

# Toksični učinak poli(vinil-klorida) na mikroalgu *Scenedesmus* sp.

---

**Bolješić, Leo**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:149:451570>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-08**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Leo Bolješić

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2021.

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

Kandidat Leo Bolješić

Predao je izrađen završni rad dana: 1. rujna 2021.

Povjerenstvo u sastavu:

Doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Dr. sc. Matija Cvetnić, poslijedoktorand, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Izv. prof. dr. sc. Šime Ukić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, zamjena

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 6. rujna 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Leo Bolješić

**TOKSIČNI UČINAK POLI(VINIL-KLORIDA) NA MIKROALGU**  
*Scenedesmus sp.*

**Mentor:** doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić  
dr. sc. Lidija Furač, viši predavač  
dr. sc. Matija Cvetnić

Zagreb, rujan 2021.



*Ovaj završni 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

Na samom početku ovog rada veliku bih zahvalu htio uputiti mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić koja je tijekom ovog cijelog puta doista pokazala što znači biti stručno vodstvo i uz iznimnu me količinu strpljivosti, razumijevanja i ažurnosti, ali i uz korisne savjete i izvanredne ideje vodila kroz sam proces izrade rada.

Od srca se zahvaljujem i asistentici Kristini Bule na vođenju i savjetima tokom eksperimentalnog rada, ali i na podršci i strpljenju prilikom pisanja samog rada.

Jedno veliko hvala htio bih uputiti svojoj obitelji, kolegama i prijateljima koji su moj studij obilježili podrškom, savjetima i veseljem te učinili da ga pamtim kao jedan prekrasan korak na cjelokupnom putu života.

Na kraju se želim osvrnuti i na prijatelje i kolege iz Studentske sekcije HDKI i BEST-a Zagreb zbog kojih moje dosadašnje studiranje nije bilo samo sakupljanje ocjena i polaganje ispita, već kontinuirani razvoj sebe, svojih sposobnosti, želja i vizija za budućnost. Hvala vam na svemu, ali od svega najviše hvala na uspomenama koje će zauvijek biti sa mnom!

## SAŽETAK

Dvadeset i prvo stoljeće je, uz nova tehnološka dostignuća i ubrzani razvoj industrije, donijelo i nove probleme s kojima se zaštita okoliša i industrijska ekologija kao takve moraju nositi. Plastične mase (polimeri) danas su prisutne na svakom koraku, a samo onečišćenje koje nastaje nepravilnim gospodarenjem plastikom i plastičnim otpadom manifestira se od makroskopskih razina (odlaganje u prirodu, narušavanje okolišnog izgleda...) do onih mikroskopskih (akumulacija mikroplastike (MP) u čitavim hranidbenim lancima okolišnih organizama). Kada se spominje MP-e, misli se na čestice <5 mm koje su raznim fizikalnim procesima nastale kao posljedica nepravilnog gospodarenja plastičnim otpadom. Kao takva, MP-a je kroz niz eksperimentalnih rezultata pokazala toksični učinak na okolišne organizme, ali je i dalje sam učinak MP-a u fokusu raznih istraživanja na globalnoj razini.

U ovome radu provedena su toksikološka ispitivanja utjecaja MP-PVC-a veličina <300 µm, 300-500 µm i 500-700 µm, i koncentracija 50 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L i 1000 mg/L na inhibiciju rasta mikroalge *Scenedesmus* sp. na temelju promjene logaritamskog broja živih stanica (log CFU). Osim logaritamskog broja živih stanica, pratila se potencijalna promjena morfološkog oblika. Rezultati ispitivanja pokazali su da je inhibicija rasta mikroalge uvelike uvjetovana pokazateljima kao što su veličina i koncentracija čestica MP-PVC-a. Naime, najveću inhibiciju (10,50 %) pokazale su veličine čestica <300 µm i 300-500 µm i koncentracije 750 mg/L i 1000 mg/L. Promjena morfološkog oblika nije uočena.

**Ključne riječi:** mikroplastika, poli(vinil-klorid), *Scenedesmus* sp., mikroalga, toksičnost

## ABSTRACT

Along with the new technological accomplishments and accelerated development of industry, 21<sup>st</sup> century also raised certain environmental issues that have to be further tackled by environmental protection and industrial ecology. Plastic masses (polymers) are today present at every turn. However, the pollution caused by improper management of plastics and plastic waste is manifested from macroscopic levels (disposal in nature, environmental disturbance ...) to those microscopic (accumulation of microplastics (MP) in entire food chains of environmental organisms). MPs are considered plastic particles smaller than 5 mm that were formed by various physical processes as a result of improper management of plastic waste. As such, MP has shown a toxic effect on environmental organisms through a series of experimental results. However, the effect of MPs remains the focus of various global studies.

In this work, toxicological studies of the effects of MP-PVC, which includes sizes <300  $\mu\text{m}$ ; 300-500  $\mu\text{m}$ ; 500-700  $\mu\text{m}$  and concentrations 50 mg/L; 250 mg/L; 500 mg/L; 750 mg/L; 1000 mg/L, were performed in order to inhibit the growth of microalgae *Scenedesmus* sp. based on the change in the logarithmic number of living cells (log CFU). In addition to the logarithmic number of living cells, a potential change in morphological shape was monitored. The test results showed that the inhibition of microalgae growth is largely conditioned by indicators such as the size and concentration of MP-PVC particles. The highest inhibition percentage (10.50%) was shown by particle sizes <300  $\mu\text{m}$ , 300-500  $\mu\text{m}$  and concentrations of 750 mg/L and 1000 mg/L. No change in morphological shape was observed.

**Key words:** microplastics, poly(vinyl-chloride), *Scenedesmus* sp., microalgae, toxicity



# Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	2
2.1. (Mikro)plastika .....	2
2.2. Podjela mikroplastike.....	3
2.2.1. Primarna mikroplastika .....	3
2.2.2. Sekundarna mikroplastika.....	4
2.3. Podjela mikroplastike s obzirom na podrijetlo .....	5
2.3.1. PVC.....	5
2.4. (Mikro)alge .....	10
2.4.1. Rod <i>Scenedesmus</i> .....	11
2.5. Ekotoksikološki testovi.....	12
2.5.1. Testovi ekotoksičnosti na (mikro)algama .....	15
3. Eksperimentalni dio .....	16
3.1. Materijali.....	16
3.1.1. Mikroplastika .....	16
3.1.2. Testni organizam.....	16
3.1.3. Kemikalije i mediji .....	17
3.2. Mjerni instrumenti i oprema .....	17
3.3. Metode rada .....	18
3.3.1. Priprema mikroplastike.....	18
3.3.2. Određivanje toksičnosti mikroplastike korištenjem alge <i>Scenedesmus</i> sp.....	18
4. Rezultati .....	22
4.1. Određivanje toksičnosti mikroplastike primjenom mikroalge <i>Scenedesmus</i> sp. ....	22
5. Rasprava.....	27
5.1. Analiza eksperimenta.....	27
6. Zaključak .....	30
7. Kratice.....	31
8. Literatura.....	32

## 1. Uvod

Godinama se proizvodnja plastike stavlja u fokus promatranja javnosti i znanstvenih stručnjaka s obzirom da je sama proizvodnja u počecima bila osuđena na velike količine često nepravilno zbrinutog otpada, a sami počeci proizvodnje plastike sežu još u 50-e godine prošlog stoljeća.<sup>1</sup> Masovna proizvodnja plastike čini budućnost i posljedice te proizvodnje su vrlo nepredvidiva i nepoznata.<sup>2</sup> Ono što se 50-ih godina 20. stoljeća mislilo da je masovna proizvodnja, u 21. stoljeću je dobilo novo značenje. Od 1950. do 2015. godine godišnja proizvodnja plastike porasla je s 2 Mt na 380 Mt, a masa ukupno proizvedene plastike procjenjuje se na 7800 t. Pola je od toga procijenjeno na proizvodnju ostvarenu u posljednjih 15 godina. Najveći udio u proizvodnji plastičnih masa imaju polietilen (PE) 36%, polipropilen (PP) 21% i poli(vinil-klorid) (PVC) 12% te plastike kao što su poli(etilen-tereftalat) (PET), poliuretan (PUR) i polistriren (PS) (<10% svaka).<sup>1,2</sup> Iako ima dobra kemijska i fizikalna svojstva, njeno zbrinjavanje, recikliranje i ponovno korištenje ipak je svakim danom sve potrebnije, pogotovo s obzirom na spomenuti rast proizvodnje. Mnoge su nordijske zemlje takvu inicijativu pokazale kroz razne oblike njene obrade i ponovnog korištenja, ali i kroz mjere predostrožnosti kod samog dizajna plastičnih proizvoda i proizvodnje plastičnih masa.<sup>3</sup>

Plastika se kada dođe u vodene ekosustave raznim procesima (struje, abrazija, sunčevo zračenje, interakcije s organizmima i plovilima i sl.) smanjuje na sitnije čestice, a kada njihova veličina postane < 5 mm naziva se mikroplastikom (MP).<sup>4</sup> MP-e kao takva najveći problem predstavlja raspršena u vodenim površinama (mora, jezera, rijeke) gdje se akumulira u raznim ekosustavima i time predstavlja kako problem zaštite okoliša, tako i u konačnici problem za ljudsko zdravlje. Vrlo često se primarna akumulacija odvija u algama koje su hrana većim organizmima (npr. ribe), a ribe su često izvor hrane ljudima.<sup>4,5</sup> S obzirom da se problematika MP-a, iako postoji već dugo vremena, tek nedavno krenula proučavati, o njenom toksičnom učinku zapravo se zna jako malo.<sup>5</sup> Toksikološka su istraživanja zbog navedenih razloga krucijalna kako bi saznali utjecaj MP-a na razne organizme, od onih najmanjih pa i do većih organizama kao što su ljudi. Istraživanja se mogu odvijati *in vitro* i *in vivo*.<sup>6</sup> Češća je uporaba *in vitro* testova toksičnosti, a jedan takav korišten je u ovom radu. Točnije, ispitivala se toksičnost PVC-a na slatkovodnu mikroalgu *Scenedesmus* sp. (OECD 201:1984) pri različitim veličinama i koncentracijama PVC-a.

## 2. Opći dio

### 2.1. (Mikro)plastika

Pojam plastike danas je opće poznat i sveprisutan zbog njene česte uporabe. Uz pojam plastike u znanstvene se svrhe češće koristi izraz sintetski polimer jer plastika to doista i je. Prvi sintetski polimer proizveo je još 1855. Alexander Parkes, a prva pojava PVC-a datira između 1838. i 1872. godine.<sup>7</sup> Međutim, prave početke vezuje se uz 1907. godinu kada je Leo Baekeland proizveo bakelit, prvu pravu sintetsku, masivno proizvedenu plastiku.<sup>7,8</sup> Nakon toga je došlo do masivnog skoka u proizvodnji plastike te je od 1950. do današnjeg dana sama proizvodnja porasla s 2 Mt 1950. na 380 Mt 2015.<sup>2</sup> U 21. se stoljeću javila potreba da se sama proizvodnja i uporaba plastike uklopi u koncept kružnog gospodarstva, a to se ostvarilo kombiniranjem izvorne i reciklirane plastike. Nadzor takvog sustava baziran je na integraciji umjetne inteligencije i baze podataka te provođenjem testova stabilnosti kako bi se predvidjela budućnost proizvedene plastike.<sup>9</sup>

Nažalost, plastični otpad koji nastaje nakon uporabe često se nepravilno zbrinjava i zbog toga ulazi u okoliš u makro obliku. Česta „konačna“ odredišta plastike postaju razna granična područja vodenih površina (farme, rezervoari, plaže, oceanski okoliš...) gdje zbog abrazije, sunčevog zračenja i antropološkog utjecaja te utjecaja organizma dolazi do fragmentacije plastičnog otpada koji u konačnici postaje MP-e. Zbog toga ta mjesta postaju žarišta onečišćenja okoliša MP-om. Pojednostavljena shema ovog procesa može se vidjeti na slici 1.<sup>4,10</sup>



Slika 1. Nastanak mikroplastike i potencijalni problemi<sup>10</sup>

## **2.2. Podjela mikroplastike**

Spomenuta masovna proizvodnja i uporaba plastike zbog njenih dobrih svojstava i niske cijene i otpad koji nastaje nakon njenog korištenja prvenstveno je predstavljao problem u makro svijetu. Međutim, potaknuta pronalaskom sitnih čestica MP-a u ljudskom izmetu i sličnih problema započela su razna istraživanja na koji način i u kojem obliku MP-e dolazi u okoliš i u konačnici se akumulira u razne ekosustave. Tako razlikujemo primarnu i sekundarnu MP-e.<sup>11</sup>

