

# Određivanje toksičnosti mikroplastičnih čestica polietilena mikroalgom *Scenedesmus* sp.

---

**Brdek, Dora**

**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:149:898716>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

Dora Brdek

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Dora Brdek

**Određivanje toksičnosti mikroplastičnih čestica polietilena  
mikroalgom *Scenedesmus* sp.**

ZAVRŠNI RAD

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

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

dr. sc. Matija Cvetnić

Zagreb, rujan 2021.



*Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta "Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike"(IP-2019-04-9661) Hrvatske zaklade za znanost na Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

## **ZAHVALA**

*Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na odličnoj organizaciji i stručnom vodstvu prilikom izrade završnog rada te se zahvaljujem na svim savjetima i uloženom vremenu i trudu.*

*Zahvaljujem se asistentici Martini Miloloži čiji su vedri duh i savjeti uvelike olakšali provođenje eksperimenta i pisanje ovog rada.*

*Za kraj, veliko hvala mojoj obitelji, dečku Stjepanu, svim prijateljima, a posebno Tei, Nini i Ivani koji su mi bili veliki poticaj i motivacija tijekom cijelog studiranja.*

## SAŽETAK

Industrijski napredak donio je važan polimerni materijal, plastiku. Zbog masovne proizvodnje i korištenja te nepravilnog upravljanja i zbrinjavanja, onečišćenje plastikom danas je postalo jedno od najvažnijih ekoloških pitanja u svijetu. Procesima razgradnje, plastika se raspada na manje čestice zvane mikroplastikom (MP) veličine 1  $\mu\text{m}$  do 5 mm. Kako bi se poboljšala spoznaja o stupnju onečišćenja plastikom, njenom transportu, distribuciji i toksičnosti u okolišu potrebno je hitno riješiti nedostatke u znanju vezano za nju.

U ovom radu se provelo ekotoksikološko istraživanje utjecaja MP-a polietilena (PE) na slatkovodnu mikroalgu *Scenedesmus* sp.. Mikroalga se izlagala različitim veličinama i koncentracijama PE-a kako bi se utvrdilo koliko je ova vrsta MP-a štetna za *Scenedesmus* sp. Rasponi veličina čestica su iznosili <300  $\mu\text{m}$ ; 300  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$  i 500  $\mu\text{m}$  do 710  $\mu\text{m}$  pri koncentracijama od 50 mg/L; 250 mg/L; 500 mg/L; 750 mg/L i 1000 mg/L. Provedena istraživanja ukazuju da različite koncentracije i veličine MP-a imaju različit utjecaj na mikroalge. Najveća uočena inhibicija rasta mikroalge *Scenedesmus* sp., 12,99%, se pojavila kod najmanje veličine čestica, <300  $\mu\text{m}$ , pri koncentraciji od 1000 mg/L. Uočeno je da su koncentracija i veličina čestica značajni parametri u ekotoksikološkim istraživanjima jer direktno utječu na inhibiciju.

**Ključne riječi:** Mikroplastika; Polietilen; Mikroalga; Toksičnost; *Scenedesmus* sp.

## **ABSTRACT**

Industrial advances have brought us an important polymeric material known as plastic. Due to mass production and use, improper management, and disposal, plastic pollution has become one of the imperative environmental issues in the world. By decomposition processes, plastic breaks down into smaller particles called microplastics (MP) sizes ranging from 1  $\mu\text{m}$  to 5 mm. In order to improve knowledge about the degree of plastic pollution, its transport, distribution and toxicity in the environment, it is necessary to urgently address the knowledge gaps related to it.

This paper has conducted ecotoxicological research on the influence of MP polyethylene (PE) on the freshwater microalgae *Scenedesmus* sp.. The microalgae were exposed to different sizes and concentrations of PE to determine how harmful this type of MP is to *Scenedesmus* sp. Particle size ranges were <300  $\mu\text{m}$ ; 300  $\mu\text{m}$  to 500  $\mu\text{m}$  and 500  $\mu\text{m}$  to 710  $\mu\text{m}$  at concentrations of 50 mg/L; 250 mg/L; 500 mg/L; 750 mg/L and 1000 mg/L. Studies conducted indicate that different concentrations and sizes of MP have a different impact on microalgae. The largest observed inhibition of the growth of the *Scenedesmus* sp. microalgae, 12.99%, occurred in the smallest particle size, <300  $\mu\text{m}$ , at a concentration of 1000 mg/L. It was observed that the concentration and size of particles are significant parameters in ecotoxicological studies because they directly affect inhibition.

**Keywords:** Microplastic; Polyethylene; Microalgae; Toxicity *Scenedesmus* sp.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Općenito o plastici</b> .....	2
2.1.1. <i>Polietilen</i> .....	3
<b>2.2. Mikroplastika</b> .....	5
2.2.1. <i>Mikroplastika u okolišu</i> .....	6
<b>2.3. Mikroalge</b> .....	8
2.3.1. <i>Rod Scenedesmus</i> .....	9
<b>2.4. Ekotoksikološka istraživanja</b> .....	9
2.4.1. <i>Testovi ekotoksičnosti</i> .....	10
2.4.2. <i>Testovi ekotoksičnosti na mikroalgama</i> .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	13
<b>3.1. Materijali</b> .....	13
3.1.1. <i>Mikroplastika</i> .....	13
3.1.2. <i>Testni organizam</i> .....	13
3.1.3. <i>Mediji i kemikalije</i> .....	14
<b>3.2. Mjerni instrumenti i oprema</b> .....	14
<b>3.3. Metode rada</b> .....	15
3.3.1. <i>Priprema mikroplastike</i> .....	15
3.3.2. <i>Određivanje toksičnosti mikroplastike primjenom mikroalge Scenedesmus sp.</i> ...	15
3.3.3. <i>Mikroskopska analiza</i> .....	17
<b>4. REZULTATI</b> .....	18
<b>4.1. Određivanje toksičnosti mikroplastike primjenom mikroalge Scenedesmus sp.</b> ...	18
<b>5. RASPRAVA</b> .....	23
<b>5.1. Analiza pokusa</b> .....	23
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	25
<b>7. POPIS SIMBOLA I KRATICA</b> .....	26
<b>8. LITERATURA</b> .....	27
<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	32



## 1. UVOD

Izumom plastike javlja se novo doba koje je doprinijelo napretku industrijske proizvodnje zbog stabilnih kemijskih svojstava mnogih polimera, dobrih karakteristika izolacije, njihove male težine i trajnosti.<sup>1</sup> Prema statistici, globalna proizvodnja plastike iznosila je blizu 350 milijuna tona (Mt) u 2017. godini, a očekuje se da će se proizvodnja udvostručiti u sljedećih 20 godina.<sup>2</sup> Doduše, samo 6% do 26% plastike se reciklira, što znači da do 94% plastike završava na odlagalištima ili ulazi u okoliš raznim putovima. PlasticsEurope procjenjuje da ulazi 6-12 megatona (Mt) plastike u oceane svake godine, te da će se akumulirati preko 250 Mt plastike u oceanima do 2025. godine.<sup>1</sup>

Onečišćenje plastikom predstavlja veliki ekološki problem zbog njene izuzetno spore biorazgradivosti. Znanstvenike još više zabrinjava činjenica da se nakon fizikalnog, kemijskog i/ili biološkog djelovanja, veliki komadići plastike usitnjavaju na mikroplastiku (MP) (1  $\mu$ m - 5 mm) ili nanoplastiku (NP) (<1000 nm). Posljednjih je desetljeća, MP-e kao nova vrsta onečišćujućih tvari, privukla pažnju u akademskom svijetu. Istraživači su otkrili prisutnost čestica MP-a širom svijeta, na primjer na 4601-5732 m dubine u morskom sedimentu na zapadu Tihog oceana, na koraljnim grebenima na otocima Xisha u Južnokineskom moru, te čak i u snijegu sjevernog i južnog pola.<sup>2</sup>

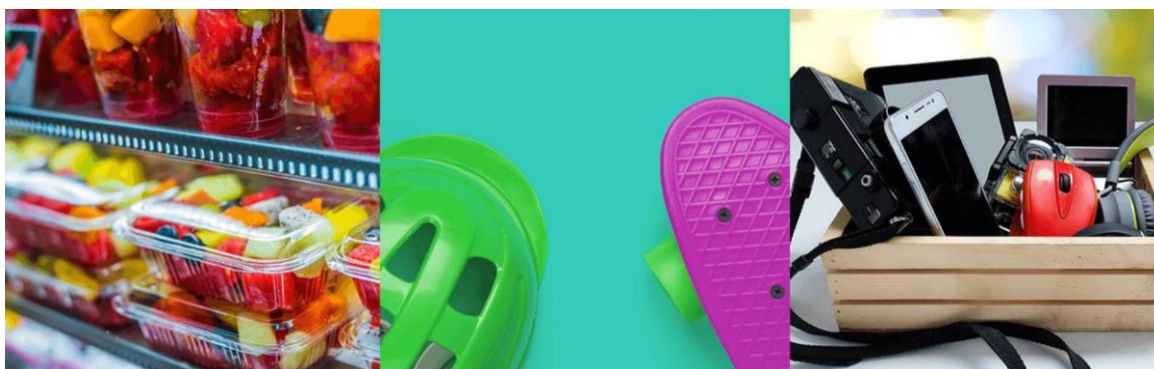
MP-e ulazi u okoliš za vrijeme proizvodnje plastičnih proizvoda i u brojnim fazama uporabe spomenutih proizvoda. Zbog velikog broja čestica MP-a koja završava u okolišu provode se brojna istraživanja o utjecaju MP-a na organizme koji su u njenom direktnom okruženju poput riba, beskralješnjaka i školjkaša. MP-e ograničava rast i razvoj organizama, povećava smrtnost, remeti endokrini metabolizam, pa čak i mijenja genetički izraz, dok kod nekih životinja koje se hrane filtracijom ne utječe na njihov opstanak čak i ako unesu velike količine MP-a. Dakle, istraživanja toksičnosti MP-a su još u početnoj fazi istraživanja te je nejasno koliki je negativni utjecaj na cjelokupni ekosustav.<sup>1</sup>

U ovom se radu ispitala toksičnost mikročestica PE-a na mikroalgu *Scenedesmus* sp. pri različitim koncentracijama i veličinama PE-a prema OECD 201:1984.<sup>3</sup>

