

Utjecaj veličine čestica mikroplastike na toksičnost mikroalge *Scenedesmus* sp.

Kuštro, Marija

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:149:433904>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Marija Kuštro

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Marija Kuštro

**UTJECAJ VELIČINE ČESTICA MIKROPLASTIKE NA TOKSIČNOST
MIKROALGE *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. Lidija Furač, v. pred

Zagreb, srpanj 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

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić što me primila pod svoje mentorstvo za izradu ovog završnog rada pod njezinim stručnim vodstvom, uloženom trudu i vremenu te svojim predavačkim pristupom na kolegijima i radom još više zainteresirala za ekologiju, zaštitu okoliša i problematiku te vrste.

Zahvaljujem se asistentici Kristini Bule koja je također puno pomogla pri izradi ovog rada sa svojim veselim karakterom, trudom, strpljenjem i vremenom.

Hvala mojim roditeljima, najužoj obitelji koji su mi najveća podrška tijekom studiranja, kolegicama sa smjera, najboljim prijateljima i prijateljicama koji se jednako vesele ovom završnom radu.

SAŽETAK

Onečišćenje plastikom, koje je zadnjih nekoliko godina u sve većem porastu, privlači sve veću pozornost znanstvenika i šire javnosti. Kao jeftini, lagani, čvrsti, izdržljivi i otporni materijal, plastika ima široku primjenu u svim djelatnostima i unatoč njenoj mogućnosti recikliranja, antropogenim učinkom završava u okolišu kao otpad. Utjecajem vremenskih uvjeta, dolazi do njene razgradnje i fragmentacije, na manje komadiće, na čestice plastike veličine manje od 5 mm koju nazivamo mikroplastikom i predstavlja opasnost što za biljni i životinjski, tako i za ljudski svijet. Postupci proizvodnje plastike uključuju korištenje širokog spektra kemikalija (npr. inicijatori, katalizatori, usporivači gorenja, stabilizatori, plastifikatori, punila i bojila). Zbog korištenja velikog udjela aditiva, postoji potencijalna migracija upravo tih štetnih aditiva putem danas sveprisutne mikroplastike u okoliš te pritom dolazi do nastanka neželjenih učinka na čovjeka i druge organizme koji su joj izloženi. Mikroalga *Scenedesmus* sp. korištena je za praćenje toksičnosti mikroplastike poli(etilen-tereftalata) (PET). Ispitivan je utjecaj tri veličina čestica: 100 – 300 µm, 300 – 500 µm i 500 – 700 µm pri pet različitim koncentracija mikroplastike PET: 50 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L i 1000 mg/L tijekom 72 sata. Prema rezultatima, vidljivo je da različite koncentracije i veličine čestica PET-a imaju različit utjecaj na mikroalgu, no broj stanica mikroalge u uzorcima i kontroli se nisu previše razlikovali odnosno nisu zabilježena veća smanjenja broja stanica mikroalge u odnosu na početni broj.

Ključne riječi: mikroplastika, *Scenedesmus* sp., veličina čestica, testovi toksičnosti, PET

ABSTRACT

Plastic pollution, which has been on the rise in recent years, is attracting increasing attention from both scientists and the general public. As a cheap, light, strong, durable and resistant material, plastic has a wide application in all industries and despite its recyclability, it ends up in the environment as a waste with its anthropogenic effect. Under the influence of weather conditions, it decomposes and fragments into smaller pieces, into plastic particles smaller than 5 mm, which we call microplastics, and poses a danger to both flora and fauna and the human world. Plastic production processes involve the use of a wide range of chemicals (e.g., initiators, catalysts, flame retardants, stabilizers, plasticizers, fillers, and dyes). Due to the use of a large proportion of additives, there is a potential migration of these harmful additives through today's ubiquitous microplastics into the environment and, due to that, there occur side effects on humans and other organisms exposed to it. Microalgae *Scenedesmus* sp. was used to monitor the toxicity of microplastics polyethylene terephthalate (PET). The effect of three particle sizes was investigated: 100 – 300 μm , 300 – 500 μm and 500 – 700 μm at five different concentrations of PET microplastics: 50 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L and 1000 mg/L for 72 hours. According to the results, it can be seen that different concentrations and particle sizes of PET have different effects on the microalgae, but the number of microalgae cells in the samples and control did not differ too much, that is no greater reductions in the number of microalgae cells compared to the initial number have been recorded.

Keywords: microplastics, *Scenedesmus* sp., particle size, toxicity tests, PET

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Plastika.....	2
2.2. Mikroplastika.....	3
2.2.1. Primarna mikroplastika	3
2.2.2. Sekundarna mikroplastika.....	4
2.3. Svojstva mikroplastike	4
2.3.1. Fizikalna svojstva.....	6
2.3.2. Kemijska svojstva	6
2.4. Vrste mikroplastike.....	7
2.4.1. Poli(etilen-terftalat).....	7
2.5. Utjecaj mikroplastike na okoliš	9
2.6. Mikroalga <i>Scenedesmus</i> sp.	11
2.7. Testovi toksičnosti.....	13
2.7.1. Toksičnost mikroplastike na mikroalge	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Mikroplastika – poli(etilen-tereftalat).....	16
3.1.2. Testni organizam – <i>Scenedesmus</i> sp.	17
3.1.3 Mediji i kemikalije.....	17
3.2. Mjerni instrumenti i oprema	18
3.3. Metode rada	19
3.3.1. Priprema mikroplastike	19
3.3.2. Određivanje toksičnosti poli(etilen-tereftalata) primjenom mikroalge <i>Scenedesmus</i> sp.	20
3.3.3. Mikroskopska analiza	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. Rezultati pokusa određivanja toksičnosti poli(etilen-tereftalata) primjenom mikroalge <i>Scenedesmus</i> sp.....	23
5. RASPRAVA.....	27
5.1. Analiza pokusa	27
5. ZAKLJUČAK	30
6. LITERATURA.....	31

1. UVOD

Plastika je u današnjem svijetu sveprisutna i na nju se gleda pod povećalom, nezamjenjivi je materijal današnjice i ne postoji područje života bez nje. Iako ima izvrsna svojstva (dobar toplinski i električni izolator, otporna na vodu i kiseline, ne oksidira, lako se oblikuje i boja) i nezamjenjivost u bilo kojem području djelovanja, prva asocijacija na nju je onečišćenje okoliša.¹

Zadnjih nekoliko godina se sve više prati problem mikroplastike u vodenom ekosustavu, odnosno štetan utjecaj na žive organizme zbog svojih toksičnih svojstava.² Plastika prolazi kroz različite kategorije razgradnje koje dovode do krhkosti i fragmentacije, usitnjavanja na manje čestice zvane mikroplastika – plastika veličine <5 mm. Specifičnosti mikroplastike su da može dugo opstati u okolišu, prenose se na velike udaljenosti te ima sposobnost bioakumulacije u prehrambenoj mreži i potencijalno može ozbiljno ugroziti ljudsko zdravlje.³ „Kako smanjiti i ukloniti mikroplastiku koju nalazimo u okolišu?“ pitanje je koji si postavljaju brojni znanstvenici zbog štetnog utjecaja na zdravlje i okoliš. Potreban je širok spektar znanja od izvora do rješenja problema. Prema literaturi, količina plastike koja ulazi u ocean s godinama se vrlo brzo povećava.⁴ Od svog prvog razvoja u 1800-ima, plastika je napredovala da bi imala koristi za sve proizvodne sektore, od zdravlja i očuvanja robe, do transporta i tehnologije i sada je neizostavna komponenta svakodnevnog života.⁵ Čestice mikroplastike su teško vidljive golim okom i to je glavni razlog zašto su brzorastuće onečišćujuće tvari. Zbog svoje male veličine prolaze kroz većinu filtara i teško ih je ukloniti.⁶ Zbog sveprisutnosti mikroplastike u okolišu, ključna je procjena njene toksičnosti. Mikroplastične čestice se razlikuju ne samo po svojstvima čestica, poput veličine i oblika, već i po kemijskom sastavu, uključujući polimere, aditive i sporedne proizvode stoga razlikujemo fizikalnu i kemijsku toksičnost. Testovi toksičnosti provode se u laboratorijima, na točno određenim modelima poput mikroorganizama i u dobro kontroliranim procesima.⁷ Možemo reći da živimo u „plastičnom svijetu“ gdje gotovo sve što nas okružuje je izrađeno od plastike, a isto tako teško je zamisliti svijet bez ovog materijala. Proizvodnja plastike dramatično se povećala posljednjih 60 godina i dalje se povećava.⁶

U ovom radu ispitivao se utjecaj različitih koncentracija i veličina čestica mikroplastike – PET na toksičnost mikroalge *Scenedesmus* sp., odnosno provodio se test ekotoksičnosti. U vremenu od tri dana pratila se inhibicija rasta mikroalge. Dobiveni podaci statistički su obrađeni i omogućili su nam lakše komentiranje dobivenih rezultata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Plastika

Plastika (izvedeno od grčkih riječi plastikos, što znači pogodno za kalupiranje i plastos, oblikovani⁵) je skupina materijala na osnovi organskih polimera koji se mogu lijevati ili oblikovati na bilo koji način pri povišenim temperaturama i tlakovima, karakterizira ih plastičnost (nepovratna deformiranja bez loma), niska gustoća, žilavost te razmjerno niska cijena što ju čini kao dobar materijal za izradu vrlo različitih proizvoda.⁸ Plastika se priprema procesom polimerizacije monomerima iz nafte, ugljena, prirodnih plinova i celuloze gdje nastaje kovalentna veza te se u tu smjesu mogu dodati različiti aditivi, kemikalije te plastifikatori kako bi se osigurala poželjna svojstva.⁶ Prve plastične mase bile su izvedene iz bjelančevina (jaja, krv) koje su se mogle umrežiti i tako služiti kao polimerna veziva. Industrija plastičnih masa doživjela je ekspanziju tijekom II. svjetskog rata i neposredno nakon njega, zbog nedostatka materijala, pojavila se potreba za poboljšanim tehnologijama i poboljšanjima u kemijskom inženjerstvu te je to dovelo do širenja raznolikosti plastike koja se proizvodi. Istisnula je tradicionalne materijale jer je jeftinija, svestrana i jednostavnija za proizvodnju u raznim oblicima.^{5,8} Plastični je otpad zbog miješanja različitih vrsta plastike razmjerno skupo oporabiti kao materijal. Učinkoviti načini njegova zbrinjavanja su spaljivanje, piroliza i rasplinjavanje, pri čemu se otpad prevodi u kruto, kapljevitom zatim u plinovito gorivo. Energetska vrijednost plastičnoga otpada bliska je onoj fosilnih goriva, a kao zamjensko gorivo neutralan je s obzirom na emisije ugljikova dioksida.⁸ Plastiku još nazivamo i polimer, skupno ime za prirodne i sintetske polimerne tvari (kemijski spoj sastavljen od makromolekula) i polimerne materijale kojih je osnovni sastojak sustav makromolekula, makromolekulni spoj, s ponavljajućim jedinicama koje svojim prostornim rasporedom mogu uvjetovati nastajanje određenih konfiguracija, odnosno konformacija.⁹ Koristi se gotovo u svim aspektima društva, uključujući pakiranje, izgradnju, prijevoz, u medicini i zdravlju, sportu, elektroniku, poljoprivredu, dizajn, prerađivačku industriju i dr., omogućila je tehnološki napredak, dizajnerska rješenja, poboljšanja ekoloških performansi i novčanu uštedu.⁵ Uz sve veću proizvodnju, plastika je dugovječna i otporna je na biorazgradnju te se na taj način akumulira u okolišu u velikoj mjeri. Najviše pogođeni i proučavani dijelovi okoliša su mora i oceani (procjenjuje se da godišnje uđe između 4 i 12 milijuna tona plastike), no treba imati na umu da svaka plastika koja zbog antropogenih aktivnosti završi u okolišu, može dospjeti i u kopnene slatkovodne ekosustave.¹⁰