### **2.2.1. Primarna mikroplastika**

Pod pojmom primarne MP-e smatra se sva MP-e nastala svakodnevnim korištenjem plastičnih proizvoda. Iako naizgled nevidljiva, emisija se događa konstantno i potencijalno može izazvati razne ekološke probleme. Pod pojmom primarne MP-e često se spominju pelete te kozmetički i proizvodi za osobnu njegu koji se proizvode i ulaze u okoliš u malim količinama. Međutim, mnoga ispitivanja inicirala su postojanje šireg raspona nastanka primarne MP-e. Osim namjerno proizvedene MP-e (npr. proizvodi za osobnu njegu), primarna MP-e nastaje i kao nusproizvod tokom korištenja proizvoda u svakodnevici (mikrovlakna otpuštena s razne odjeće, prah nastao kao posljedica trošenja automobilskih guma, MP puštena s boja i sl.), ali i kao posljedica slučajnog ispuštanja (peletirani suhi materijali). Smatra se da je primarna MP-e svojevrsni oblik konstantnog otpuštanja malih količina plastike u okoliš.<sup>11</sup>

Spomenuti proizvodi za osobnu njegu danas su česti primjer svakodnevnog ispuštanja primarne MP-e u okoliš. Jednostavan primjer upravo su maske za lice koja sadrže mikrozrnca (MP-u), a svakodnevno se nanose na lice i ispiru. Nakon ispiranja ulaze u sustav otpadnih voda i često iz njega „pobjegnu“. Jednom kada dođu u okoliš nikada ne podliježu potpunoj biorazgradnji i akumuliraju se u okolišu recipijenta i time stvaraju ekološki problem. Unatoč tome što postoje alternativni oblici proizvoda za osobnu njegu i korištenje ovakvih oblika se smanjuje, velik broj stručnjaka svakako predlaže zabranu korištenja ovakvih proizvoda. Europska je komisija zatražila da ECHA (European Chemicals Agency) pripremi zabrane povezane s namjernim dodatkom MP-e u potrošačkim i profesionalnim proizvodima.<sup>11-13</sup>

### 2.2.2. Sekundarna mikroplastika

Kada se spominje sekundarna MP-e, misli se na MP-e nastalu fragmentacijom većeg plastičnog otpada u okolišu.<sup>4,11</sup> Procjena ukupne količine plastičnog otpada dugo je vremena stvarala problem, ali je u konačnici procijenjeno da je 274 milijuna Mt plastičnog otpada generirano od strane 192 obalne države samo tokom jedne godine (2010.) od čega je 4,8 – 12,7 milijuna dospjelo u ocean i vodene površine. Najveći udio u tome ima Kina. Rijeke potencijalno služe kao transportni put za razne veličine plastičnog otpada do oceana i jezera. Koliki problem rijeke kao transportni putevi jesu pokazuju procjene na temelju raznih modela prema kojima 1,15 do 2,41 milijuna Mt plastičnog otpada dolazi do oceana i jezera samo putem rijeka.<sup>11</sup>

Makroplastika (MAP) dolazi iz raznih izvora i raznih veličina, od ribarskih mreža i alata do namjerno odbačenih plastičnih boca i ambalaža.<sup>12</sup> Međutim, o tome što će se s njom dogoditi najviše ovisi o tome u kakvom se okolišu nađe i hoće li ona tamo ostati, karakteristike plastike (PVC, PET, PE...), vanjske sile (režimi strujanja, sunčevo zračenje...), fizičke karakteristike okoliša (npr. reljef dna), stupanj biorazgradnje od strane organizama i u konačnosti antropogena aktivnost.<sup>12,14,15</sup> Primjerice, ukoliko se plastična vrećica nađe zarobljena među stijenama na delti brze rijeke, zbog raznih će sila doći do fragmentacije plastike. Isto tako, ako se neki komad MAP zaglavi na propeleru plovila, on će fragmentirati.<sup>14, 15</sup> Česti izvori primarne i sekundarne MP-e prikazani su na slici 2.



**Slika 2.** Česti izvori primarne i sekundarne MP-e: a) pelete (primarna), b) maska za lice (primarna), c) ribarske mreže (sekundarna) i d) plastične boce (sekundarna)

## **2.3. Podjela mikroplastike s obzirom na podrijetlo**

S obzirom na podrijetlo, razne vrste MP-a dijele se prema MAP od koje su nastale. Tako su neke od osnovnih vrsta MAP koje su i glavni izvori MP-a u okolišu PET, PE, PP i PVC.<sup>16</sup> Primjeri za pojedine MAP su plastične boce i ambalaže jela za podgrijavanje (PET); boce za mlijeko i boce sredstava za čišćenje (PE); tubice za margarin i pakiranja jela za mikrovalnu (PP); boce za šampon i obične plastične boce, razna jednokratna plastika, cijevi, podovi (PVC).<sup>17,18</sup>

### **2.3.1 PVC**

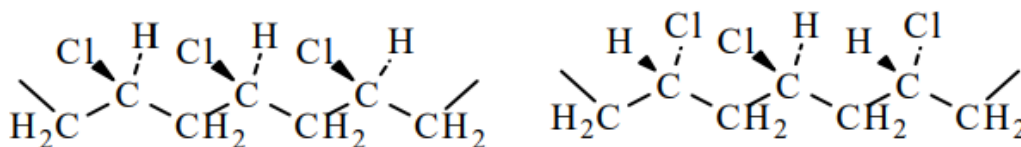
Poli(vinil-klorid) ili PVC je prilagodljiva, dugotrajna i ekonomična plastika podložna recikliranju koja se danas nalazi u iznimno širokom spektru primjene. Da bi se bolje razumjela sve veća svakidašnja uporaba PVC-a potrebno je otići u povijest. Njegovo otkriće datira još u 19. stoljeće kada su ga u dva navrata slučajno otkrili Henri Regnault i Eugen Baumann tako što su novoproduzveni plin vinil-klorid (VC) ostavili izloženog sunčevom svjetlu kada je u konačnici nastala bijela krutina – PVC. Međutim, smatralo ga se teškim za proizvodnju i uporabu te je njegova komercijalna uporaba započela tek 20-ih godina 20-og stoljeća. U početku se koristio kao izolator žica na vojnim brodovima i kao vodootporni premaz za razne tkanine, a s vremenom, pogotovo 1950-ih, su se počela primjećivati razna svojstva PVC-a koja su ga činila pogodnim za razne primjene. Neka od tih svojstava su otpornost na kemikalije, koroziju i svjetlost zbog čega su ga do početka 1960. počele proizvoditi čak 5 tvrtki.<sup>18</sup> Prvotno termički nestabilniji od ostalih plastika, PVC-u su se tokom vremena počeli dodavati razni aditivi kako bi ga se učinilo otpornim na ekstremne temperature. Kada se to postiglo, njegova primjena je postala sve češća te se počeo koristiti i kao materijal za izradu cijevi za dovođenje vode kućanstvima i industrijama. Od 1980-ih pa do danas PVC ostaje jedna od najviše proizvedenih plastika na svijetu, odmah nakon PE i PP, a nalazimo ga u raznim industrijama kao što su zdravstvo, informacijske tehnologije (IT), transport i tekstilna te građevinska industrija.<sup>18</sup>

#### **2.3.1.1. Stuktura, proizvodnja i svojstva PVC-a**

PVC u primjeni ima raznolike strukture, a time i raznolika svojstva ovisno o načinu polimerizacije VC-a pomoću koje ga se proizvodi.<sup>19,20</sup> Kako bi se u potpunosti razumjela svojstva PVC-a, potrebno je u obzir uzeti geometrijsku izomeriju prilikom razvoja mehanizama njegove

degradacije i stabilizacije. Stereoizomerija se pojavljuje kao rezultat prisutnosti trodimenzionalne strukture u pojedinim polimerima. Stereoizomerija esencijalna za pojedine polimere među kojima je i PVC naziva se taktičnost. Ako se u usporedbu stavi taktičnost i optička izomerija, važno je naglasiti da će fizička svojstva optičkih izomera ostati ista (osim polarizacije svjetla), dok će taktičnost polimera utjecati fizička i mehanička svojstva polimera kao što su jačina, elastičnost i apsorpcija svjetla te promjena faza, temperature, kristaličnosti i mnogih drugih svojstava.<sup>19</sup>

Taktičnost polimera uglavnom je vezana uz 3 osnovne strukture: izotaktične (sve grupe na istoj strani lanca), ataktične (neravnomjerna distribucija grupa) i sindiotaktične (grupe, primjerice Cl kod PVC-a su pravilno raspoređene na obje strane lanca ili njegovog segmenta s eventualnim alternativnim rasporedom).<sup>19</sup> Na slici 3 predočene su izotaktična i sindiotaktična struktura PVC-a.



**Slika 3.** Izotaktična i sindiotaktična struktura PVC-a<sup>19</sup>

Osnovni način proizvodnje PVC-a jest radikalna polimerizacija VC-a pomoću četiri različita mehanizma (suspenzijska, emulzijska te polimerizacija u otopini i u masi). Iako je ovakav način proizvodnje najefikasniji, on također rezultira u formaciji raznih oblika izomera i strukturnih defekata. Ovi su faktori iznimno važni potrošačima PVC-a jer oni često izazivaju probleme s bojom, termičkom stabilnošću, kristaličnošću, ponašanjem prilikom vođenja procesa te konačnim fizičkim svojstvima PVC-a. Zato se prije, tokom i nakon polimerizacije dodaju razni aditivi kao što su sredstva za plastificiranje, toplinski stabilizatori, lubrikanti, fileri i slični polimeri u svrhu tzv. kopolimerizacije. Primjerice, kopolimerizacija VC-a s imidnim monomerima i klorinacijom PVC-a dokazana je da povećava toplinsku otpornost PVC-a.<sup>20</sup>

Energija aktivacije za izotaktičnu adiciju veća je u odnosu na sindiotaktičnu, i to za čak 500-600 cal/mol. Sindiotaktični sadržaj PVC-a dobivenog radikalnom polimerizacijom smanjuje se s povećanjem reakcijske temperature. Termička nestabilnost PVC-a često je uzrokovana grupama koje se u lancu ponašaju kao anomalije te je prilikom polimerizacije i kopolimerizacije cilj stvoriti glava-rep strukturu.<sup>20</sup>

Najčešći i najvažniji tip polimerizacije VC-a je suspenzijska radikalna polimerizacija pomoću koje se na globalnoj razini proizvodi čak 80% ukupnog PVC-a, dok se emulzijskom proizvodi 12%, a polimerizacijom u masi 8%. Suspenzijski se PVC dobiva diskontinuiranim postupkom u velikim reaktorima kapaciteta čak 150 do 250 m<sup>3</sup> u zatvorenome sustavu. Ukapljeni VC (smjesa svježeg i rekuperiranog monomera) dispergira se u destiliranoj vodi uz dodatak zaštitnih aditiva. Količine inicijalnih komponenata ovise o tipu PVC-a, veličini reaktora i sl. Najčešći aditivi koji se u ovakvu proizvodnju dodaju su omekšavala, toplinski i svjetlosni stabilizatori, maziva, dodaci za poboljšanje preradljivosti i žilavosti, punila i ojačavala te pigmenti i bojila.<sup>21</sup> Često korišteni stabilizatori jesu olovne soli (najviše korištene), organokositreni sapuni, Ca/Zn organski sustavi, kadmijevi sapuni (ne koriste se od 2002.) i kapljevit Ba/Zn i Ca/Zn sapuni.<sup>21</sup> Svojstva PVC-a proizvedenog pomoću suspenzijske polimerizacije prikazani su u tablici 1.