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Općenito o plastici

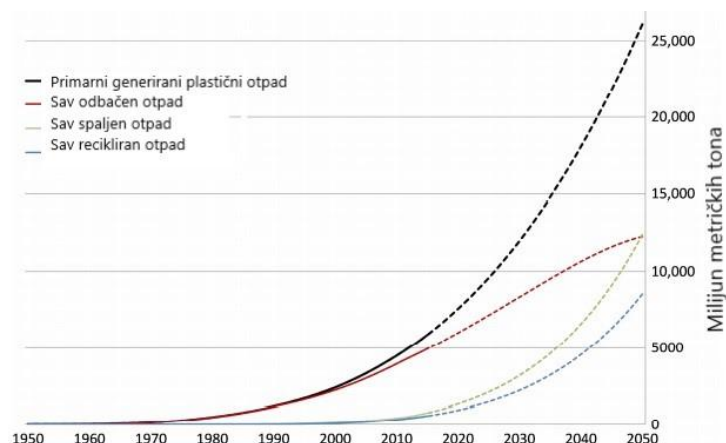
Plastika se počela proizvoditi ranih 1950.-ih. Njena svestranost svakodnevno inspirira inovacije koje pomažu da život bude bolji i sigurniji. Plastika se koristi za proizvodnju biciklističkih kaciga, dječjih sigurnosnih sjedalica i zračnih jastuka u automobilima, slika 1. Nalazi se u mobitelima, televizorima, računalima i drugoj elektroničkoj opremi koja omogućuje moderan život. Sastav je krovova, zidova, podova i izolacije koji kuće i zgrade čine energetski učinkovitima dok plastika u ambalaži pomaže u održavanju hrane sigurnom i svježom.<sup>4</sup> Neke plastike su tvrde i otporne na lom, druge su mekane i fleksibilne. Svojstva plastike čini mogućim mnoge stvari koje se uopće ne prepoznaju kao plastika poput boja, zaštitnih premaza i obloga, ljepila te izolacije.<sup>4</sup>



**Slika 1.** Primjer plastike iz svakodnevnog života<sup>4</sup>

Kad se govori o polimernim materijalima, tj. MP-u, razlikujemo prirodno sintetiziranu plastiku poput gume dobivene iz drveta brazilskog kaučukovca ili plastiku sintetiziranu iz fosilnih goriva.<sup>4,5,6</sup> Najzastupljenije vrste plastike koje se proizvode u svijetu su: polietilen (PE), polipropilen (PP), polivinilklorid (PVC), poliester (PES), poliuretan (PU), polistiren (PS) te polietilen tereftalat (PET).<sup>5</sup>

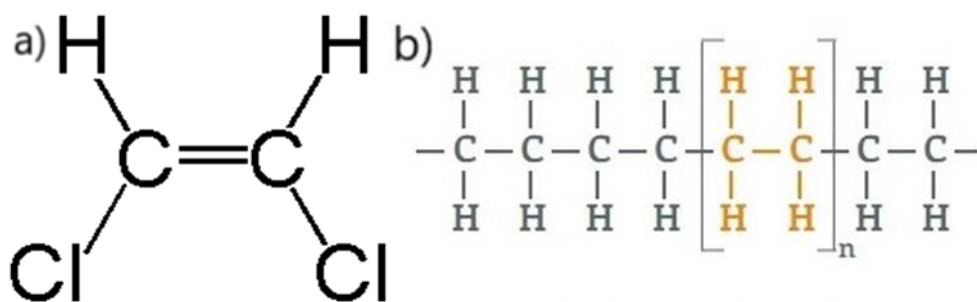
Unatoč pozitivnim svojstvima plastike njena masovna proizvodnja i nepravilno zbrinjavanje dovelo je do akumulacije plastičnog otpada u okolišu, najviše u morima i rijekama gdje šteti flori i fauni. S obzirom na buduće projekcije proizvodnje plastike, očekuje se udvostručavanje količina plastičnog otpada u prirodnom okolišu do 2050. godine, slika 2.<sup>2,5,7</sup>



**Slika 2.** Prikaz kumulativnog stvaranja i zbrinjavanja plastičnog otpada ( u milijunima metričkih tona). Čvrste linije pokazuju povijesne podatke od 1950. godine do 2015. godine; crtkane linije prikazuju projekcije povijesnih trendova do 2050. godine <sup>5</sup>

### 2.1.1. Polietilen

PE je lagana, izdržljiva termoplastika s promjenjivom kristalnom strukturom. To je jedna od najčešće proizvedene plastike na svijetu (deseci milijuna tona proizvode se širom svijeta svake godine). PE nastaje polimerizacijom monomera etilena. Kemijska formula glasi  $(C_2H_4)_n$ , a strukturna formula je prikazana na slici 3.<sup>8</sup>



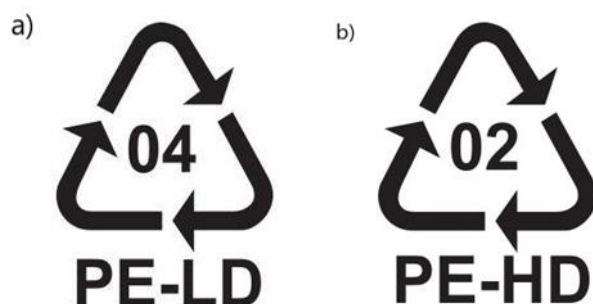
**Slika 3.** Strukturna formula: a) etilena i b) polietilena.<sup>8</sup>

PE pripada poliolefinskoj obitelji polimera i klasificiran je po svojoj gustoći i grananju. Najčešće vrste polietilena su prikazane u tablici 1.

**Tablica 1.** Najčešće vrste polietilena.

RAZGRANATE VERZIJE	<ul style="list-style-type: none"><li>• Polietilen niske gustoće (LDPE)</li><li>• Linearni polietilen niske gustoće (LLDPE)</li></ul>
LINEARNE VERZIJE	<ul style="list-style-type: none"><li>• Polietilen visoke gustoće (HDPE)</li><li>• Polietilen ultra-visoke molekularne težine (UHMWPE)</li></ul>
UNAKRSNO POVEZANI POLIETILEN	<ul style="list-style-type: none"><li>• PEX</li><li>• XLPE</li></ul>
DRUGE VRSTE POLIETILENA	<ul style="list-style-type: none"><li>• Polietilen srednje gustoće (MDPE)</li><li>• Polietilen vrlo niske gustoće (VLDPE)</li><li>• Polietilen visoke molekularne težine (HMWPE)</li><li>• Polietilen ultra-niske molekularne težine (ULMWPE)</li><li>• Klorirani polietilen (CPE)</li></ul>

Identifikacijski kodovi za dva glavna oblika PE su prikazani na slici 4.

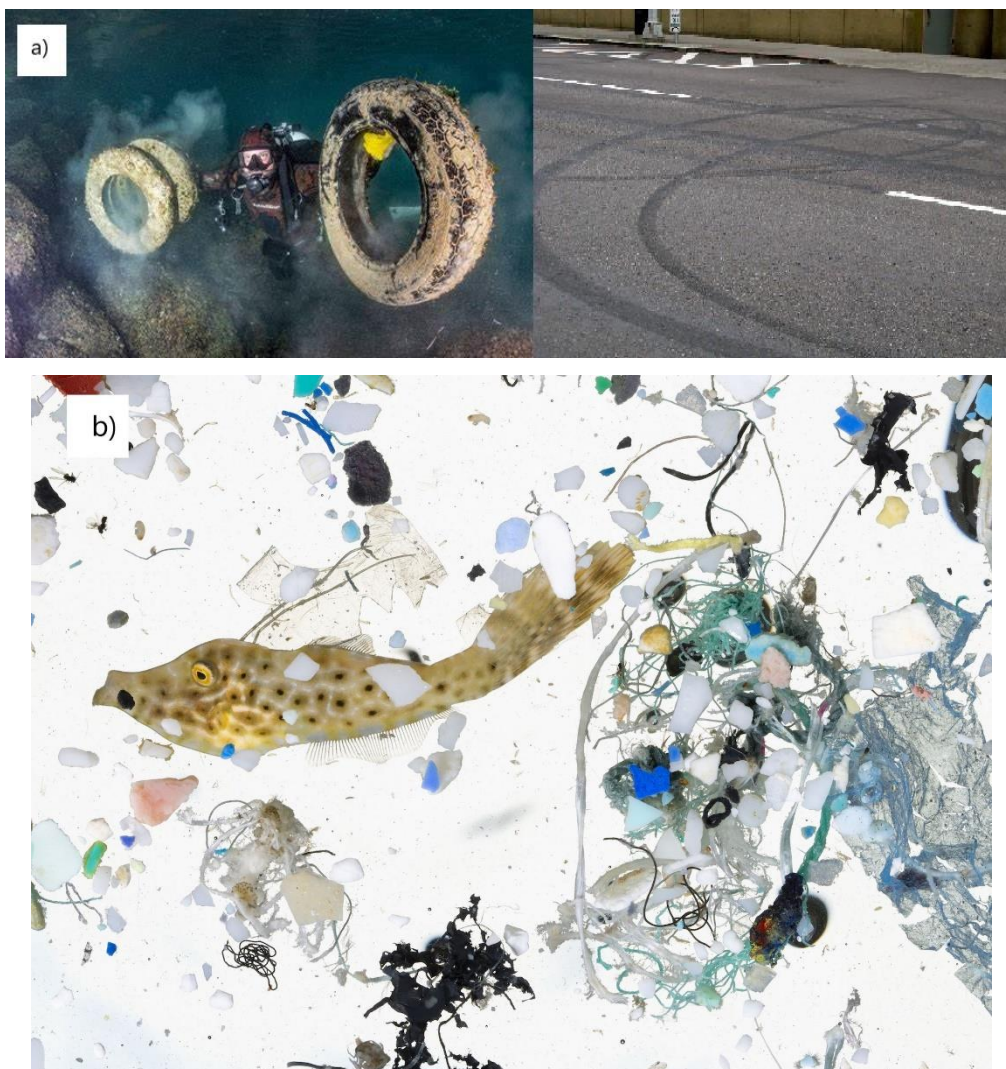


**Slika 4.** Identifikacijski kod: a) polietilena niske gustoće (LDPE), b) polietilena visoke gustoće (HDPE)<sup>8</sup>

LDPE i HDPE nisu biorazgradive prirode i značajno doprinose stvaranju plastičnog otpada. Oba oblika polietilena mogu se reciklirati i koriste se za proizvodnju boca za neprehrambene artikle, plastiku za vanjske primjene, kante za kompost itd. U čvrstom obliku PE je siguran i netoksične prirode, ali može biti toksičan ako se udiše i/ili apsorbira kao para ili tekućina tijekom proizvodnih procesa. PE (HDPE i XLPE) naširoko se koristi za primjene vezane uz vodu. Križni polietilen (PEX) postao je popularan za pitku vodu u posljednjih nekoliko godina, ali PEX zahtijeva posebnu opremu i ne može se reciklirati. PE visoke gustoće (HDPE) se koristi kod cijevi čija je primjena prijenos ne-pitke vode, a ako se koristi za prijenos pitke vode onda je riječ o toplim i hladnim vodama.<sup>8</sup>

