

Primjena slatkovodne mikroalge *Scenedesmus* sp. za određivanje toksičnosti mikroplastičnih čestica polipropilena

Tavra, Dubravka

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:661949>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-11**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJI

Dubravka Tavra

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJI

Dubravka Tavra

**PRIMJENA SLATKOVODNE MIKROALGE *Scenedesmus* sp.
ZA ODREĐIVANJE TOKSIČNOSTI MIKROPLASTIČNIH
ČESTICA POLIPROPILENA**

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

Prije svega, zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić na stručnom vodstvu, konstruktivnim savjetima, riječima ohrabrenja i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se asistentici Martini Miloloži na strpljenju, trudu i uloženom vremenu prilikom rada u laboratoriju, ali i savjetima za izradu ovog rada.

Za kraj, veliko hvala mojoj obitelji, prijateljima te Studentskoj sekciji Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa koji su mi bili velika podrška i motivacija u dosadašnjem studiranju.

SAŽETAK

Plastika je zbog vrlo dobrih kemijskih i fizikalnih svojstava te isplative cijene doživjela eksponencijalni rast u proizvodnji i primjeni posljednjih 100 godina. No, sve što jednom nastane, neće nestati, stoga sukladno povećanoj proizvodnji nastaju i ogromne količine plastičnog otpada, koji nerijetko završava u okolišu, pogotovo vodenom i to nepravilno zbrinut. Raznim procesima u prirodi, nastaju čestice <5 mm koje se nazivaju mikroplastikom. Toksičan utjecaj tih čestica je dijelom dokazan, ali je veliki dio još uvijek neistražen.

U ovome radu provela su se toksikološka ispitivanja utjecaja mikroplastičnih čestica veličina 500-710 μm , 300-500 μm i <300 μm pri koncentracijama od 50 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L i 1000 mg/L na inhibiciju rasta mikroalge *Scenedesmus* sp.. Pratilo su se i morfološke promjene. Dobiveni rezultati ukazuju na to da je koncentracija čestica značajni parametar prilikom ispitivanja toksičnosti jer se povećanjem koncentracije jasno uočava i povećana inhibicija rasta. Najveća inhibicija rasta mikroalge *Scenedesmus* sp., 8,22%, prouzročena je pri najmanjoj veličini čestica, <300 μm , te pri koncentraciji od 750 mg/L. Tijekom pokusa nisu zabilježene značajne morfološke promjene mikroalge.

Ključne riječi: mikroplastika, polipropilen, ekotoksičnost, mikroalga, *Scenedesmus* sp.

ABSTRACT

Due to its very good chemical and physical properties, plastics have experienced an exponential growth in cost-effective production and application over the last 100 years. However, everything that appears once will not disappear, so correspondingly increased production also generates huge amounts of plastic waste, which often ends up in the environment, especially water where it is improperly disposed. By various processes in nature, particles <5 mm are formed which are called microplastics. The toxic effects of these particles have been partially proven, but a large part is still unexplored.

In this work, toxicological studies of the effects of microplastic particles of size 500-710 μm , 300-500 μm and <300 μm at concentrations of 50 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L and 1000 mg/L were performed to inhibit the growth of the microalgae *Scenedesmus* sp.. Morphological changes were also monitored. The obtained results indicate that the particle concentration is an important parameter when testing for toxicity because by increasing the concentration the growth inhibition also increases. The highest inhibition of microalgae growth of *Scenedesmus* sp., 8.22%, was produced with the smallest particle size <300 μm , at a concentration of 750 mg/L. No significant morphological changes of the microalgae were observed during the experiment.

Key words: microplastics, polypropylene, ecotoxicity, microalgae, *Scenedesmus* sp.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	2
2.1. Mikroplastika.....	2
2.1.1. Primarna mikroplastika.....	2
2.1.2. Sekundarna mikroplastika.....	3
2.2. Vrste i svojstva plastike i mikroplastike.....	4
2.2.1. Aditivi u mikroplastici	5
2.2.2. Adsorpcija onečišćujućih tvari na mikroplastiku	5
2.3. Polipropilen.....	6
2.3.1. Kemijska i fizikalna svojstva polipropilena	6
2.3.2. Primjena polipropilena	7
2.3.3. Polipropilen u okolišu	7
2.3.4. Utjecaj polipropilena na žive organizme	9
2.4. Mikroalge.....	9
2.4.1. Rod <i>Scenedesmus</i>	10
2.5. Ekotoksikologija.....	12
2.5.1. Razvoj ekotoksikologije	12
2.5.2. Testovi ekotoksičnosti	13
2.5.3. Testovi ekotoksičnosti na mikroalgama	14
3. Eksperimentalni dio.....	16
3.1. Materijali.....	16
3.1.1. Mikroplastika	16
3.1.2. Testni organizam	16
3.1.3. Mediji i kemikalije	17
3.2. Mjerni instrumenti i oprema	17
3.3. Metode rada	18

3.3.1. Priprema mikroplastike	18
3.3.2. Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom alge <i>Scenedesmus</i> sp.....	18
3.3.3. Mikroskopska analiza	20
4. Rezultati	22
4.1. Rezultati pokusa.....	22
5. Rasprava	26
5.1. Analiza pokusa.....	26
6. Zaključak.....	28
7. Literatura	29

1. Uvod

Svijet bez plastike danas je nezamisliv, no masovna proizvodnja i korištenje tog materijala krenula je još 1950-ih.¹ Nakon Drugog svjetskog rata uslijedio je snažan rast broja stanovništva i razvoj gospodarstva. Posljedično tome, stvarala se sve veća potreba za raznim resursima. Plastika je materijal odličnih svojstava koji se može primjenjivati gotovo svugdje, stoga je potražnja za tim materijalom u stalnom povećanju. Kao rezultat, proizvodnja plastike se podigla s 1,5 milijuna tona 1950. godine, na 322 milijuna tona 2015. godine, odnosno za gotovo 215 puta.² Prema istraživanjima od 2015. do 2017. godine stvoreno je približno 6300 Mt plastičnog otpada, od čega je oko 9% reciklirano, 12% je spaljeno, a 79% akumulirano na odlagalištima ili u prirodnom okolišu.^{1,3} Također se procjenjuje da je od početka proizvodnje plastike do 2017. proizvedeno 8300 milijuna Mt izvorne plastike, tj. one koja nije reciklirana ili ponovno upotrebljena.¹ Najveće skupine u ukupnoj proizvodnji plastike su polietilen, PE (36%), polipropilen, PP (21%) i polivinilklorid, PVC (12%), zatim polietilen tereftalat, PET, poliuretan, PUR i polistiren, PS (<10%).¹

No, iako je plastika materijal dobrih kemijskih i fizikalnih svojstava ima i svoje nedostatke. Zadnjih se godina sve više ovaj materijal spominje s negativnom konotacijom. Mala je mogućnost biorazgradnje, a kroz različite procese prelazi u mikroplastiku (MP) i nanoplastiku (NP), za koje je zabilježeno da su sveprisutne onečišćujuće tvari u okolišu i da pokazuju toksična svojstva.⁴ Zabilježeno je prisustvo MP-a u hrani namijenjenoj za prehranu ljudi i u uzorcima zraka. Dakle, ljudi, kao i ostali živi svijet izloženi su MP česticama, čiji se utjecaj na okoliš sve više ispituje jer je još uvijek velikim dijelom nepoznat.⁵

Kako bi se ispitali mogući štetni učinci nekog spoja ili tvari najčešće se provode testovi toksičnosti. Oni se mogu provesti *in vivo* ili *in vitro*, ovisno o svrsi istraživanja.⁶ Češće se provode *in vitro* testovi. Mogu se provoditi primjenom bakterija⁷ (npr. *Vibrio fischeri*), mikroalgi^{8,9} i drugih vodenih mikroorganizama. Toksičnost se često određuje na mikroalgama koje ukazuju na promjene cijelog ekosustava u kojemu se nalaze.^{8,9} Razvojem novih tehnologija koje uključuju računala, moguće je olakšati obradu rezultata. Zbog toga, sve se više primjenjuju računala i programi u kombinaciji matematičko-statističkim pristupom.^{10,11}

U ovom radu ispitala se akutna toksičnost polipropilena na slatkovodnu mikroalgu *Scenedesmus* sp. (OECD 201:1984) pri različitim veličinama i koncentracijama PP-a.