**Tablica 1.** Svojstva suspenzijskog PVC-a<sup>22</sup>

Svojstvo	Mjerna jedinica	Raspon
Suvišak VC-a u proizvodnji	mg/kg	0,5-5
Mehaničke nepravilnosti	max. količina	10-15
Relativna viskoznost	-	1,55-3,65
Inherentna viskoznost	-	0,5-1,63
Reducirana viskoznost	mL/g	84-122
Apsorpcija plastifikatora	minimalni phr (parts per hundred rubber)	31
K-vrijednost (termička provodnost)	-	49-89
Stupanj polimerizacije	-	520-1400
Poroznost	mL/g	0,17-0,51
Otpor	Ω cm	10 <sup>14</sup>
<p><b>Posebna svojstva:</b> otpornost na abraziju, konzistentna i uska raspodjela veličina čestica, dielektrična svojstva, odlične karakteristike suhog toka, dobra sposobnost spajanja s ostalim plastikama, visoka gustoća, visoka poroznost, nisko onečišćenje, niski troškovi, mehanička snaga, pogodno za medicinsku uporabu i korištenje na otvorenom, homogeno otapanje, prozirnost, brza apsorpcija plastifikatora</p>		

### 2.3.1.2. PVC u okolišu

Zbog ustaljene kvalitete i visokog stupnja onečišćenja okoliša plastikom, ona se često naziva i „najvećim ekološkim izazovom ovog stoljeća“. Međutim, PVC-u se u toj priči daje vrlo malo pažnje. Razlog tome što je količina PVC-a u okolišu iznimno mala u odnosu na stupanj njene



proizvodnje (10% ukupne). Mogući razlog tome je da je otpad industrije u kojoj se najviše koristi (građevinska) često velik i takvim se otpadom vrlo dobro gospodari, a činjenica da se PVC proizvodi koriste dulje vrijeme doprinosi tome da je godišnje omjer nastalog otpada i proizvodnje u konačnici dosta malen.<sup>23</sup> Čestice se PVC-a u vodenom okolišu često nalaze u sedimentima rijeka gdje zbog svoje veće gustoće (1,16 – 1,58 g/cm<sup>3</sup>) najčešće zaostaju. Međutim, ukoliko je tok rijeke turbulentniji može doći i do transporta samih čestica u ostale vodene okoliše kao što su jezera i mora. Primjerice, u jezeru Rawal u Pakistanu su u sedimentima nađene veće koncentracije PVC-a (<1 mm) nego u samoj vodi, a razlog tome je nepravilno odlaganje otpada i turističke aktivnosti.<sup>23,24</sup>

PVC u okolišu, iako ga je manje od ostale plastike, uzrokuje dodatna onečišćenja jer mu je zbog inicijalno slabijih svojstava krucijalno dodati brojne aditive (više nego bilo kojoj drugoj plastici) koji zajedno sa samom plastikom završavaju u okolišu. PVC-e je izvorno termalno nestabilan što iziskuje dodavanje raznih toplinskih/termalnih stabilizatora u polimer u velikim količinama (oko 4% masenog udjela). Najčešći su takvi stabilizatori olovo te kombinacija metalnih i organskih stabilizatora, a samo je olovo iznimno toksično za razne vodene ekosustave i ljude. Uz to, benzil butil ftalat (BBP) (ftalat koji se koristi kao plastifikator kod PVC-a) je jedan od najtoksičnijih aditiva koji uzrokuje niz problema s hormonima i reprodukcijom kod ljudi i životinja.<sup>25</sup>

### **2.3.1.3. Utjecaj PVC-a na žive organizme**

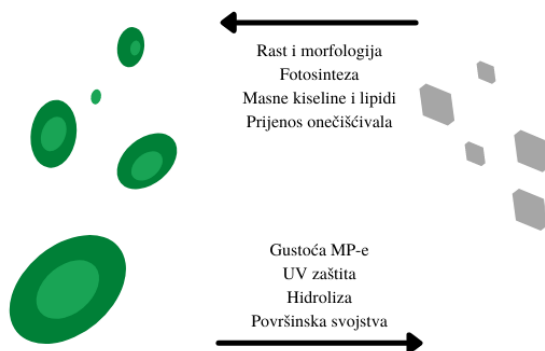
Problematika MP-a već niz godina predstavlja jedan od glavnih fokusa istraživanja onečišćenja slatkovodnih i morskih okoliša. MP-e je sam po sebi heterogeni set materijala koji se razlikuju u veličini i obliku, ali i u kemijskom sastavu koji uključuje polimere, aditive i nusproizvode. Time rečeno, i dalje je velika dilema imaju li kemikalije u plastikama ili same čestice veći utjecaj na toksičnost MP-a. Jedan plastični proizvod može sadržavati stotine kemikalija (antioksidansi, termički stabilizatori, plastifikatori, bojila, ostatak monomera tokom polimerizacije...)<sup>26</sup> Velik broj njih je na polimerni lanac vezano slabim van der Waalsovi silama i zbog toga vrlo lako završe u okolišu u kojem se nađu i postaju dostupni vodenim organizmima.<sup>26</sup> Primjerice, epoksi smola s PVC plastičnih proizvoda je inducirala tokstičnost na organizam *Daphnia magna*. Ekstrahirane kemikalije s PVC-a pokazale su veći utjecaj na reprodukciju – oslabile su ju, produljile proces za 3 dana te smanjile veličinu jedinki.<sup>26</sup> Također, MP-PVC

ponašala se kao vektor zemljanim crvima za bioakumulaciju perfluorooktan sulfonata (PFOS) i perfluorooktanske kiseline (PFOA) što je uzrokovalo smanjenu sposobnost razmnožavanja.<sup>27</sup> Jedan od reprezentativnih primjera također su zebrice (*Danio rerio*) na koje sama MP-a nije utjecala, ali je otpuštanje olova sa same MP-e tokom 24 sata uzrokovalo negativan odgovor zebrića na izlaganje istoj. PVC se u ovom slučaju ponašao kao rezervoar olova iz kojeg se olovo kontinuirano otpuštalo s plastike u okoliš.<sup>28</sup> Iz navedenog se može zaključiti da je kod samog PVC-a za organizme najveći problem količina aditiva koji se u njega dodaje kako bi mu se poboljšala svojstva.<sup>20,21,25-28</sup>

#### 2.3.1.4. Utjecaj PVC-a na mikroalge

MP-e su iznimno rasprostranjene u slatkovodnim okolišima. Veliki udio istraživanja toksičnog učinka trenutno pripada vodenim životinjama, ali je važno istaknuti i štetnost MP-a na mikroalge kao što su *Scenedesmus* sp. i *Chlorella* sp.. Primjerice, na mikroalgu *Chlorella* sp. PVC-e je utjecao na način da je tokom vremena pri višim koncentracijama smanjio koncentraciju klorofila a za čak 55,23%.<sup>29</sup> PVC-e kao takav inhibira fotosintezu ove mikroalge. Prvenstveno, akumulacija unutarstaničnih reaktivnih oblika kisika oštećuje staničnu strukturu i blokira sintezu klorofila te pritom izaziva oksidativni stres.<sup>25,29</sup> Također, MP-e ima veliku aktivnu površinu i snažnu sposobnost adsorpcije te s mikroalgama tvori heteroagregate koji mikroalge čine neaktivnima.<sup>29</sup> U odnosu na primjer PP-e, PVC-e pokazuje veću sposobnost inhibicije stvaranja klorofila a, ali na samu algu ne utječe fatalno. Dakle, fotosintetska aktivnost je u mikroalgama pri bilo kakvom okolišnom stresu smanjena.<sup>28</sup> Također, na aktivnost mikroalgi utječe i veličina čestica. Naime, što je čestica manja ona ima veću sposobnost tvorenja heteroagregata i na taj način negativno utječe na fotosintetsku aktivnost.<sup>29,30</sup> Sama morfologija MP-a manje je toksična za mikroalge u odnosu na kemikalije i aditive kojih u PVC-u ima jako puno (npr. benzotiazol, ftalid, acetofenon, kobalt, cink, olovo) koji se kontinuirano ispuštaju iz MP-e zbog njihove slabe vezanosti na MP-u.<sup>26,31</sup> Uz spomenute, to su često i preostali (nepolimerizirani) monomeri. Većina aditiva nije kovalentno vezana za površinu plastike te se potencijalno vrlo lako otpušta u okoliš.<sup>31</sup> Tako je primjerice na mikroalgu *Raphidoceli subcapitata* adsorpcija tih aditiva utjecala na sam rast više nego što je to činila sama MP-e. MP-e se tu zapravo više ponašala kao vektor za prijenos onečišćivala s MP-e na mikroalge.<sup>31</sup> Osim navedenog, kod mikroalgi MP-e mogu utjecati i na energetske metabolizam tako što utječu na izvore energije, ali i tako što ih pojedine mikroalge

mogu unijeti u sustav kroz proces fagocitoze.<sup>31</sup> Većina efekata je privremena te se ovisno o vrsti mikroalge oporavak u konačnici dogodio tokom različitog vremena što zbog ojačanja membrane, što zbog reducirane površinske izloženosti kroz stvaranje raznih tipova agregata između samih mikroalgi.<sup>31</sup> Mikroalge MP-u povećavaju gustoću time što od više čestica MP-a stvara gušće heteroagregate, štite samu plastiku od UV zračenja koje ju potencijalno može modificirati, zbog vezivanja na površinu MP-a smanjuju joj površinska svojstva, a trenutno se istražuje i potencijalan utjecaj mikroalgi na hidrolizu MP-a. MP-e, s druge strane, negativno ili pozitivno (efekt homeze) utječu na rast i morfologiju mikroalgi, smanjuju fotosintetsku aktivnost, utječu na kvalitetu i količinu proizvedenih masnih kiselina i lipida, te se često imaju funkciju prijenosa onečišćujuće tvari na mikroalge. Na slici 4 prikazana je pojednostavljena shema međusobnog utjecaja MP-a i mikroalgi.<sup>31</sup>



**Slika 4.** Utjecaj mikroalge na MP-u (donja strelica) i obratno (gornja strelica)<sup>31</sup>

Osim negativnog utjecaja, na mikroalgama se primijetila i pojava fenomena hormeze. Točnije, ovaj je fenomen baziran na konceptu doza-odgovor gdje se pri manjim koncentracijama onečišćujuće tvari rast biljki, algi i mikroalgi pospješuje, dok se pri većim koncentracijama on inhibira.<sup>31,32</sup>

## 2.4. (Mikro)alge

Alge predstavljaju vrlo raznolik opus drevnih biljaka koje su stvorile razne evolucijske linije fotoautotrofskih organizama. Njihova vegetativna tijela nisu organizirana na principu korijena i lisnatih stabljiki, već mnoge žive kao zasebne stanice, kolonije, filamenta ili primitivna

vegetacijska tijela te nemaju nikakav žilni sustav. Razlikujemo prokariotske (cijanobakterije) i eukariotske alge te ne pripadaju u rod biljaka. Međutim, za alge je prihvaćen naziv „niže biljke“ zbog fotosinteze kao zajedničke karakteristike s tradicionalnim biljkama. Za prokariotske oksifototrofe osnovna je karakterizacija osnovana na sadržaju klorofila a i b koji nisu maskirani kao ukrasni pigmenti.<sup>33</sup>

Kao takve, alge se u hranidbenim lancima vodenih ekosustava nalaze na samom dnu te istovremeno žive pod pritiskom ostalih kompetitivnih organizama.<sup>34,35</sup> Zbog toga se uveo i pojam alelopatije koji predstavlja osnovni princip kompeticije zbog nutrijenata, svjetla ili prostora. Ona može biti negativna kada se radi o „namjernoj“ alelopatiji, dok se pozitivna promatra na principu „oportunizma“. Tako je dokazano i da neke mikroalge proizvode toksine zbog kompeticije sa ostalim mikroalgama. Primjerice, *Karlotinium veneficum* mikroalga proizvodi karlotoksin koji ostalim organizmima (uključujući predatore) utječe na karakteristike plivanja.<sup>34</sup>

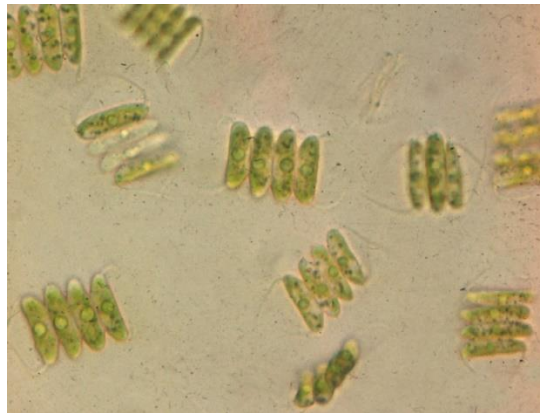
U primjeni, pod pojmom mikroalgi u najširem smislu smatraju se i prokariotske cijanobakterije i eukariotske mikroskopske alge. Širenje ovih organizama iznimno je veliko s obzirom da nastanjuju razne ekosustave – od hladnih arktičkih regija, kroz vrlo lužnata i slana područja do vrućih izvora i suhih područja. One su važni potrošači CO<sub>2</sub> i primarni proizvođači što ih čini bazom hranidbenih lanaca u vodenim ekosustavima te su jedni od najefikasnijih pretvornika solarne energije u biomasu. Svjetlost je ujedno i najvažniji faktor u rastu mikroalgi. Količina energije fotona koju svaka stanica prima ovisi o mnogim faktorima, a u konačnici tek 90% fotona koji se uhvate na potpunoj osvjetljenosti se uopće ne koriste za fotosintezu, već kao toplina i fluorescencija. Optimalna temperatura za rast većine mikroalgi je između 25 i 30 °C.<sup>35</sup>