## 2.2. Mikroplastika

Pojam mikroplastike opisuje manje formacije plastike tj. polimernih materijala karakterizirane veličinom od 1  $\mu\text{m}$  do 5 mm. Sve čestice veće od 5 mm se svrstavaju pod pojam makroplastike (MAP).<sup>9,10</sup> Osim prema veličini čestica, mikroplastika se dijeli i prema podrijetlu na primarnu i sekundarnu. Primarna MP-e se proizvodi kako bi se koristila u raznim proizvodima za uporabu no nakon uporabe odlazi u razne sastavnice okoliša i tako ga onečišćuje kao što je prikazano na slici 3a). Sekundarna MP-e nastaje mehaničkom ili kemijskom razgradnjom MAP-a poput plastičnih vrećica, boca i sl. te čini veći udio onečišćenja okoliša, slika 3b). Primarna MP-e je obično pravilnog oblika dok je sekundarna MP-e nepravilnog oblika čestica i veličina zato što nastaje raspadom.<sup>9,10,11,12</sup>



Slika 5. Prikaz: a) primarne MP-e<sup>13,14</sup> i b) sekundarne MP-e<sup>15</sup>

### 2.2.1. Mikroplastika u okolišu

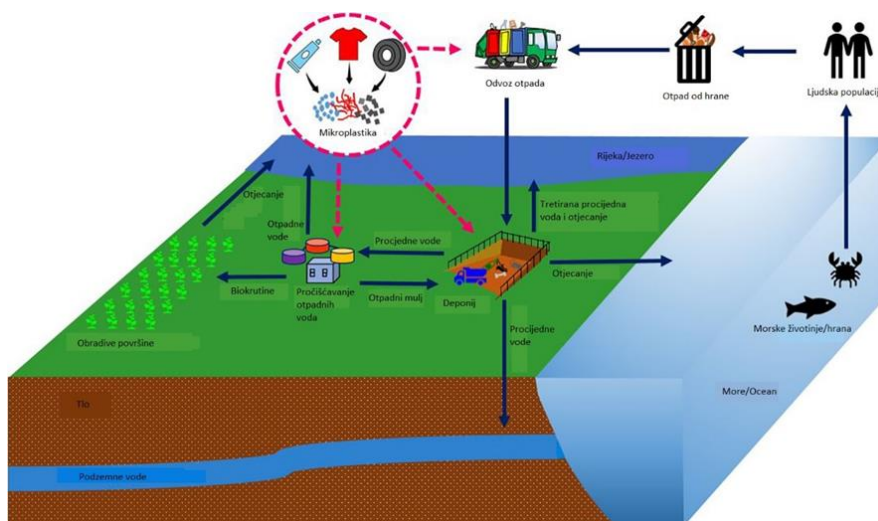
Čitav prirodni okoliš sastoji se od vodenog, kopnenog i atmosferskog okruženja. Vodeni okoliš jedan je od osnovnih elemenata okoliša i ujedno i najviše narušen i uništen od strane ljudi. Na površini Zemlje, tlo je sastavni dio biosfere, čija je uloga opskrbljivanje kopnenih biljaka hranjivim tvarima i vodom, što je značajno za proces fotosinteze i razmjenu energije u biljkama. Atmosfersko okruženje je bitan element okoliša jer živa bića ne mogu živjeti bez kisika. Kretanje zraka i promjene tlaka zraka uzrokuju kontinuiranu razmjenu energije i tvari između oceana i kopna, između tla i zraka. Stoga se vjeruje da čestice MP-a nisu samo u vodenom, kopnenom i atmosferskom okruženju, već se prenose kroz sve slojeve biosfere.<sup>2</sup>

Razvoj suvremene poljoprivrede rezultirao je opsežnom uporabom plastičnih materijala i mulja, kao i promjene u načinu navodnjavanja, ostavljajući puno MP-a na površini tla. Godišnje se u Europi u poljoprivrednim djelatnostima koristi više od milijun tona plastičnog materijala od kojeg je važno spomenuti plastične filmove koji se upotrebljavaju u izradi staklenika. Naime, staklenici imaju značajnu prednost jer se proizvodi mogu uzgojiti znatno brže u kontroliranim uvjetima. Međutim, nedostatak je nepravilno odlaganje plastičnih folija koje se trošenjem usitnjavaju i predstavljaju veliki gospodarski i ekološki problem.<sup>16</sup> Štoviše, poljodjelstvo, procesi berbe i druge agronomске prakse na tlu, mogu uzrokovati migriranje MP-a s površine prema dnu.<sup>2</sup> Uz to, kišama ili navodnjavanjem sitne čestice MP-a mogu završiti u podzemnim vodama (slika 6). Zdravo tlo je stanište glista, jedne od najreprezentativnije životinje u zemlji, koje na površini tijela imaju sloj viskozne tjelesne tekućine za koje se čestice MP-a mogu pridržavati te tako svojim kretanjem mogu transportirati plastiku.<sup>2,17</sup> Godišnje, 5 – 13 teragrama (Tg) plastike dolazi s kopna u oceane.<sup>2</sup> Otprilike 5,25 bilijuna čestica plastike, teške oko 269 000 megagrama (Mg), pluta površinom oceana s koncentracijama do 580 000 fragmenata plastike po kvadratnom kilometru. MP-e ima sposobnost adsorpcije onečišćujućih tvari iz okoliša, sudjeluje u agregaciji s fitoplanktonima, kolonizaciji s mikroorganizama i stvaranju biofilma koji dovode do povećanja njezine gustoće, te zbog težine ona tone na dno mora ili rijeka zbog čega se često može naći u sedimentu.<sup>2,17</sup> Tako se plastika nalazi u obalnim područjima širom svijeta, u sedimentu fjordova, ušća, plitkih obalnih područja pa čak i u najdubljem dijelu oceana. Riječni transport plastičnih ostataka u ocean izravno je povezan s proizvodnjom, brzim odlaganjem, često nakon jednokratne uporabe, i lošim upravljanjem plastičnim otpadom na globalnoj razini. Plastika šteti morskoj bioti i na kraju se može vratiti ljudima putem hranidbenog lanca.<sup>2,17,18</sup>

U atmosferi je MP-e podijeljena na: suspendiranu atmosfersku MP-e (SAMP), atmosferske padaline i prašinu (vanjska i unutrašnja). U zraku, na rasprostranjivanje MP-a uglavnom utječu

meteorološki uvjeti, kao što su brzina vjetra, smjer vjetra, vlaga, kiša i snijeg. Većina znanstvenika slaže se s izjavom da atmosferska plastika također doprinosi količini MP-a u vodenom i kopnenom okolišu, no međusobne veze, izvorni putovi i stupanj doprinosa između ekosustava nisu jasni.<sup>2</sup>

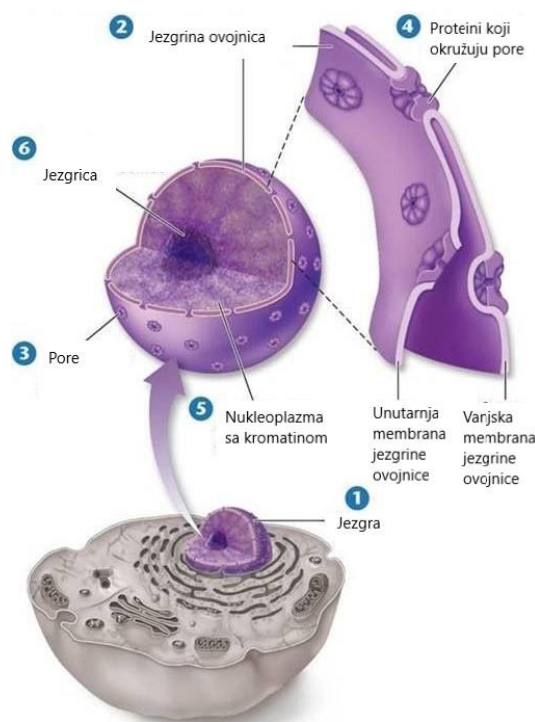
Na temelju dosadašnjih podataka o onečišćenju plastikom, rezultati pokazuju da uklanjanje plastike iz oceana ima zanemarive učinke zbog same površine oceana i veličine godišnjih emisija plastike u prirodni okoliš. Najbolja strategija za ublažavanje onečišćenja morskom plastikom je stoga izbjegavanje ulaska plastike u ocean. To se može ostvariti putem zapreka na ušćima rijeka, poboljšavanjem gospodarenja otpadom kako bi se izbjeglo ulazak plastike u prirodni okoliš s odlagališta otpada i spaljivanjem plastičnog otpada na kopnu. Međutim, budući da izgaranje plastičnog otpada dovodi do onečišćenja atmosferskim CO<sub>2</sub>, konačna i najodrživija strategija je smanjenje proizvodnje i uporabe na globalnoj razini te izbjegavanje spaljivanja. Plastično onečišćenje složen je i globalni problem koje pojedine države ne mogu lako riješiti. Unatoč veličini problema, postoje brojni alati koje vlade, tvrtke, nevladine organizacije i drugi akteri mogu primijeniti kako bi smanjili otpad i spriječili korištenje plastike za jednokratnu uporabu. Primjerice, primjenom poreza, naknada i / ili zabrana plastike za jednokratnu upotrebu zemlje širom svijeta uspjele bi smanjiti njihovo korištenje. Osim toga, poboljšanje gospodarenja otpadom i recikliranje mogu pomoći u smanjenju proizvodnje plastike i na taj način smanjiti količinu plastičnog otpada koji ulazi u okoliš.<sup>1,2,17,18</sup>



**Slika 6.** Prikaz dospjevanja MP-a u ekosustave<sup>2</sup>

### 2.3. Mikroalge

Mikroalge su fotosintetski mikroorganizmi koje karakterizira jednostavna stanična građa koja se sastoji od stanične stijenke i membrane, a specifične su po tome što nemaju oblikovanu jezgrinu ovojnicu.<sup>19</sup> Dije se na prokariotske i eukariotske mikroorganizme.<sup>19</sup> Jezgrina ovojnica je dvostruka membrana koja se sastoji od lipidnog dvosloja i koja okružuje jezgricu eukariotskih stanica, ograđujući genski materijal u jezgrici od citoplazmatskog prostora.<sup>20,21</sup>