Plastiku možemo klasificirati prema veličini čestica na nanoplastiku, mikroplastiku, mezoplastiku, makroplastiku i megoplastiku. Nanoplastika je obično manja od 1 μm , mikroplastika manja od 5 mm, mezoplastika predstavlja veličinu veću od 5 mm, makroplastika je veća od 1 centimetra, a megoplastika je veća od 1 metra.¹¹ Plastika je prikladna za mnoge industrijske primjene zbog prisutnosti stabilnih veza ugljik-vodik, ali upravo te veze ju čine otpornom na raspadanje u okolišu.¹² Ovisno o vrsti, polimerima se mogu dodati različiti aditivi za poboljšanje njihovih svojstava, poput plastifikatora, antioksidansa, usporivača gorenja, ultraljubičastih stabilizatora, maziva i bojila kako bi bile bolje karakteristike plastike (fleksibilnost, čvrstoća, otpornost na toplinu, električna izolacija itd.).⁵

2.2. Mikroplastika

Mikroplastikom se smatraju svi polimerni materijali čija se veličina kreće između 1 μm i 5 mm.¹³ Čestice mikroplastike postale su globalna briga otkako su dodane proizvodima koji se koriste gotovo svakodnevno. Prvi je put mikroplastika spomenuta 1972. godine, ali sve do 2004. godine se pojam mikroplastika nije koristio te je tada počeo trend praćenja rasta onečišćenja mikroplastikom u morskom, zatim u svim vodenim ekosustavima.⁶ Točno podrijetlo mikroplastike teško je identificirati zbog njihove fragmentarne prirode, male veličine i različitih izvora, no jedan od načina je da možemo smanjiti odlaganje plastičnog otpada.¹² Teško ju je ukloniti iz vodenog okoliša, a ako se jednom u njemu nađe, npr. korištenjem ribolovnih mreža, istodobno dolazi i do uklanjanja planktona s vodene površine i štetnog djelovanja na organizme i tako se ometa funkcioniranje ekosustava.⁶ Mikroplastika se klasificira prema načinu proizvodnje na primarnu i sekundarnu.¹³

2.2.1. Primarna mikroplastika

Primarna mikroplastika definirana je kao plastika proizvedena u mikroskopskoj veličini, a odnosi se na proizvode za zdravstvenu i osobnu njegu (sredstva za čišćenje lica, hidratantne kreme, šamponi, kozmetika), a koriste se za stabilizaciju emulzije i regulaciju viskoznosti te se tijekom upotrebe mikroplastika ispire i odlazi putem kanalizacije u otpadne vode koje dolaze do okoliša.^{12,14} Primarna mikroplastika u okoliš može ulaziti ovisno o putu primjene, kroz otpadne vode (kozmetika), atmosferu (mikro-abrazivno miniranje), slučajnim gubitkom tijekom prijevoza i pretovara ili otjecanjem vode iz pogona za preradu.⁵ Utvrđeno je da jedan od najznačajnijih izvora mikroplastike u morskom okolišu je otpadna voda onečišćena vlaknima od pranja odjeće.¹⁴

2.2.2. Sekundarna mikroplastika

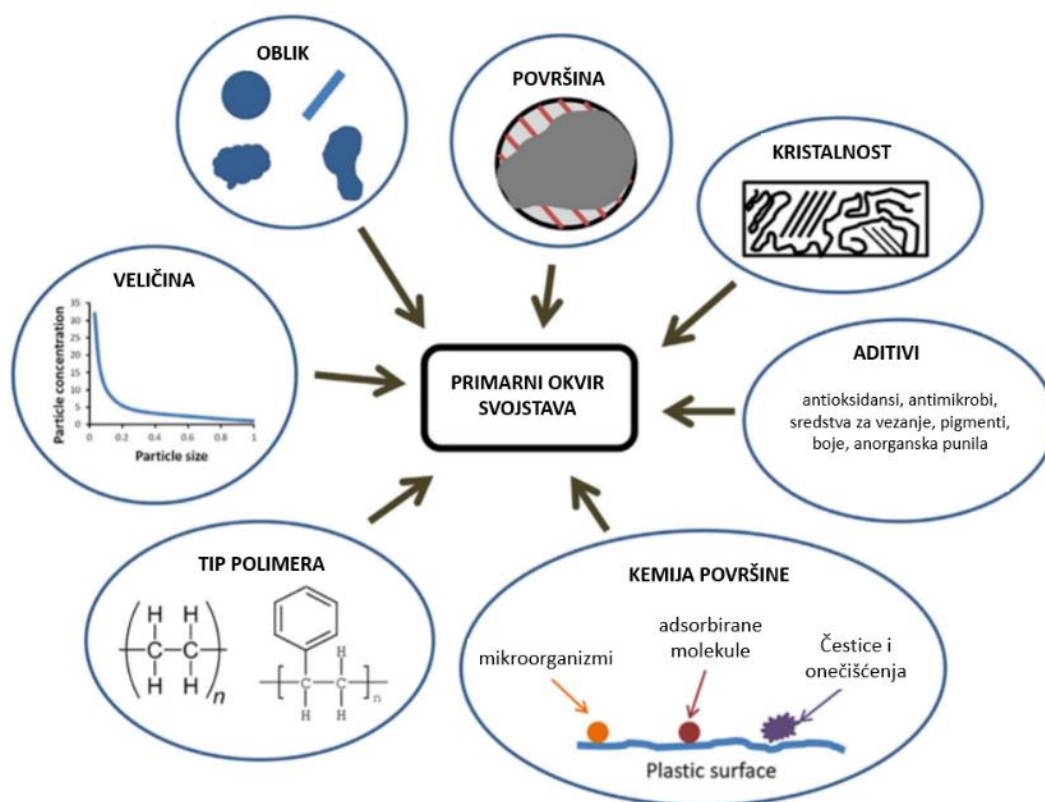
Pod sekundarnom mikroplastikom smatraju se proizvodi koji nastaju razgradnjom većeg plastičnog materijala iz mehaničkih ili fotooksidativnih putova, nusproizvod je usitnjavanja i vremenskih utjecaja na veće plastike u okolišu, odnosno rezultat različitih fizikalnih, bioloških i kemijskih procesa koji smanjuju strukturni integritet plastičnih ostataka.^{12,14} Uporabom plastičnih proizvoda može se pojaviti sekundarna mikroplastika (tekstil, boje i gume) ili nakon odlaganja plastike u okoliš, a putevi mogu biti različiti, kroz otpadne vode (čestice tekstila nakon pranja), zrakom (pri sušenju tekstila), tlom (poljoprivreda, abrazija guma), otjecanjem vode i UV zračenjem.⁵ Glavni čimbenici okoliša koji se odnose na sekundarno stvaranje mikroplastike su izloženost UV svjetlu, temperatura i abrazija. UV zračenje na sunčevoj svjetlosti uzrokuje oksidaciju polimerne matrice, što rezultira prekid kemijske veze. U vodenom ekosustavu je smanjena izloženost UV zračenju i niže su temperature (veće dubine u morima) što usporava proces stvaranja sekundarne mikroplastike.^{5,12,14} Prema istraživanju koje su proveli Duis i Corrs, 75 – 90% plastike pronađene u vodenom okolišu potječe iz kopnenih izvora, a 10 – 25% iz oceanskih izvora. Najčešći put mikroplastike iz kopnenog izvora je zbog nepropisanog odlaganja plastičnog otpada.¹²

2.3. Svojstva mikroplastike

Mikroplastiku najčešće klasificiramo prema morfološkim karakteristikama: veličini, obliku i boji. Kada govorimo o veličini, ona je važan faktor zbog njenog raspona utjecaja na organizme. Oblici mikroplastike se razlikuju, a podijeljeno je u nekoliko glavnih kategorija, fragmenti, vlakna, zrnca, pjene, peleti, sfere, iako se korištena nomenklatura razlikuje među istraživačkim skupinama. Kad je riječ o boji, na njoj se ne može temeljiti identifikacija mikroplastike jer je vrlo subjektivna. Pri kategorizaciji mikroplastike koja trpi krhkost, usitnjavanje, izbjeljivanje ili je obložena živim organizmima treba biti oprezan pri donošenju zaključaka da nebi dovelo do nepravilnih rezultata.⁵ Kada se mikroplastika pronađe u određenom dijelu vodenog ekosustava – vodenoj površini ili sedimentu, radi se analiza kvantifikacije i određivanja veličine (pomoću mikroskopa). Boja mikroplastike uglavnom je upadljiva, a kada se nađe u sedimentu, obojena je. Upravo zbog toga da se ne dovede do nepravilnih rezultata, mikroplastika je podvrgnuta daljnjoj kemijskoj analizi pri čemu se najčešće koristi Fourierova transformirana infracrvena spektroskopija (FT-IR) i Ramanova spektroskopija ili njihovim mikroskopskim verzijama.¹⁰

Mikroplastika puštena u jezera, rijeke, mora, oceane i mjesto na kojem će upravo ona završiti ovisi o njenoj gustoći. Gustoća utječe na to hoće li mikroplastika plutati ili potonuti, odnosno hoćemo li ju naći u vodi ili u sedimentu. Na primjer, u morskoj vodi, mikroplastika gušća od morske vode ($>1,027 \text{ g/cm}^3$, npr. polivinilklorid (PVC)) će potonuti, dok ona s manjom gustoćom (npr. polietilen (PE) i polipropilen (PP)) težit će plutanju. Proces kolonizacije organizama na plastičnu površinu povećavaju težinu čestica, ubrzavajući tako njihovo tonjenje do dna sedimenata, također razgradnja, usitnjavanje i ispiranje aditiva mogu promijeniti gustoću mikroplastičnog materijala i njegovu raspodjelu unutar vodenog ekosustava.^{5,10}

Fizikalna i kemijska svojstva mikroplastike su potencijalno bitna za njihovu toksičnost, uključujući veličinu čestica, oblik čestica, kristalnost, promjene na površini, kemijski sastav, vrstu polimera i aditiva, a kao skup čine vrlo bitna svojstva što je prikazano na slici 1.¹⁵ Na svojstva utječu uvjeti okoliša i putevi razgradnje. Tako svaka čestica mikroplastike razlikuje se po svojim fizikalno-kemijskim svojstvima pa iz tog razloga potrebno ih je identificirati kako bi se utvrdile potencijalne opasnosti i rizici koje predstavljaju.¹⁵



Slika 1. Fizikalno-kemijska svojstva mikroplastike.¹⁵

2.3.1. Fizikalna svojstva

Veličina čestica

Veličina čestica je vrlo važno svojstvo zbog svog utjecaja na organizme. Plastika ostavljena u okolišu kroz određeni period prolazi kroz procese razgradnje, fragmentira se i raspada, tvoreći čestice koje se sastoje od široke raspodjele veličine čestica s raznolikim rasponom oblika čestica.¹⁵ Veća je vjerojatnost da će čestice manje veličine ući u stanice i uzrokovati povećanje staničnih oštećenja zbog veće specifične površine koja omogućuje veću interakciju sa staničnim komponentama.¹⁶

Oblik čestica

Oblik čestica je isto važan faktor pri praćenju utjecaja na organizme jer na primjer vlakna mogu imati toksičniji utjecaj na organizam od zrnca. Čestice nepravilnijeg ili iglastog oblika mogu se lakše pričvrstiti na unutarnje i vanjske površine i njihov učinak je štetniji.¹⁵

Kristalnost

Kristalnost je važno svojstvo jer se kristalno područje sastoji od više uređenih i čvrsto strukturiranih polimernih lanaca. To je karakteristika koja utječe na fizikalna svojstva poput gustoće i propusnosti. Mijenja se s vremenom razgradnje. Kako mikroplastika smanjuje veličinu, kod amorfni polimera kristalnost će se povećavati.¹⁵

2.3.2. Kemijska svojstva

Toksičnost povezana s plastikom može biti uzrokovana ispiranjem kemikalija, uključujući zaostale monomere, početne tvari, otapala i katalizatore, kao i aditivi (npr. antioksidansi, boje, biocidi, plastifikatori) ugrađeni tijekom smjese i obrada. PVC često se smatra najopasnijom plastikom zbog klorida i velikog sadržaja aditiva te tijekom postupka proizvodnje i spaljivanja dolazi do stvaranja dioksina – organski spoj iz skupine polikloriranih ugljikovodika, jedna od najotrovnijih tvari. Polikarbonat, proizveden od bisfenola A, spoj je koji ometa endokrini sustav i PET ispiranjem kemikalija također utječe na endokrini sustav. Aditivi se mogu izdvojiti iz plastičnih materijala u svim fazama životnog ciklusa, ovisno o tome koliko je kemikalija složena unutar određene polimerne jedinice.¹⁵