Zbog iznimno velikog sadržaja sirovih vlakana, vitamina, minerala i sl., mikroalge se sve više koriste za prehranu i kao suplementi u prehrani. Primjerice, *Chlorella* i *Spirulina* mikroalge su na tržištu zdrave prehrane kao izvori proteina u obliku tableta, kapsula i tekućina.<sup>35</sup>

#### **2.4.1. Rod *Scenedesmus***

Zelene alge su najheterogenijih grupa fotoautotrofskih protoktista u biosferi koje imaju iznimno širok raspon oblika, veličina i staništa. Kao primarni proizvođači, zelene alge imaju veliku vrijednost za Zemlju koja je gotovo na razini prašuma. Razlog tomu je njihova iznimna rasprostranjenost. Sam proces fotosinteze ovisi o količini nutrijenata i dostupnost svjetla algama.<sup>36</sup>

Među organizmima u slatkovodnim staništima vrlo se često susreću zelene mikroalge roda *Scenedesmus* sp. (razred *Chlorophyceae*, red *Sphaeropleales*, obitelj *Scenedesmaceae*). Nađene su u svim klimatskim područjima na svijetu, a najviše u eutrofskim jezerima i barama. Pojavljuju se kao samostalne stanice ili u cenobijama od 2 do 32, najčešće 4-8 stanica i u 2-3 reda što je vidljivo na slici 5. Međutim, sama morfologija im je ovisna u kakvoj se okolini nalaze. U prisutnosti organizama poput *Daphnia magna* dolazi do smanjenja samih kolonija zbog kemikalija koje otpuštaju. Same kolonije najčešće nastaju prilikom rasta stanica, dok se zbog okolišnih učinaka češće nalaze u jednostaničnim oblicima.<sup>37-39</sup> Razmnožavanje im je u većini slučajeva nespolno pomoću nepokretnih spora nazvanih autospore. Česte su komponente slatkovodnih planktona i vrlo se često koriste u istraživanjima onečišćenja i fotosinteze te su zbog visokog sadržaja lipida potencijalni izvori za proizvodnju biodizela.<sup>40</sup> U procesima pročišćavanja otpadnih voda ove mikroalge omogućuju kisik potreban za bakterijski raspad organske tvari i time pomažu uništavanju opasnih supstanci.<sup>39</sup> U normalnim uvjetima, ciklus rasta im je 16 dana prije nego postignu stacionarno stanje. Velik broj *Scenedesmus* mikroalgi karakterizira se na temelju brzine rasta te akumulacije biomase i lipida.<sup>40</sup>



**Slika 5.** Formiranje kolonija mikroalge *Scenedesmus* sp.<sup>39</sup>

## 2.5. Ekotoksikološki testovi

Ekotoksikologija je znanost koja se bavi proučavanjem i prevencijom štetnih učinaka antropogenih emisija kemijskih spojeva na strukturu, funkciju i bioraznolikost ekosustava. Iako pokriva i prirodno ispuštene kemikalije, u zadnjih nekoliko godina usmjerena je pretežno na antropogeno djelovanje. U primjeni je danas jedna od najčešćih grana ekotoksikologije tzv.

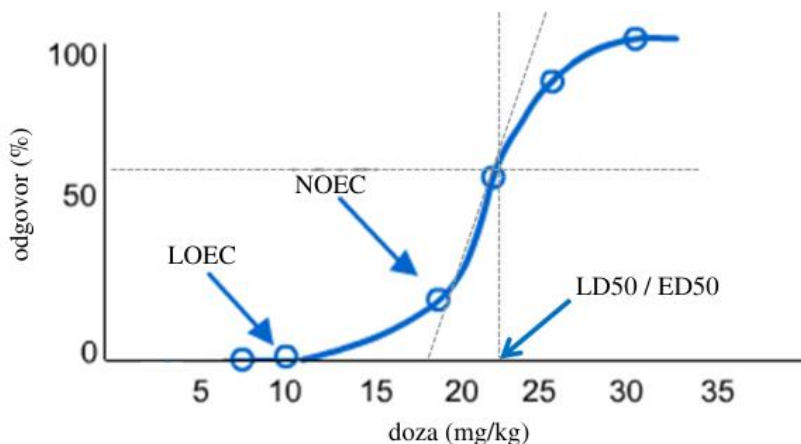
eksperimentalna ekotoksikologija koja kao cilj ima pri kontroliranim uvjetima identificirati poveznicu između izlaganja organizama kemikalijama (ili grupama kemikalija) i potencijalnog toksičnog efekta koji se na organizmima zapazio.<sup>41</sup> Iako metode i konačni ciljevi mogu biti vrlo raznoliki, eksperimentalna toksikologija može provoditi nekoliko oblika testova, a to su: testovi toksičnosti na jednoj vrsti (npr. alge, kopnene i vodene biljke, ribe, ptice, mikroorganizmi ...); funkcionalni testovi toksičnosti (mjerjenje direktnog efekta na neku funkciju ekosustava kao što je npr. mineralizacija ugljika ili dušika); testovi toksičnosti na više vrsta (istraživanje efekta kemikalija na prirodne ili umjetne skupove ili na velike kompleksne zajednice).<sup>41</sup>

Razni se testovi provode sa svrhom direktnog ili indirektnog određivanja potencijalnog štetnog učinka pojedinih kemijskih spojeva na okoliš. Direktni testovi nazivaju se *in vivo* testovi, a indirektni (ili na dijelovima organizma) *in vitro*. *In vivo* testovi danas su na velikom broju organizama (posebno kralježnjaka) zabranjeni te se češće provode *in vitro* testovi.<sup>42,43</sup>

Velik broj ekotoksikoloških testova kao osnovnu zadaću imaju prikupiti podatke bazirane na odgovoru nakon ekotoksikološkog pothvata kako bi se odredila maksimalna (sigurna) koncentracija kemijskih spojeva koji se mogu naći u vodi, sedimentima i zemlji; za evaluaciju / monitoring otpadne vode; i za upravljanje rizikom. Takvi testovi se izvode i na vodenim i na kopnenim organizmima, iako se vodeni organizmi koriste za puno veći raspon ekotoksikoloških testova. Testovi izvođeni na jednoj vrsti često su bazirani na principu odnosa doza-odgovor između materijala i biološkog efekta na ispitivanom organizmu. Karakterizacija ovog odnosa bazirana je na izlaganju uzoraka organizama s povećanjem razine testnog materijala i potom opažanju njihovih odgovora tokom vremena trajanja testa.<sup>42</sup> Analitička validacija kemijskog izlaganja pojedinim koncentracijama iznimno je važna kod mnogo standardiziranih testnih protokola korištenih u regulativne svrhe. Ovo je posebno važno kod statičnih ili obnovljivo-statičnih testova na vodenim organizmima kod kojih se razina kemikalije ili materijala ne obnavljaju kontinuirano.<sup>42</sup>

Uz sam dizajn testova, važno je promotriti i njihovo trajanje. Kod akutnih testova promatraju se kratkorajna (sati ili dani) izlaganja i odgovori organizama unatoč nemobilnosti, gubitku ili ravnoteži organizama te čak rastu populacije (u slučaju algi). Uobičajene krajnje točke testova akutne toksičnosti su LD<sub>50</sub> i EC<sub>50</sub> koje predstavljaju medijane smrtonosnih koncentracija ili doza (LD), odnosno medijan efektivne koncentracije (EC). LC<sub>50</sub> je koncentracija pri kojoj testni materijal izaziva smrtnost 50% testne populacije, dok EC<sub>50</sub> predstavlja koncentraciju koja ima

određeni učinak (npr. imobilizaciju ili inhibiciju rasta).<sup>41</sup> LOEC predstavlja najnižu dozu koja izaziva odgovor, dok NOEC predstavlja najvišu dozu koja ne izaziva odgovor.<sup>44</sup> Izgled krivulje *doza – odgovor* prikazan je na slici 6. s naznačenim parametrima.



**Slika 6.** Primjer krivulje doza-odgovor s odgovarajućim parametrima<sup>45</sup>

S druge strane, testovi kronične toksičnosti obuhvaćaju one testove koji traju barem 10% životnog ciklusa testnog organizma. Ova kategorija testova uključuje procijene punih životnih ciklusa koji su standardizirani za neke vodene testne vrste (primjerice *Daphnia magna* ili *Ceriodaphnia dubia*). Analiza regresije podataka kronične toksičnosti može se koristiti da bi se generirala koncentracija koja izaziva inhibiciju.<sup>42</sup>

Testovi toksičnosti na jednoj vrsti i u *in vivo* i u *in vitro* obliku pokazali su problem zbog potencijalnih ograničenja u predviđanju toksičnih učinaka kemijskih spojeva na razini čitavog ekosustava. Također, organizmi kao reprezentativni uzorak mogu neadekvatno predstavljati raspon osjetljivosti na kemijske spojeve koji se u prirodnom okruženju događa. Standardizirani dokumenti protokola i uputa o tome kako se testovi na mikro i makro razini trebaju provoditi stvoreni su od strane USEPA (*United States Environmental Protection Agency*), ASTM (*American Society for Testing Materials*) i OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*).<sup>42</sup>

### 2.5.1. Testovi ekotoksičnosti na (mikro)algama

Efekti kemijskih spojeva na vodene organizme i sam fokus na njima pokazuje da je bioakumulacija spojeva ključ studije vodene ekotoksikologije gdje se, u srži, proučava sudbina tvari koja je pod kontrolom raznih kompleksnih fizikalno-kemijskih procesa u vodama i sedimentima te kopnenim i zračnim područjima, ali i samim ekosustavima. Često se s ciljem pojednostavljivanja učinka kemijskih spojeva na vodene ekosustave koriste pojedine vrste organizama kao reprezentativni modeli raznih trofičkih razina. To uključuje primarne proizvođače (alge, biljke), primarne potrošače (organizmi koji jedu biljke/alge), sekundarne potrošače (organizmi koji jedu primarne proizvođače) i predatori na vrhu lanca (ili tercijarni potrošači – velike ribe, ptice...). Spomenuti reprezentativni modeli se nakon same definicije izlažu raznim laboratorijskim studijama s ciljem dobivanja doza-odgovor krivulja iz kojih se potom mogu derivirati LC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>, NOEC i LOEC. Ove se koncentracije koriste u modeliranju pristupa koji bi procijenili razinu kemijskog spoja koji nema učinak na vodeni ekosustav kao cjelinu.<sup>46</sup> U tablici 2 dani su primjeri ekotoksikoloških ispitivanja MP-PVC-a na razne mikroalge.

**Tablica 2.** Ekotoksikološka ispitivanja MP-PVC-a na razne mikroalge.

Naziv mikroalge	Veličina PVC [ $\mu$ m]	Koncentracija PVC [mg/L]	Zabilježeni učinci
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	111 - 216	5 - 500	Smanjena fotosintetska aktivnost, smanjen sadržaj klorofila, s porastom koncentracije MP-e raste efekt inhibicije rasta mikroalge <sup>28</sup>
<i>Microcystis flosaquae</i>	111 – 216	5 - 500	Smanjena fotosintetska aktivnost, smanjen sadržaj klorofila, s porastom koncentracije MP-e raste efekt inhibicije rasta mikroalge <sup>28</sup>
<i>Chlorella sp.</i>	74	200	Inhibicija rasta mikroalge, smanjen sadržaj klorofila <sup>47</sup>
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	74	200	Inhibicija rasta mikroalge, smanjen sadržaj klorofila <sup>47</sup>
<i>Skeletonema costatum</i>	1	50	Smanjena fotosintetska aktivnost, smanjen sadržaj klorofila <sup>48</sup>



### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroplastika

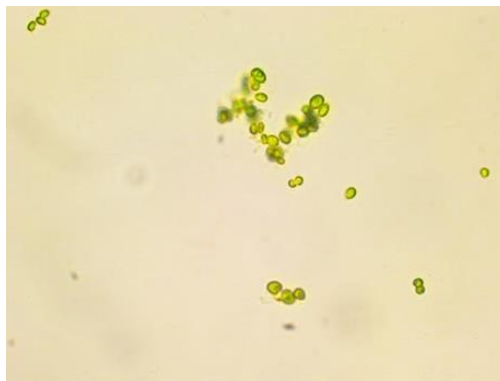
Toksični učinak MP-PVC-a određivao se pomoću mikroalge *Scenedesmus* sp. MP-e je dobivena usitnjavanjem makroplastike (MAP). Za dobivanje PVC-a usitnjavana je jednokratna plastična ambalaža prikazana na slici 7 na kojoj se nalazila oznaka za PVC.