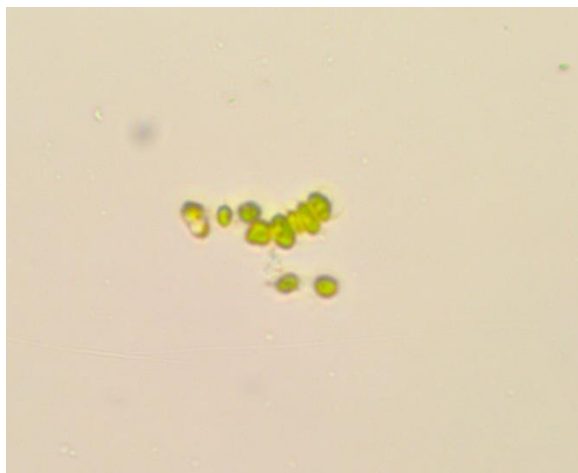
**Slika 7.** Prikaz jezgrine ovojnice<sup>21</sup>

Mikroalge postoje više od 2 milijarde godina i smatraju se najstarijim biljakama na Zemlji, a ovisno o vrsti, njihova veličina može varirati od nekoliko  $\mu\text{m}$  do nekoliko stotina  $\mu\text{m}$ .<sup>19</sup> Najpoznatiji predstavnici prokariotskih mikroalgi su cijanobakterije (*Cyanophyceae*), a eukariotskih mikroalgi su bičaši (*Euglenophyta*), dijatomeje (*Bacillariophita*), zlatne mikroalge (*Chrysophyceae*) te neke zelene vrste mikroalgi (*Chlorophyta* i *Bacillariophita*).<sup>19</sup> Cijanobakterije ili modrozeleno alge su prokariotski organizmi, koji su po svojim karakteristikama bliski bakterijama i imaju važnu ulogu u vezanju atmosferskog dušika. Jednostavna stanična struktura mikroalgi osigurava brz i uspješan rast u nepovoljnim uvjetima što ih čini prisutnima u najekstremnijim i najraznovrsnijim ekosustavima kao što su pustinje, toplinski izvori, te ispod leda Antartike. Trenutno je taksonomski opisano preko 50 000 različitih vrsta mikroalgi, međutim njihov je broj daleko veći.<sup>19</sup>



### 2.3.1. Rod *Scenedesmus*

*Scenedesmus* je rod od oko 70 vrsta kolonijalnih zelenih algi (porodica *Scenedesmaceae*), te je jedan od najčešćih rodova slatkovodnih algi.<sup>22</sup> *Scenedesmus* sp. su nemotile, nepokretne alge, i obično se sastoje od 4, 8, 16 ili 32 stanice raspoređene u nizu.<sup>22,23</sup> Neke vrste imaju čekinje. Nepokretne se alge razmnožavaju sporama koje se nazivaju autospore. Na slici 8. je prikazana mikroskopska fotografija mikroalge *Scenedesmus* sp. pri povećanju 400×



**Slika 8.** Mikrofotografija mikroalge *Scenedesmus* sp. snimljena u nultom danu pomoću svjetlosnog mikroskopa, P= 400×

Mikroalge *Scenedesmus* sp. koriste se eksperimentalno za proučavanje onečišćenja i fotosinteze, te se u industriji koriste kao potencijalni izvor biodizela.<sup>22,24,25</sup> Mikroalge se koriste i u procesima pročišćavanja otpadnih voda jer osiguravaju kisik za bakterijsku razgradnju organske tvari i time pomažu uništiti druge štetne tvari. Zbog jednostavne građe organizma i velike zastupljenosti u okolišu na mikroalgama se provode testovi ekotoksičnosti.<sup>26</sup>

## 2.4. Ekotoksikološka istraživanja

Ekotoksikologija je multidisciplinarna znanost koja povezuje znanja iz toksikologije i ekologije u cjelinu. Proučava učinak toksičnih tvari tj. kemikalija na stanicu, organ, organizam pa sve do biosfere te ispituje kretanje štetnih onečišćujućih tvari u okolišu: kako migriraju, kako se transformiraju i razgrađuju.<sup>26</sup> Nadalje, ekotoksikologija je znanost o onečišćenju koje se nalazi u biosferi i prati utjecaje koje ono ima na sastavnice okoliša uključujući i ljude. Krajnji je cilj ekotoksikologije otkriti i predvidjeti učinke onečišćenja na sve ekološke čimbenike.<sup>26,27</sup>

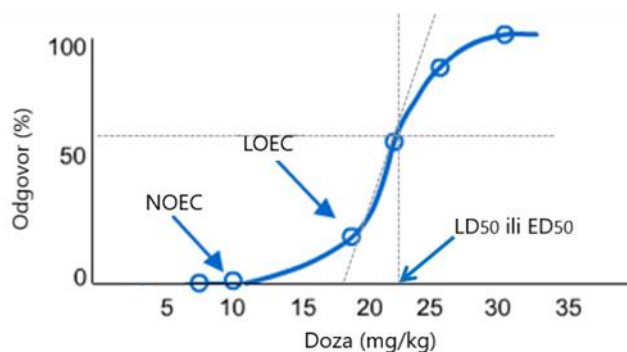
#### 2.4.1. Testovi ekotoksičnosti

Za ispitivanje toksičnosti neke tvari prisutne u okolišu se koriste testovi ekotoksičnosti. Ovakvi testovi se provode da se otkrije koja koncentracija određene onečišćujuće tvari ima negativan ili smrtonosan učinak na organizme.<sup>26</sup> Kada govorimo o toksičnosti razlikujemo akutnu i kroničnu toksičnost. Akutna se toksičnost javlja odmah ili vrlo brzo nakon izloženosti toksičnoj tvari dok je kronična toksičnost neželjeni učinak koji se razvija tjednima, mjesecima ili godinama nakon izlaganja toksičnoj tvari.

U staroj Grčkoj su Aristotel i Galen za istraživanja koristili životinje kako bi unaprijedili razumijevanje anatomije, fiziologije, patologije i toksikologije.<sup>27</sup> Od tada se napredak u navedenim disciplinama oslanjao na eksperimentiranje na životinjama. Međutim, dok je uporaba životinja u istraživanjima nesumnjivo pridonijela napretku brojnih grana znanosti, također se javila zabrinutost i pitanje etičnosti.<sup>27</sup> U današnje vrijeme se zbog pritiska javnosti i povećanja prava životinja takvi testovi više ne provode. Svi testovi ekotoksičnosti se moraju provoditi u skladu sa zakonom te ISO i OECD regulativom. Razlikujemo *in vivo* i *in vitro* testove.<sup>27,28</sup> Ako govorimo o *in vivo* istraživanju toksični se učinci provode na cijelom organizmu, a ako je riječ o *in vitro* istraživanju ekotoksikološko se ispitivanje provodi na dijelu organizma, stanici. U posljednjih trideset godina povećan je interes akademskih, regulatornih i privatnih sektora za *in vitro* testove jer se sve više *in vivo* testiranja zakonski zabranjuju.<sup>27</sup>

Veliki razvitak poljoprivrede, farmaceutske, kemijske i petrokemijske industrije, brojne komunalne djelatnosti te ekološke katastrofe za koje je kriv čovjek su uzrokovale onečišćenje vodenog okoliša koji je glavni ekološki problem.<sup>27</sup> Pošto su mikroalge odgovorne za primarnu proizvodnju u vodenim ekosustavima tako da procesom fotosinteze pretvaraju anorganski u organski ugljik i služe kao hrana mnogim vodenim organizmima, biloakva promjena na njima će rezultirati promjenom u cijelom ekosustavu.<sup>29</sup> Zato se na njima provode istraživanja. Osim na mikroalgama brojna ekotoksikološka istraživanja se provode na organizmima poput: *Daphnia magna*<sup>27</sup>, slatkovodnim škampima<sup>29</sup>, zebrafish (*Danio rerio*) te afričkim kandastim žabama (*Xenopus laevis*)<sup>27</sup>. Trenutno većina regulatornih metoda u ekotoksikologiji još uvijek koriste kralježnjake (uglavnom riblja jajašca) i njihovu smrtnost kao krajnju točku procjene toksičnosti kemikalije tj. onečišćenja.<sup>27</sup> Klasično ispitivanje akutne toksičnosti zahtijeva izračun smrtonosne doze 50% (LD<sub>50</sub>) čija vrijednost ukazuje na smrtnost polovice testirane populacije nakon određenog vremena trajanje testa. No najčešće se još i određuje efektivna doza 50% (ED<sub>50</sub>) čija vrijednost govori o negativnom učinku određenog toksina na 50% testiranih jedinki. Ekotoksikološkim se istraživanjima često određuju i najviša doza koja ne

izaziva učinak (NOEC) te najniža doza koja izaziva toksikološki učinak (LOEC). Na slici 9. su prikazane vrijednosti LD<sub>50</sub>, ED<sub>50</sub>, NOEC i LOEC.<sup>30</sup>



**Slika 9.** Dijagram doza-odgovor<sup>30</sup>

#### 2.4.2. Testovi ekotoksičnosti na mikroalgama

Jedan se test ekotoksičnosti provodio na mikroalgama roda *Scenedesmus obliquus* koje su se izlagale česticama pet različitih oblika polistirena (PS) različitih veličina i različitih površinskih naboja uz prisutstvo huminske kiseline. Nakon 96 h uočena je inhibicija rasta mikroalgi i ED<sub>50</sub> od 0,21 µg/L.<sup>30</sup> Vrijednosti inhibicije se nisu brojčano puno razlikovale kod različitih oblika PS-a, no bila je uočena različita toksičnost za različitu veličinu čestica MP-e. Velike su čestice blokirale proces fotosinteze dok su male čestice uništile staničnu stjenku adsorbirajući se na površinu mikroalge te se primijetio porast toksičnosti malih čestica MP-e primjenom huminske kiseline.<sup>28</sup>

Kada se promatrala toksičnost PE-a uzetog iz kozmetike u obliku perlica MP-a na *Lemna minor* (vodenoj leći), koja je plutajuća vodena biljka, primijetilo se da pri koncentraciji PE-a od 0 mg/L do 100 mg/L ne dolazi do značajnog utjecaja na lišće, no javlja se inhibicija rasta korijena. Razlog tome je što listovi plutaju na površini vode, a korijenje dopire u dubinu i služi za dopremanje nutrijenata biljci i javlja se negativan utjecaj na čestice MP-a.<sup>2</sup> U istom je istraživanju otkriveno da veličina čestica MP-a ima negativan utjecaj na rast i razvoj mikroalgi te dolazi do poremećaja u procesu fotosinteze. S druge strane neka istraživanja tvrde da čestice MP-a vrlo malo utječu na inhibiciju mikroalgi ili da dolazi do porasta broja stanica jer MP-e stanicama nekih vrsta mikroalgi služi kao supstrat za rast.<sup>28,33</sup> Rezultati dobiveni različitim testovima ekotoksičnosti PE-a primjenom mikroalgi dani su u tablici 2. Većina znanstvenih radova ne može pronaći vrijednosti ED<sub>50</sub> za MP-e zato što su za dokazivanje toksičnosti

potrebne velike koncentracije čestica te se vjeruje da vrijednosti ED<sub>50</sub> mogu varirati ovisno o vrsti MP-e koja se koristi pri istraživanju.<sup>33</sup>