Kemija površine mijenja se kako stari, fotooksidativni procesi razgradnje utječu na površinu plastike tako što nastaju nove funkcionalne skupine i radikali kemijskim reakcijama, ti procesi mogu oslabiti površinu i dolazi do oslobađanja mikroplastičnih čestica te utječe i na

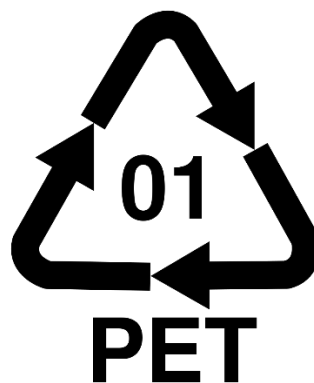
interakciju između čestica i organizma. Novonastala površina omogućava stvaranje biofilma na površini mikroplastika.¹⁵

2.4. Vrste mikroplastike

Godišnja proizvodnja plastike znatno se povećala od 1,5 milijuna tona u 1950-ima na procijenjenih 368 milijuna tona u 2020 godini. Najčešće korišteni i najzastupljeniji polimeri su polietilen visoke gustoće (HDPE), polietilen male gustoće (LDPE), PVC, polistiren (PS), PP i PET, koji zajedno čine približno 90% ukupne proizvodnje plastike u svijetu. To su vrste polimera koji se najčešće nalaze u okolišu, posebno u vodenom ekosustavu. Zbog svojih svojstava, kao što je otpornost na koroziju, većina plastike smatra se "teško razgradivim" materijalima, koji će u okolišu moći opstati i do jednog stoljeća. Makroplastika, odavno je viđena i predstavljena kao prijetnja morskom okolišu, a mikroplastika odnedavno je skrenula pozornost jer se sve više nalazi u okolišu i u organizmima.¹⁴

2.4.1. Poli(etilen-terftalat)

PET je materijal širokog područja primjene, najviše kao ambalažni materijal. Zadaće ambalaže su zaštita njenoga sadržaja, omogućavanje transporta i informiranje potrošača o zapakiranom proizvodu, ekonomična u proizvodnji, okolišno pogodna uz mogućnost uporabe, te jednostavna i sigurna pri odlaganju, a te sve potrebe PET kao materijala odgovara tim zahtjevima.¹⁷ PET je materijal koji je moguće reciklirati, a prije toga mu prethodi predobrada – prikupljanje, razvrstavanje, usitnjavanje i pranje. Recikliranje, postupak ponovne uporabe, provodi se s ciljem smanjivanja upotrebe prirodnih resursa, smanjivanja količine otpada i zaštite okoliša.¹⁸ Svaki ambalažni materijal izrađen od plastike ima svoju oznaku, tako je PET označen brojem 1, a njegova oznaka, simbol, prikazan je na slici 2.



Slika 2. Simbol ambalažnog materijala PET-a.¹⁹

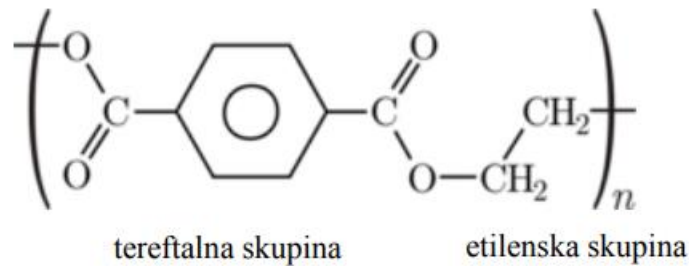
Godine 1941. John Rex Whinfield i James Tennant Dickson otkrivaju PET, a ušao je u komercijalnu uporabu godine 1953. kao tekstilno vlakno i nedugo zatim u obliku filma (u fotografskim aplikacijama, kasetama, ambalaži za hranu). Ima dobra mehanička, kemijska i električna svojstva, a može biti i u amorfnom i kristalastom stanju. Najvažniji prodor PET-a dogodio se 70-ih godina 20. stoljeća kada se PET počeo koristiti za proizvodnju boca za gazirana pića. Danas se upotrebljava za ambalažu za prehrambene i ostale proizvode (npr. deterdženti i kozmetika), za folije u kućanstvu i industriji, u medicini, kirurgiji i farmaciji te nalazi primjenu kod električnih i elektroničkih instrumenata, automobilskih proizvoda, rasvjetni proizvodi i sportska oprema.^{17,20} Prednost PET ambalaže za pića izvanredna je prilagodljivost u transportu. Mala masa i otpornost na udarce čine ju idealnom za prijevoz i na velike udaljenosti, pretovar i skladištenje. No problem nastaje pri skupljanju PET ambalažnog otpada jer zauzima veliki volumen i teško je biorazgradiv.²⁰ Upravo ta proizvodnja boca od PET-a je velika prijetnja okolišu jer se one vrlo često nađu u vodenom ekosustavu ispuštene i odbačene.

U 2019. godini procijenjeno je da je globalna proizvodnja plastike na Zemlji bila oko 368 milijuna tona. Prema Plastic Europe (2020), PET je jedan od najproizvedenijih polimera u Europi (7,9% od ukupne proizvedene količine). Budući da je PET lagan, jeftin i ima vrlo malu proizvodnju troškova, pokazalo se da je jedan od najboljih kandidata za proizvode za jednokratnu uporabu za masovnu potrošnju.^{21,22} PET je materijal koji se zapravo smatra sigurnijim od ostalih plastičnih polimera i posljedično tome široko se koristi u proizvodima za jednokratnu upotrebu. Dokazana je njegova pojava u različitim morskim dijelovima, posebno za čestice manje od 150 μm (koje se smatraju bioaktivnijima).²¹

PET je kristalične strukture, nelomljiv, žilav, otporan na mehanička oštećenja, bez mirisa, izvrsne prozirnosti i sjaja, lagan i nepropusan je za vodenu paru, kisik i ugljični dioksid. Postojanost PET-a na kemikalije i otapala bitno se poboljšava povišenjem kristalnosti polimera. Ovisno o kristalnosti, ovisit će talište, ali uglavnom je oko 250 °C. Zbog svoje prozirnosti, može ga se lako obojati u različite boje.¹⁷ Koristi se kao električni izolator, a njegova izolacijska svojstva smatraju se dobrima zbog ozbiljnog ograničenja orijentacije dipola na sobnoj temperaturi koja je znatno ispod temperature prijelaza.²⁰

PET je plastomerni materijal, aromatski poliester, termoplastična polimerna smola iz porodice poliestera te je kemijski vrlo stabilan, a njegova strukturna formula prikazana je na slici 3. Suvremeni je PET oplemenjeni poliester bitno poboljšanih svojstava (navedenih gore), proizvodi se iz nafte ili zemnoga plina te se gotovo isključivo sastoji od ugljika, kisika i vodika.²⁰ Kondenzacijski je polimer, što znači da proces polimerizacije uključuje uklanjanje

vode, a kao katalizator koristi se antimon, te stabilizatori (najčešće fosforna kiselina ili njezini esteri) radi sprječavanja djelomične razgradnje.^{23,24} Postupak proizvodnje PET-a uključuje dvije različite početne reakcije. Prva početna reakcija je reakcija esterifikacije u kojoj tereftalna kiselina reagira s etilen glikol na temperaturi između 240 °C i 260 °C i tlak između 300 i 500 kPa. Druga reakcija je reakcija trans-esterifikacije gdje reagira s dimetil-tereftalatom na 150 °C, 180 °C – 210 °C, 140–220 °C i 100 kPa. Trans-esterifikacija je mnogo poželjniji postupak zbog lakšeg pročišćavanja.²⁵



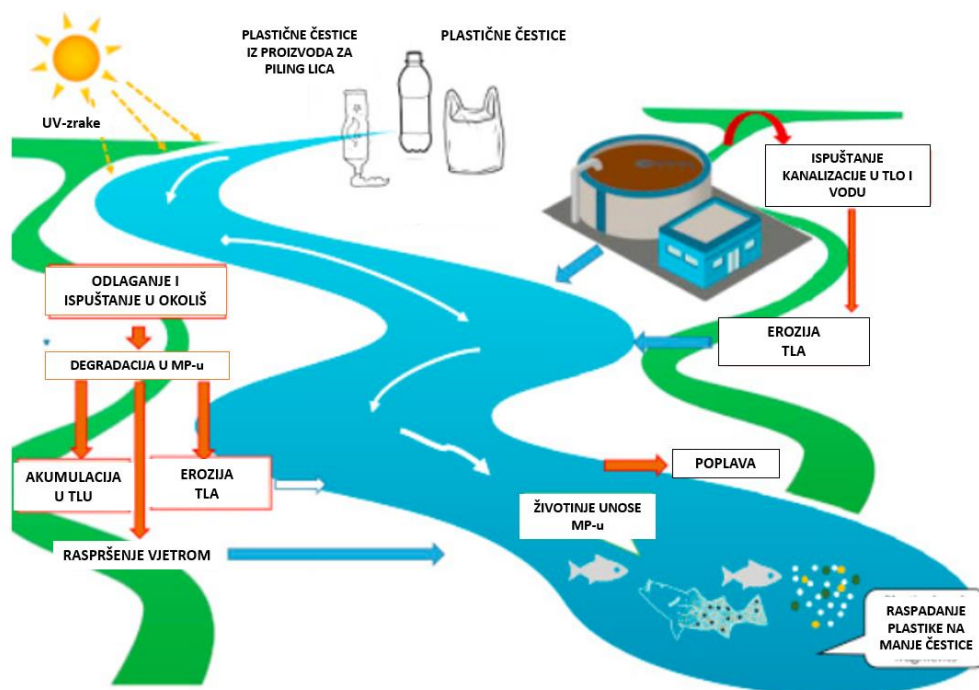
Slika 3. Strukturna formula poli(etilen-tereftalata).²⁵

Mikroplastika je izuzetno postojana u okolišu zbog odsutnosti ili slabe aktivnosti kataboličkih enzima koji mogu razgraditi njihove plastične sastojke. PET ima visok omjer aromatičnih komponenata, kemijski je inertan, što rezultira otpornošću na mikrobnju razgradnju. Njegove monomere, tereftaltnu kiselinu (TPA) i etilen glikol (EG) dobivamo iz sirove nafte. Zbog njegove jednostavne proizvodnje i velike primjene, u okoliš su unesene velike količine PET-a što rezultira akumulacijom PET-a u ekosustavima širom svijeta. Istraživanja ukazuju da je PET enzimski razgradljiv pomoću mikrobnih zajednica, a jedna od njih je bakterija *Ideonella sakaiensis* koja može koristiti PET kao glavni izvor energije i ugljika.²⁶ Uzgajanjem bakterije na PET-u, stvaraju se dva enzima sposobna da hidroliziraju PET i reakcijski intermedijar, mono (2-hidroksietil) tereftaltnu kiselinu pa oba enzima razgrađuju PET na dva monomera, tereftaltnu kiselina i etilen glikol. Shodno navedenom, u okolišu postoje mikroorganizmi koji imaju sposobnost razgradnje PET-a.²⁶

2.5. Utjecaj mikroplastike na okoliš

Postoje brojni načini kako organizmi u vodenom ekosustavu mogu unijeti mikroplastiku u organizam, a to uključuje hranjenje, izravno gutanje ili su izloženi propuštanju potencijalno štetnih aditiva koji ulaze u prehrambeni lanac. Zbog velikog omjera površine i volumena te određenih karakteristika, mikroplastika je sposobna apsorbirati razna onečišćenja, poput teških metala, kloriranih i aromatskih spojeva, i potencijalno postojanih

organskih onečišćivala zbog svoje hidrofobne prirode.¹² Između izvora i transporta prati se sudbina i ponašanje čestica mikroplastike od kopna do vodenog organizma, kao što je prikazano na slici 4.