**Slika 7.** PVC-e jednokratna plastična ambalaža.

##### 3.1.2. Testni organizmi

Za ispitivanje toksičnosti PVC-a koristila se slatkovodna mikroalga *Scenedesmus* sp. Mikrofotografija mikroalge snimljena je u nultom danu i prikazana je na slici 8. Korištena kultura pohranjena je u zbirci Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 8.** Mikrofotografija mikroalge *Scenedesmus* sp. snimljena u nultom danu, P=400x.

### 3.1.3. Kemikalije i mediji

- **Bazalni medij**

Bazalni medij (BM), *Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution*, Sigma, Ujedinjeno Kraljevstvo, koristio se za uzgoj kulture *Scenedesmus* sp. te kao medij za postavljanje pokusa. Pripremao se prema uputama proizvođača na način da se 20 mL BM-a dodalo na 1 dm<sup>3</sup> deionizirane vode. pH-vrijednost BM-a podešena je pomoću otopine NaOH koncentracije 0,1 mol/dm<sup>3</sup>. Na ovaj način pripremljeni BM prije upotrebe se sterilizirao.

- **Etanol**

Etanol masenog udjela 70% koristio se za sterilizaciju MP-a prije postavljanje pokusa s *Scenedesmus* sp.

### 3.2. Mjerni instrumenti i oprema

- Za usitnjavanje MAP korišten je blender Philips, a za prosijavanje mikroplastike upotrijebljen je uređaj za trešenje sita W.S. Tyler RX-86 Sieve shaker, USA, i sita istog proizvođača, veličine pora 300 µm, 500 µm i 710 µm.
- Za miješanje bazalnog mehanizma prilikom podešavanja pH-vrijednosti koristila se magnetna mješalica WiseStir® MSH-20A, Švicarska.
- Za vaganje s većom preciznošću upotrebljavala se vaga Sartorius AG, Njemačka.
- Za prethodno steriliziranu mikroplastiku korišten je membranski lijevak uz vakuum pumpu, i sterilni celulozno nitratni (C/N) membranski filteri Ahlstrom ReliaDisc™, promjera pora 0,45 µm.
- Za provedbu eksperimenta koristila se tresilica proizvođača LAUDA-GFL Gesellschaft model 3005.
- S ciljem određivanja broja živih stanica algi (CFU) upotrebljena je Thomina komorica.
- Za sterilizaciju bazalnog medija, čistog staklenog posuđa, te onečišćenog posuđa, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija.
- U svrhu aeriranja alge *Scenedesmus* sp. korištena je aeracijska pumpa Tetracac, a za osvjetljenje alge koristila se lampa.

- U pokusima s *Scenedesmus* sp., pHvrijednost se određivala pH-elektrodom SenTix® 940, a koncentracija otopljenoga kisika kisikovom elektrodom FDO® 925 pomoću prijenosnog mjerača WTW Multi 340i. Instrument je prije svake upotrebe kalibriran.
- Optička gustoće određena je na spektrofotometru Hach, Model DR/2400, SAD.
- Mikroalga *Scenedesmus* sp., mikroskopirana je pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan).
- Alga *Scenedesmus* sp., mikroskopirana je pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera).

### 3.3. Metode rada

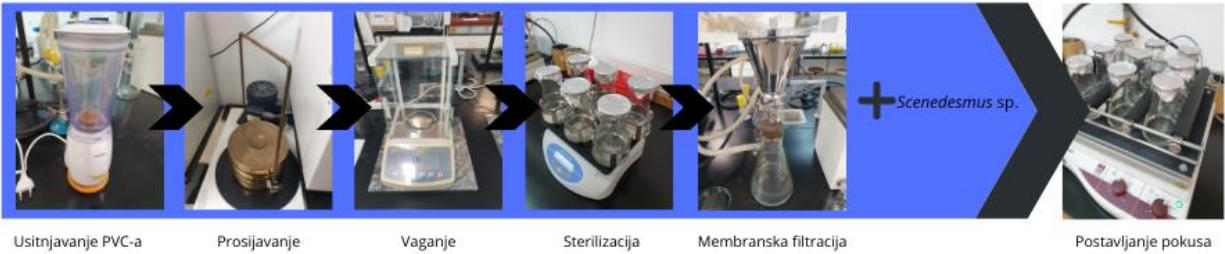
#### 3.3.1. Priprema mikroplastike

MAP-PVC-e prikazana na slici 1, prvotno je usitnjena škarama na manje komade te se zatim usitnjavala u blenderu uz dodatak mokrog leda. Usitnjene čestice PVC-a sušile su se na zraku 24 – 48 h pri sobnoj temperaturi, te su se zatim prosijavale mehanički koristeći sita određenih pora u svrhu dobivanja čestica veličine: <300  $\mu\text{m}$ , 300 – 500  $\mu\text{m}$  i 500 – 710  $\mu\text{m}$ .

U svrhu sterilizacije PVC-a, određene mase PVC-a izvagane su u Erlenmayerove tikvice od 100 mL u koje se dodao 70 % etanol te su tikvice stavljene na rotacijsku tresilicu tijekom 10 min pri 160 o/min i sobnoj temperaturi. Čestice PVC-a su izdvojene iz etanola i isprane sterilnom deioniziranom vodom primjenom vakuum filtracije uz sterilnu tehniku rada. PVC-e zaostao na sterilnom membranskom filtru (0,45  $\mu\text{m}$ ) se uz pomoć sterilne žlice i pincete prebacio u sterilne tikvice volumena 250 mL za postavljanje pokusa.

#### 3.3.2. Određivanje toksičnosti mikroplastike korištenjem alge *Scenedesmus* sp.

Proveden je eksperiment kojim se određivala toksičnost PVC-a na mikroalgi *Scenedesmus* sp.. Eksperiment se provodio na rotacijskoj tresilici 3 dana pri 160 okretaja/min u tikvicama volumena 250 mL, odnosno radnog volumena  $V_R = 100$  mL. Na slici 9 prikazan je shematski prikaz pripreme PVC-a i postavljanje eksperimenta.



**Slika 9.** Shematski prikaz pripreme PVC-a i postavljanje eksperimenta za određivanje toksičnosti PVC-a primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp.

Prije postavljanja eksperimenta uzgojila se mikroalga *Scenedesmus* sp. u bazalnom mediju (BM) uz kontinuiranu aeraciju i interval svjetlosti 16:8 (svjetlo:mrak) tijekom 14 dana.<sup>49</sup> Broj živih stanica mikroalgi (CFU) iznosio je nakon 14 dana  $1,3 \cdot 10^6$  st/mL. CFU (st/mL) određivao se izravnim brojanjem u Thominoj komorici, na način da su se stanice mikroalge brojale unutar 3 kvadrata, a ukupan broj živih stanica odredio se prema formuli 1.1:

$$N = \frac{m \cdot n \cdot 16 \cdot 10^4}{K} \quad (1.1)$$

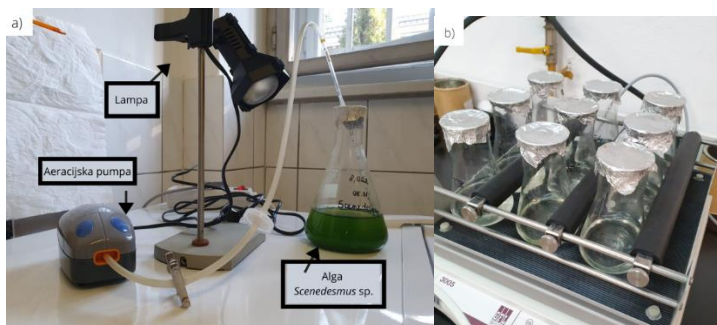
gdje  $N$  predstavlja ukupan broj stanica u 1 mL,  $m$  ukupan broj pobrojanih stanica,  $n$  recipročnu vrijednost razrjeđenja,  $10^4$  korekciju volumena i  $K$  broj kvadrata u kojima je izvršeno brojanje.

Na slici 10 prikazan je svjetlosni mikroskop opremljen kamerom za snimanje mikrofotografija koji se koristio u eksperimentu za 0. i 3. dan u svrhu praćenja morfoloških promjena stanica mikroalge.



**Slika 10.** Svjetlosni mikroskop opremljen kamerom za snimanje mikrofotografija.

Na slici 11 a) prikazana je uzgojena mikroalga, aeracijska pumpa i lampa. Početni CFU suspenzije mikroalge korištene u eksperimentu iznosio je  $2,1 \cdot 10^5$  st/mL, odnosno početna optička gustoća u BM-u iznosila je 0,043, a određivala se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 670 nm.<sup>50</sup> Slika 11 b) prikazuje postavljanje eksperimenta. Tikvice prikazane na slici 11 b) sadržavale su suspenziju *Scenedesmus* sp., BM i PVC. Pokus je proveden prema OECD 201:1984<sup>51</sup> te je za eksperiment bila postavljena i slijepa proba (SP) koja nije sadržavala PVC.



**Slika 11.** a) Fotografija uzgojene mikroalge *Scenedesmus* sp. uz lampu i aeracijsku pumpu, b) eksperiment za određivanje toksičnosti PVC-a primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp.

Uz CFU vrijednost, pri postavljanju pokusa pratilo se nekoliko pokazatelja – optička gustoća (OG), pH-vrijednost, temperatura i koncentracija otopljenoga kisika. Početni uvjeti pri postavljanju eksperimenta prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Početni uvjeti za određivanje toksičnosti PVC-a primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp.

Vrsta MP-e	PVC
$\gamma_{MP}$ / mg/L	50; 250; 500; 750; 1000
Veličina MP-e / $\mu\text{m}$	<300; 300-500; 500-710
pH-vrijednost / -	7,96
$\gamma$ (O <sub>2</sub> ) <sub>0</sub> / mg/L	8,45
log CFU <sub>0</sub> / -	5,32
OG <sub>0</sub> / -	0,04
T / °C	23,5

U eksperimentu su određivane vrijednosti logaritamskog broja živih stanica, log CFU, za početne uvjete (Tablica 3) te tijekom 3 dana u intervalima od 1 dan. Na početku i na kraju eksperimenta određivane su pH – vrijednosti, koncentracije otopljenog kisika i temperatura. Za svaku se veličinu PVC-a računao iznos inhibicije rasta mikroalge koristeći log CFU slijepe probe i uzorka. Inhibicija spomenutog rasta izražavala se u obliku postotka (%), a računala se prema formuli:

$$\text{INH} = \frac{\log \text{CFU} (\text{kontrola}) - \log \text{CFU} (\text{uzorak})}{\log \text{CFU} (\text{kontrola})} \times 100\% \quad (1.2)$$

gdje log CFU (kontrola) predstavlja logaritamski broj živih stanica mikroalge u slijepoj probi, a log CFU (uzorak) logaritamski broj živih stanica mikroalge u tikvici s uzorkom, tj. s PVC-om.

## 4. Rezultati

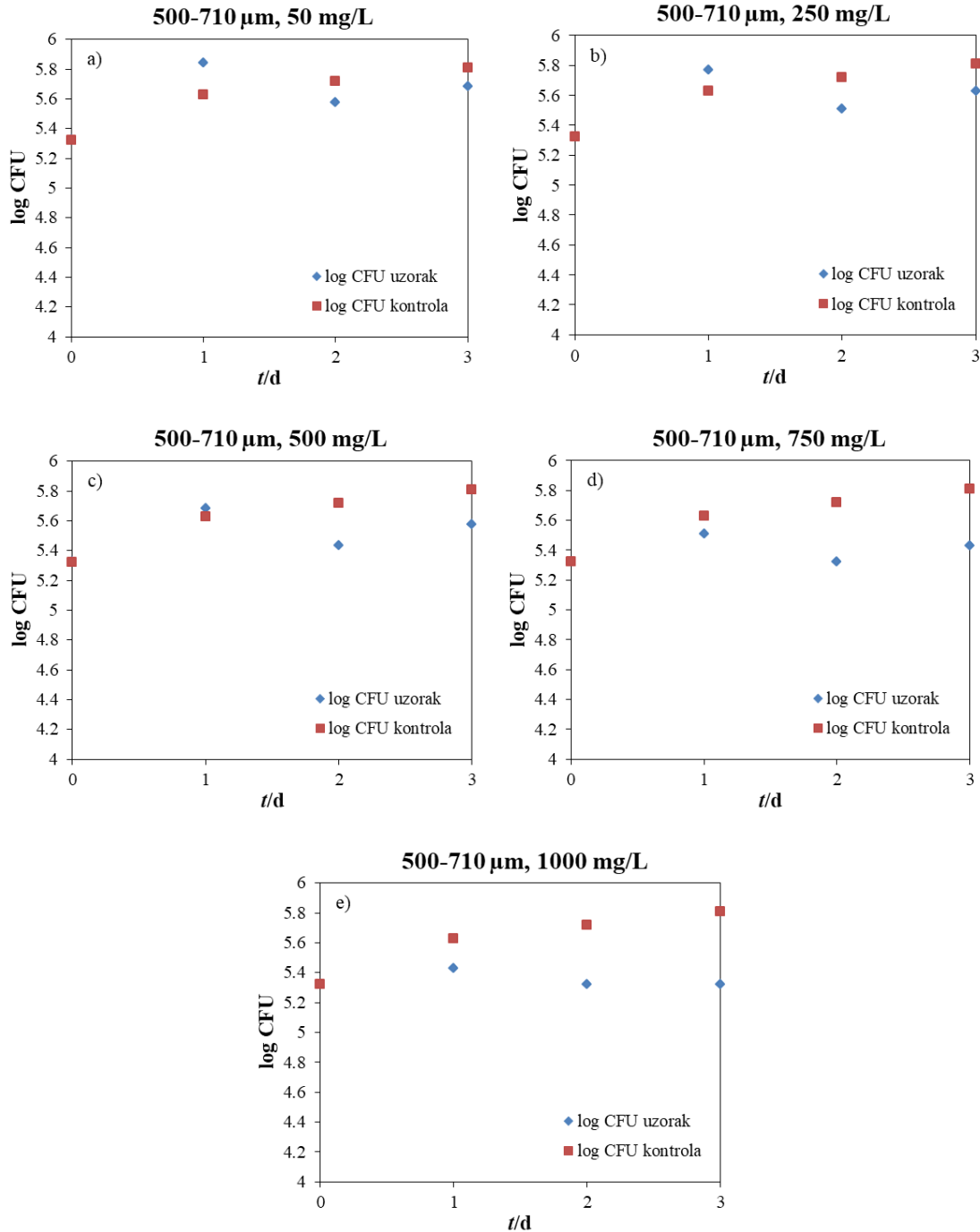
### 4.1. Određivanje toksičnosti mikroplastike primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp.