2. Opći dio

2.1. Plastika i mikroplastika

Prvu potpuno sintetičku plastiku napravio je 1907. godine Leo Baekeland.¹² Par desetljeća kasnije, došlo je do spoznaje da se pojavljuje plastika veličine <5mm. Kao novi pojam „*mikroplastika*“ se uvela još 1968., a tada je predstavljala deformaciju plastičnih materijala^{13,14}, no znanstvenici su ju 1970. godine definirali kao manje fizičke dijelove plastike, a to je pojam kojim ju i dan danas poznajemo.¹³

Konkretnija podjela plastike, koja je usvojena 2004. godine, prema veličini čestica je sljedeća: svi polimerni materijali čija se veličina kreće između 1 µm i 5 mm nazivaju se mikroplastikom (MP), veće od 5 mm skupini mezoplastike (MEP), a one veće od 1 cm skupini makroplastike (MAP).¹³ Postoje razne podjele mikroplastike, a osim prema veličini, vrlo je značajna i podjela prema podrijetlu na primarnu i sekundarnu mikroplastiku.¹⁴

2.1.1. Primarna mikroplastika

Primarnom MP nazivaju se one čestice koje se „namjerno“ proizvode i izravno se kao takve ispuštaju u okoliš.¹⁵ Ona se može primjenjivati u raznim proizvodima. Dodaje se u sredstva za čišćenje, kozmetičke proizvode poput gelova za tuširanje, piling preparata za tijelo i lice, paste za zube itd.¹⁵ PE i PP su prevladavajuće vrste plastike u ovim proizvodima, a koriste se za stabilizaciju emulzije, regulaciju viskoznosti i kondicioniranje kože.¹⁶ Isto tako, primarna MP koristi se i za propuhivanje mašina i motora kako bi se sa njih uklonila hrđa i boja te i u tehnologiji pjeskarenja.¹³ Čestice primarne MP najčešće imaju pravilan izgled, okruglasti ili vlaknasti i površina im je ravnomjerno raspoređena.¹³

Na globalnoj razini, godišnje se ispusti u prosjeku 1,5 (0,8 – 2,5) Mt primarne mikroplastike, a najveći dio dolazi od aktivnosti na kopnu, točnije od ispiranja sintetičkog tekstila i abrazije guma tijekom vožnje.¹⁶ U prilog tome idu podaci da jedan predmet sintetičkog tekstila može otpustiti čak više od 1900 plastičnih vlakana u samo jednom ciklusu pranja,¹⁴ a čak 30% mikroplastičnih čestica u vodnom okolišu potječe od abrazije guma.¹⁷ Nadalje, godišnja potrošnja vlakana za odjeću u svijetu iznosi 69,7 milijuna tona tj. oko 11 kg po stanovniku (2010).¹⁵ Globalna potrošnja sintetičke gume je porasla za 27,3% između 2002. i 2010., uglavnom pod vodstvom Kine, a prosječna potrošnja je 0,93 kg po čovjeku, iako se taj broj značajno razlikuje po regijama u svijetu.¹⁵ Osim ova dva, treći značajan izvor primarne mikroplastike je gradska prašina.¹⁵ Istraživanja su pokazala da i postrojenja za

pročišćavanje otpadnih voda igraju važnu ulogu u ispuštanju mikroplastike u okoliš, točnije iz mulja otpadnih voda, ali i kanalizacije. Te čestice su dovoljno male da prolaze kroz filtere za obradu voda i tako završe u već spomenutom aktivnom mulju.¹⁸ Taj isti mulj se dalje odlaže na određene površine, nerijetko i na poljoprivredne, što dovodi do toga da se čestice primarne mikroplastike tada mogu nalaziti i na takvim zemljištima. Problemi nastaju i prilikom ispiranja tla, ukoliko je ispod određene površine u blizini pitka voda. Ispiranjem mikroplastika lako može dospjeti u podzemne vode, a dalje i u izvore pitke vode.¹⁹

2.1.2. Sekundarna mikroplastika

Sekundarna mikroplastika je ona koja je nastala razgradnjom većih plastičnih proizvoda u manje čestice, odnosno nije izravno kao takva dospjela u okoliš.¹⁵ Ona čini većinu mikroplastike u okolišu.¹⁵ MAP proizvodi od kojih nastaje sekundarna MP su najčešće plastične vrećice, plastične boce, ribarske mreže.^{13,15} Procjenjuje se da čak 18% svog MP-a potječe od razgradnje plastične užadi tj. mreža.¹³ Razgradnja može biti posljedica utjecaja temperature, UV zračenja, mehaničkog djelovanja (strujanje valova, vjetar).¹⁸ Čestice sekundarne MP najčešće nemaju pravilan oblik kao što je to slučaj kod primarne MP. Vanjskim utjecajima mogu značajno promijeniti oblik i boju pa ih je zbog toga puno teže karakterizirati (slika 1).¹³ Upravo je boja jedan od pokazatelja stupnja onečišćenosti stoga je vrlo bitna karakteristika MP-a.¹³

Na globalnoj razini postoji problem sa sekundarnom MP. Ona konstantno nastaje razgradnjom MAP-a i taj proces je u stalnom porastu. Unatoč novom trendu smanjenja proizvodnje i korištenja plastičnih proizvoda, toliko plastičnog otpada je nastalo posljednjih desetljeća da će sekundarna MP samo od toga nastajati još jako dugi period.²⁰ Znanstvenici smatraju da su svi proizvodi od plastike koji su ikada proizvedeni, a nisu termički obrađeni tj. uklonjeni, još uvijek prisutni u okolišu.²¹ Posljedica je sve veće onečišćenje okoliša MP-om, posebice vodnog. Također, zbog premale veličine kao i u slučaju primarne MP, ove čestice mogu proći kroz filtere za obradu otpadnih voda i završiti u aktivnom mulju i pitkoj vodi te se tako lako prenijeti u ostatak okoliša.^{19,21}



Slika 1. Primjer primarne mikroplastike iz proizvoda za osobnu njegu (lijevo) i sekundarne mikroplastike nastale razgradnjom plastične čase (desno)¹⁴

2.2. Vrste i svojstva plastike i mikroplastike

Plastika je materijal koji nastaje preradbom nafte ili prirodnog plina, odnosno to je sintetski dobiven polimer sastavljen od monomera dobivenih ekstrakcijom navedenih sirovina.^{22,23} MP kao pojam obuhvaća skup komada plastike različitih veličina, oblika, boja, specifične gustoće, kemijskog sastava i drugih karakteristika.²⁴ Podjelom polimera prema načinu ponašanja pri visokim temperaturama poznate vrste su plastomeri, elastomeri i duromeri.²⁵ Najveći dio proizvedene plastike u svijetu čine plastomeri, kojima se zagrijavanjem do temperature mekšanja ili taljenja ne mijenja kemijska struktura.²⁶ Najpoznatiji i najviše primjenjivani plastomeri su PE, PP, PVC, PET, PUR i PS.¹ Samim time, najviše pronađene MP pronađene u okolišu pripada upravo navedenim vrstama. Izgrađeni su od linearnih ili granatih makromolekula velikih relativnih molekularnih masa, a mogu biti potpuno amorfni ili kristalasti.²⁶ Kemijska i fizikalna svojstva plastike su vrlo dobra pa i nije za čuditi da se masovno primjenjuje širom svijeta. Ovi polimeri su dobri toplinski i električni izolatori i lako se oblikuju i bojaju tijekom proizvodnje.²⁷ Velik utjecaj na ponašanje čestica MP-a u okolišu imaju njihova fizička svojstva : gustoća, veličina i oblik. Iz tog razloga, bitno ih je poznavati kako bi se što lakše predvidjelo gdje će čestice u konačnici završiti.²⁸

2.2.1. Aditivi u mikroplastici

Kako bi se poboljšala kemijska i fizikalna svojstva plastike dodaju joj se razni aditivi. Aditivi mogu uključivati usporivače gorenja kao što je polibrominiranidifenil eteri (PBDE) ili organske usporivače gorenja s fosforom i plastifikatore kao što su bis (2-etilheksil) ftalat (DEHP) i drugi ftalati. Benzofenoni i benzotriazoli, ultraljubičasti apsorberi i antioksidanti, kao što su BHT i Irganox, također se često dodaju proizvodima od plastike.^{29,30} Dokazano je kako su ovi aditivi štetni za ljude i okoliš, a otpuštaju se s MP-a kada dospije u prirodu.³⁰ Isto tako, MP može otpuštati i postojeane organske onečišćujuće tvari, POP, koje stvaraju velike probleme i zbog toksičnosti i zbog nemogućnosti razgradnje. No, aditivi koji se otpuštaju u okoliš čine manji dio štetnog utjecaja MP-a, dok puno veći problem stvaraju štetne tvari koje se adsorbiraju na MP i time povećavaju toksičnost čestica MP-a za čak nekoliko stotina puta.³¹