Slika 4. Shematski prikaz prijenosa plastike od izvora nastajanja do stvaranja mikroplastičnih čestica i utjecaja na vodene organizme.¹⁰

Mikroplastika u vodenom ekosustavu štetno utječe na mikroalge, ribe, školjke, zebrice, dafnije, nematode itd.. Toksičnost mikroplastike može biti posljedica unutarnje toksičnosti, fizičkih oštećenja i ispiranja kemikalija prisutnih u plastici i sposobnosti mikroplastike da apsorbira postojeće organske onečišćujuće tvari ili da djeluje kao sakupljač za različite mikrobne nakupine ili čak patogene bakterije.¹⁰ Mikroplastika je fizička opasnost za organizme ako ju progutaju. Neki od učinaka su blokada crijevnog trakta, inhibicija izlučivanja želučanog enzima, smanjeni podražaji hranjenja, smanjena razina steroidnih hormona, kašnjenja u ovulaciji i neuspjeh reprodukcije, a to sve dovodi do smanjenja potrošnje hrane zbog smanjenog volumena želuca. Morske ptice su jedna od najosjetljivijih vrsta na gutanje mikroplastike, jer im se smanjuje volumen skladišta želuca i podražaji hranjenja te ne mogu probaviti mikroplastične čestice.¹⁴

Na različite načine možemo kontrolirati i smanjiti onečišćenje mikroplastikom, a jedan od načina je da zakonodavna tijela reguliraju zakone za gospodarenje plastikom, njihovom upotrebom i odlaganjem, prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Prikaz različitih strategija za kontrolu bilo koje vrste onečišćenja plastikom.¹²

METODE	STRATEGIJA
ZAKONODAVSTVO	EU regulativa o kemikalijama, Zakon o kemikalijama
	Pravilnik o ambalaži i otpadnoj ambalaži
	Direktive 94/62/EZ u pogledu smanjenja potrošnje laganih plastičnih vrećica za nošenje
	Direktiva 1999/31/EZ o odlagalištima otpada
	Naknada za ambalažu i ambalažni otpad
JAVNOST	Educirati javnost o mikroplastici, njezinim svojstvima i štetnom djelovanju
INŽENJERSKI ALATI	MBR tehnologija, mehanički, kemijski i biološki tretmani (aktivni mulj) i biološki aktivna filtracija
BIOTEHNOLOŠKI ALATI	Proizvodnja biorazgradive plastike Enzimi, bakterije, mikroorganizmi koji razgrađuju plastiku

Zbog svoje otpornosti na razgradnju, većina plastičnih ostataka postojat će u okolišu stoljećima i može se prevoziti daleko od izvora, uključujući velike udaljenosti unutar mora. Izvori na kopnu i oceanu jesu glavni izvori plastike koja ulazi u okoliš, a to su domaće, industrijske i ribolovne aktivnosti, odnosno industrije. Oceani su posebna žarišta nakupljanja plastičnog otpada. Makroplastika i mikroplastika predstavljaju rizik za organizme u prirodnom okolišu, na primjer, gutanjem ili zapetljavanjem u plastiku. Mnoga su istraživanja istraživala potencijalni unos hidrofobnih onečišćenja, koja se potom mogu bioakumulirati i biomagnificirati kroz prehrambeni lanac. Za rješavanje problema plastičnog onečišćenja u morskom okolišu, vlade bi prvo trebale igrati aktivnu ulogu u rješavanju tog problema plastičnog otpada uvođenjem zakonodavstva za kontrolu izvora plastičnih ostataka i uporabe plastičnih dodataka. Uz to, industrija plastike trebala bi preuzeti odgovornost za kraj vijeka trajanja svojih proizvoda uvođenjem programa recikliranja ili nadogradnje plastike.¹⁴

2.6. Mikroalga *Scenedesmus* sp.

Mikroalge su prokariotski i eukariotski, fotosintetski mikroorganizmi koje pokreće sunčeva svjetlost i koji pretvaraju ugljični dioksid u potencijalna biogoriva, hranu za životinje i bioaktivne sastojke velike vrijednosti s jednostavnim zahtjevima rasta (svjetlost, šećeri, CO₂, N, P i K) koji mogu stvarati lipide, proteine i ugljikohidrate u velikim količinama u kratkom

vremenskom razdoblju.^{27,28} Mikroalge su jedan od najstarijih oblika života. One su primitivne biljke (talofiti), a to je značenje da nemaju korijenje, stabljike i lišće, nemaju oblikovanu jezgrenu ovojnicu i kao svoj primarni fotosintetski pigment ima klorofil a. Njihov jednostavni oblik i sastav im omogućava da se lako prilagode okolišnim uvjetima. Mikroalge mogu biti autotrofne ili heterotrofne – prve zahtijevaju samo anorganske spojeve kao što su CO₂, soli i izvor svjetlosti za rast, dok druge nisu fotosintetski pa im je potreban vanjski izvor organskih spojeva kao i hranjive tvari i izvor energije. Za autotrofne alge ključna je fotosinteza (komponenta njihovog opstanka) pri čemu pretvaraju sunčevo zračenje i CO₂ koji kloroplasti apsorbiraju u adenzin trifosfat (ATP) i O₂ gdje dobivaju energiju na staničnoj razini, koja se zatim koristi u disanju za proizvodnju energije za potpuni rast.²⁸

Naziv alge *Scenedesmus* dolazi od grčkih riječi „skene“ što znači šator (latinske riječi „scene“, od kud i engleska riječ „scene“, a time označava i krajolik), pozornica, ukrasno okruženje ili mjesto i „desmos“ što znači veza. Mogu biti jednoćelijske ili kolonijalne, tvoreći 2 – 32 stanične, obično 4 ili 8 stanične cenobije, prikazano na slici 5 (slikano tijekom eksperimenta) te su nepokretne.²⁹ Cenobij je pravilno oblikovana trajna kolonija jednostaničnih organizama koja nastaje udruživanjem jedinki iste vrste.³⁰ Okolna sluzava matrica može biti prisutna ili odsutna. Stanice su poredane linearno, naizmjenično ili u 2 – 3 reda, dodirujući se s bočnim stranama ili samo u subpolarnom području. Stanice su veličine 3 – 78 x 2 – 10 μm, gotovo sferne do elipsoidne, izdužene ili talasaste do izdužene fusiforme, a stanični polovi mogu biti glavasti, tupi, akutni ili dugo se sužavaju. Neke su vrste bodljikave ili imaju dlačice. Razmnožavaju se nespolno autosporama (nepokretne spore).^{29,31} Kokoidni organizmi (stanice nepravilnog okruglog oblika), kao što je *Scenedesmus* sp., obično imaju točan broj stanica po koloniji, nastali nizom brzih dioba stanica kada se organizam prvi put formira. Nakon što se dobije točan broj stanica, organizam raste u veličini, ali ne i u broju stanica.³¹



Slika 5. Prikaz 4-staničnog cenobija.

Stvaranje cenobije ovisi o nizu čimbenika. Veći udio jednoćelijskih organizama pronađen je pri visokim intenzitetima svjetlosti i visokim temperaturama te da se povećava izloženost unosa hranjivih tvari, što nam govori da pri većim brzinama rasta organizmi više vole da nisu kolonizirani. Uspješan rast i podjela algi oslanja se na ravnotežu koja se odvija na površini vodenog ekosustava koja sadrži idealne svjetlosne i prehrambene uvjete – „dobro osvijetljena zona“ i izbjegavanja ispaše grabežljivaca. Veće kolonije imaju manji omjer površine i volumena, što ograničava unos hranjivih sastojaka i sakupljanje svjetlosti, a velika masa potiče tonjenje, ali pružaju i značajnu sigurnost. *Scenedesmus* sp. obično akumulira β -karoten, izomere astaksantina, lutein i kantaksanatin kada su izloženi stresnim uvjetima kao što je ograničena dostupnost dušika.³²

Rod *Scenedesmus* je vrsta mikroalge koja se koristi za eksperimentalno proučavanje onečišćenja, fotosinteze, promjene u fiziologiji i biokemiju stanica.³³ Imaju mogućnost rasta s vrlo malom razinom hranjivih tvari i akumuliraju velik udio lipida te imaju visok sadržaj proteina.³⁴ Godine 1942. Gaffron i Rubin dolaze do otkrića da zelena alga *Scenedesmus* ima mogućnost proizvodnje vodika, vrlo je brz i osjetljiv proces zbog slabe učinkovitosti pretvorbe svjetlosti / kemikalija unutar stanica.³⁵ Koriste se kao pokazatelj onečišćenja, gdje se mogu prilagoditi i dobro rasti u onečišćenoj vodi ili kanalizaciji.³⁶

2.7. Testovi toksičnosti

Toksičnost je svojstvo neke tvari da ima štetan utjecaj na živa bića i/ili na okoliš. Koliko je neka tvar opasna nije lako definirati, jer njena otrovnost ovisi o brojnim okolišnim čimbenicima (načinu, količini i učestalosti izlaganja) te o samom organizmu i njegovim individualnim fiziološkim čimbenicima. Korištenjem testova toksičnosti dobivamo podatke o otrovnosti određene tvari i testiramo njihove učinke. Oni su nam vrlo bitni kako bismo dobili podatke o otrovnosti neke tvari na čovjeka. Čovjek nije prihvatljiv model za eksperimentiranje, stoga testovima toksičnosti podvrgavaju se razne vrste biljaka i životinja. Testovi toksičnosti na živim organizmima (*in vivo*) provode se u laboratorijima, na točno određenim modelima i u dobro kontroliranim procesima. Testni organizmi mogu biti mikroalge, na kojima se kao pokazatelji toksičnosti najčešće prate prirast, koncentracija fotosintetskih pigmenata i količina sintetiziranih proteina, bakterije, kavsci, biljke i životinje. Postoji više vrsta testova toksičnosti, a razlikuju se u svom cilju, trajanju i načinu provođenja.³⁷

Kod mikroalga se pretpostavlja da čestice mikroplastike smanjuju rast što je krajnja točka u toksikološkom praćenju. Ali kod istraživanja, rezultati variraju.³⁸ Uočava se i

inhibicija. Inhibicija označava sprječavanje, kočenje, zaustavljanje, zadržavanje.³⁹ Upravo se u ovom radu pratila inhibicija rasta pod utjecajem različitih veličina i koncentracija PET mikroplastike. Gustoća polimera katkad utječe na inhibiciju (veća je pri manjoj gustoći), dok koncentracija uvijek utječe. Izloženost mikroalge na čestice mikroplastike može dovesti i do promjene u sadržaju klorofila i fotosintetske aktivnosti.³⁸ Na temelju studija koji se bave procjenom utjecaja mikroplastike u vodenom ekosustavu na organizme, potvrđeno je da čimbenici poput koncentracije čestica, oblika i veličine su odlučujući faktori pri procjeni toksičnosti. Inhibicijski učinak trebao bi se smanjivati s povećanjem izloženosti česticama mikroplastike. Veličina čestica utječe tako da je inhibicija rasta vjerojatnija kod mikroalgi koje su bile izložene manjim česticama pri višim koncentracijama.³⁸ Mikroplastika može ometati prijenos unutar stanica, izazvati oksidativni stres, uzrokovati imunotoksičnost, neurotoksičnost i oštećenje DNA. U prisutnosti onečišćujućih tvari, može doći do procesa agregacije, adsorpcije i transformacije. Oblik čestica, veličina, površinski naboj i funkcionalna skupina ključni su čimbenici koji utječe na toksičnost mikroplastike.¹⁶ Nepravilne kutne čestice mogu prouzročiti veće oštećenje što može rezultirati većom toksičnošću kada se uspoređi sa česticama sfernog oblika. Čestice mikroplastike koje su već ostarjele, teže će apsorbirati veće količine onečišćujućih stvari od novonastalih čestica zbog jačeg površinskog naboja. Boja također ima ulogu u toksičnosti i adsorpciji onečišćujućih tvari što nam govori činjenica da mikroplastične čestice u crnoj boji adsorbiraju veća onečišćenja od bijelih mikroplastičnih čestica.¹⁶

2.7.1. Toksičnost mikroplastike na mikroalge

Brojna istraživanja su pokazala toksičan učinak mikroplastike na mikroalge, a on varira kod čestica različitih veličina. Mikroplastika većih dimenzija uzrokuje negativan učinak zbog slabog prodora svjetlosti i utječe na fotosintezu, dok čestice manjih dimenzija uništavaju staničnu stijenku adsorbiranjem na površinu mikroalge. Mikroalge apsorbiraju čestice mikroplastike za razliku od riba koje je unose gutanjem, a zooplanktoni i školjke filtracijom. Mikroalge su odgovorne za primarnu proizvodnju u vodenom ekosustavu. Anorganski ugljik pretvaraju u organski ugljik procesom fotosinteze i izvor su hrane za mnoge vodene organizme. Inhibicija rasta, fotosinteza, oksidativni stres i ekspresija gena na mikroalge su neki od pokazatelja utjecaja mikroplastike, povezano s veličinom, svojstvima površine, koncentracije, pa čak i vremenskoj izloženosti česticama mikroplastike.⁴⁰ Primijećeni štetni učinci na mikroalgama su mehanička oštećenja, odnosno kontakt s mikroplastikom može dovesti do oštećenja stanične stijenke, dovodi do promjene u strukturi pa sve to može dovesti

do izumiranja stanice.⁴⁰ Neki znanstvenici tvrde da učinak zasjenjenja čestica mikroplastike su glavni razlog toksičnosti mikroalgi jer fotosinteza je tada znatno umanjena.⁴⁰ Utjecaj različitih veličina mikroplastike još je u fazi istraživanja. Čestice mikroplastike imaju tendenciju da reagiraju sa otopljenim organskim tvarima poput huminske kiseline i bjelančevinama, i tvore sloj oko čestica koji se sastoji od prirodnih biomolekula koji igra važnu ulogu u diktiranju ponašanja i toksičnosti čestica na vodene organizme (istraživanja su otkrila da je dodatak huminske kiseline značajno ublažio toksičnost nano-polistirena (PS) na zooplanktonu).⁴⁰ Postoje brojna znanstvena istraživanja kakav je toksični utjecaj različitih vrsta mikroplastike na određenu mikroalgu, a neki njihovi učinci prikazana su u tablici 2. gdje je vidljivo o kojoj se vrsti mikroplastike radi i na kojoj mikroalgi je provedeno istraživanje.

