*, **15** (2023), 15040911.

62. Nandiyanto, A.B.D., Ragadhita, R., Fiandini, M., Interpretation of Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR): A Practical Approach in the Polymer/Plastic Thermal Decomposition, *Indonesian Journal of Science & Technology*, **8** (2023), 153297.
63. Fang, J., Xuan, Y., Li, Q., Preparation of polystyrene spheres in different particle sizes and assembly of the PS colloidal crystals, *Science China Technological Sciences*, **53** (2010), 3088-3093.
64. 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- FTIR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms, *Marine Pollution Bulletin*, **127** (2018) 704–716.
65. Kučić Grgić, D., Miloloža, M., Skripta iz laboratorijskih vježbi iz kolegija Ekotoksikologija, Zagreb, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.
66. Parker, L., The world's plastic pollution crisis explained, *National Geographic* (2019).
URL: <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/plastic-pollution>
(pristup 02.06.2023.)
67. Miloloža, M., Kučić Grgić, D., Bolanča, T., Ukić, Š., Cvetnić, M., Ocelić Bulatović, V., Dionysiou, D.D., Kušić, H., Rogošić, M., Biotreatment strategies for the removal of microplastics from freshwater systems, *Environmental Chemistry Letters*, **20** (2022), 1377-1402.
68. Bordós, G., Urbányi, B., Micsinai, A., Kriszt, B., Palotai, Z., Szabó, I., Hantosi, Z., Szoboszlai, S., Identification of microplastics in fish ponds and natural freshwater environments of the Carpathian basin, Europe, *Chemosphere*, **216** (2019), 110-116.
69. 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.
70. Hou, L., Majumder, E.L.-W., Potential for and Distribution of Enzymatic Biodegradation of Polystyrene by Environmental Microorganisms, *Materials*, **14** (2021), 14030503.
71. Yang, X.-G., Wen, P.-P., Yang, Y.-F., Jia, P.-P., Li, W.-G., Pei, D.-S., Plastic biodegradation by in vitro environmental microorganisms and in vivo gut microorganisms of insects, *Microbial Physiology and Metabolism*, **13** (2022), 100175.
72. Castro, A., Soares, D., Vilarinho, C., Castro, F., Kinetics of thermal de-chlorination of PVC under pyrolytic conditions, *Waste Management*, **32** (2012), 847-851.

73. Miloloža, M., Ukić, Š., Cvetnić, M., Bolanča, T., Kučić Grgić, D., Optimization of Polystyrene Biodegradation by *Bacillus cereus* and *Pseudomonas alcaligenes* Using Full Factorial Design, *Polymers*, **14** (2022), 14204299.
74. Lee, P.J., Gioia, A.J.D., Rapid Analysis of 25 Common Polymer Additives, *Waters* (2008). URL: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002488en.pdf> (pristup 10.06.2023.)
75. URL: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004752en.pdf> (pristup 12.06.2023.)
76. Teearu, A., Vahur, S., Haljasorg, U., Leito, I., Haljasorg, T., Toom, L., 2,5-Dihydroxybenzoic acid solution in MALDI-MS: ageing and use for mass calibration, *Journal of mass spectrometry*, **49** (2014), 970-979.
77. Sareen, N., Grover Carlton, A.M., Surratt, J.D., Gold, A., Lee, B., Lopez-Hilfiker, F., Mohr, C., Thornton, J.A., Zhang, Z., Lim, Y.B., Turpin, B.J., Identifying precursors and aqueous organic aerosol formation pathways during the SOAS campaign, *Atmospheric Chemistry and Physics*, **16** (2016), 2016200.
78. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2002/em/b105578j> (pristup 16.06.2023.)
79. URL: <https://microbiologynote.com/candida-parapsilosis-morphology-pathogenesis-transmission-treatment/> (pristup 18.07.2023.)
80. Gagné, F., Biomarker Expression and Integration, *Biochemical Ecotoxicology*, 2014, str.231-248.

Životopis

Petra Krajnik [REDACTED] Godine 2013. završila je osnovnu školu Stenjevec u Zagrebu te je nakon toga upisala Opću gimnaziju „Tituš Brezovački“. Nakon završetka srednje škole, upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala. Studentsku stručnu praksu na 2. godini preddiplomskog studija odradila je u tvrtki Zagrebačka pivovara d.o.o. Završni rad izradila je u Zavodu za analitičku kemiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Tomislava Bolanče na temu „Štetni aspekti prisutnosti ftalata u okolišu“. Njegovom obranom 2021. godine stekla je naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke kemijskog inženjerstva. Studiranje nastavlja iste godine upisom diplomskog studija Kemija i inženjerstvo materijala na istom fakultetu.