2.2.2. Adsorpcija onečišćujućih tvari na mikroplastiku

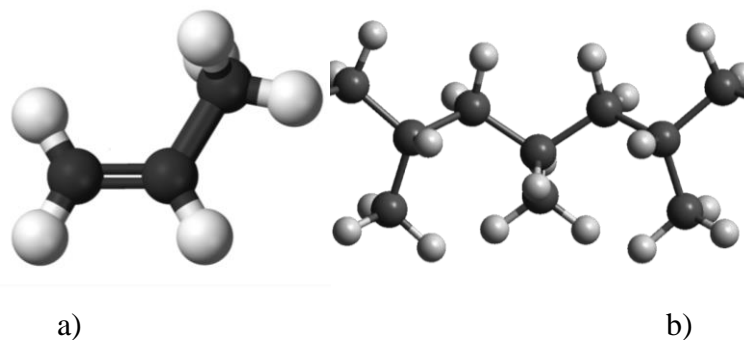
Postojanje MP-a u okolišu, a posebice u vodama posljednjih godina sve više zabrinjava znanstvenu zajednicu zbog sposobnosti adsorpcije drugih spojeva, uključujući teške metale, postojeane organske onečišćujuće tvari itd.³² Adsorpcija (lat. *adsorptio*: pripijanje), je proces u kojemu čestice plina ili kapljevine (atomi, molekule i ioni) bivaju privučene na površinu krutog tijela. Porozni ili granulirani materijali imaju veću sposobnost adsorpcije zbog povećane površine.³² Adsorpcija na MP je moguća zbog prisutnosti mikroplastičnih pora, čime se povećava aktivna površina, a veže se pomoću Van der Waalsovih sila.^{34,35} Tvari koje se vežu su teški metali, farmaceutici, policiklički aromatski ugljikovodici (PAH), poliklorirani bifenili (PBC), razni pesticidi, a među njima i poznato toksični diklordifeniltrikloretan (DDT).^{34,35,38} Dostupnost navedenih tvari u određenom sustavu određuje količinu koja će se adsorbirati na MP. Odnosno, što je više onečišćujućih tvari u okolišu to će ih se više i vezati za MP te će koncentracija istih biti veća.³⁶ Osim dostupnosti, značajan utjecaj na adsorpciju imaju i okolišni uvjeti. Dokazano je kako povećanje pH ima velik utjecaj na ubrzanje procesa adsorpcije.³⁵ Isto tako, MP koja se nalazi bliže izvoru onečišćujućih tvari sadržavat će veće koncentracije istih od one koja je udaljena od izvora, bez obzira na njezina svojstva.³⁵ Dokazano je da ostarjela MP ima veći adsorpcijski kapacitet zbog povećane površine i funkcija nakon dužeg izlaganja UV zračenju i ostalim okolišnim uvjetima.³⁶ Ponašanje MP-a mijenja se i dodatkom površinski aktivnih tvari, poput tenzida. Dodavanje tenzida može promijeniti fizikalna i kemijska svojstva MP-a, povećavajući mogućnost adsorpcije.

2.3. Polipropilen

Polipropilen je termoplastični materijal molekulske formule $(C_3H_6)_n$, nastao polimerizacijom monomera propilena (slika 2). Prisutan je u mnogim industrijama. Polipropilen se razlikuje u molekularnoj strukturi pa može biti izotaktički, sindiotaktički i ataktički.³⁹ Industrijski proizvodi temelje se na izotaktičkom polipropilenu, koji također uključuje kopolimer propilena i malu količinu etilena.³⁹

2.3.1. Kemijska i fizikalna svojstva polipropilena

PP je pogodan je za razne tehnike obrade što ga čini vrlo traženim materijalom.⁴⁰ Može se obraditi praktički svim metodama, uključujući injekcijsko prešanje, puhanje, ekstrudiranje, puhani i lijevani film, termoformiranje itd.⁴¹ Jedan je od najkorištenijih vrsta plastomera kao što je prethodno navedeno, a razlog tomu su također i umjereni troškovi izrade te vrlo dobra svojstva vidljiva u Tablici 1. Gustoća od $0,9 \text{ g/cm}^3$ čini ga jednim od najlakših plastomera.⁴¹ Njegova izvrsna kemijska svojstva uključuju otpornost na većinu organskih otapala, kiselina i baza, osim na vrlo jaka oksidirajuća sredstva. Dobra otpornost na zamor čini ga široko korištenim materijalom u dijelovima koji se često savijaju.^{42,43} Ispitivanja su pokazala da tanki dijelovi PP-a mogu izdržati više od milijun ponovljenih savijanja.⁴³ Isto tako, PP ima dobru otpornost na pucanje pod utjecajem okoliša.^{43,44} Zadržava mehanička i električna svojstva pri povišenim temperaturama, u vlažnim uvjetima i kada je uronjen u vodu tj. vodootporan je.⁴⁴



Slika 2. a) molekula monomera propilena i b) molekula polimera polipropilena⁴⁵

Nedostatak PP-a je mala udarna čvrstoća, posebice pri nižim temperaturama (već neznatno ispod $0 \text{ }^\circ\text{C}$).⁴⁴

Tablica 1. Karakteristike polipropilena^{46,47}

Karakteristike	Vrijednost
Temperature primjene	-40 do +160 °C
Otpornost na ulja	odlično/vrlo dobro
Otpornost na kemikalije	odlično/vrlo dobro
Otpornost na vodu	odlično/vrlo dobro
UV stabilnost	dobro/zadovoljavajuće
Otpornost na habanje	dobro
Opća otpornost na atmosferske utjecaje	dobro
Vlačna čvrstoća	33 MPa
Specifična težina	0,905 g/cm ³
Izduženje do prekida	400 %
Dielektrična čvrstoća	17,7÷33, 5 MV/m

2.3.2. Primjena polipropilena

Primjena PP-a je zaista široka. Čestice ovog plastičnog polimera koriste se kao vlakna, filmovi, niti i razni dijelovi za automobile. Primjenjuje se za potrebe krute ambalaže i ambalaže za hranu što danas ujedno predstavlja i najveći problem s nastalim otpadom. Isto tako, PP nalazi svoju primjenu i u medicinskim proizvodima.^{41,42} Upravo se u aktualnim kirurškim maskama mogu pronaći čestice PP-a, koji se nalazi u 2 od 3 sloja istih.⁴⁸ Česta je zamjena staklu i metalu, a koristi se i u velikim uređajima kao što su pećnice, perilice posuđa, hladnjaci i perilice rublja, te općenito u kućanskim potrepštinama.⁴¹

2.3.3. Polipropilen u okolišu

Za početak je potrebno napomenuti koliko otpada koji sadrži PP postoji i nastaje i koja količina od toga se u stvari ispravno zbrinjava kako bi se mogao dalje istraživati utjecaj na okoliš, a time i na sva živa bića.

Moderna plastika napravljena je s ciljem dugog vijeka trajanja, odnosno plastični proizvodi su dizajnirani i kemijski stabilizirani kako bi što duže trajali.⁴¹ Globalno tržište PP-a procijenjeno je na više od 80 milijardi \$ u 2014. godini, a prema istraživanjima očekuje se da će doseći 133,3 milijarde \$ do 2023. godine.⁴⁹ Podatak iz 2013. godine govori o potrošnji PP-a na globalnoj razini u prosjeku od 55 milijuna tona, a procjene statističara su da će potražnja za ovom vrstom plastike rasti u prosjeku za 3% godišnje do 2024. godine.⁵⁰ Ovakve brojke samo potvrđuju koliko će, sukladno tome, plastičnog otpada nastati jednom kada ti proizvodi budu odbačeni tj. izgube svoju prvobitnu funkciju. Mnogi PP proizvodi završavaju u morima i oceanima tj. vodnom okolišu, a javljaju se i u sedimentima na plažama.⁵¹ Na morska staništa utječu plastični ostaci koji se u geografskom smislu brzo šire i akumuliraju u oceanskim žirovima, tj. velikom sustavu kružnih oceanskih struja.⁵¹ Raspodjela tih ostataka u moru ovisi o različitim mehanizmima, uključujući vjetrove, struje, geografske karakteristike obale i ljudske čimbenike poput urbanizacije i trgovačkih ruta.⁵¹ Broj plastičnih ostataka i PP-a i ostalih vrsta plastike u Sredozemnom moru i Atlantskom oceanu je vrlo visok što se pripisuje i prirodnim i ljudskim čimbenicima.⁵² Od 20 najonečišćenijih rijeka svijeta, čak sedam rijeka nalazi se u Kini, a četiri rijeke u Indoneziji, što samo potvrđuje činjenicu o antropogenom utjecaju s obzirom na to da je u tim područjima gustoća stanovništva ogromna, a isto tako i industrija vrlo proširena.⁴⁷ Sedimentacija je također vrlo bitna pojava kada se govori o akumulaciji MP-a u okolišu. Područje niske turbulencije koje se podudara sa zonom konvergencije kretanja sedimenata morskog dna favorizirat će sedimentaciju, stvarajući zonu akumulacije.^{53,54} Jedno od svojstava PP-a je i već spomenuta mala gustoća, odnosno specifična težina. Iako se to smatra pozitivnim u industriji zbog lagane obrade i korištenja istog, u okolišu to stvara još veće probleme. Čestice PP-a su vrlo lagane i zato lebde u vodnom okolišu. S obzirom na to da su izrazito poletne, lako se prenose i dospijevaju u sve dijelove vodnog okoliša.⁵¹ Međutim, plastika male gustoće može se naći i na morskom dnu. Na površini PP-a često koloniziraju (mikro)organizmi pri čemu se stvara biofilm što dovodi do povećanja gustoće i sedimentacije na dno.⁵⁵ Znanstvenici su otkrili da se biofilm razvija na površini plastike već nakon jednog tjedna, a ta se mikroba gustoća znatno povećava nakon tri tjedna. Kad plastika dosegne određenu gustoću, dio toga tone na morsko dno, a neki ostaci zaostaju u vodenom stupcu zbog turbulencije.⁵⁶