Postupkom opisanim u poglavlju 1.3.2. uzgojena je mikroalga *Scenedesmus* sp. koja se koristila u eksperimentu. Tijekom eksperimenta se pratila promjena broja živih stanica (CFU) te početna i krajnja vrijednost pH – vrijednosti i koncentracije otopljenoga kisika. Dobiveni rezultati promjene log CFU prikazani su grafički na slikama 12 – 14, a ukupna promjena pH – vrijednosti, koncentracije otopljenoga kisika te temperature u tablici 4. Slika 15 prikazuje inhibiciju rasta mikroalge *Scenedesmus* sp. za svaku veličinu čestica PVC-a.

**Tablica 4.** pH-vrijednost, koncentracija otopljenoga kisika i temperatura nakon 3 dana provođenja eksperimenta toksičnosti PVC-a primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp. za sve uzorke i slijepu probu.

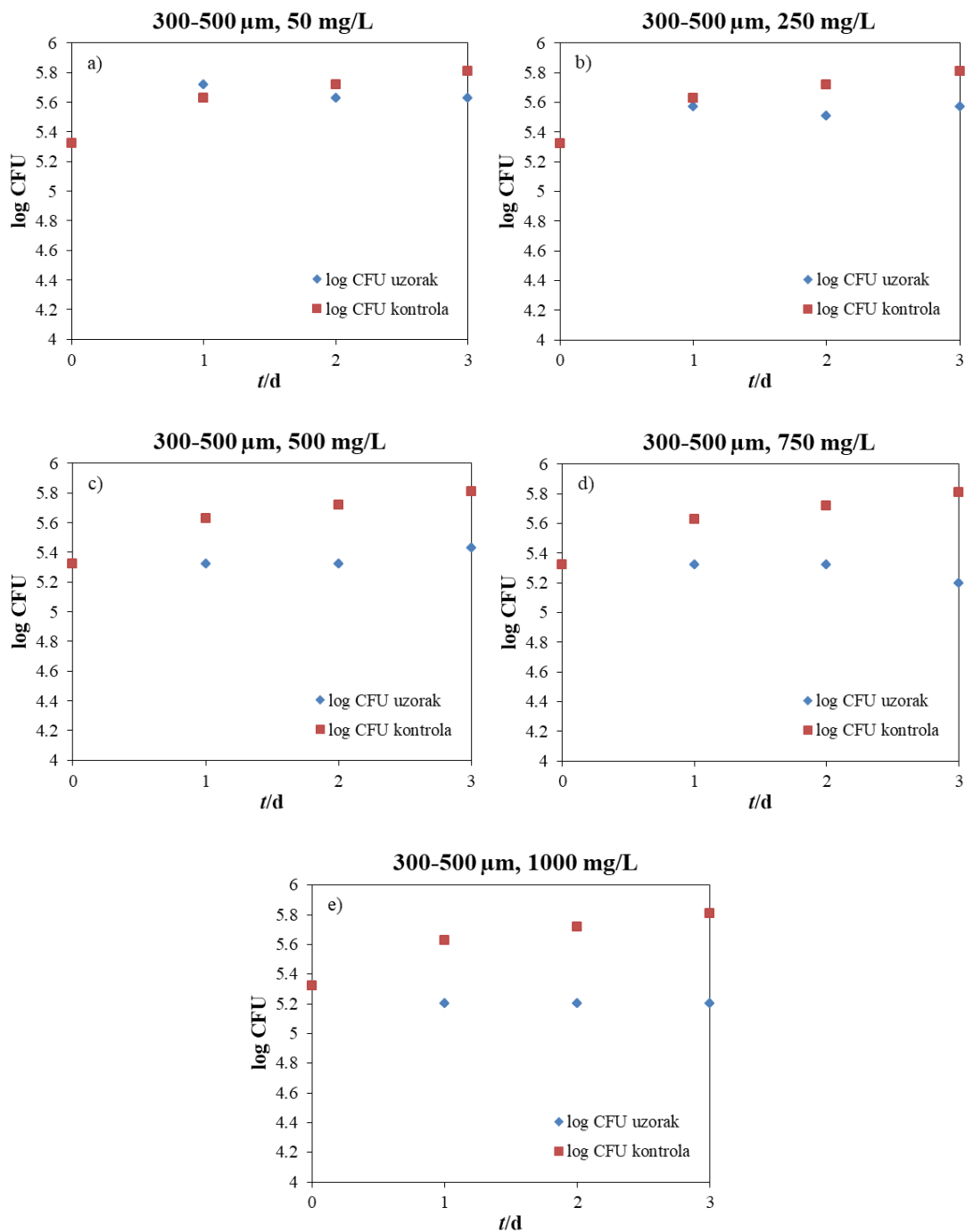
Veličina PVC-a / $\mu\text{m}$	$\gamma_{\text{MP}}$ / mg/L	pH vrijednost / -	$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	$T/ ^\circ\text{C}$
--*	--*	7,94	9,06	21,1
500-710	50	7,94	8,93	22,2
	250	7,94	9,06	22,6
	500	7,94	9,08	22,6
	750	7,93	9,04	22,1
	1000	7,93	9,04	22,2
300-500	50	7,94	8,9	22,8
	250	7,94	8,91	22,7
	500	7,92	8,75	23,1
	750	7,92	8,96	23,2
	1000	7,92	8,85	22,4
< 300	50	7,91	8,78	22,8
	250	7,9	8,69	22,7
	500	7,89	8,77	22,2
	750	7,89	8,77	22,1
	1000	7,9	8,72	22,5

\*SP – nije sadržavala čestice PVC

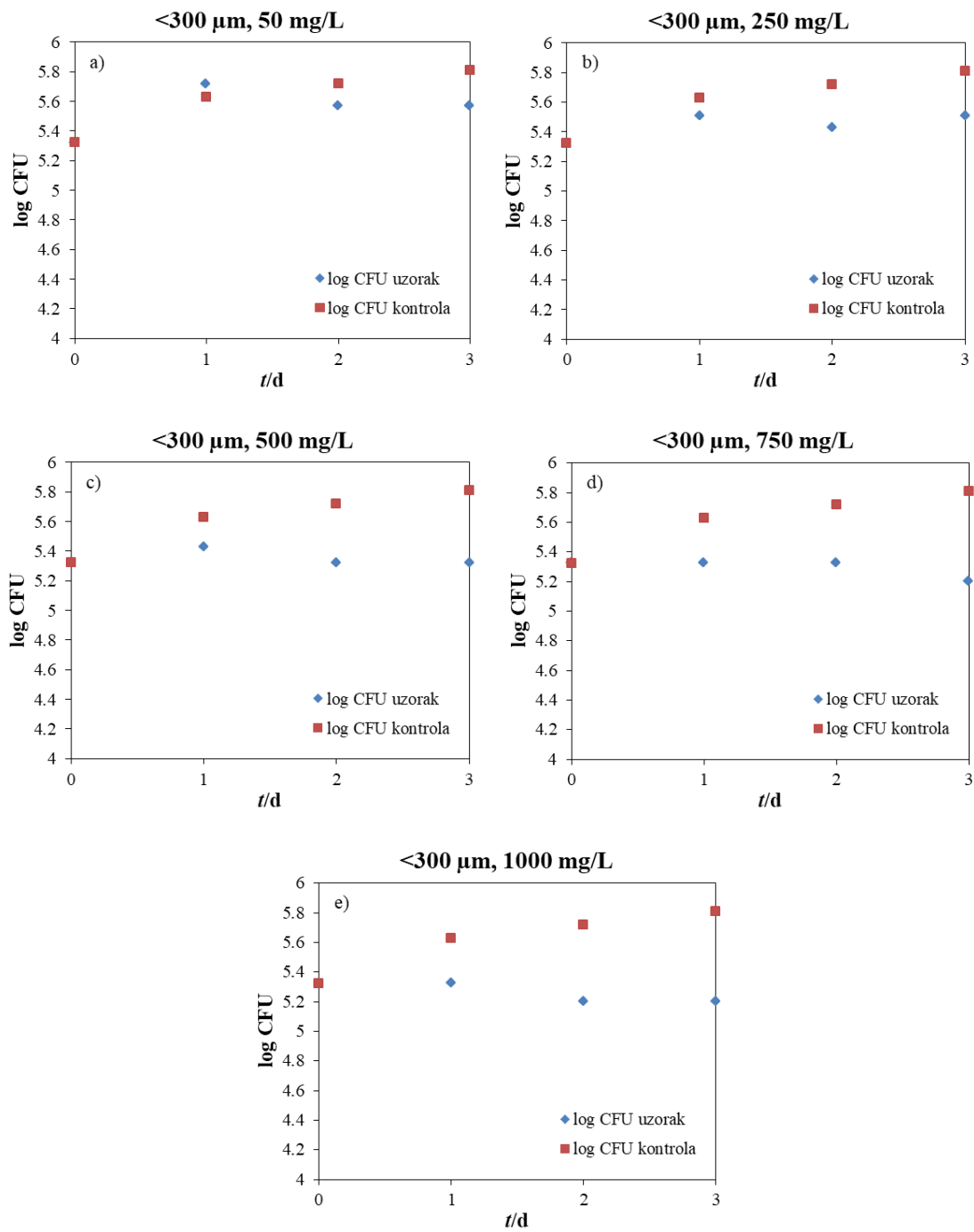


**Slika 12.** Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uзорak PVC-a veličine čestica 500 – 710  $\mu\text{m}$ , koncentracije: a) 50 mg/L, b) 250 mg/L, c) 500 mg/L i d) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 3 dana.