**Tablica 2.** Testovi ekotoksičnosti PE-a primjenom mikroalgi.

Vrsta mikroalge	Veličina PE-a, $\mu\text{m}$	Koncentracija PE-a, mg/L	Rezultat
<i>Tetraselmis chuii</i>	1 do 5	0,75 do 48	Pri koncentraciji od 0,9 mg/L i 2,1 mg/L smanjenje sadržaja klorofila <sup>33</sup>  Nema značajnih promjena u rastu, tj. inhibiciji stanica pri koncentraciji od 1,475 mg/L <sup>34</sup>
<i>Skeletonema costatum</i>	74	0,01 do 0,1	Inhibicija rasta stanica, porast oksidativnog stresa <sup>34</sup>
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	63 do 75	130	Značajan porast broja stanica <sup>33,34</sup>
<i>Dunaliella salina</i>	180 do 212	0: 50; 100; 150; 200; 250; 300; 350	Za koncentracije čestica od 200 mg/L do 350 mg/L je uočen porast broja stanica i povećan sadržaj klorofila. Morfologija stanice se nije znatno mijenjala <sup>3</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroplastika

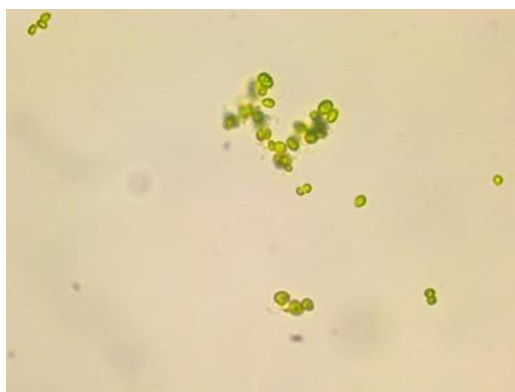
Za određivanje toksičnosti mikroplastike primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp. koristio se PE jedna vrsta MP-a koja je dobivena usitnjavanjem makroplastike. Za dobivanje PE-a koristile su se plastične vrećice. Svaka MAP ima oznaku koja odgovara traženoj vrsti plastike pa tako i PE kao što je prikazano na slici 10.



**Slika 10.** MAP koja se koristila za dobivanje MP-PE.

##### 3.1.2. Testni organizam

Za provedbu toksikoloških istraživanja korištena je slatkovodna mikroalga *Scenedesmus* sp. koja je prikazana na slici 11. Navedena mikroalga pohranjena je u zbirci na Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.



**Slika 11.** Mikrofotografija mikroalge *Scenedesmus* sp. snimljena u nultom danu pomoću svjetlosnog mikroskopa, P= 400×.

### 3.1.3. Mediji i kemikalije

#### **Bazalni medij**

Bazalni medij (BM), *Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution*, Sigma, Ujedinjeno Kraljevstvo, koristio se za uzgoj mikroalge *Scenedesmus* sp. te kao medij za postavljanje pokusa. Pripremao se prema uputama proizvođača, tako da se 20 mL BM-a dodalo na 1 L deionizirane vode. Tako pripremljen BM se sterilizirao prije upotrebe.

#### **Etanol**

Prije postavljanja pokusa sa *Scenedesmus* sp. korištena MP-e je sterilizirana u 70% etanolu.

### 3.2. Mjerni instrumenti i oprema

- ✓ Za usitnjavanje plastičnih materijala korišten je blender Philips, a za prosijavanje mikroplastike upotrijebljen je uređaj za trešenje sita W. S. Tyler RX-86-1 Sieve shaker, USA, i sita istog proizvođača, veličine pora <300 µm, 300-500 µm i 500-710 µm.
- ✓ Za precizno vaganje korištena je vaga Sartorius AG, Njemačka.
- ✓ Za filtraciju sterilizirane mikroplastike korišten je membranski lijevak uz vakuum pumpu, i sterilni celulozno nitratni (C/N) membranski filteri Ahlstrom ReliaDisc™, promjera pora 0,45 µm.
- ✓ U radu je korištena rotacijska termostatorirana tresilica Heidolph unimax 1010, Heidolph inkubator 1000, Njemačka, i magnetska mješalica WiseStir MSH-20A kod podešavanja pH-vrijednosti BM-a.
- ✓ U svrhu određivanja broja živih stanica mikroalgi (CFU) upotrijebljena je Thomina komorica.
- ✓ Za sterilizaciju bazalnog medija, hranjive podloge, čistog staklenog posuđa, kao i onečišćenog posuđa, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija.
- ✓ U svrhu aeriranja mikroalge *Scenedesmus* sp. korištena je aeracijska pumpa Tetrattec, a za osvjetljenje mikroalge koristila se lampa.
- ✓ Vrijednost pH određivana je 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 gustoća određivana je na spektrofotometru Hach, Model DR/2400, SAD.

- ✓ Mikroalga *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

MP-a prikazana na slici 10, prvo je usitnjena škarama na manje komade te zatim u blenderu uz dodatak suhog leda. Usitnjene čestice PE-a sušile su se na zraku 24 – 48 h pri sobnoj temperaturi, te su se zatim prosijavale mehanički koristeći sita određenih veličina pora u svrhu dobivanja čestica veličine: <300 µm; 300 µm do 500 µm i 500 µm do 710 µm. U svrhu sterilizacije mikroplastike, određene mase PE-a izvagale su se u Erlenmeyerove tikvice od 100 mL u koje se dodao 70%-tni etanol te su tikvice stavljene na rotacijsku tresilicu tijekom 15 min pri 160 o/min i sobnoj temperaturi. Čestice PE-a su nakon toga izdvojene iz etanola i isprane sterilnom deioniziranom vodom primjenom vakuum filtracije poštivajući sterilnu tehniku rada. Čestice PE-a zaostale na sterilnom membranskom filtru (0,45 µm) su se zatim pomoću sterilne žlice i pincete prebacile u tikvice volumena 250 mL za postavljanje pokusa sa *Scenedesmus* sp..

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

U ovom radu proveden je pokus određivanja toksičnosti PE-a na mikroalgi *Scenedesmus* sp. koji se provodio na rotacijskoj tresilici pri 23±2 °C, 160 o/min i 3 dana u tikvicama volumena 250 mL, odnosno radnog volumena,  $V_R = 100$  mL.

Prije postavljanja pokusa uzgojila se mikroalga *Scenedesmus* sp. u BM uz kontinuiranu aeraciju i interval svjetlosti 16:8 (svjetlo:mrak) tijekom 10-14 dana.<sup>13</sup> Broj živih stanica algi (CFU) iznosio je nakon 3 dana  $6,9 \times 10^5$  st/mL. CFU (st/mL), a određivao se izravnim brojanjem u Thominoj komorici, tako da su se brojale mikroalge unutar 3 kvadrata, a ukupan broj živih stanica se određivao prema formuli 3.1:

$$N = \frac{m * n * 16 * 10^4}{K} \quad (3.1)$$

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 12 a) prikazana je uzgojena mikroalga. Od uzgojene suspenzije mikroalge priređivala se suspenzija za pokus čiji je početni CFU iznosio  $10^5$  st/mL, odnosno čija je početna optička gustoća iznosila 0,03, a određivala se spektrofotometrijski pri  $\lambda = 670$  nm. Tikvice, prikazane na slici 12 b) sadržavale su suspenziju *Scenedesmus* sp., BM-a i MP-u. Pokus se provodio prema OECD 201:1984<sup>3</sup> te je za svaki pokus bila postavljena i kontrolna tikvica koja je sadržavala sve navedeno osim MP-a.



**Slika 12.** a) Fotografski snimak uzgojene mikroalge *Scenedesmus* sp. i b) određivanja toksičnosti MP-PE primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp.

Osim CFU, tijekom provedbe pokusa, u nultom i trećem danu praćena je pH-vrijednost i koncentracija otopljenoga kisika. U tablici 3. dani su početni uvjeti za pokus.

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

Vrsta mikroplastike	Polietilen (PE)
Veličina MP-e, $\mu\text{m}$	<300; 300-500; 500-710
$\gamma_{\text{MP}}$ , mg/L	50; 250; 500; 750; 1000
OG	0,0383
CFU / stanica/ml	$6,93 \cdot 10^5$
pH-vrijednost	8,00
$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	8,57
$T / ^\circ\text{C}$	23,40



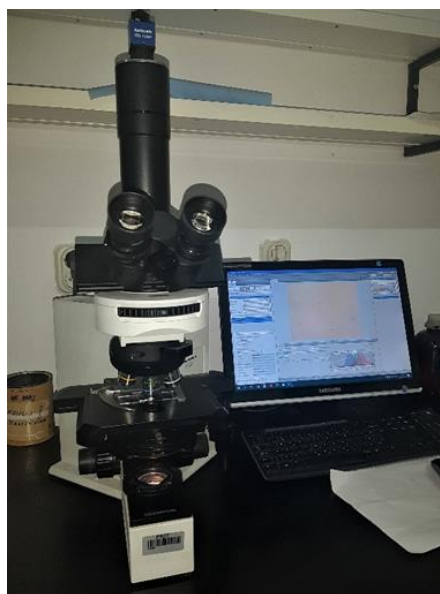
Tijekom provedbe pokusa praćen je broj živih stanica mikroalge, CFU. U svrhu izračuna inhibicije rasta mikroalge, broj živih stanica mikroalgi je izražen preko logaritamske vrijednosti te je dobiven log CFU. Inhibicija rasta izražavala se u postotku, a računala se prema formuli 3.2:

$$\text{INH} = \frac{\log \text{CFU}(\text{kontrola}) - \log \text{CFU}(\text{uzorak})}{\log \text{CFU}(\text{kontrola})} \quad (3.2)$$

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

### 3.3.3. Mikroskopska analiza

Mikroskopskom su analizom praćene morfološke karakteristike i eventualni negativni učinci mikroplastike na mikroalgu *Scenedesmus* sp.. Mikroalga se mikroskopirala tako da se pomoću Pasteur pipete izuzela kapljica uzorka suspenzije mikroalge i BM-a te se pripremao nativni preparat alge nultog i trećeg dana tijekom provedbe pokusa. Tako pripremljen preparat je mikroskopiran pod ukupnim povećanjem od 400×. Na slici 13 je prikazan svjetlosni mikroskop s ugrađenom kamerom pomoću kojeg je mikroskopirana *Scenedesmus* sp..