Osim u vodi, znatno onečišćenje plastikom primijećeno je i na plažama. Istraživanjima iz 2011. sedimenta plaža uz Belgijsku obalu utvrđena je prosječna koncentracija MP-a od 92,8 čestica/kg suhog taloga, a vlakna su činila preko 88% (82,1 čestica/kg) od ukupno prikupljenih plastičnih ostataka. Pretpostavlja se da su analizirana vlakna bili najlon, polivinil

alkohol i PP, koji se uglavnom dobivaju iz ribarskih mreža, tepiha i užadi.⁵⁷ Utvrđeno je da je nakupljanje MP-a u sedimentu na plažama Južne Koreje nakon kišne sezone bilo veće od one prije kišne sezone.⁵⁶ Uz to, smjerovi vjetra i oceanskih struja važne su odrednice razine onečišćenja MP-om na plažama. Isto tako, više predmeta od plastike uočeno je na vjetrovitim plažama u usporedbi sa zavjetrinskim plažama.^{57,58}

2.3.4. Utjecaj polipropilena na žive organizme

Mnoga znanstvena istraživanja pokazuju da je gutanje i zapletanje plastike glavna fizička opasnost za morsku faunu, uključujući zooplanktone i organizme na višoj trofičkoj razini.^{50,60,61} Plastični ostaci pronađeni su u više vrsta širom svijeta, uključujući morske ptice, kornjače, rakove i ribe.⁵⁰

Prije svega, MP, a tako i čestice PP-a, predstavljaju i fizičku i kemijsku opasnost za žive organizme. Fizički učinci uključuju blokadu crijevnog trakta, inhibiciju izlučivanja želučanog enzima, smanjene podražaje hranjenja, smanjenu razinu spolnih hormona, neuspjeh reprodukcije.⁶²⁻⁶⁴ Gutanje rijetko dovodi do trenutne smrti u organizmima, međutim, kronični učinci imaju dugoročne posljedice.⁶⁴ Morske ptice su jedna od najosjetljivijih vrsta na gutanje plastike. Rezultirajuće nakupljanje plastike i MP-a u njihovom gastrointestinalnom traktu na kraju dovodi do gastrointestinalne blokade ili problema s podražajima hranjenja.⁴⁸ Vrste koje se hrane površinski, poput galebova i burnjaka, unose veće količine PP-a koji se nalazi na površini.⁵¹ Zooplanktivorous ribe, na primjer mali auk (*Alle alle*), također su osjetljive na gutanje plastike, a MP im otežava razlikovanje zooplanktona, amfipoda, veslonošaca i MP ostataka.⁶⁵ Uz to, MP također može prijanjati na kožu ribe i preći u druge dijelove organizma, kao što su škrge, jetra i mišići.⁶⁵ Dokazano je i da se vrlo fine MP-e čestice mogu prenijeti kroz stanice u krvotok i limfni sustav, što rezultira raspršivanjem MP-a po cijelom organizmu., a tada je osim fizičke opasnosti izražena i ona kemijska zbog mogućeg otpuštanja aditiva i drugih onečišćujućih tvari vezanih na čestice plastike.⁶⁶

2.4. Mikroalge

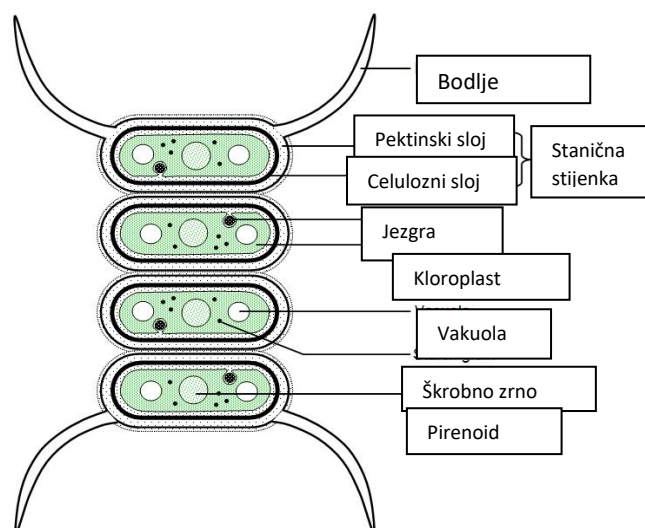
Alge su na dnu prehrambenog lanca i najvažniji su primarni proizvođači u vodenim ekosustavima.⁶⁷ Mikroalge proizvode oko polovice ukupno proizvedenog kisika godišnje.⁶⁸ Kao primarni proizvođači, sve promjene mikroalgi u slatkovodnom i morskom okruženju u konačnici utječu na strukturu i funkciju vodenih ekosustava, stoga su njihovi biološki pokazatelji važni za praćenje i procjenu kakvoće vodnog okoliša.^{67, 69}

Alge mogu biti višestanični ili jednostanični oblik živih organizama. Ubrajaju se u prokariotske ili eukariotske mikroorganizme široke biološke raznolikosti.⁷⁰ Mogu se podijeliti u makro ili mikroalge na temelju njihove veličine. Mikroalge su upravo jedan od najranijih oblika života na Zemlji.⁷⁰ Karakterizira ih jednostavna stanična građa koja se sastoji od stanične stijenke i membrane, ali nemaju oblikovanu jezgenu ovojnicu.⁷¹ Jednostavna stanična struktura mikroalgi osigurava brz i uspješan rast u nepovoljnim uvjetima okoline te su stoga prisutne u najrazličitijim i najekstremnijim primjerima ekosustava.⁷⁰

Trenutno se zna da postoji preko 50 000 različitih vrsta mikroalgi. Njihove različite morfološke i fiziološke karakteristike omogućavaju njihovu primjenu u različitim biotehnološkim procesima.⁷² One su obnovljivi, održivi i ekonomični izvori biogoriva, bioaktivnih medicinskih proizvoda i sastojaka hrane.⁷³

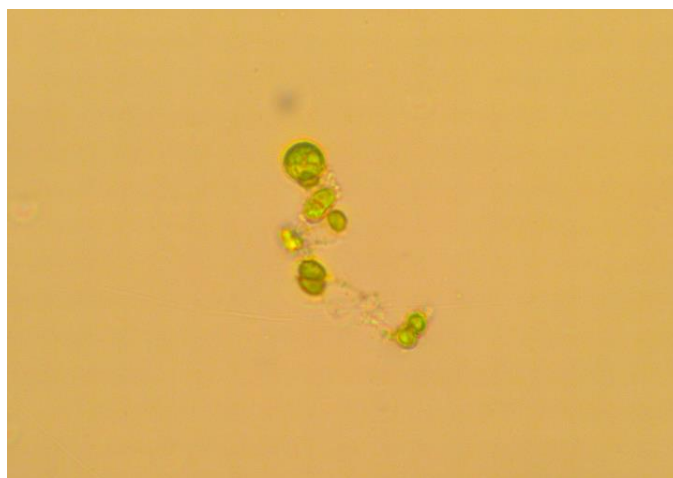
2.4.1. Rod *Scenedesmus*

Rod *Scenedesmus* broji oko 70 vrsta zelenih algi (porodica *Scenedesmaceae*, red *Sphaeropleales*, razred *Chlorophyceae*, koljeno *Chlorophyta*).^{74,75} *Scenedesmus* je jedan od najčešćih rodova slatkovodnih algi, međutim izuzetno raznolike morfologije koje se nalaze unutar vrsta otežavaju identifikaciju istih. Većina vrsta nalazi se širom svijeta no određene vrste postoje samo u lokalnim populacijama poput *Scenedesmus intermedius* i *Scenedesmus serratus* koje se nalaze na Novom Zelandu.⁷⁵ *Scenedesmus* može postojati kao jednostanični organizam, a često se nalazi i u cenobiji od četiri ili osam stanica.⁷⁵ Koenocitna stanica ili otvorena kolonija naziva se *coenobium* (množina cenobija), a većina cenobija sastoji se od različitog broja stanica, često kao višestruki od dvije (4, 8, itd.) U dobrim uvjetima češće se pronalaze kao jednostanični, no u slučaju nepovoljnih uvjeta, kada su smanjene mogućnosti rasta, nalaze se u cenobiji od 8 stanica.^{75,76} Razmnožavanje se odvija putem nepokretnim spora koje se nazivaju autospore.⁷⁴ Anatomija *Scenedesmus*a prikaza je na slici 3.



Slika 3. Anatomija *Scenedesmus*⁷⁷

Scenedesmus sp. uobičajena je slatkovodna zelena mikroalga.⁷⁸ Ona je nepokretna, a veličina varira ovisno o morfologiji.⁷⁶ Fizičke karakteristike prikazane su u Tablici 2. Koristi se kao pokazatelj onečišćenja i može se lako prilagoditi i dobro rasti u onečišćenoj vodi pa čak i u kanalizaciji.^{79,80} Upravo zbog sposobnosti brze prilagodbe i mogućnosti manipulacije svojim metabolizmom može se lako prilagoditi prisutnosti potencijalno štetnih tvari pa se široko koristi i u ekotoksikološkim istraživanjima.⁸¹ Nalazi se u svježim i slatkim vodama bogatim hranjivim tvarima.⁷⁸ Poznato je kako se mikroalge koriste i u industrijske svrhe, a tako i *Scenedesmus* sp. Pokazalo se kako je ova mikroalga pogodna za proizvodnju biodizela.⁸² Mikrofotografija mikroalge *Scenedesmus* sp. prikazana je na slici 4, a vidljivi su cenobiji od 2 stanice.