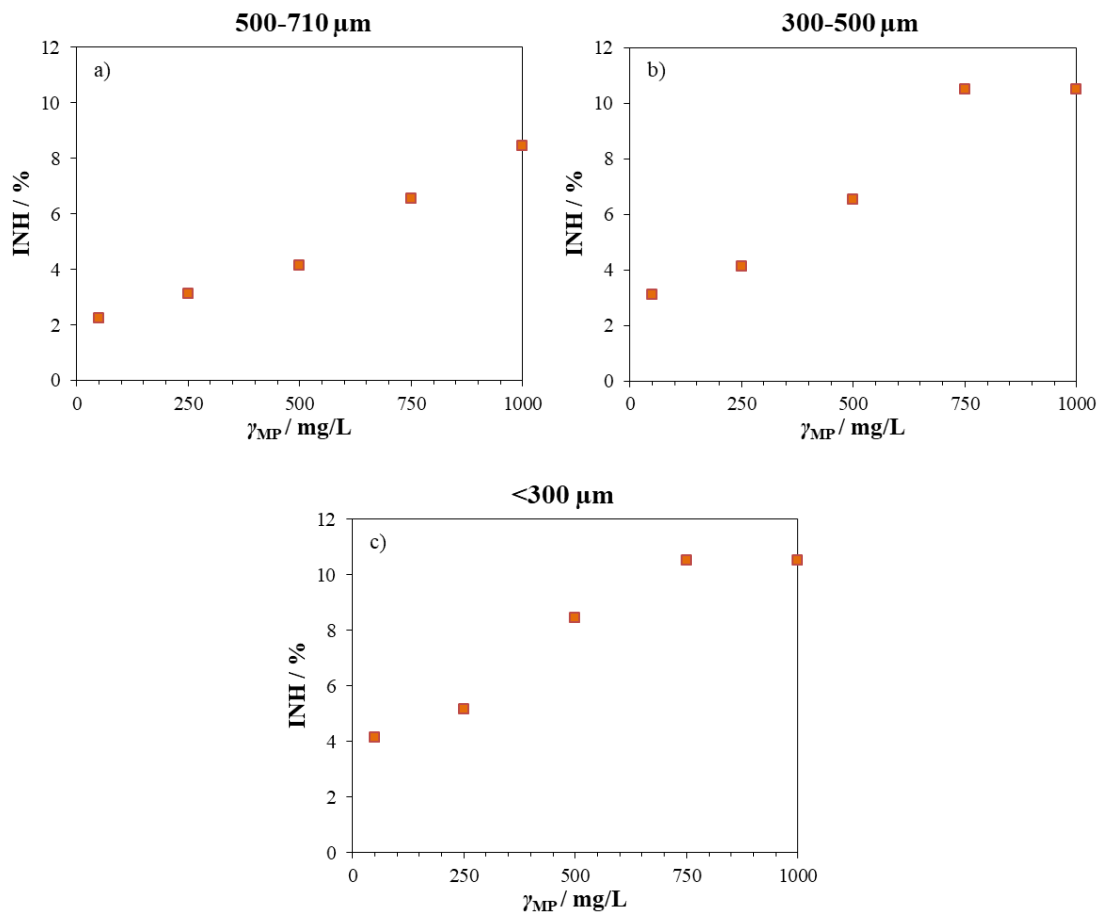




**Slika 13.** Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uzorak PVC-a veličine čestica 300 - 500  $\mu\text{m}$ , koncentracije: a) 50 mg/L, b) 250 mg/L, c) 500 mg/L, d) 750 mg/L i e) 1000 mg/L za kontrolu tijekom 3 dana.



**Slika 14.** Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uzorak PVC-a veličine čestica < 300 μm, koncentracije: a) 50 mg/L, b) 250 mg/L, c) 500 mg/L, d) 750 mg/L i e) 1000 mg/L za kontrolu tijekom 3 dana.



**Slika 15.** Inhibicija rasta mikroalge *Scenedesmus* sp. s obzirom na različite koncentracije pri veličini PVC-a: a) 500-710  $\mu\text{m}$ , b) 300-500  $\mu\text{m}$  i c) <300  $\mu\text{m}$ .

## 5. Rasprava

U provedenom se eksperimentu ispitivao utjecaj MP-PVC-a na slatkovodnu mikroalgu *Scenedesmus* sp.. Način provedbe i praćeni pokazatelji detaljno su opisani u poglavlju 3. *Eksperimentalni dio.*

### 5.1. Analiza eksperimenta

U eksperimentu je određivana toksičnost MP-a korištenjem slatkovodne mikroalge *Scenedesmus* sp.. Mikroalga je bila izložena PVC-u tijekom 3 dana, a početni uvjeti prikazani su u tablici 2. Ispitivan je direktan utjecaj PVC-a veličine čestica <300 µm; 300-500 µm; 500-710 µm na inhibiciju rasta mikroalge. Tijekom pokusa nisu zabilježene morfološke promjene stanica mikroalge. Usporedbom početnih (Tablica 2) i konačnih uvjeta (Tablica 3) može se zamijetiti da se pH – vrijednosti, koncentracije otopljenog kisika i temperature nisu značajno mijenjale.

Nakon 3 dana je u svim tikvicama u kojima se eksperiment provodio zapažen rast mikroalgi. Usporedbom svih grafova može se primijetiti sličan trend promjene broja stanica tijekom vremena. Tijekom promatranja mikroskopske slike *Scenedesmus* sp. mogla se primijetiti tendencija grupiranja u kolonije od najčešće 2 do 8 stanica.<sup>53</sup>

Slike 12 – 14 prikazuju promjenu logaritamskog broja stanica *Scenedesmus* sp. pri veličinama čestica PVC-a <300 µm; 300-500 µm; 500-710 µm te koncentracija 50 mg/L; 250 mg/L; 500 mg/L; 750 mg/L; 1000 mg/L u usporedbi sa slijepom probom tijekom 3 dana. Svi rezultati prikazuju sličan trend promjene logaritamskog broja stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. tijekom eksperimenta. Nakon prvog dana pri svim veličinama i niskim koncentracijama (50 mg/L) došlo je do blagog rasta mikroalge, osim pri veličini 500-710 µm kada se ta pojava mogla uočiti i pri višim koncentracijama (500 mg/L). Nakon drugog dana uglavnom se može uočiti nagli pad, a nakon trećeg dana ili prestanak rasta (isti broj) ili blagi porast logaritamskog broja stanica.

U slučaju najveće veličine čestica nakon drugog i trećeg dana nije se pojavilo smanjenje logaritamskog broja stanica u odnosu na početni logaritamski broj stanica (5,32), već se nakon prvobitnog rasta, logaritamski broj stanica vratio na 5,32. Pri veličini čestica 500-710 µm najveći rast mikroalge u odnosu na početni logaritamski broj stanica pokazala je koncentracija PVC-a 50 mg/L u prvom danu što je vidljivo na slici 12 a) gdje je logaritamski broj stanica porastao s 5,32 na 5,84. Pri veličini čestica 300-500 µm najveći rast mikroalge u odnosu na početni logaritamski

broj stanica bio je također u prvom danu pri najnižoj koncentraciji PVC-a (50 mg/L) gdje je logaritamski broj stanica porastao s 5,32 na 5,72 što je vidljivo na slici 13 a). Isti trend može se primijetiti i kod najmanje veličine čestica (<300  $\mu\text{m}$ ) gdje je najveći porast također u prvom danu s porastom logaritamskog broja stanica s 5,32 na 5,72, vidljivo na slici 14 a). U drugom danu je i kod srednjih (300-500  $\mu\text{m}$ ) i kod najmanjih (<300  $\mu\text{m}$ ) veličina čestica došlo do pada logaritamskog broja stanica mikroalgi s početnih 5,32 na 5,20 pri koncentraciji 1000 mg/L što je vidljivo na slikama 13 e) i 14 e). Nakon trećeg dana došlo je do istog pada (s 5,32 na 5,2) pri koncentracijama 750 i 1000 mg/L, što je vidljivo na slikama 12 d) i e) te 13 d) i e). Na svim grafovima se tijekom tri dana može zamijetiti usporavanje rasta pri srednjim i visokim koncentracijama (250 mg/L, 500 mg/L; 750 mg/L; 1000 mg/L) PVC-a. Ovi rezultati u skladu su s najvećom osjetljivošću mikroalge *Scenedesmus* sp. na srednje i male veličine čestica pri srednjim i visokim koncentracijama.<sup>55</sup> Uvidom u navedeno može se uočiti obrazac djelovanja PVC-a na *Scenedesmus* sp. Naime, što je veličina čestica PVC-a manja, to ona uzrokuje veću inhibiciju rasta mikroalge, pogotovo pri srednjim i višim koncentracijama.<sup>29,52,55,56</sup>

Na slici 15. prikazana je inhibicija rasta mikroalge pri različitim veličinama i koncentracijama čestica PVC-a: a) 500-710  $\mu\text{m}$ , b) 300-500  $\mu\text{m}$  i c) <300  $\mu\text{m}$ . Iz grafova se može zamijetiti da različite veličine PVC-a i njegove različite koncentracije različito utječu na inhibiciju rasta *Scenedesmus* sp. Kod najvećih se čestica (500-710  $\mu\text{m}$ ) najveći postotak inhibicije (8,43 %) javlja se kod koncentracije 1000 mg/L (Slika 15 a) te se taj postotak smanjuje prema nižim koncentracijama. Isti trend pojavljuje se kod veličina čestica 300-500  $\mu\text{m}$  i <300  $\mu\text{m}$  gdje se najveći postoci inhibicije javljaju kod koncentracija 750 i 1000 mg/L (10,50 %), ali različito opadaju prema nižim koncentracijama što je vidljivo na slikama 15 b) i c). Kod srednje veličine čestica pad je puno nagliji odnosno kod najmanjih veličina inhibicija i dalje ostaje dosta visoka i pri koncentraciji od 500 mg/L (8,43 %). Što su čestice manje dolazi do veće i brže inhibicije, a ona raste s porastom koncentracije i tokom vremena izloženosti (Slika 15) što je u skladu s literaturom.<sup>55,30</sup> Postojanje inhibicije uvjetovano je i činjenicom da u laboratorijskim uvjetima mikroalge imaju ograničenu dostupnost prirodnog svjetla, a s obzirom na literaturu razmatra se i inhibicija rasta s obzirom na veličinu čestica odnosno moguće je da veće čestice PVC-a zaklanjaju svjetlost mikroalgama pa na taj način negativno utječu na fotosintezu i doprinose inhibiciji.<sup>30,58</sup>

Iz dobivenih rezultata lako je primjetljivo da različite koncentracije i veličine PVC-a imaju različit utjecaj na mikroalgu. To se poklapa s nizom istraživanja u kojima je dokazano da

toksični učinak na mikroalge postoji, ali on ovisi o vrsti, koncentraciji i veličini čestica MP-a te vrsti organizma odnosno mikroalgi na kojoj se istraživanje provodi.<sup>54,55</sup> Pretpostavlja se da će kontinuiranim izlaganjem *Scenedesmus* sp. bilo kojoj vrsti MP-a doći do smanjenja broja stanica, a kolika će takva inhibicija biti ovisi o koncentraciji MP-a. Manje koncentracije MP-a nemaju tendenciju agregiranja, te se zbog toga lakše adsorbiraju na mikroalge, smanjuju im mobilnost te time i rast.<sup>56</sup> S obzirom da je *Scenedesmus* sp. nepokretna mikroalga može se pretpostaviti da male koncentracije MP-a minimalno utječu na njezin rast.<sup>56</sup> Izloženost različitim vrstama MP-a može uzrokovati fizička oštećenja, pucanje staničnih stjenki i struktura te u konačnici dovesti do smrti mikroalgi.<sup>30,57</sup>

S obzirom na dobivene rezultate i sve navedeno može se zaključiti da se toksični učinak PVC-a na *Scenedesmus* sp. povećava smanjenjem veličine čestica i povećanjem koncentracije i da su potrebna dodatna istraživanja kako bi se mogao utvrditi točan mehanizam djelovanja čestica na mikroalgu.

## 6. Zaključak

Odlična svojstva i niska cijena svakim danom povećavaju primjenu plastike u industriji, ali i svakodnevi. Iznimno velike količine plastike koje nastaju stvaraju problem po pitanju gospodarenja istom te se svakim danom može sve više svjedočiti rastućoj alarmantnosti nepravilnog gospodarenja plastičnim otpadom. MAP kao takva je još od početka njene masovne proizvodnje i distribucije stvarala probleme, a u zadnjih nekoliko desetljeća sve se veća pozornost daje MP-u i njenom toksičnom učinku za okoliš. Ona je danas prisutna u raznolikim ekosustavima te su novija istraživanja pokazala koliku opasnost ona, iako sitna i neprimjetna, može izazvati u živom svijetu.

Cilj eksperimenta bio je odrediti toksičnost MP-PVC-a primjenom slatkovodne mikroalge *Scenedesmus* sp. Nakon provedbe pokusa i usporedbe rezultata dobivenih usporedbom raznih koncentracija i veličina PVC-a, može se zaključiti da toksičan utjecaj PVC-a na ispitivanu mikroalgu postoji. Najveća inhibicija rasta *Scenedesmus* sp. iznosila je 10,50%, a pojavila se pri veličini čestica <300  $\mu\text{m}$  i 300-500  $\mu\text{m}$  pri koncentracijama MP-e 750 mg/L i 1000 mg/L.

Dobiveni su rezultati direktni pokazatelji da su i koncentracija i veličina čestica značajni čimbenici toksičnosti MP-a jer analogno smanjenju čestica i povećanju koncentracije povećava se postotak inhibicije rasta mikroalge. Na temelju navedenih činjenica može se zaključiti da se toksičnost PVC-a povećava smanjenjem veličina čestica i povećanjem njihove koncentracije. Međutim, ovo je područje dosta slabo istraženo te će buduća istraživanja morati pokazati na koji se točno način toksičnost PVC-a manifestira unutar živog svijeta kako bi se precizniji zaključci mogli donijeti.