**Slika 13.** Svjetlosni mikroskop s ugrađenom kamerom

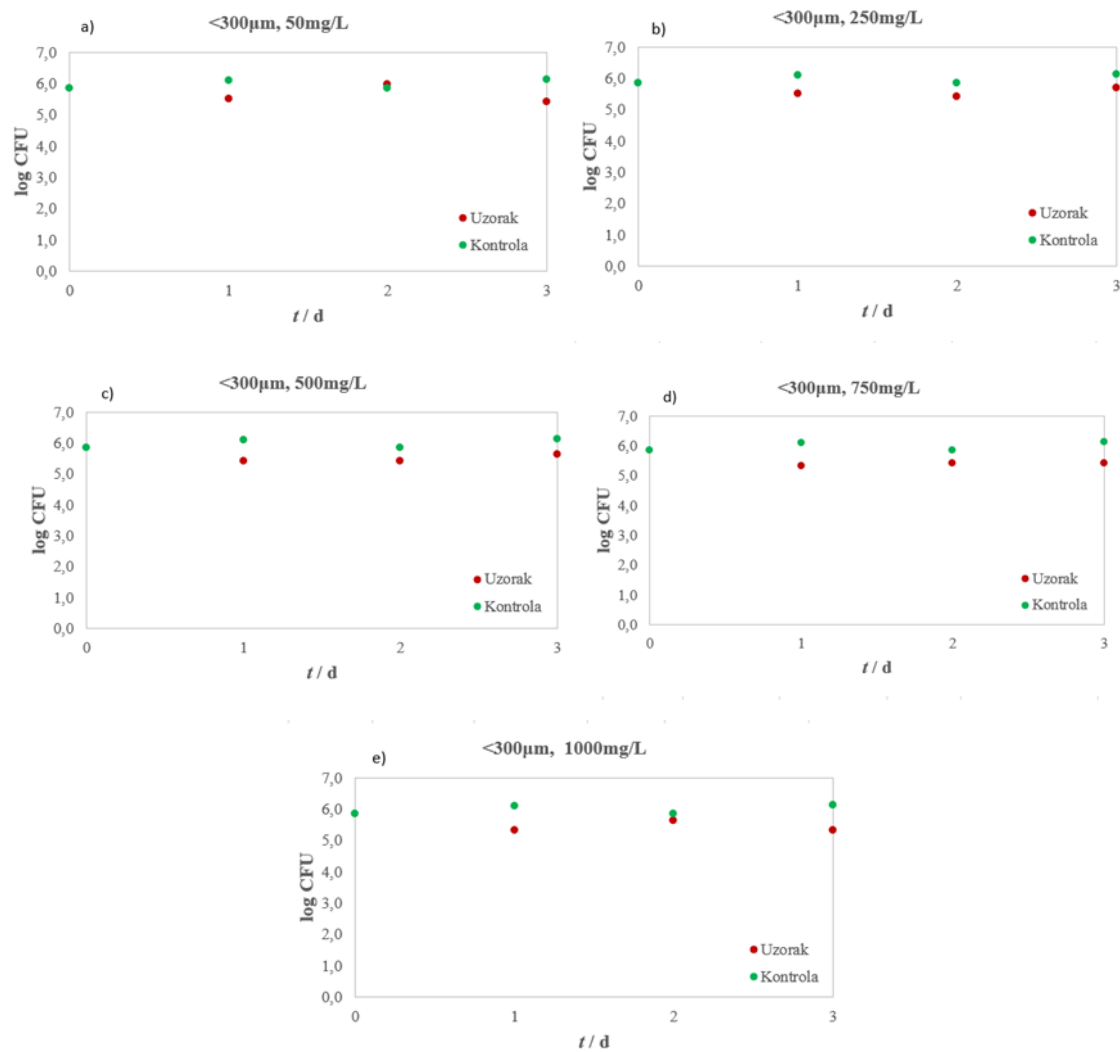
## 4. REZULTATI

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

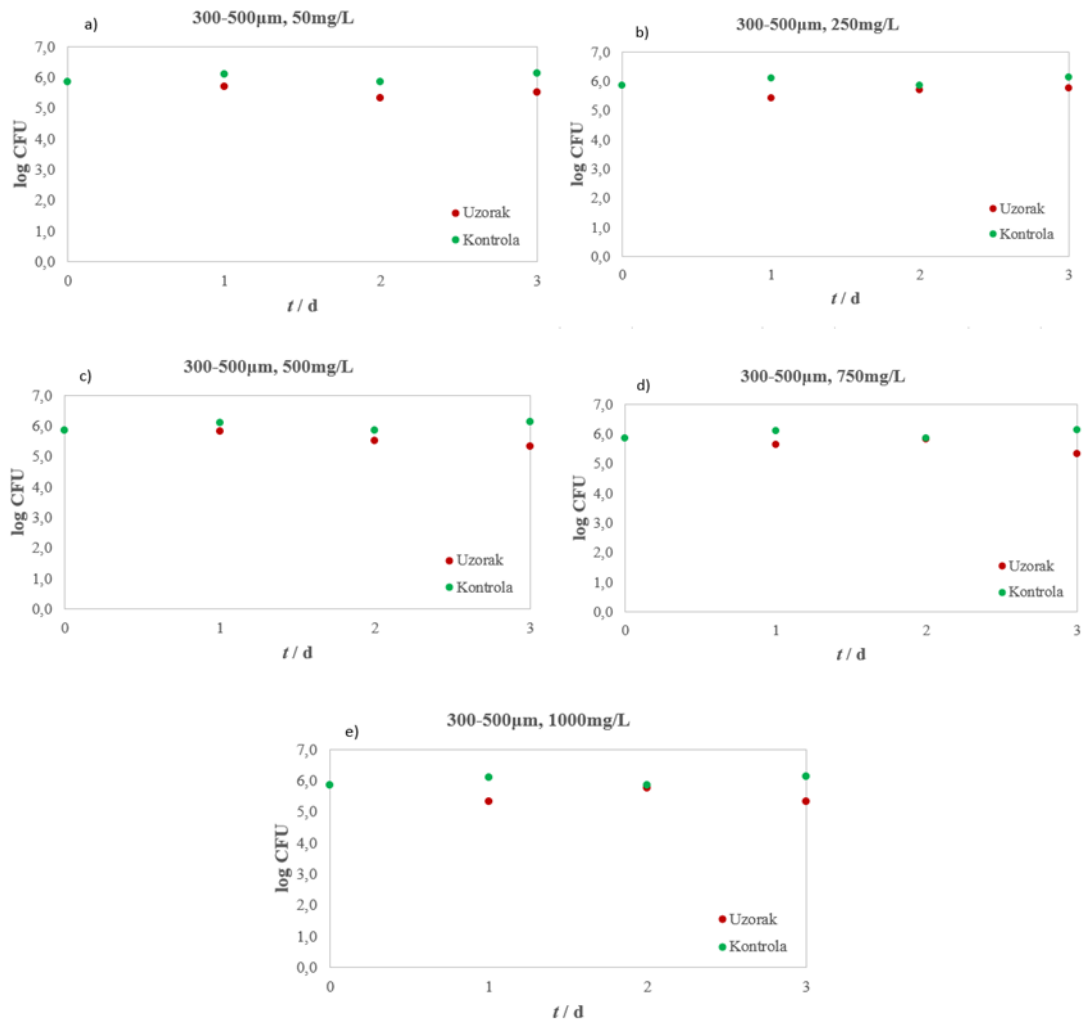
Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.2. uzgojena je mikroalga *Scenedesmus* sp. koja se koristila u pokusu. Tijekom pokusa pratila se promjena broja živih stanica CFU koji se određivao prema jednadžbi (3.1). Grafički prikaz promjene CFU vrijednosti je prikazan na slikama 14-16 dok slika 17 prikazuje grafičke prikaze inhibicije. U tablici 4. prikazani su ostali parametri kojima se proučavao utjecaj PE-a na mikroalgu *Scenedesmus* sp..

**Tablica 4.** Početni uvjeti te uvjeti na kraju pokusa za određivanje toksičnosti PE-a primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp..

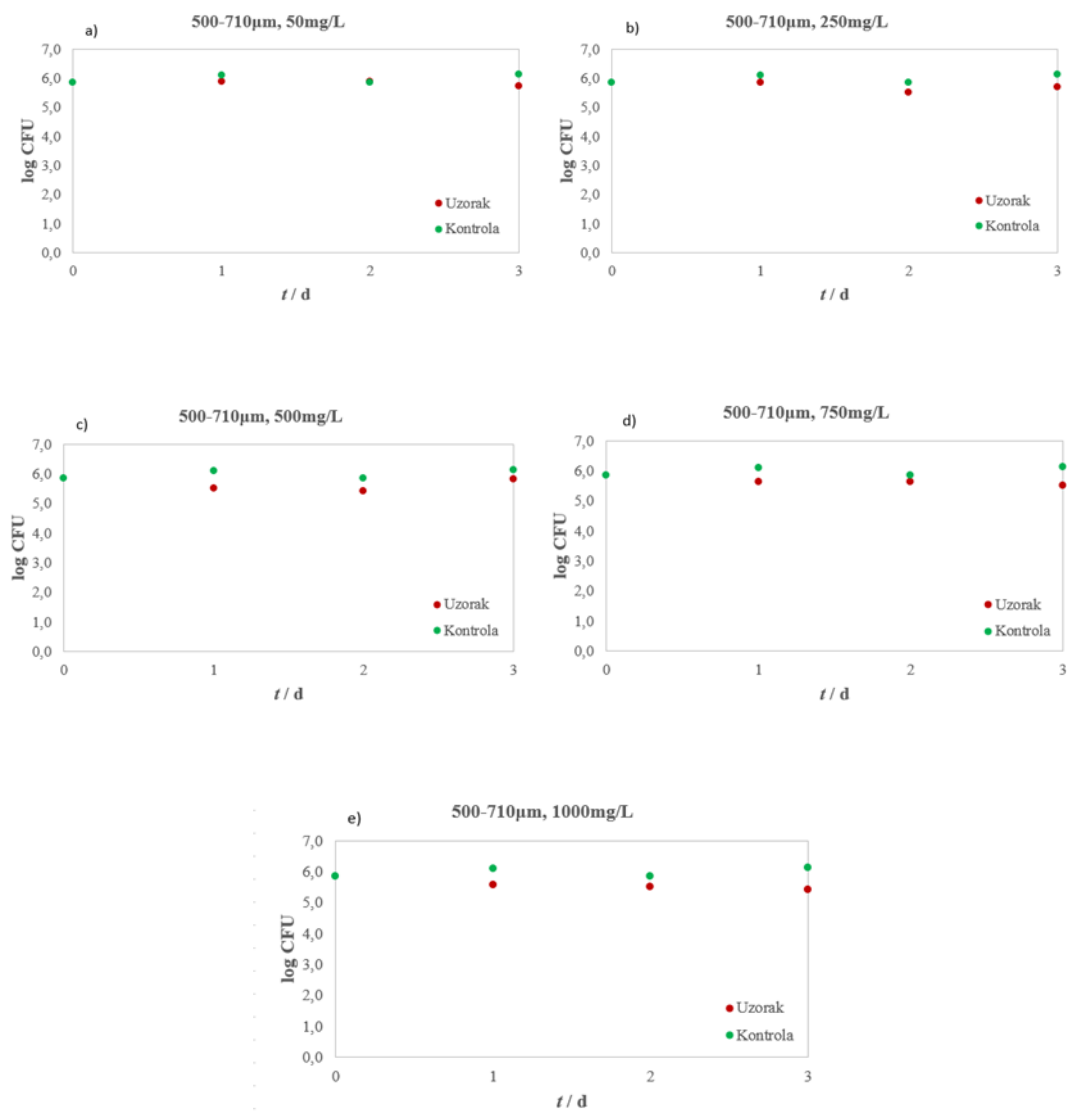
t / d	Veličina, $\mu\text{m}$	$\gamma_{\text{MP}}$ / mg/L	pH-vrijednost / -	$\gamma(\text{O}_2)$ /	T / °C	
0			8,01	8,57	23,40	
3	<300	1000	7,89	8,67	23,50	
		750	7,92	8,65		
		500	7,94	8,88		
		250	7,92	8,76		
		50	7,91	8,87		
	300-500	1000	7,91	8,55	23,50	
		750	7,88	8,78		
		500	7,87	8,69		
		250	7,88	8,61		
		50	7,91	8,74		
	500-710	1000	7,90	8,66	23,50	
		750	7,90	8,62		
		500	7,90	8,64		
		250	7,89	8,55		
		50	7,90	8,52		
		Kontrola		7,82	8,81	22,30