Slika 4. Mikrofotografija mikroalge *Scenedesmus* sp., P = 400x

Tablica 2. Fizičke karakteristike mikroalge *Scenedesmus* sp.^{76,83-85}

Veličina i brojnost	Ovisno o morfologiji: ravna ili blago zakrivljena cenobija koja se sastoji od 2-32 stanice koje su linearno ili bočno poredane u 1 ili 2 reda i obično okružene sluzi, npr. <i>Scenedesmus acutus</i> može biti duljine (5 - 13 μm) i širine (2,3 - 6 μm).
Bičevi (flagele)	Nema
Pokretljivost	Nepokretna
Oblik	Različiti oblici morfologije - linearni, kostulatoidni, izmjenični, nepravilni ili daktilokokoidni

Općenito, mikroalge se nerijetko koriste za testove ekotoksičnosti, a to vrijedi i za *Scenedesmus* sp. Primijećeno da vrste roda *Scenedesmus* podnose veću toksičnost u usporedbi s ostalim uobičajeno dostupnim slatkovodnim vrstama algi poput *Chlorella* sp.⁸⁶

2.5. Ekotoksikologija

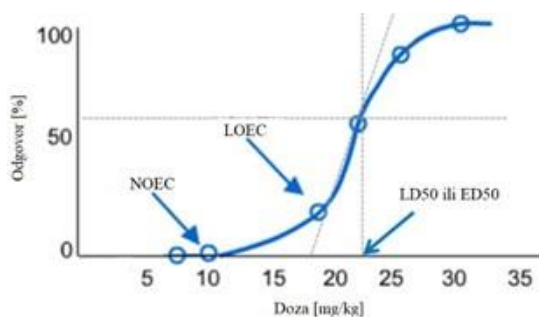
2.5.1. Razvoj ekotoksikologije

Toksikologija je započela kao znanstveno područje za razumijevanje trovanja otrovnim kemikalijama, hranom, biljkama i životinjama koje su uzrokovale štetne učinke na zdravlje ljudi.⁸⁷ Brzo je znanost napredovala pa je došlo do uže podijele na kliničku toksikologiju, forenzičku toksikologiju, industrijsku toksikologiju, toksikologiju okoliša, farmaceutske toksikologiju i eksperimentalnu toksikologiju.⁸⁸ Ovakav razvoj doveo je do novog multidisciplinarnog područja nazvanog ekotoksikologija. Ono integrira biološke informacije, ekološke pojmove i toksikološke aspekte onečišćenja okoliša u ekosustavu.⁹³ Ekotoksikologija obuhvaća temeljna istraživanja o učincima otrovnih kemikalija na populacije, zajednice i kopneni, slatkovodni i morski ekosustav. Razjašnjava mehanizme i procese kojima onečišćujuće tvari djeluju na ekosustave i ispituje izazvani utjecaj. Ekotoksikološki podaci doprinose razumijevanju ekološkog rizika i mogu ukazati na moguće nove pristupe regulaciji i kontroli otrovnih tvari u različitim ekosustavima.^{89,90,91,92} Pojam "ekotoksikologija" skovao je René Truhaut 1969. godine definirajući ga kao "*grana toksikologije koja se bavi proučavanjem toksičnih učinaka uzrokovanih prirodnim ili sintetičkim onečišćujućim tvarima na sastavnice ekosustava, uključujući ljude, životinje, biljke i mikroorganizme*".⁹³

2.5.2. Testovi ekotoksičnosti

Ispitivanja toksičnosti koriste se kako bi se procijenio učinak nekog onečišćenja na opstanak, rast, reprodukciju i ponašanje na ispitivanim organizmima. Ovi testovi mogu pomoći utvrditi jesu li koncentracije onečišćujućih tvari u medijima dovoljno visoke da uzrokuju smrtonosne, subletalne ili općenito štetne učinke na organizme.⁸⁷ Svi testovi toksičnosti moraju se provoditi u skladu s zakonskom regulativom.⁸⁷ Testove ekotoksičnosti možemo podijeliti na *in vivo* i na *in vitro* testove. Ukoliko se određuje utjecaj na organizam u cjelini provodi se *in vivo* test, a ukoliko se određuje utjecaj na pojedini dio organizma onda se primjenjuje *in vitro* test.⁹⁴ *In vivo* testovi na većini kralježnjaka su zabranjeni, stoga se većina testova provodi *in vitro*.

Dvije glavne organizacije zadužene za propise ovakvih istraživanja su ISO i OECD. Propisuju metode provođenja testova toksičnosti i dopušteno vrijeme izlaganja organizama tvarima koje se ispituju.⁹⁵ Određeno je da se testovi inhibicije rasta na algama mogu provoditi 72 h, a na ribama i njihovim embrijima 96 h.¹⁰⁰ *In vivo* testovi sve više su u primjeni. Osim već spomenutog problema *in vitro* testova s ispitivanjima na evolucijskim razvijenijim kralježnjacima i problema sa zaštitom životinja, oni su i jeftiniji i brži te omogućuju ponovljive, brze i precizne rezultate.⁹⁶ Ono što je ključno u svakom istraživanju tj. eksperimentu je da se postupak može ponoviti i da je to kontrolirani proces. *In vitro* testovi vrlo jednostavno omogućuju navedene uvjete, stoga su odličan izbor za provođenje testova ekotoksičnosti.⁹⁶ Nakon obavljenog testa ekotoksičnosti, crta se krivulja doza-odgovor. Pomoću ove krivulje moguće je odrediti najnižu dozu ili koncentraciju tvari koja se ispituje i koja izaziva prvi učinak, a isto tako i najveću dozu ili koncentraciju bez učinka.^{97,98} Cilj ispitivanja (eko)toksičnosti je najčešće odrediti LD₅₀ i ED₅₀. LD₅₀ označava dozu tvari koja je uzrokovala smrt kod 50 % jedinki izloženih toj tvari, a ED₅₀ je efektivna doza koja uzrokuje negativan učinak kod 50% ispitivanih jedinki.¹⁰² Najniža doza koja izaziva učinak naziva se LOEC, a najviša doza koja ne izaziva učinak NOEC.¹⁰² Izgled krivulje *doza-odgovor* prikazan je na slici 5. s označenim parametrima.



Slika 5. Krivulja *doza-odgovor* s ključnim parametrima⁹⁹

2.5.3. Testovi ekotoksičnosti na mikroalgama

S obzirom na to da su mikroalge nositelji vodenih ekosustava, ispitivanja na njima mogu pružiti informacije i uvid o cijelom ekosustavu u kojemu se one nalaze.^{67,69} Osim inhibicije rasta, na mikroalgama se mogu pratiti i morfološke promjene, oksidativni stres, oštećenje DNA, smanjenje klorofila i inhibicija fotosinteze.¹⁰⁰

Jedan od testova ekotoksičnosti rađen je upravo na mikroalgi *Scenedesmus* sp. Ispitala se toksičnost dibutil ftalata, organske tvari koja se pronalazi adsorbirana na površini čestica MP-a. S jedne strane, dokazana je inhibicija rasta mikroalge *Scenedesmus obliquus* pri izloženosti u vremenu od 96h, a ED₅₀: 0,21 µg/L.¹⁰¹ No, s druge strane kao što je već i spomenuto ranije, neka istraživanja pokazuju kako mikroalge ipak mogu razgraditi neka onečišćenja. Pokazalo se da neke slatkovodne alge i cijanobakterije mogu sintetizirati organska onečišćenja koja su često adsorbirana na površini MP čestica i osloboditi ih u izvanstanični medij pod uvjetima oksidativnog stresa.¹⁰² Iako su ovakvi rezultati djelomično kontradiktorni, to može implicirati na različite obrambene mehanizme i razne biološke reakcije i odgovore mikroalgi u različitim rasponima koncentracija onečišćujućih tvari.¹⁰¹