## 7. Kratice

ASTM - American Society for Testing Materials

BM – bazalni medij

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

EC<sub>50</sub> – efektivna koncentracija koja je izazvala učinak na 50% populacije

ED<sub>50</sub> – efektivna doza koja je izazvala učinak na 50% populacije

INH - inhibicija

ISO – *International Organization for standardization*

LC<sub>50</sub> – letalna koncentracija koja je izazvala smrt kod 50% populacije

LD<sub>50</sub> – letalna doza koja je izazvala smrt kod 50% populacije

LOEC – najniža koncentracija tvari s vidljivim štetnim učinkom

MAP – makroplastika

MP – mikroplastika

Mt – metrička tona

NOEC – najviša koncentracija tvari bez vidljivog štetnog učinka

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*

OG – optička gustoća

*T* – temperatura, °C

*t* – vrijeme (sat;h/dan;d)

USEPA - United States Environmental Protection Agency

UV – ultraljubičasto zračenje

γMP – masena koncentracija mikroplastike, mg/L

γ(O<sub>2</sub>) – masena koncentracija kisika, mg/L



## 8. Literatura

- [1.] I.R. Geyer, J.R. Jambeck, K. Lawender Law , Production, use, and fate of all plastics ever made, *Science Advances* , 3 (2017) 7.
- [2.] S. Hohn, E. Acevedo-Trejos, J. F. Abrams, J. Fulgencio de Moura, R. Spranz, A. Merico, The long-term legacy of plastic mass production, *Science of The Total Environment*, 746 (2020) 141115.
- [3.] L. Milios, L. Holm Christensen, D. McKinnon, C. Christensen, M. K. Rasch, M. Hallstrøm Eriksen, Plastic recycling in the Nordics: A value chain market analysis. *Waste Management*, 76 (2018) 180–189.
- [4.] J. P. G. L. Frias, R. Nash, Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*, 138 (2019) 145–147.
- [5.] B. Li, L. Su, H. Zhang, H. Deng, Q- Chen, H. Shi, Microplastics in fishes and their living environments surrounding a plastic production area, *Science of The Total Environment*, 727 (2020) 138662.
- [6.] J. Jeong, J. Choi, Adverse outcome pathways potentially related to hazard identification of microplastics based on toxicity mechanisms, *Chemosphere*, 231 (2019) 249-255
- [7.] [www.bpf.co.uk/plastipedia/plastics\\_history/Default.aspx](http://www.bpf.co.uk/plastipedia/plastics_history/Default.aspx) (Pristup 25.3.2021.).
- [8.] N.Usahanunth, S. Tuprakay, The transformation of waste Bakelite to replace natural fine aggregate in cement mortar, 6 (2017), 120-133.
- [9.] R. Y. Getor, N. Mishra, A. Ramudhin, The role of technological innovation in plastic production within a circular economy framework. *Resources, Conservation and Recycling*, 163 (2020) 105094.
- [10.] K. Zhang, A. H. Hamidian, A. Tubić, Y. Zhang, J. K. H. Fang, C. Wu, P. K. S. Lam, Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review, 274 (2021) 11655.
- [11.] T. Wang, B. Li, X. Zou, Y. Wang, Y. Li, L. Mao, C. Zhang, Y. Xu, W. Yu, Emission of primary microplastics in mainland China: Invisible but not negligible. *Water Research*, 162 (2019) 214-224.
- [12.] L. Anagnosti, A. Varvaesou, P. Pavlou, E. Protopapa, V. Carayanni, Worldwide actions against plastic pollution from microbeads and microplastics in cosmetics focusing on European policies. Has the issue been handled effectively?, *Marine Pollution Bulletin*, 162 (2021) 111883.

- [13.] [https://ec.europa.eu/environment/topics/plastics/microplastics\\_en](https://ec.europa.eu/environment/topics/plastics/microplastics_en) (Pristup 10.08.2021.)
- [14.] J. Boucher, D. Friot, Primary Microplastics in the Oceans, A Global Evaluation of Sources, 2017.
- [15.] Y. Meng, F.J. Kelly, S. L. Wright, Advances and challenges of microplastic pollution in freshwater ecosystems: A UK perspective, *Environmental Pollution*, 256 (2020) 113445.
- [16.] V. Sotck, C. Laurisch, J. Franke, M. Hilal Donmez, L. Voss, L. Bohmert, A. Braeuning, H.Sieg, Uptake and cellular effects of PE, PP, PET and PVC microplastic particles, *Toxicology in Vitro*, 70 (2021) 105021.
- [17.] S. Serranti, A. Gargiulo, The Utilization of Hyperspectral Imaging for Impurities Detection in Secondary Plastics, *The Open Waste Management Journal*, 3 (2010) 56-70.
- [18.] <https://pvc.org/about-pvc/> (pristup 30.3.2021.).
- [19.] G. Wypych, PVC structure and morphology, *PVC Degradation and Stabilization* (2020) 47–50.
- [20.] K. Endo, Synthesis and structure of poly(vinyl chloride). *Progress in Polymer Science*, 27(10) (2002) 2021-2054.
- [21.] T. Kovačić, B. Andričić, Suspenzijski poli(vinil-klorid) i rizici njegove proizvodnje, 26(2005)3: 128-132.
- [22.] G. Wypych, PVC properties, *PVC formulary* (2020) 5-45.
- [23.] A.E. Schwarz, T.N. Ligthart, E. Boukris, T. van Harmelen, Sources, transport, and accumulation of different types of plastic litter in aquatic environments: A review study. *Marine Pollution Bulletin*, 143 (2019) 92-100.
- [24.] K. N V Lakshmi, S. Sundarajan, S. Ramakrishna, Identification and characterization of micro-plastic in the marine environment: A mini review. *Marine Pollution Bulletin*, 160 (2020) 111704.
- [25.] M.O. Rodrigues, N. Abarantes, F. J. M. Gonçalves, H. Nogueira, J.C. Marques, A. M.M. Gonçalves, Impacts of plastic products used in daily life on the environment and human health: what is known? *Environmental Toxicology and Pharmacology* 72 /2019) 103329.
- [26.] L. Zimmermann, S. Göttlich, J. Oehlmann, M. Wagner, C. Völker, What are the drivers of microplastic toxicity? Comparing the toxicity of plastic chemicals and particles to *Daphnia magna*. *Environmental pollution* 267 (2020) 115392.

- [27.] Z. Sobhani, C. Fang, R. Naidu, M. Megharaj, Microplastics as a vector of toxic chemicals in soil: Enhanced uptake of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid by earthworms through sorption and reproductive toxicity. *Environmental Technology & Innovation*, 22 (2021) 101476.
- [28.] D. Boyle, A. I. Catarino, N. J. Clark, T. B. Henry, Polyvinyl chloride (PVC) plastic fragments release Pb additives that are bioavailable in zebrafish. *Environmental Pollution* 263 (2020) 114422.
- [29.] Y. Wu, P. Guo, X. Zhang, Y. Zhang, S. Xie, J. Deng. Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae, *Journal of Hazardous Materials*, 374 (2019) 219-227.
- [30.] J. C. Prata, J. P. da Costa, I. Lopes, A. C. Duarte, T. Rocha-Santos. Effects of microplastics on microalgae populations: A critical review, *Science of the Total Environment* 665 (2019) 400–405.
- [31.] V. Nava, B. Leoni, A critical review of interactions between microplastics, microalgae and aquatic ecosystem function. *Water Research* 1 (2020) 116476.
- [32.] E. Agathokleous, M. Kitao, E. J. Calabrese, Hormesis: Highly Generalizable and Beyond Laboratory. *Trends in Plant Science* x (2020) 11.
- [33.] L. Krienitz, Algae. *Encyclopedia of Inland Waters* (2009) 103-113.
- [34.] R.X. Roulin, T. U. H. Baumeister, S. Fenizia, G. Pohnert, M. Vallet, Aquatic Chemical Ecology – A Focus on Algae. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (2019) 19.
- [35.] J. Masojide, G. Torzillo, Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. *Encyclopedia of Ecology*, (2008) 2226-2235.
- [36.] L. Naselli-Flores, R. Barone, Green Algae. *Encyclopedia of Inland Waters* (2009) 166–173.
- [37.] [https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus\\_id=43474&-session=abv4:AC1F06400a5b52AE22Ok5E026315](https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=43474&-session=abv4:AC1F06400a5b52AE22Ok5E026315) (Pristup 10.4.2021.).
- [38.] M. Lürilin, Grazing-Associated Infochemicals Induce Colony Formation in the Green Alga *Scenedesmus*. *Protist*, 152(1) (2001) 7–16.
- [39.] Encyclopaedia “Scenedesmus”, *Encyclopedia Britannica*, 2018. <https://www.britannica.com/science/Scenedesmus> (Pristup 12.4.2021.).
- [40.] R.S. Gour, A. Chawla, H. Singh, R. S. Chauhan, A. Kant Characterization and Screening of Native *Scenedesmus* sp. Isolates Suitable for Biofuel Feedstock (2016), 1-16.

- [41.] J. V. Tarazona, M. J. Ramos-Peralonso, Ecotoxicology. Encyclopedia of Toxicology (2014) 276-280.
- [42.] J. R. Bidwell, In vivo ecotoxicology models. An Introduction to Interdisciplinary Toxicology (2020) 507–523.
- [43.] Scott, J., & Minghetti, M. (2020). Toxicity testing: in vitro models in ecotoxicology. An Introduction to Interdisciplinary Toxicology, 477–486.
- [44.] M. C. Newman, Y, Zhao, Ecotoxicology Nomenclature: LC, LD, LOC, LOEC, MAC. Encyclopedia of Ecology (2008) 1187–1193.
- [45.] [https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Toxicology\\_Dose\\_Descriptors.html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Toxicology_Dose_Descriptors.html) (Pristup 20.4.2021.).
- [46.] B. Versonnen, M. Sobanska, R. Cesnaitis, Ecotoxicology, Aquatic. Encyclopedia of Toxicology (2014) 281–283.
- [47.] C. Song, Z. Liu, C. Wang, S. Li, Y. Kitamura, Different interaction performance between microplastics and microalgae: The bioelimination potential of *Chlorella* sp. L38 and *Phaeodactylum tricornutum* MASCC-0025. Science of The Total Environment, 723 (2020) 138146.
- [48.] Z. Zhu, S. Wang, F. Zhao, S. Wang, F. Liu, G. Liu, Joint toxicity of microplastics with triclosan to marine microalgae *Skeletonema costatum*. Environmental pollution, 246 (2019) 509-517
- [49.] C. Ma, Y.-B. Zhang, S.-H. Ho, D.-F. Xing, N.-Q. Ren, B.-F. Liu. Cell growth and lipid accumulation of a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4 by combining light/dark cycle with temperature variation, Biotechnology for Biofuels, 10 (2017) 260.
- [50.] J. S. Brown. Absorption and fluorescence of chlorophyll a in particle fractions from different plants, Biophysical Journal, 9 (1969) 1552.
- [51.] OECD, Guideline for Testing of Chemicals, 201. Alga, Growth Inhibition Test, 1984.
- [52.] C. Campanale, C. Massarelli, I. Savino, V. Locaputo, V. Felice Uricchio. A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health, 17 (2020) 1212.
- [53.] M. Lüring, E. Van DonkGrazer. Induced Colony Formation in *Scenedesmus*: Are There Costs to Being Colonial? , Oikos, 88, (2000), 111-118.

- [54.] S. B. Sjollema, P. Redondo-Hasselerharm, H. A. Leslie, M. H. S. Kraak, A.D Vethaak. Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? *Aquatic Toxicology*, 170 (2016) 259–261.
- [55.] C. Scherer, R. Wolf, J. Völker, F. Stock, N. Brennhold, G. Reifferscheid, M. Wagner. Toxicity of microplastics and natural particles in the freshwater dipteran *Chironomus riparius*: Same same but different? *Science of The Total Environment*, (2019) 134604.
- [56.] C. Cunha, M. Faria, N. Nogueira, A. Ferreira, N. Cordeiro. Marine vs freshwater microalgae exopolymers as biosolutions to microplastics pollution, *Environmental Pollution* 249 (2019) 372-380.
- [57.] G. Liu, R. Jiang, J. You, D. C. G. Muir, E. Y. Zeng. Microplastic Impacts on Microalgae Growth: Effects of Size and Humic Acid, *Environmental Science and Technology*, 54 (2020) 1782–1789.
- [58.] Q. Wang, X. Wangjin, Y.Zhang, N. Wang, Y. Wang, G. Meng, Y. Chen. The toxicity of virgin and UV-aged PVC microplastics on the growth of freshwater algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Science of The Total Environment*, (2020) 141603.