Tablica 2. Toksikološki utjecaj mikroplastika (PVC, PC, PE) na mikroalgu.

MIKROPLASTIKA	MIKROALGA	UČINAK
PVC	<i>Skeletonema costatum</i>	Pozitivna inhibicija rasta mikroalge, sadržaj klorofila i fotosintetska učinkovitost su se smanjili, negativan utjecaj zasjenjivanja. ⁴¹
PC	<i>Chorella vulgaris</i>	Utjecaj zasjenjenja, negativan utjecaj na rast i fotosintezu, adsorbirane u mikroalgi, smanjenje inhibicije rasta. ⁴²
PE	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Pozitivna inhibicija rasta mikroalge, toksičan utjecaj, koncentracija klorofila se povećava, fizičko oštećenje na mikroalgi. ⁴³

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroplastika – poli(etilen-tereftalat)

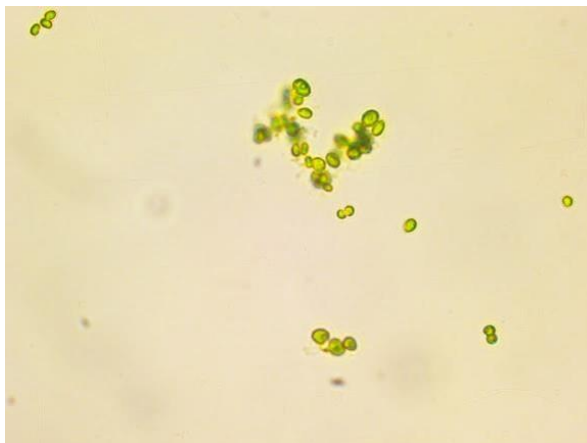
PET je plastika koja se koristila za ispitivanje toksičnosti na mikroalgi *Scenedesmus* sp.. Kako bi se ispitala toksičnost PET-a pomoću mikroalge bilo je potrebno usitnjavanje makroplastike PET ambalaže, odnosno boca za jednokratnu upotrebu, prikazanih na slici 6 pod a). Na svim bocama nalazila se oznaka prikazana na slici 1 pod b) koja potvrđuje da se radilo o PET materijalu.



Slika 6. Prikaz: a) boca za jednokratnu upotrebu, b) oznaka PET materijala.

3.1.2. Testni organizam – *Scenedesmus* sp.

Za toksikološko ispitivanje koristila se slatkovodna mikroalga *Scenedesmus* sp. koja je prikazana na slici 7. Uzgojena je u laboratoriju pri laboratorijskim uvjetima, lako je održiva i morfologija joj je dobro poznata.²⁹ Kultura mikroalge nalazi se u zbirci Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 7. Mikrofotografija mikroalge *Scenedesmus* sp. snimljene u nultom danu, P=400x.

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 dodavalo na 1 L deionizirane vode. Podešavanje pH – vrijednosti BM-a na 8,0 postiglo se dodatkom 0,1 M NaOH. Tako pripremljen BM se sterilizirao prije upotrebe.

- Etanol

Etanol (70 %) koristio se za sterilizaciju MP-a, tj. PET-a prije postavljanja pokusa sa *Scenedesmus* sp..

3.2. Mjerni instrumenti i oprema

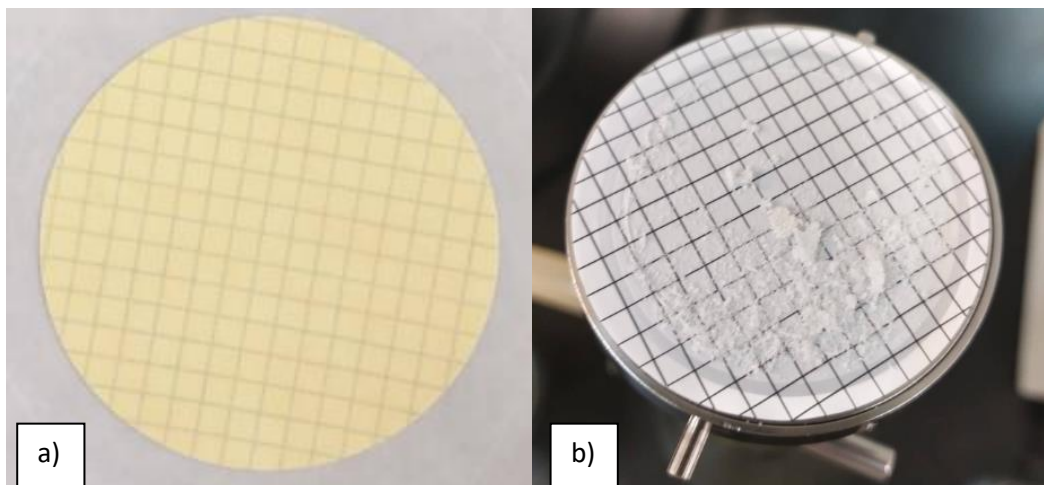
- Za provedbu pokusa u radu je korištena tresilica LAUDA-GFL Gesellschaft model 3005, proizvođač LLG.
- Za usitnjavanje plastičnih materijala korišten je blender Philips, a za prosijavanje mikroplastike upotrijebljen je uređaj za trešenje sita W. S. Tyler RX-86-1 Sieve shaker, USA, i sita istog proizvođača, veličine pora 300 μm , 500 μm i 710 μm .
- Za precizno vaganje uporabljena 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 svrhu određivanja broja živih stanica algi (CFU) upotrijebljena je Thomina komorica.
- Za sterilizaciju bazalnog medija, čistog staklenog posuđa, kao i onečišćenog posuđa, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija.
- U svrhu aeriranja alge *Scenedesmus* sp. korištena je aeracijska pumpa Tetratrec, a za osvjetljenje alge koristila se lampa.
- U radu je korištena rotacijska magnetska tresilica WiseStir MSH – 20A kod podešavanja pH – vrijednosti BM-a.
- U provedbi određivanja 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 s ugrađenom kamerom Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan.

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprema mikroplastike

PET makroplastika prikazana na slici 6 pod a), boca za jednokratnu upotrebu, prvo je usitnjena škarama na manje komade te se zatim usitnjavala u blenderu uz dodatak mokrog leda. Usitnjene čestice PET-a sušile su se na zraku 24 – 48 h pri sobnoj temperaturi, te su se zatim prosijavale mehanički koristeći sita određenih veličina pora za dobivanje čestica veličine: <math><300\ \mu\text{m}</math>; 300 – 500 $\mu\text{m}</math>; 500 – 710 $\mu\text{m}</math>.$$

Čestice PET-a dobivene prosijavanjem, izvagane su na analitičkoj vagi u Erlenmayer-ovim tikvicama od 100 mL da bi se dobile koncentracije od 50 mg/L; 250 mg/L; 500 mg/L; 750 mg/L; 1000 mg/L. U svrhu sterilizacije čestica PET-a, u pripremljene tikvice dodao se 70 % etanol i stavljene su na rotacijsku tresilicu (10 min pri 160 o/min) pri sobnoj temperaturi. Čestice PET-a su zatim izdvojene iz etanola primjenom vakuum filtracije te su isprane dodatno deioniziranom vodom. Tijekom provedbe vakuum filtracije koristio se membranski filter veličina pora 0,45 $\mu\text{m}</math>, prikazan na slici 8 pod a), na kojem su zaostajale čestice PET-a kao što je prikazano na slici 8 pod b). Čestice PET-a zaostale na membranskom filtru prenesene su sterilnom tehnikom rada u Erlenmayer-ovu tikvicu od 250 mL za postavljanje pokusa pomoću sterilne žlice i pincete.$



Slika 8. Membranski filter a) prije uporabe (0,45 $\mu\text{m}</math>), b) zaostala mikroplastika nakon filtracije.$

3.3.2. Određivanje toksičnosti poli(etilen-tereftalata) primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp.

Pokus za određivanje toksičnosti PET-a na mikroalgi *Scenedesmus* sp. provodio se na rotacijskoj tresilici, pri sobnoj temperaturi, 160 o/min i 3 dana u Erlenmayerovim tikvicama od 250 mL, odnosno radnog volumena $V_R = 100$ mL.

Prije postavljanja pokusa uzgojila se mikroalga *Scenedesmus* sp. u bazalnom mediju (BM) uz kontinuiranu aeraciju i interval svjetlosti 16:8 (svjetlo:mrak) tijekom 14 dana.⁴⁰ Aeracija je postignuta aeracijskom pumpom, a svjetlost se dovodila pomoću lampe, kao što je prikazano na slici 9.



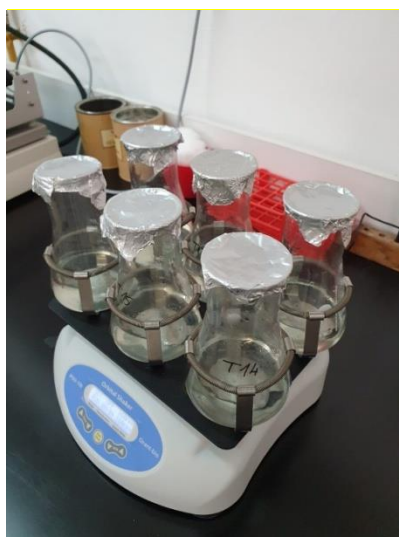
Slika 9. Uzgojena mikroalga *Scenedesmus* sp. uz aeracijsku pumpu i lampu.

Broj živih stanica mikroalge (CFU) iznosio je nakon 14 dana $1,2 \times 10^6$ st/mL. Pomoću Thomine komorice izravno su se brojale stanice mikroalge unutar 3 kvadrata kako bi se odredio ukupan broj živih stanica (CFU).⁴⁴ CFU se određivao prema formuli [1]:

$$N = \frac{m * n * 16 * 10^4}{K} \quad [1]$$

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.

Od tako uzgojene suspenzije algi (slika 9) priredila se suspenzija za pokus čiji je CFU iznosio 10^5 st/mL odnosno čija je početna optička gustoća (OG) u BM-u iznosila 0,03, a određivala se spektrofotometrijski pri $\lambda = 670$ nm.⁴⁵ Erlenmayerove tikvice sadržavale su suspenziju mikroalge *Scenedesmus* sp., BM i PET. Tako pripremljene tikvice stavljene su na rotacijsku tresilicu što je prikazano na slici 10.



Slika 10. Pokus određivanja toksičnosti PET-a primjenom alge *Scenedesmus* sp.

Tijekom pokusa određivao se CFU sva tri dana, a pH – vrijednost i koncentracija kisika na početku i na kraju pokusa. U tablici 3 prikazani su početni uvjeti za provedbu pokusa. Pokus se provodio prema OECD 201:1984⁴⁶, te je za pokus bila postavljena i kontrolna tikvica odnosno slijepa proba (SP) koja nije sadržavala PET.