Istraživao se i utjecaj PP-a. Toksičan utjecaj dokazan je i na slatkovodnim, a i na morskim mikroalgama, a u tablici 3. su prikazani rezultati nekih istraživanja. Naime, izloženost PP-u pokazala je smanjeni rast mikroalgi i smanjenu mogućnost fotosinteze.¹⁰³ Smanjena mogućnost fotosinteze direktna je posljedica smanjene koncentracije klorofila prilikom izlaganja mikroalgi MP česticama PP-a.^{103,104} Dokazano je kako su koncentracija, veličina čestica i vrijeme izlaganja mikroalgi MP-u glavni faktori koji utječu na spomenute pojave. Istraživanja su pokazala kako je inhibicija sadržaja klorofila bila veća pri višim koncentracijama PP-a, a time i smanjena mogućnost fotosinteze.¹⁰³ Postoje dva moguća razloga za ovakvu pojavu. Prvi je nakupljanje unutarstaničnih reaktivnih molekula kisika koje oštećuju staničnu strukturu i blokiraju sintezu klorofila. Drugi je taj što MP-e ima veliku aktivnu površinu i jaku adsorpcijsku sposobnost, stoga bi mikroalge i MP-e mogli tvoriti heteroagregate te bi se na taj način sposobnost mikroalgi za fotosintezom inaktivirala.⁶⁶ Pokazano je i da pod utjecajem MP-a dolazi do smanjenja brzine prijenosa elektrona u stanicama mikroalgi što dovodi do nakupljanja tih istih elektrona, a to dovodi do povećane razine reaktivnih molekula kisika. Visoka razina tih molekula potiče peroksidaciju lipida na staničnoj membrani. Dakle, alge su u stanju oksidativnog stresa.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ S druge strane, neka istraživanja su pokazala da MP-e može služiti kao supstrat za rast algi, što može pospješiti rast istih i da nema nužno negativnog učinka MP-a na njih.^{108,109} Također se pokazalo da

negativni učinci MP-a na fotosintezu mikroalgi u određenom trenutku dođu do najveće vrijednosti, a zatim oslabe.¹⁰⁴

Smatra se da plastika postaje novo stanište za mikroorganizme, uključujući i mikroalge, stoga se testovi ekotoksičnosti provode i u tom smjeru, istražujući kolonizaciju mikroalgi na površinu plastike i mikroplastike.¹¹⁰ Istraživanja pokazuju kako se zajednice mikroalgi razlikuju prilikom rasta na plastičnim podlogama (PP,PE,PS) od onih na staklenim podlogama ili pak od nekih drugih materijala.¹¹¹

Tablica 3. Ekotoksikološka istraživanja PP-a primjenom mikroalgi.

Naziv mikroalge	Veličina PP [µm]	Koncentracija PP [mg/L]	Učinci
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	64 - 236	5-500	Smanjen sadržaj klorofila, nema značajnih promjena u rastu ¹⁰⁴
<i>Microcystis flosaquae</i>	64 - 236	5-500	Smanjen sadržaj klorofila, nema značajnih promjena u rastu ¹⁰⁴
<i>Chlorella sp.</i>	74	200	Smanjen sadržaj klorofila, blaga inhibicija rasta ¹¹²
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	74	200	Smanjen sadržaj klorofila, blaga inhibicija rasta ¹¹²

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroplastika

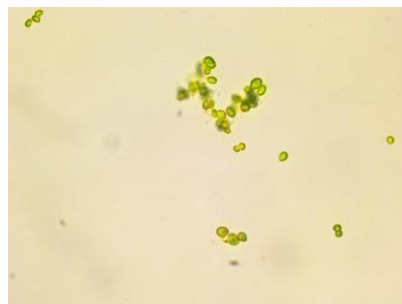
Za određivanje toksičnosti MP-a koristila se plastika oznake PP koja je dobivena usitnjavanjem makroplastike (MAP). Usitnjavao se plastični pribor za jelo koji je imao oznaku tražene vrste plastike (PP) prikazan na slici 6.



Slika 6. Plastični pribor od PP-a koji se koristio za dobivanje MP-a.

3.1.2. Testni organizam

Test toksičnosti provodio se primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp., čija je mikrofotografija prikazana na slici 7. Navedena kultura pohranjena je u zbirci Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 7. Mikrofotografija mikroalge *Scenedesmus* sp. snimljena u nultome danu pomoću svjetlosnog mikroskopa, 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. pH-vrijednost BM-a je podešena na 8,0 pomoću 1 M NaOH. Tako pripremljen BM se sterilizirao prije upotrebe.

Etanol

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

3.2. Mjerni instrumenti i oprema

- U radu je korištena rotacijska tresilica LAUDA-GFL Gesellschaft model 3005, Njemačka, za provedbu pokusa u šaržnim uvjetima.
- 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, 500 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 BM, hranjive podloge, čistog staklenog posuđa, kao i onečišćenog posuđa, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija.
- U svrhu aeriranja mikroalge *Scenedesmus* sp. korištena je aeracijska pumpa Tetrtec, a za osvjetljenje alge koristila se lampa.
- U radu je korištena magnetska tresilica WiseStir MSH – 20A kod podešavanja pH – vrijednosti BM-a.
- U pokusima je pH-vrijednost određivana 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

Makroplastika prvo je usitnjena škarama na manje komade te se zatim usitnjavala u blenderu uz dodatak mrog leda. Usitnjene čestice mikroplastike PP-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: 500-710 μm ; 300-500 μm ; <300 μm . U svrhu sterilizacije mikroplastike, određene mase PP-a izvagale su se u Erlenmeyerove tikvice od 100 mL u koje se dodao 70 % etanol te su tikvice stavljene na rotacijsku tresilicu tijekom 15 min pri 160 o/min i sobnoj temperaturi. Čestice mikroplastike PP-a su zatim bile izdvojene iz etanola i isprane sterilnom deioniziranom vodom primjenom vakuum filtracije uz sterilnu tehniku rada. Mikroplastika zaostala na sterilnom membranskom filtru (veličine pora 0,45 μm) se zatim pomoću sterilne žlice i pincete prebacila u tikvice volumena 250 mL za postavljanje pokusa sa *Scenedesmus* sp..

3.3.2. Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom alge *Scenedesmus* sp.

Pokus se provodio na termostatiranoj rotacijskoj tresilici pri 22 ± 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 12/12 tijekom 10 dana¹, kao što je prikazano na slici 8.



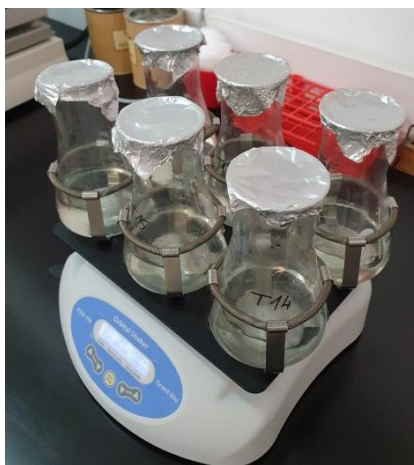
Slika 8. Uzgoj mikroalge *Scenedesmus* sp..

Broj živih stanica mikroalgi (CFU) iznosio je nakon 10 dana $9,8 \times 10^5$ st/mL. CFU (st/mL) određivao se izravnim brojanjem u Thominoj komorici, tako da su se brojale mikroalge unutar 3 kvadrata, a ukupan broj živih stanica određivao se prema formuli:

$$N = \frac{m \cdot n \cdot 16 \cdot 10^4}{K}$$

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 uzgojene suspenzije alge priređivala se suspenzija za pokus čiji je početni CFU iznosio $6,4 \times 10^5$ st/mL, odnosno čija je početna optička gustoća u BM-u iznosila 0,03, a određivala se spektrofotometrijski pri $\lambda = 670$ nm.¹¹³ Tikvice su sadržavale suspenziju alge, BM i mikroplastiku PP, kao što je prikazano na slici 9. Pokus se provodio prema OECD 201:1984.¹¹⁴ Za pokus je bila postavljena i slijepa proba koja nije sadržavala čestice PP-a. Tijekom provedbe pokusa svaki dan je praćen CFU, a nulti i treći dan određivala se i pH-vrijednost, koncentracija otopljenoga kisika i optička gustoća (OG).



Slika 9. Određivanje toksičnosti polipropilena (PP) primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp..

Tablica 4. Početni uvjeti za pokus određivanja toksičnosti polipropilena (PP) primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp..

γ_{MP} / mg/L	50; 250; 500; 750; 1000
veličina MP-e / μm	500-710; 300-500; <300
pH-vrijednost / -	8,33
γ (O ₂) / mg/L	8,61
log CFU ₀ / -	5,80
OG ₀ /-	0,03

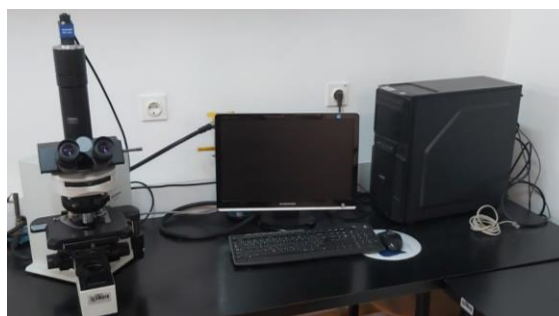
Izračunate su vrijednosti logaritamskog broja živih stanica, log CFU, za početne uvjete (tablica 4.) i nakon 3 dana . Računala se i inhibicija rasta alge upotrebljavajući log CFU kontrole i uzorka. Inhibicija rasta izražavala se u postotku, a računala se prema formuli:

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

gdje log CFU(kontrola) predstavlja logaritamski broj živih stanica alge u kontrolnoj tikvici, a log CFU(uzorak) logaritamski broj živih stanica alge u tikvici s uzorkom, tj. s mikroplastikom PP.