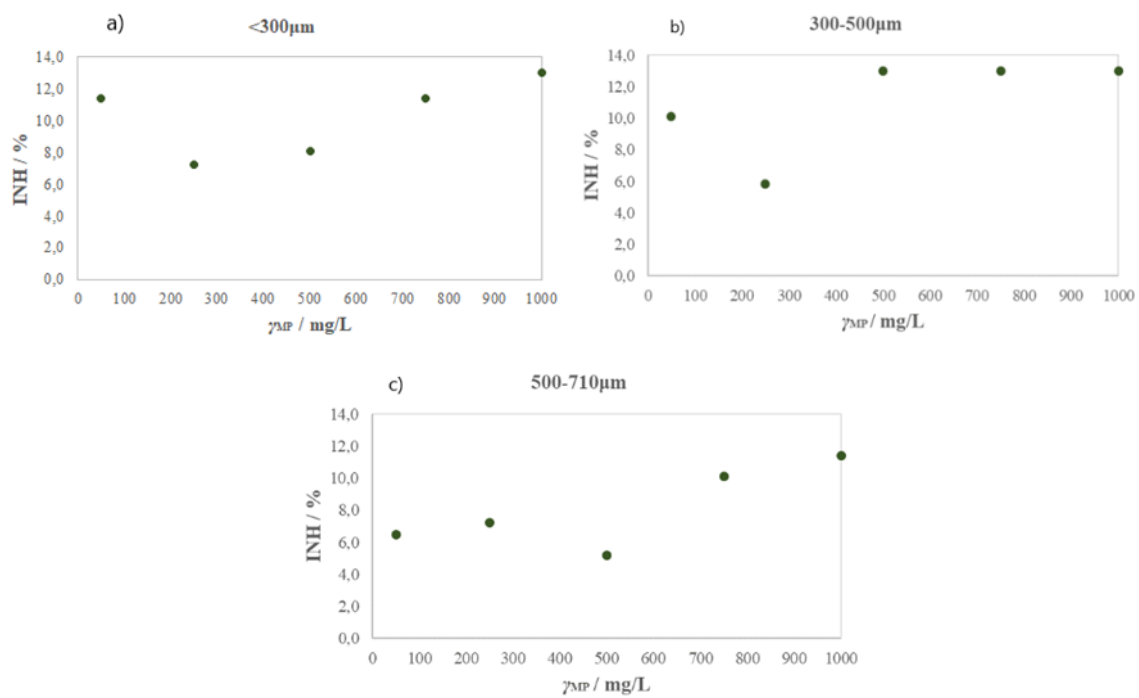
**Slika 14.** Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uzorak PE veličine čestica <math><300\ \mu\text{m}</math>, koncentracije: a) 50 mg/L, b) 250 mg/L, c) 500 mg/L, d) 750 mg/L i e) 1000 mg/L te za kontrolu tijekom 3 dana.



**Slika 15.** Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uzorak PE veličine čestica 300 μm do 500 μm, koncentracije: a) 50 mg/L, b) 250 mg/L, c) 500 mg/L, d) 750 mg/L i e) 1000 mg/L te za kontrolu tijekom 3 dana.



**Slika 16.** Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uzorak PE veličine čestica 500 μm do 710 μm, koncentracije: a) 50 mg/L, b) 250 mg/L, c) 500 mg/L, d) 750 mg/L i e) 1000 mg/L te za kontrolu tijekom 3 dana.



**Slika 17.** Inhibicija rasta *Scenedesmus* sp. s obzirom na različite koncentracije PE-a pri veličini čestica: a) < 300 μm, b) 300 μm do 500 μm i c) 500 μm do 710 μm.

## 5. RASPRAVA

U ovome radu ispitao se utjecaj MP-a na slatkovodnu mikroalgu *Scenedesmus* sp.. Proveo se pokus ispitivanja toksičnosti PE-a, a način provedbe i praćeni parametri opisani su u poglavlju 3. Eksperimentalni dio.

### 5.1. Analiza pokusa

U pokusu se određivala toksičnost MP-a primjenom slatkovodne mikroalge *Scenedesmus* sp.. Mikroalga se izlagala PE-u tijekom 3 dana, a početni uvjeti prikazani su u tablici 3. Ispitivao se direktan utjecaj MP-a veličine čestica <300 µm; 300 µm do 500 µm i 500 µm do 710 µm na inhibiciju rasta mikroalge. Tijekom pokusa nisu zabilježene značajne morfološke promjene mikroalge. pH – vrijednosti i koncentracija otopljenog kisika se također nisu značajno mijenjale što je prikazano u tablici 3. Nakon 3 dana u svim uzorcima uoćen je rast slatkovodne mikroalge koji je moguć zbog bezbojnosti PE-a koji ne ometa dovod svjetla mikroalgama tj. nema efekta sjene, kojima je svjetlost potrebna za proces fotosinteze.<sup>27</sup> Rast stanica pripisuje se tome što se mikroalge mogu prilagoditi različitim uvjetima u okruženju u kojem se nalaze. Prilikom mikroskopiranja se u više navrata moglo uočiti prirodno grupiranje stanica mikroalgi roda *Scenedesmus* koje su prisutne u 4,8,16 ili 32 stanica u koloniji.<sup>22,23</sup>

Slike 14 – 16 prikazuju promjenu broja stanica *Scenedesmus* sp. za uzorke PE-a veličine čestica <300 µm; 300 µm do 500 µm i 500 µm do 710 µm te koncentracija 50 mg/L; 250 mg/L; 500 mg/L; 750 mg/L i 1000 mg/L u usporedbi s kontrolom tijekom 3 dana. Usporedbom svih grafova može se primijetiti sličan trend promjene broja stanica mikroalge tijekom pokusa. Može se zaključiti da je pri izlaganju mikroalge svim koncentracijama i veličinama PE-a došlo do sličnog trenda promjene broja stanica mikroalge odnosno nakon 1. dana došlo je do blagog porasta, u 2. danu u svim uzorcima je došlo do smanjenja broja stanica mikroalge te se u 3. danu taj broj ponovno povećao. Pri izlaganju *Scenedesmus* sp. česticama PE-a veličine 500 µm do 710 µm, najveće smanjenje broja stanica mikroalge nakon 2 dana izazvala je koncentracija od 500 mg/L gdje se početni broj stanica smanjio sa 5,51 na 5,43, -što je prikazano na slici 16 c). Kao što je vidljivo na slici 15 e), prilikom izlaganja *Scenedesmus* sp. česticama PE-a veličine 300 µm do 500 µm, najveće smanjenje broja stanica mikroalge tijekom 2 dana izazvala je koncentracija od 50 mg/L gdje se početni broj stanica smanjio sa 5,68 na 5,33 no desio se i pad broja stanica pri koncentraciji od 500 mg/L s početnog broja 5,81 na 5,51. Izlaganje *Scenedesmus* sp. PE-u veličine čestica <300 µm, slika 14, koncentracije od 250 mg/L; 500

mg/L i 750 mg/L pokazuju jednake vrijednosti broja stanica u drugom danu što označava najveću osjetljivost mikroalge *Scenedesmus* sp. na najmanje veličine čestica nižih i srednjih koncentracija. Ovakav trend označava da čestice mikroplastike manjih veličina uzrokuju višu inhibiciju stanica mikroalge, što ih čini toksičnijima u odnosu na veće čestice.<sup>28</sup> Na slici 17 prikazana je inhibicija rasta alge *Scenedesmus* sp. s obzirom na različite veličine i koncentracije PE-a pri veličini čestica: a) <300 µm, b) 300 µm do 500 µm i c) 500 µm do 710 µm. Primjećuje se da različite veličine čestica i koncentracije MP-a imaju različit utjecaj na inhibiciju rasta alge *Scenedesmus* sp. Kod čestica veličine <300 µm, najviša inhibicija se uočava za najviše ispitivane koncentracije, 750 mg/L i 1000 mg/L. Visok postotak inhibicije za najnižu ispitivanu koncentraciju može se protumačiti s obzirom na eksperimentalnu pogrešku. Najviši postotak inhibicije kod čestica veličine 300 µm do 500 µm se javlja pri koncentracijama od 500 mg/L; 750 mg/L; 1000 mg/L što upućuje na „plato“- rast stanica algi je stagnirao i nije došlo do ponovnog rasta. U slučaju najvećih čestica ispitivane MP-e (500 µm do 710 µm), najviša inhibicija je uočena pri koncentraciji od 1000 mg/L. Kao što je prikazano u slici 17, za svaki raspon ispitivanih veličina čestica, može se uočiti porast inhibicije rasta mikroalge povećanjem ispitivanih koncentracija PE-a.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da različite vrste, koncentracije i veličine MP-a imaju različit utjecaj na mikroalgu. To se poklapa sa nekoliko istraživanja u kojima je dokazano da toksični učinak MP-a na alge postoji, ali on ovisi o vrsti, koncentraciji i veličini čestica MP-a te vrsti mikroalge na kojoj se istraživanje provodi.<sup>1,2</sup> Izloženost raznim vrstama MP-a može uzrokovati veliki broj fizičkih oštećenja, zatim oksidativni stres stanica mikroalgi i ekspresiju gena određenih metaboličkih puteva. Iako nije sasvim istražen mehanizam toksičnosti, pretpostavlja se da dolazi do adsorpcije plastičnih čestica na površinu mikroalgi koje ometaju izmjenu svjetlosti i plina te na taj način ometaju proces fotosinteze.<sup>34-37</sup>



## 6. ZAKLJUČAK

Plastika ima raznoliku uporabu u modernom industrijskom društvu zbog svoje male težine, velike izdržljivosti, lakog oblikovanja i ekonomske prednosti. Sve veća proizvodnja i upotreba plastike dovodi do sve većih količina plastika koje završavaju u okolišu. U posljednje vrijeme, sve više pažnje pridaje se MP-u. Ona izaziva zabrinutost znanstvenika jer nije lako uočljiva u okolišu tj. ne narušava njegov estetski izgled no njezina štetna svojstva stvaraju veliku prijetnju živim bićima, posebice onima u vodenim ekosustavima.