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

POČETNI UVJETI	
vrsta mikroplastike	PET
$\gamma(\text{mikroplastika}) / \text{mg/L}$	50; 250; 500; 750; 1000
veličina PET-a / μm	<300; 300-500; 500-710
pH – vrijednost / -	8,181
$\gamma(\text{O}_2) / \text{mg/L}$	9,06
$\log\text{CFU}_0 / -$	5,63
$\text{OG}_0 / -$	0,03

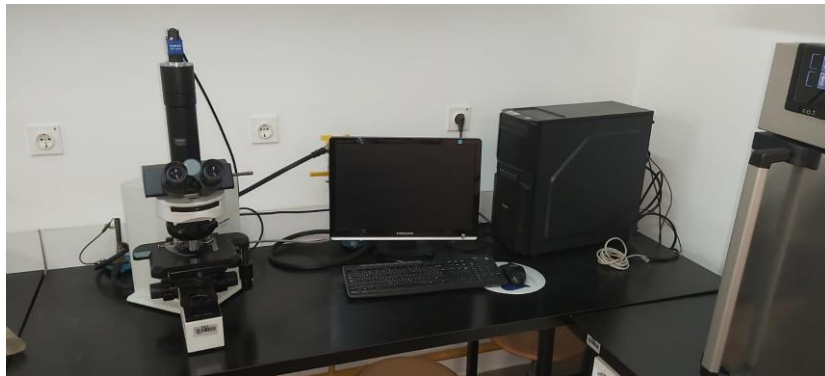
Inhibicija rasta mikroalge izražavala se preko logaritamske vrijednosti (log CFU) kontrole i uzorka. Inhibicija rasta izražavala se u postotku, a računala se prema formuli [2]:

$$INH = \frac{\log CFU (\text{kontrola}) - \log CFU (\text{uzorak})}{\log CFU (\text{kontrola})} \times 100\% \quad [2]$$

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

3.3.3. Mikroskopska analiza

Za mikroskopsku analizu mikroalge koristio se svjetlosni mikroskop, prikazan na slici 11, u svrhu praćenja morfoloških karakteristika mikroalge *Scenedesmus* sp. Mikroskopska analiza provedena je na način da se izuzela, pomoću Pasteur pipete, kapljica suspenzije mikroalge i BM-a. Pripremao se nativni preparat za 0. i 3. dan provedbe pokusa i tako pripremljen preparat je mikroskopiran pod ukupnim povećanjem od 400 \times .



Slika 11. Svjetlosni mikroskop s ugrađenom kamerom.

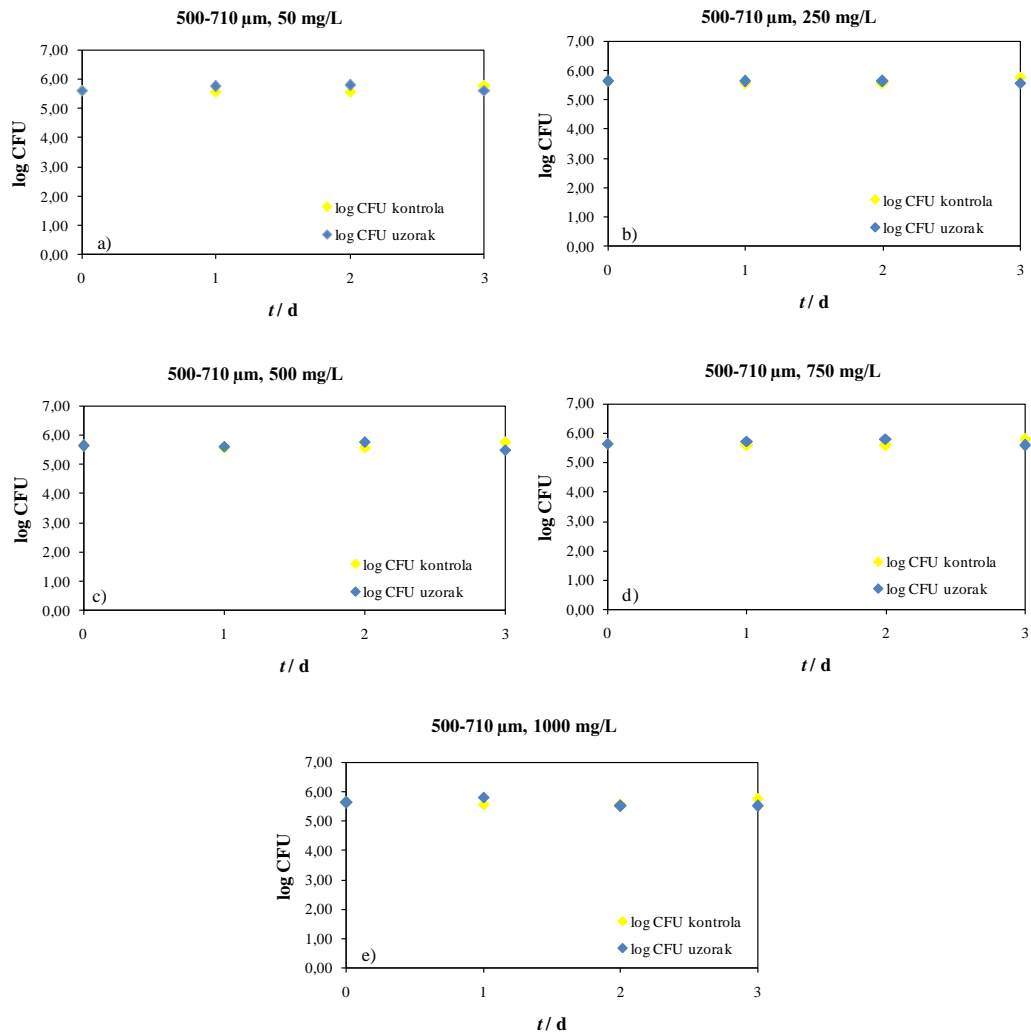
4. REZULTATI

4.1. Rezultati pokusa određivanja toksičnosti poli(etilen-tereftalata) primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp.

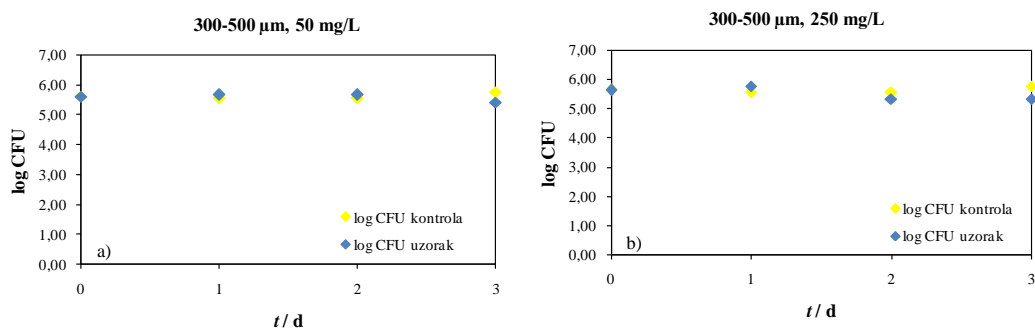
Primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp. pratila se toksičnost PET-a. Tijekom sva 3 dana pratila se promjena broja živih stanica (CFU) što je prikazano na slikama 12, 13 i 14, a na slici 15 prikazana je inhibicija rasta s obzirom na koncentraciju PET-a za različite veličine čestica. Promjena pH – vrijednosti, koncentracije otopljenoga kisika te morfološke karakteristike mikroalge praćene su na početku i na kraju pokusa. U tablici 4 prikazani su podaci nultog i trećeg dana za pH – vrijednost i koncentraciju otopljenog kisika za određenu veličinu i koncentraciju PET-a te kontrolnu tikvicu.

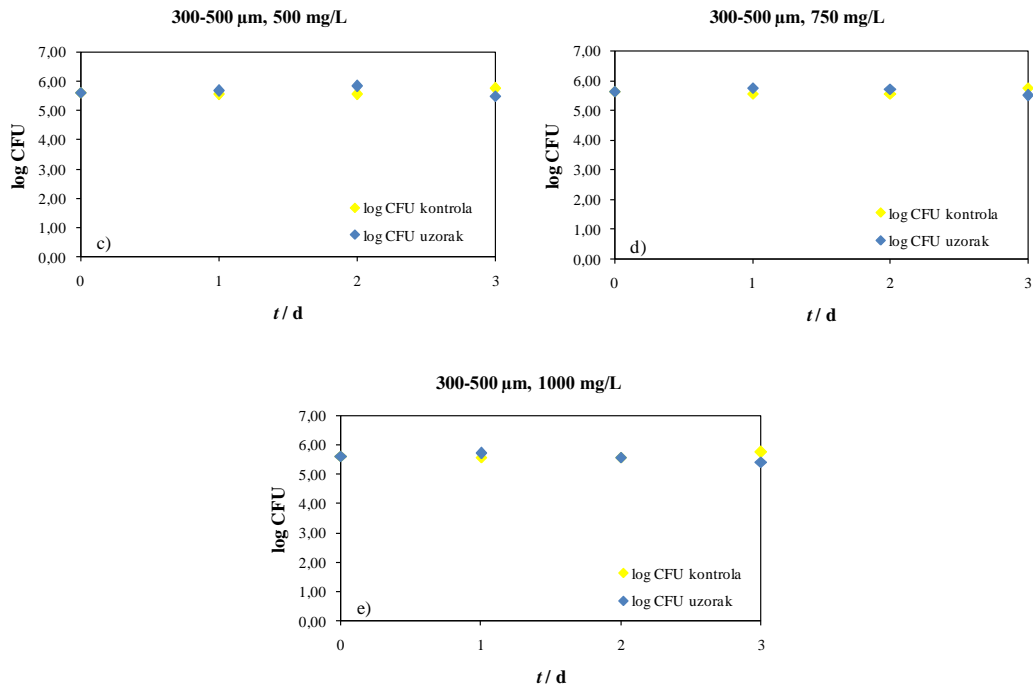
Tablica 4. pH – vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika za 0. i 3. dan za svaki uzorak PET-a i kontrolnu tikvicu (SP).

<i>t</i> / d	pH-vrijednost / -	$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L
0	8,181	9,060
3		
500 – 710 μm	50 mg/L	8,082
	250 mg/L	8,060
	500 mg/L	8,048
	750 mg/L	8,067
	1000 mg/L	8,013
300 – 500 μm	50 mg/L	8,056
	250 mg/L	8,071
	500 mg/L	8,067
	750 mg/L	8,033
	1000 mg/L	8,044
<300 μm	50 mg/L	8,042
	250 mg/L	8,037
	500 mg/L	8,048
	750 mg/L	8,039
	1000 mg/L	8,031
SP	8,028	8,560

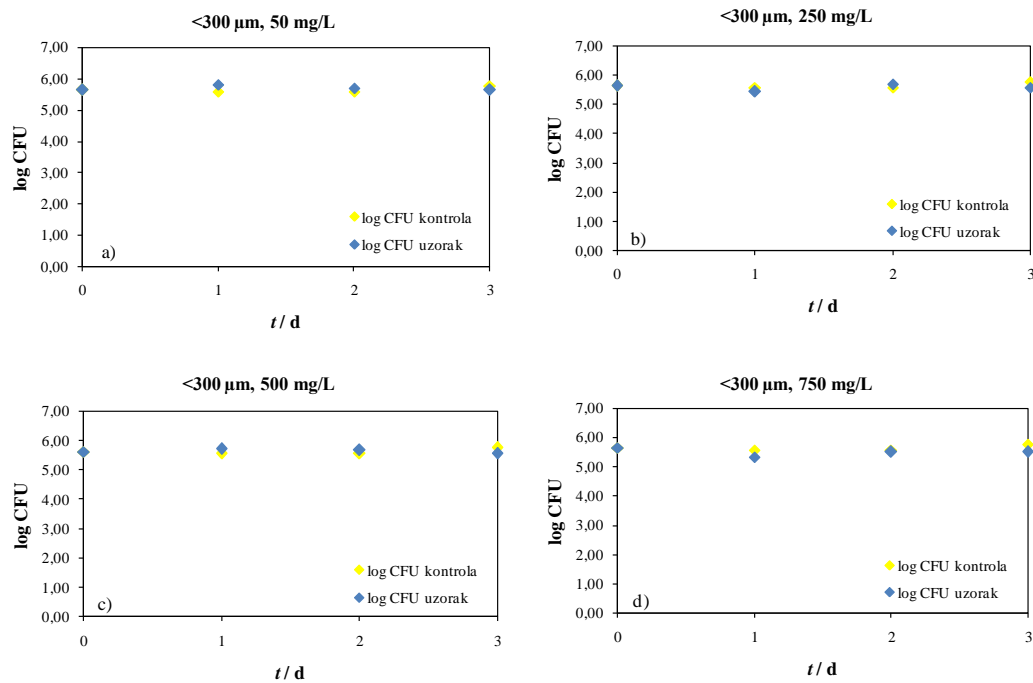


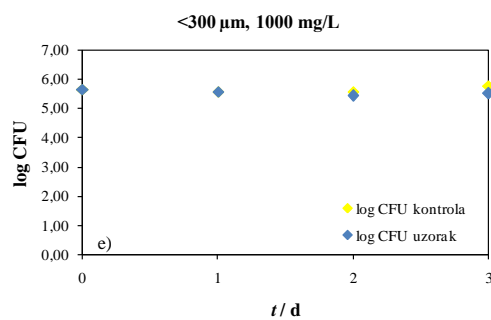
Slika 12. Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uzorak PET-a veličine čestica 500 – 710 μm , koncentracije: a) 50 mg/L, b) 250 mg/L, c) 500 mg/L, d) 750 mg/L i e) 1000 mg/L za kontrolu tijekom 3 dana.