3.3.3. Mikroskopska analiza

Mikroskopskom analizom su praćene morfološke karakteristike mikroalge *Scenedesmus* sp.. Mikroalga se mikroskopirala na način da se pomoću Pasteur pipete izuzela kapljica uzorka suspenzije alge i BM-a. Pripremao se nativni preparat za 3.dan provedbe pokusa. Pripremljeni preparat je mikroskopiran pod ukupnim povećanjem od 400× na mikroskopu prikazanom na slici 10.



Slika 10. Prikaz svjetlosnog mikroskopa pomoću kojeg su se mikroskopirale mikroalge *Scenedesmus* sp..

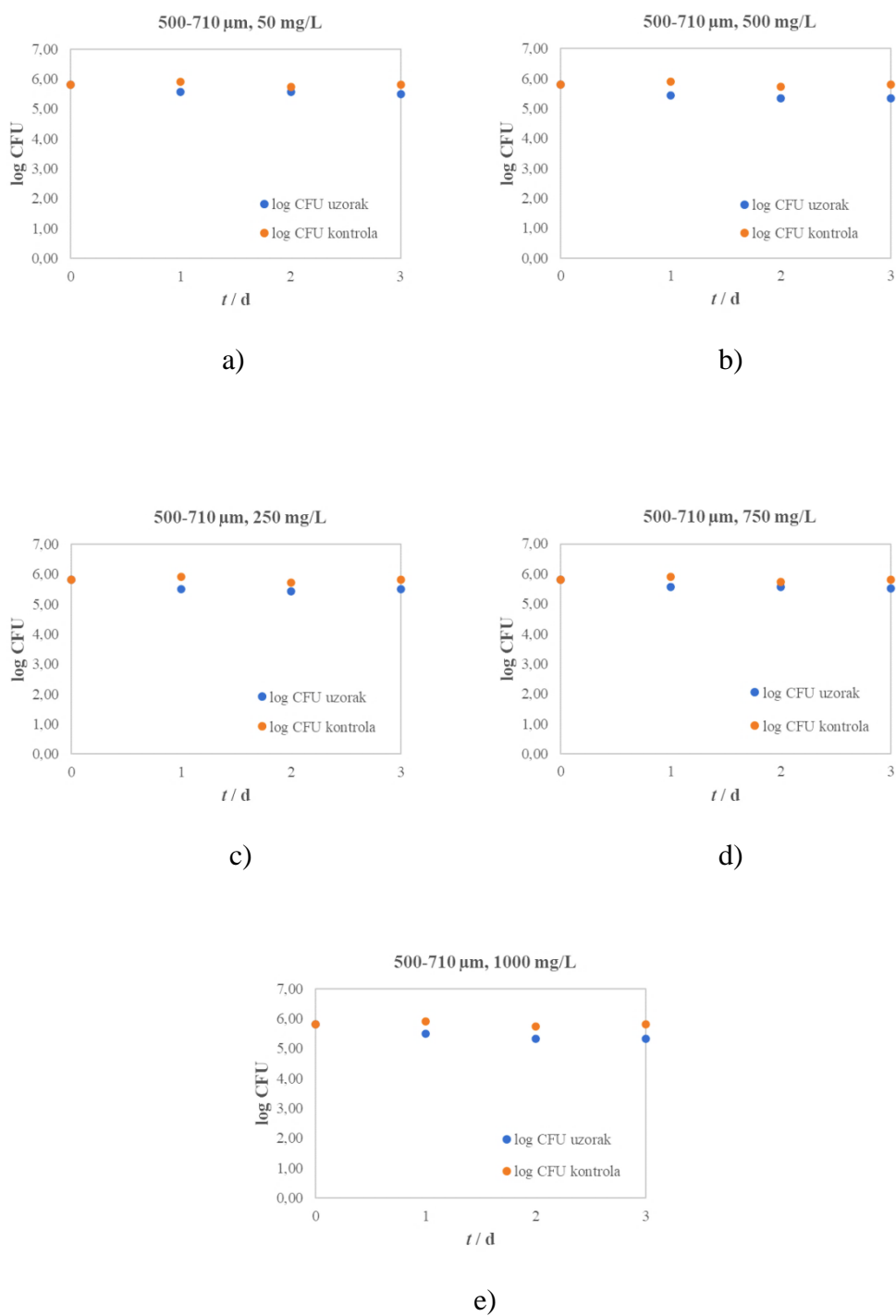
4. Rezultati

4.1. Rezultati pokusa

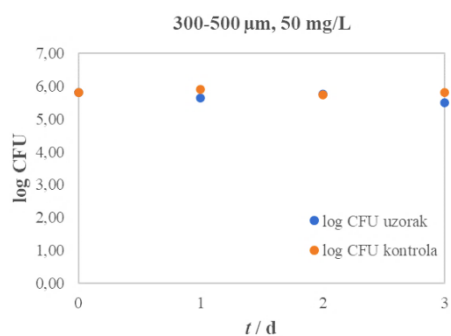
Primjenom mikroalge *Scenedesmus* sp. pratila se toksičnost PP-a. Tijekom pokusa pratila se promjena broja živih stanica CFU tri dana što je i prikazano na slikama 11, 12 i 13, a na 14. slici je prikazana inhibicija rasta s obzirom na koncentraciju PP-a za različite veličine čestica. Također se pratila promjena pH – vrijednosti i koncentracije otopljenoga kisika na početku i na kraju pokusa tj. nulti i treći dan. U tablici 5 prikazani su podaci nultog i trećeg dana za pH – vrijednost i koncentraciju kisika za određenu veličinu i koncentraciju PP-a.

Tablica 5. Prikaz temperature i dobivenih podataka pH – vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika za nulti i treći dan za svaki uzorak PP-a i slijepe probe (SP).

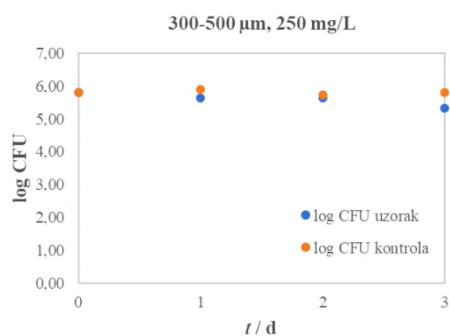
<i>t</i> / d		pH-vrijednost / -	$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	<i>T</i> / °C
0		8,331	8,61	23,4
3. dan				
500-710 μm	50 mg/L	7,881	8,86	22,1
	250 mg/L	7,919	8,63	22,1
	500 mg/L	7,862	8,87	22,3
	750 mg/L	8,126	8,6	23,3
	1000 mg/L	7,918	8,48	23,6
300-500 μm	50 mg/L	8,112	8,66	22,9
	250 mg/L	8,116	8,71	23,1
	500 mg/L	7,834	8,76	23,2
	750 mg/L	7,861	8,54	23,5
	1000 mg/L	7,825	8,69	22,0
<300 μm	50 mg/L	7,807	8,81	21,7
	250 mg/L	8,052	8,75	21,8
	500 mg/L	7,793	8,72	21,8
	750 mg/L	8,081	8,7	22,1
	1000 mg/L	8,095	8,74	21,9
Slijepa proba		8,057	8,82	21,9



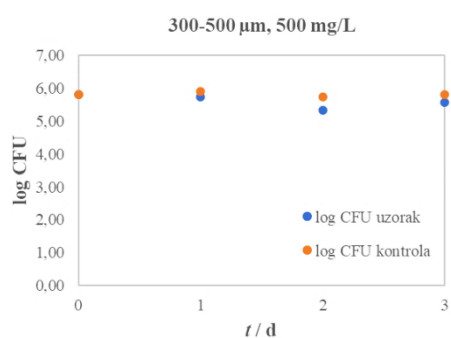
Slika 11. Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uzorak PP-a veličine čestica 500-710 μm , koncentracije: a) 50 mg/L, b) 250 mg/L, c) 500 mg/L, d) 750 mg/L i e) 1000 mg/L te za kontrolu tijekom 3 dana.