Cilj istraživanja bio je odrediti toksičnost MP-e, točnije PE-a primjenom slatkovodne mikroalge *Scenedesmus* sp.. Dobiveni rezultati ukazuju na to da su koncentracija čestica i veličina čestica značajni parametri prilikom ispitivanja toksičnosti PE-a. U slučaju najvećih čestica (500  $\mu\text{m}$  do 710  $\mu\text{m}$ ), koncentracija MP-a od 500 mg/L znatno je utjecala na smanjenje rasta živih stanica nakon 2 dana dok se kod manjih veličina MP-e (<300  $\mu\text{m}$  i 300  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$ ) znatniji utjecaj na rast stanica uočio pri nižim koncentracijama. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da se inhibicija rasta mikroalge povećava smanjenjem veličine čestice PE-a i povećanjem koncentracije odnosno da je kod malih čestica dovoljna mala koncentracija PE-a za inhibiciju stanica, dok je kod većih čestica obrnuto. Međutim, ovo područje je još uvijek nedovoljno istraženo i potrebno je provesti još istraživanja kako bi se utvrdio precizniji utjecaj MP-a na žive organizme.

## 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

BM – bazalni medij

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

MAP – makroplastika

MP – mikroplastika

OG – optička gustoća

PE – polietilen

T – temperatura, °C

*t* – vrijeme (sat;h/dan;d)

$\gamma MP$  – masena koncentracija mikroplastike, mg/L

$\gamma(O_2)$  – masena koncentracija kisika, mg/L

PC – polikarbonat

PET – polietilen teraftalat

Mg – megagram

Tg – teragram

SAMP – suspendirana atmosferska mikroplastika

LD<sub>50</sub> – smrtonosna doza 50% populacije

ED<sub>50</sub> – efektivna doza 50% testiranih jedinki

NOEC – najviša doza koja ne izaziva toksikološki učinak

LOEC – najniža doza koja izaziva toksikološki učinak

Cu – simbol za bakar

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

FK – fulvinska kiselina

## 8. LITERATURA

- [1] Kosior, E., Mitchell, J., Chapter 6-Current industry position on plastic production and recycling, *Plastic Waste and Recycling*, 2020, str. 133-162.
- [2] Huang, D., Tao, J., Cheng, M., Deng, R., Chen S., Yin, L., Li, R., *Microplastics and Nanoplastics in the Environment: Macroscopic Transport and Effects on Creatures*, *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 124399.
- [3] Chae, Y., Kim, D., An, Y. J., *Effects of micro-sized polyethylene spheres on the marine microalga Dunaliella salina: Focusing on the algal cell to plastic particle size ratio*, *Aquatic Toxicology*, 2019, 216: 105296.
- [4] URL: <https://www.chemicalsafetyfacts.org/plastics> (pristup 02.03.2021.)
- [5] R. Geyer, J.R. Jambeck, K. Lawender Law, *Production, use, and fate of all plastics ever made*, *Science Advances*, 2017, 3.7: e1700782.
- [6] URL: <https://www.enciklopedija.hr/kaučukovac> (pristup 25.08.2021.)
- [7] Hohn, S., Acevedo-Trejos, E., Abrams, J. F., Fulgencio de Moura, J., Spranz, R., Merico, A., *The long-term legacy of plastic mass production*, *Science of the Total Environment*, 2020, 746: 141115.
- [8] URL: <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polyethylene-plastic> (pristup 04.03.2021.)
- [9] URL: <https://www.britannica.com/technology/microplastic> (pristup 04.03.2021.)
- [10] URL: <https://oceanservice.noaa.gov/facts/microplastics.html> (pristup 04.03.2021.)
- [11] URL: <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/microplastics/> (pristup 04.03.2021.)
- [12] URL: <https://www.europarl.europa.eu/mikroplastika-izvori-posljedice-rjesenja> (pristup 25.08.2021.)
- [13] URL: <https://www.pomorac.net/> (pristup 25.08.2021.)
- [14] URL: <https://www.dreamstime.com/road-rubber> (pristup 25.08.2021.)
- [15] URL: <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/microplastics/> (pristup 25.08.2021.)
- [16] Paralto, M. C. M., Valenti, Porto, F., S. M. C., *Journal of Environmental Management*, 2020, 263: 110389.
- [17] Tang, Y., Liu, Y., Chen, Y., Zhang, W., Zhao, J., He, S., Yang, C., Zhang, T., Tang, C., Zhang, C., Yang, Z., *A review: Research progress on microplastic pollutants in aquatic environments*, *Science of The Total Environment*, 2020, 142572.

- [18] Huang, W., Song, B., Liang, J., Niu, Q., Zeng, G., Shen, M., Deng, J., Luo, Y., Wen, X., Zhang, Y., Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: A review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health, *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 124187.
- [19] URL: [www.phyox.com/hr/o-mikroalgama](http://www.phyox.com/hr/o-mikroalgama) (pristup 25.08.2021.)
- [20] URL: [https://hr.unionpedia.org/Jezgrina\\_ovojnica](https://hr.unionpedia.org/Jezgrina_ovojnica) (pristup 25.08.2021.)
- [21] URL: <http://instrukcije-kemija.blogspot.com/instrukcije-iz-biologije-stanicna.html> (pristup 25.08.2021)
- [22] URL: <https://www.britannica.com/science/Scenedesmus> (pristup 27.10.2020.)
- [23] URL: [http://www.freshwaterlife.org/imagearchive/main.php?g2\\_itemId=10315](http://www.freshwaterlife.org/imagearchive/main.php?g2_itemId=10315) (page 11) (pristup 27.10.2020)
- [24] Not, F., Sianoz, R., Kooistrax, W. H.C.F., Simon, N., Vaultot, D., Probert, I., Diversity and Ecology of Eukaryotic Marine Phytoplankton, *Advances in Botanical Research*, 2012, 64: 1-53.
- [25] M., Bhattacharya, S., Goswami, Microalgae – A green multi-product biorefinery for future industrial prospects, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 25: 101580.
- [26] Zhou, H., Xiang, N., Xie, J., Diao, X., Ecotoxicology: The History and Present Direction, *Encyclopedia of Ecology*, 2018, 2: 1-9.
- [27] Scott, J., Minghetti, M., *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology :Toxicity testing: in vitro models in ecotoxicology*, 2020, str. 477-486.
- [28] Liu, G., Jiang, R., You, J., C. G. Muir, D., Y. Zeng, E., Microplastic Impacts on Microalgae Growth: Effects of Size and Humic Acid, *Environmental Science and Technology* 2019, 54.3: 1782-1789.
- [29] URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7233318/> (pristup 25.08.2021.)
- [30] Definition of Toxicological Dose Descriptors (LD50, LC50, EC50, NOAEL, LOAEL, etc) ([www.chemsafetypro.com](http://www.chemsafetypro.com)) (pristup 05.06.2021.)
- [31] Worth, A. P., Types of Toxicity and Applications of Toxicity Testing, u: M. Balls, R. Combes, A. P. Worth, *The History of Alternative Test Methods in Toxicology*, London, 2019, str. 7–10.
- [32] Ma, M., Zhu, W., Wang, Z., Witkamp, G. J., Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid, *Aquatic Toxicology*, 2003, 63.3: 221-228.

- [33] Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T., Effects of microplastics on microalgae populations: A critical review, *Science of The Total Environment*, 2019, 665: 400–405.
- [34] Guo, Y., Ma, W., Li, J., Liu, W., Qi, P., Ye, Y., Guo, B., Zhang, J., Qu, C., Effects of microplastics on growth, phenanthrene stress, and lipid accumulation in a diatom, *Phaeodactylum tricornutum*, *Environmental Pollution*, 2020, 257: 113628.
- [35] Cunha, C., Faria, M., Nogueira, N., Ferreira, A., Cordeiro, N., Marine vs freshwater microalgae exopolymers as biosolutions to microplastics pollution, *Environmental Pollution*, 2019, 249: 372-380.
- [36] Cunha, C., Paulo, J., Faria, M., Kaufmann, M., Cordeiro, N., Ecotoxicological and biochemical effects of environmental concentrations of the plastic-bond pollutant dibutyl phthalate on *Scenedesmus* sp., *Aquatic Toxicology*, 2019, 215: 105281.
- [37] Wu, Y., Guo, P., Zhang, X., Zhang, Y., Xie, S., Deng, J., Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae, *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 374: 219-227.
- [38] Wan, J.-K., Chu, W.-L., Kok, Y.-Y., Lee, C.-S., Distribution of Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Ecosystems and Their Impacts on Aquatic Organisms, with Emphasis on Microalgae, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Volume 246, 2018, 133–158.
- [39] Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y., Yu, F., *Science of the Total Environment*, 2020, 715; 136968
- [40] Ma, C., Zhang, Y.-B., Ho, S.-H., Xing, D.-F., Ren, N.-Q., Liu, B.-F., Cell growth and lipid accumulation of a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4 by combining light/darkcycle with temperature variation, *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10.1: 1-14.

## **ŽIVOTOPIS**

Dora Brdek [REDACTED] Pohađala je osnovnu školu „OŠ Sv. Klara“ i srednju školu „X. gimnazija Ivan Supek“, u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu završila je sa odličnim uspjehom. Nakon završetka srednje škole, 2016. godine, upisala se na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, na preddiplomski studij Ekoinženjerstvo, no 2019. godine je promijenila preddiplomski studij te upisala Kemijsko inženjerstvo. Završni rad radila je u Zavodu za industrijsku ekologiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Dajane Kučić Grgić, a stručnu praksu odradila je u Nastavnom zavodu 'Dr. Andrija Štampar' u ožujku 2021. godine na Odjelu za zdravstvenu ispravnost i kvalitetu voda.