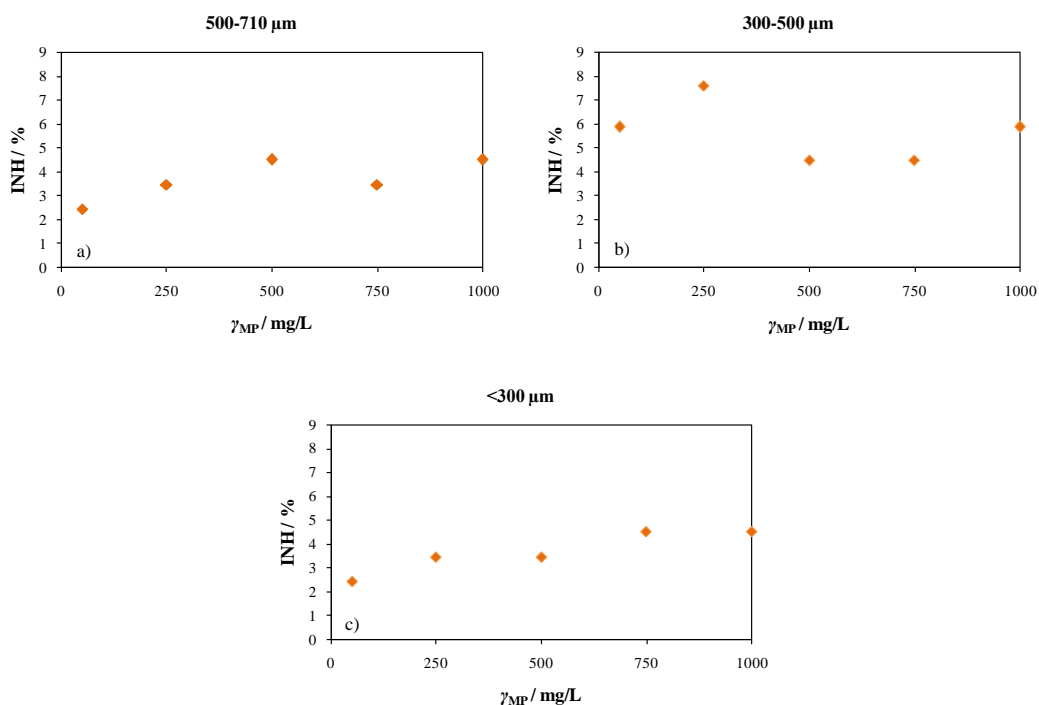


Slika 13. Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uзорak PET-a veličine čestica 300 – 500 μm , koncentracije: a) 50 mg/L, b) 250 mg/L, c) 500 mg/L, d) 750 mg/L i e) 1000 mg/L za kontrolu tijekom 3 dana.





Slika 14. Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uzorak PET-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 koncentraciju PET-a za veličine čestica: a) 500 – 710 μm, b) 300 – 500 μm i c) <300 μm.

5. RASPRAVA

Plastika općenito nalazi primjenu u raznim djelatnostima - u industriji, gospodarenju otpadom, kućanstvu i sl. te vrlo lako može završiti u okolišu i tako ga onečistiti. Zbog raznih procesa koji se događaju u okolišu može doći do razgradnje i prijenosa čestica mikroplastika u sve dijelove okoliša. Plastika koja se odbacuje u okoliš može imati štetne posljedice za živi svijet, odnosno može narušiti ekološku ravnotežu zbog svojih štetnih svojstava. Problem pri zbrinjavanju polimernog otpada leži ponajprije u tome što neprestano nastaju sve veće količine, a polimerni otpad uglavnom nije podložan biorazgradnji i ne može se uključiti u prirodne kružne tokove.⁴⁷ PET kao vrsta plastike je vrlo popularan polimer, materijal koji se smatra sigurnijim od ostalih plastičnih polimera i posljedično tome široko se koristi u proizvodima za jednokratnu upotrebu, ponajviše u ambalažne svrhe, ali i za proizvodnju mnogih drugih proizvoda. PET ima vrlo dobra mehanička, električna i toplinska svojstva i zbog toga ima veliku primjenu u svakodnevnom životu. Iako se smatra sigurnijim, svejedno ga nalazimo u velikim količinama u okolišu kao mikroplastiku.^{21,48} Istražena literatura slabo istražuje toksikološki utjecaj PET-a na vodeni ekosustav. Zbog svega navedenog, u ovome radu provodio se pokus ispitivanja toksičnosti PET-a na slatkovodnu mikroalgu *Scenedesmus* sp..

5.1. Analiza pokusa

U pokusu sa slatkovodnom mikroalgom *Scenedesmus* sp. određivala se toksičnost PET-a kojem se mikroalga izlagala tijekom 3 dana, a početni uvjeti prikazani su u tablici 3. Ispitivao se utjecaj PET-a veličine čestica <300 µm; 300 – 500 µm; 500 – 710 µm na inhibiciju rasta mikroalge.

Tijekom pokusa (3 dana) pratila se promjena broja stanica mikroalge, a na početku i na kraju pokusa pratile su se morfološke promjene stanica mikroalge, promjena pH – vrijednosti i promjena koncentracije otopljenoga kisika. Nakon provedenog pokusa nisu zabilježene značajne morfološke promjene, ali prilikom mikroskopiranja moglo se uočiti prirodno grupiranje stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. u 4 stanice u koloniji.¹ pH – vrijednost i koncentracija otopljenog kisika također se nisu značajno mijenjale u usporedbi s početnim uvjetima koji su dani u tablici 3 te sa tablicom 4 gdje su navedene vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika za 0. i 3. dan za svaki uzorak PET-a i kontrolnu tikvicu.

Mikroalga *Scenedesmus* sp. bila je izložena PET-u veličina <300 µm; 300 – 500 µm; 500 – 710 µm i koncentracijama 50 mg/L; 250 mg/L; 500 mg/L; 750 mg/L; 1000 mg/L. Slike

12, 13 i 14 prikazuju promjenu logaritamskog broja živih stanica *Scenedesmus* sp. Na slikama je vidljivo da ne dolazi do većih odstupanja, porasta ili smanjenja, u uzorcima u odnosu na kontrolni uzorak, odnosno nakon prvog dana došlo je do blagog porasta u većini pokusa, nakon drugog dana došlo je isto do blagog porasta u svim pokusima te je u trećem danu u svim pokusima došlo do smanjenja logaritamskog broja živih stanica mikroalge.

Pri izlaganju *Scenedesmus* sp. PET-u veličine čestica 500 μm – 710 μm , najveće smanjenje broja stanica mikroalge nakon trećeg dana izazvale su koncentracije od 500 mg/L i 1000 mg/L gdje se početni log CFU smanjio sa 5,63 na 5,51 što je prikazano na slici 12 c) i e). Kod veličina čestica 300 – 500 μm , najveće smanjenje broja stanica mikroalge nakon trećeg dana izazvala je koncentracija od 250 mg/L gdje se početni log CFU smanjio na 5,33 što je prikazano na slici 13 b). Kod veličina čestica <300 μm , najveće smanjenje broja stanica mikroalge nakon tri dana izazvale su koncentracije od 750 mg/L i 1000 mg/L gdje se početni log CFU smanjio na 5,51 što je prikazano na slici 14 d) i e).

Na slici 15 prikazana je inhibicija rasta mikroalge *Scenedesmus* sp. s obzirom na koncentracije čestica: 50 mg/L; 250 mg/L; 500 mg/L; 750 mg/L; 1000 mg/L, posebno za svaku veličinu čestica <300 μm ; 300 – 500 μm ; 500 – 710 μm . Primjećuje se da različite veličine čestica i koncentracije PET-a imaju različit utjecaj na inhibiciju rasta mikroalge *Scenedesmus* sp.. Kao što je prikazano na slici 15 pod a) kod čestica veličine 500 μm – 710 μm najviša inhibicija se javlja kod viših koncentracija (500 mg/L; 1000 mg/L), a iznosi 4,51 %, pod b) kod čestica veličine 300 μm – 500 μm najviša inhibicija se javlja kod manjih koncentracija (50 mg/L; 250 mg/L), a iznosi 5,89 % odnosno 7,63 % te pod c) se kod čestica veličine <300 μm najviši postotci inhibicije javljaju kod viših koncentracija (750 mg/L; 1000 mg/L), a iznosi 4,51 %. Najveća inhibicija u pokusu iznosila je 7,63 %, a izazvale su je čestice PET-a veličine 300 – 500 μm i koncentracija 250 mg/L.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da različite koncentracije i veličine čestica PET-a imaju različit utjecaj na mikroalgu, no broj stanica mikroalge u uzorcima i kontroli se nisu previše razlikovali odnosno nisu zabilježena veća smanjenja broja stanica mikroalge u odnosu na početni broj. U nekoliko slučajeva su pokusi s uzorcima PET-a sadržavali veći broj živih stanica mikroalge nego kontrolni pokus. Ova pojava se može objasniti činjenicom da *Scenedesmus* sp. može koristiti PET kao izvor ugljika za rast i razvoj.⁴⁹ Muslihuddin i suradnici i Song i suradnici su na temelju svojih istraživanja i dobivenih rezultata utvrdili da se pri izlaganju PET-a slatkovodnoj mikroalgi OG povećava, odnosno da PET pozitivno utječe na rast mikroalge.^{43,49}

Usporedbom inhibicije rasta PET-a za različite veličine čestica uočava se da se inhibicija za veličine čestica 500 μm – 710 μm i <300 μm povećala s porastom koncentracije te je najveći postotak inhibicije jednak za obje veličine, a najveća inhibicija rasta mikroalge zabilježena je kod veličine čestica 300 μm – 500 μm za koncentraciju 250 mg/L. Inhibicija ovisi o koncentraciji, veličini čestica i vremenu izloženosti. Mikroplastika ima slabi inhibicijski učinak na rast mikroalge.⁴³

Mikroalge su općenito odgovorne za primarnu proizvodnju u vodenim ekosustavima, glavni globalni izvor kisika i vrlo su važne za očuvanje prirodne ravnoteže. Čestice mikroplastike osim što mogu izazvati inhibiciju njihovog rasta kao što je dokazano u ovome radu, mogu izazvati i druge štetne učinke. Njihov utjecaj ovisi o količini i koncentraciji čestica, a razmatraju se štetni utjecaji poput oštećenja stanične stijenke (koja služi kao prepreka prodiranju čestica), negativni utjecaj na fotosintezu i slično.^{22,50} Međutim, ovo područje je još uvijek nedovoljno istraženo te je teško govoriti o konkretnim utjecajima mikroplastike pa tako i PET-a na mikroalge, ali očito je da negativan utjecaj, koji je potrebno još istražiti, postoji.

5. ZAKLJUČAK

Mikroplastika su malene plastične čestice veličine <5 mm i dijelimo ju na primarnu i sekundarnu mikroplastiku – proizlaze iz komercijalnih proizvoda (kozmetika, tekstil) i raspadanja većih plastičnih masa (boce za piće). Godine 1960. počinje masovna proizvodnja plastičnih materijala, njena primjena prisutna je u svim djelatnostima te nakon jednokratne uporabe ili kada se istroši bude odbačena u okoliš na neprihvatljiv način i s tom nemarnošću počinje doba kada plastične čestice postaju prijatna okolišu i organizmima u njemu.

Iako je oku nevidljiva, mikroplastika stvara probleme u okolišu jer njeni štetni učinci djeluju na biljke, životinje pa tako i na ljude jer putem hranidbenog lanca ulazi u naš organizam. Mikroplastične čestice imaju toksičan učinak na organizme, a on ovisi o vrsti i veličini mikroplastike te različitim kemijskim sastavom. PET kao plastični materijal, jednostavne je proizvodnje, zahvaljujući dobrim mehaničkim, električnim i toplinskim svojstvima koristi se u proizvodnji ambalaže za jednokratnu upotrebu.

Cilj ovog rada bio je odrediti toksičan utjecaj mikroplastičnih čestica PET-a veličina <300 μm ; $300 - 500$ μm ; $500 - 710$ μm i koncentracija 50 mg/L ; 250 mg/L ; 500 mg/L ; 750 mg/L ; 1000 mg/L na mikroalgu *Scenedesmus* sp. odnosno utjecaj parametra veličine čestica i koncentracije na inhibiciju rasta. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da veličina čestica i koncentracija imaju utjecaj na inhibiciju rasta mikroalge – najveća inhibicija rasta mikroalge zabilježena je kod veličine čestica $300 - 500$ μm za koncentraciju 250 mg/L . Broj stanica mikroalge u uzorcima i kontroli se nisu previše razlikovali odnosno nisu zabilježena veća smanjenja broja stanica mikroalge u odnosu na početni broj. Morfologija mikroalge *Scenedesmus* sp. se nije mijenjala.

Nakon provedenog pokusa i usporedbom dobivenih rezultata može se zaključiti da toksičan utjecaj PET-a na mikroalgu *Scenedesmus* sp. postoji. Usporedbom parametara može se zaključiti da se povećanjem koncentracije i smanjenjem veličine čestica povećava toksičnost PET-a. Međutim, utjecaj PET-a je još uvijek nedovoljno istražen i potrebno je provesti još istraživanja kako bi se utvrdio precizniji utjecaj na žive organizme pa tako i čovjeka.

6. LITERATURA

- [1] Rujnić – Sokele, M., Plastični otpad – globalni ekološki problem, *Polimeri*, 36 (1-2), 2015., 34-37
- [2] Bule, K., Zadro, K., Tolić, A., Radin, E., Miloloža, M., Ocelić Bulatović, V. i Kučić Grgić, D., Mikroplastika u morskom okolišu Jadrana, *Kemija u industriji*, 69 (5-6 (special issue)), 2020., 303-310
- [3] Raju, S., Carbery, M., Kuttykattil, A., Senathirajah, K., Subashchandrabose, SR., Evans, G., Thavamani, P., Transport and fate of microplastics in wastewater treatment plants: implications to environmental health, *Rev Environ Sci Bio/Technology*. 2018. 17, pp. 637–53.
- [4] Wu, WM., Yang, J., Criddle, CS., Microplastics pollution and reduction strategies, *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2017;11(1):6.
- [5] Lusher, A., Hollman, P., Mendoza- Hill, J., Microplastics in fisheries and aquaculture, *Food and Agriculture Organization of the United Nations* 615. 2017, 2070-7010.
- [6] Nerland, IL., Halsband, C., Allan, I., Thomas, K.V., Microplastics in marine environments: Occurrence, distribution and effects, Report No.6754-2014, 2014.
- [7] Zimmermann, L., Göttlich, S., Oehlmann, J., Wagner, M., & Völker, C.. What are the drivers of microplastic toxicity? Comparing the toxicity of plastic chemicals and particles to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 115392. 2020.
- [8] Flajšman, F., Janović, Z., Mencer, H.J., Vogl, O., Polimerijske znanosti u Hrvatskoj, *Polimeri*, 17(1996) 2, str. 93–96.
- [9] Čatić, I., Barić, G., Cvjetičanin, N., Galić, K., Godec, D., Grancarić, A.M., Andričić, B., *Polimeri – od prapočetaka do plastike i elastomera*, *Polimeri*, 31 (2), 2010, 59-70.
- [10] Pico, Y., Alfarhan, A., Barcelo, D., Nano- and microplastic analysis: Focus on their occurrence in freshwater ecosystems and remediation technologies, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 113, 2019, 409-425.
- [11] Oladejo, A., Analysis of microplastics and their removal from water, Helsinki Metropolia University of Applied Sciences. 2017.
- [12] Westphalen, H., Abdelrasoul, A., Challenges and Treatment of Microplastics in Water, *Water Challenges of an Urbanizing World*. InTech. 2018., 15.
- [13] Crawford, C. B., Quinn, B., Microplastics, standardisation and spatial distribution i The interactions of microplastics and chemical pollutants, *Microplastic Pollutants*, Amsterdam, 2017., str. 101–130, 131-157

- [14] LI, W. C., TSE, H. F., & FOK, L., Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects, *Science of The Total Environment*, 566-567, 333–349, 2016.
- [15] Lambert, S., Scherer, C., Wagner, M., Ecotoxicity testing of microplastics: considering the heterogeneity of physicochemical properties, *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 13 (2017), 470–475
- [16] Bhagat, J., Nishimura, N., & Shimada, Y., Toxicological interactions of microplastics/nanoplastics and environmental contaminants: Current Knowledge and Future Perspectives. *Journal of Hazardous Materials*, 123913, 2020.
- [17] Rujnić – Sokele, M., Izradba ambalaže od poli(etilen-tereftalata) te njezina uporaba i primjena u prehrambenoj industriji, *Polimeri*, 24 (2-4), 87-94, 2003.
- [18] Ptiček Siročić, A., Đurina, M. i Špoljarić, E., Oporaba pet ambalaže, *Environmental Engineering - Inženjerstvo okoliša*, 3 (1), 83-88, 2016.
- [19] ChemicalSafetyFacts.org, Types of Plastic Food Packaging and Safety: A Close-Up Look, <https://www.chemicalsafetyfacts.org/types-plastic-food-packaging-safety-close-look/> (pristup: 11.3.2021)
- [20] Radović, S., Malnović, Z., Razvoj odvojenoga sakupljanja i recikliranja ambalažnoga otpada od PET-a u Republici Hrvatskoj, *Polimeri*, 25 (1-2), 23-28, 2004.
- [21] Piccardo, M., Provenza, F., Grazioli, E., Cavallo, A., Terlizzi, A., & Renzi, M., PET microplastics toxicity on marine key species is influenced by PH, particle size and food variations, *Science of The Total Environment*, 136947, 2020.
- [22] *Plastics – the Facts 2020*, An analysis of European plastics production, demand and waste
dana, [PlasticsEurope, https://www.plasticseurope.org/application/files/8016/1125/2189/AF_Plastics_the_facts-WEB-2020-ING_FINAL.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/8016/1125/2189/AF_Plastics_the_facts-WEB-2020-ING_FINAL.pdf) (pristup: 25.3.2021)
- [23] McFarlane, F.E., *Thermoplastic Polyesters, Poly(ethylene terephthalate) (PET)*, Rubin, I.I., *Handbook of Plastic Materials and technology*, John Wiley & Sons, New York, 1990, 639-647
- [24] Janović, Z., *Polimerizacije i polimeri*, HDKI-Kemija u industriji, Kratis, Zagreb, 1997.
- [25] Awaja, F., Pavel, D., Recycling of PET, *European Polymer Journal*, 41(7), 1453–1477, 2005.
- [26] Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Oda, K., A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate), *Science*, 351(6278), 1196–1199, 2016.
- [27] Chisti, Y., Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306, 2007.

- [28] Brennan, L., Owende, P., Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577, 2010.
- [29] Meyen, F.J.F., Beobachtungen über einige niedere Algenformen. *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae* 14: 768-778, 1829.
- [30] Cenobij. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=11198> (pristup: 27.3.2021)
- [31] The Editors of Encyclopaedia Britannica, Green algae, <https://www.britannica.com/science/green-algae> (pristup: 27.3.2021)
- [32] Lürling, M., The Smell of Water: Grazer-Induced Colony Formation in *Scenedesmus*, Thesis. Agricultural University of Wageningen, 1999.
- [33] Martínez Sancho, M., Jiménez Castillo, J. M., El Yousfi, F., Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalga *Scenedesmus obliquus*, *Process Biochemistry*, 32(8), 657–664, 1997.
- [34] Wu, Y.-H., Yu, Y., Li, X., Hu, H.-Y., Su, Z.-F., Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. *Bioresource Technology*, 112, 193–198, 2012.
- [35] Fakhimi, N., Dubini, A., Reference Module in Life Sciences, 2020.
- [36] Sarawak Biodiversity Centre, *Scenedesmus* sp., 2019., <https://www.sbc.org.my/programmes/r-d-bioprospecting/187-english-categories/programmes/r-d-laboratories/algae-research/featured-algae/866-scenedesmus> (pristup: 27.3.2021)
- [37] Turk, D., Testovi toksičnosti na živim organizmima, Bioinstitut, 2018. <https://www.bioinstitut.hr/blog/biologija/testovi-toksicnosti-zivim-organizmima-102/> (pristup: 25.3.2021)
- [38] Reichelt, S., Gorokhova, E., Micro- and Nanoplastic Exposure Effects in Microalgae: A Meta-Analysis of Standard Growth Inhibition Tests. *Frontiers in Environmental Science*, 8., 2020.
- [39] Inhibicija. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=27450> (pristupljeno: 26.3.2021)
- [40] Liu, G., Jiang, R., You, J., C. G. Muir, D. and Y. Zeng, E., Microplastic Impacts on Microalgae Growth: Effects of Size and Humic Acid, *Environmental Science & Tehnology*, (2020), 54, 1782–1789.

- [41] Zhang, C., Chen, X., Wang, J., and Tan, L. (2017). Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastic and algae. *Environ. Pollut.* 220, 1282–1288.
- [42] Tunali, M., Nnaemeka Uzoefuna, E., Meric Tunali, M., Yeniguna, O., Effect of microplastics and microplastic-metal combinations on growth and chlorophyll a concentration of *Chlorella vulgaris*, *Science of The Total Environment*, Volume 743, 15 November 2020, 140479
- [43] Song, C., Liu, Z., Wang, C., Li, S., Kitamura, Y., Different interaction performance between microplastics and microalgae: The bio-elimination potential of *Chlorella* sp. L38 and *Phaeodactylum tricornutum* MASCC-0025, *Science of The Total Environment*, 723 (2020) 138146.
- [44] Duraković, S., *Uvod u opću mikrobiologiju*, Zagreb, 2020.
- [45] Sharma, R., Singh, G. P., Sharma, V. K., Effects of Culture Conditions on Growth and Biochemical Profile of *Chlorella Vulgaris*, *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 3 (2012) 131–137.
- [46] OECD, *Guideline for Testing of Chemicals*, 201. Alga, Growth Inhibition Test, 1984.
- [47] Ptiček Siročić, A., Kratofil Krehula, Lj., Katančić, Z., Rešček, A., Hrnjak Murgić, Z. i Jelenčić, J., Karakterizacija otpadnog poli(etilen-tereftalata) nakon alkalne obrade, *Kemijska Industrija*, 60 (7-8) 379–385 (2011).
- [48] Mandal, S., Dey, A., PET Chemistry, u: Thomas, S., Rane, A., Kanny, K., Abitha, V. K., Thomas, M. G., *Recycling of Polyethylene Terephthalate Bottles*, Indija, 2018., str. 1–22.
- [49] Muslihuddin, M., Hadiyanto, Muhammad, F., Khoironi, A., Afiati, N., The influence of micro plastic to *Chlorella* growth in difference aquatic systems, *Proceedings of the 2nd International Conference on Chemical Process and Product Engineering (ICCPPE)*, 2019.
- [50] Sjollema, S. B., Redondo-Hasselerharm, P., Leslie, H. A., Kraak, M. H. S., Vethaak, A. D., Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth?, *Aquatic Toxicology*, 170 (2016) 259–261.