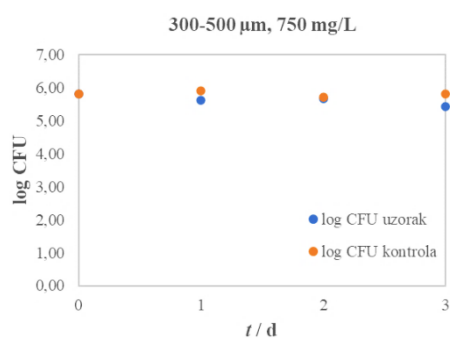
a)



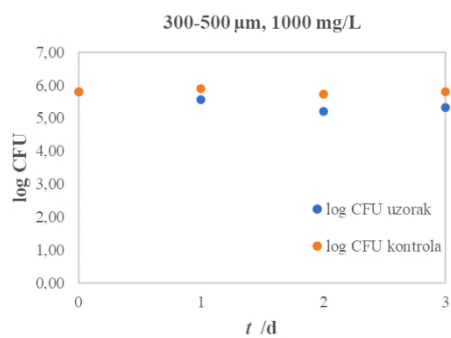
b)



c)

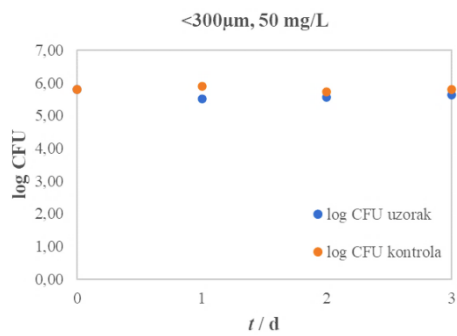


d)

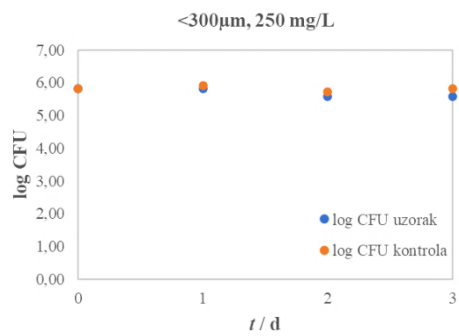


e)

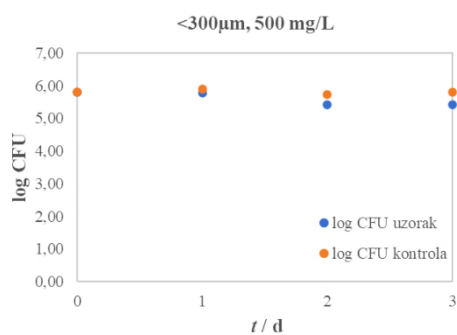
Slika 12. Promjena logaritamskog broja živih stanica mikroalge *Scenedesmus* sp. za uzorak PP-a veličine čestica 300-500 μm , koncentracije: a) 50 mg/L, b) 250 mg/L, c) 500 mg/L, d) 750 mg/L i e) 1000 mg/L te za kontrolu tijekom 3 dana.



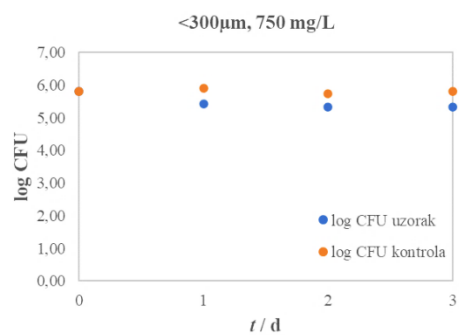
a)



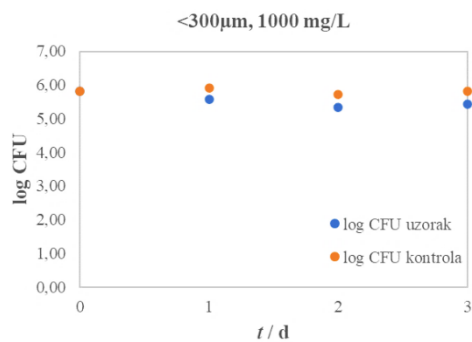
b)



c)

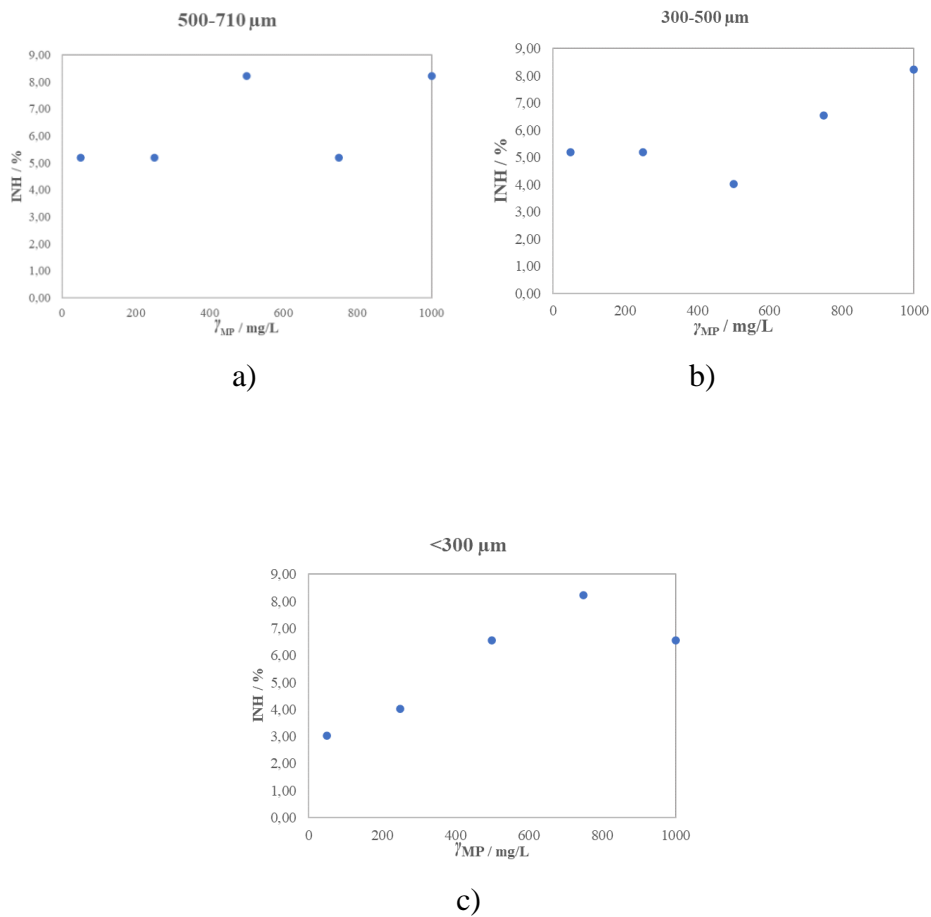


d)



e)

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



Slika 14. Promjena inhibicije rasta mikroalge *Scenedesmus* sp. s povećanjem koncentracije za uzorak PP-a veličine čestica a) 500-710 μm , b) 300-500 μm i c) <300 μm .

5. Rasprava

Poznavajući kemijska i fizikalna svojstva plastike, može se zaključiti kako su to materijali odličnih svojstava. Upravo iz tog razloga, godišnja proizvodnja i potrošnja rastu posljednjih desetljeća. Posljedično nastaju i velike količine plastičnog otpada koje nerijetko završe u okolišu gdje mogu negativno utjecati na žive organizme.¹¹⁵ Zato se istražuje utjecaj plastike tj. mikroplastike na živi svijet u kojem nažalost završi. U ovom istraživanju proveli su se pokusi ispitivanja toksičnosti mikroplastike, PP-a, na slatkovodnu mikroalgu *Scenedesmus* sp.. Način provedbe ovih pokusa, kao i praćeni parametri, opisani su u poglavlju 3. *Eksperimentalni dio*.

5.1. Analiza pokusa

U ovome pokusu, slatkovodna mikroalga *Scenedesmus* sp. izlagala se mikroplastici PP-a tijekom 3 dana, a početni uvjeti prikazani su u tablici 4. Ispitivao se direktan utjecaj PP-a veličine čestica 500-710 μm , 300-500 μm , <300 μm na inhibiciju rasta mikroalge. Pratile su se i morfološke promjene no tijekom pokusa nisu zabilježene značajne morfološke promjene mikroalge.

Slike 11., 12. i 13 prikazuju promjenu logaritamskog broja živih stanica mikroalge (CFU) po danima u usporedbi s kontrolom tijekom 3 dana. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da različite koncentracije i veličine PP-a imaju različite utjecaje na mikroalgu. U slučaju praćenja CFU, kod svih veličina primijećen je isti trend, a to je da se CFU blago smanjio tijekom 3 dana provođenja pokusa. Ipak, najveće promjene primijećene su pri najvećoj koncentraciji od 1000 mg/L (slike 11. e), 12. e) i 13. e)). Kod najveće veličine čestica, 500-710 μm , najveći pad log CFU ostvaren je između prvog i drugog dana, sa 5,51 na 5,33. Također i kod veličine 300-500 μm , drugi dan je uočena najveća promjena, log CFU je bio 5,20 u usporedbi s prvim danom kada je bio 5,57. Kod najmanje veličine čestica, <300 μm , do najvećeg pada log CFU došlo je isto u drugom danu, s 5,57 na 5,33. Postoji više provedenih istraživanja kojima bi se rezultat blagog smanjenja CFU mogao objasniti. Jedno od njih je proučavalo utjecaj različitih vrsta mikroplastike, polistirena i poli(metil-metakrilata) na mikroalgu *Scenedesmus* sp.. Dokazano je kako mikroalge izlučuju egzopolimerne tvari (EPS) kojima mogu flokulirati čestice MP i tako stvarati agregate tj. nakupine čestica.¹¹⁶ Dakle, one imaju potencijal flokulirati MP. Na taj način može se objasniti da nije bilo većeg utjecaja PP-a na broj živih stanica mikroalgi jer su ih uspjele flokulirati i tako spriječile mogući toksičan utjecaj jer tvari iz MP-a nisu uspjele doprijeti do njihovih stanica s obzirom na to da su bile

okružene EPS-om. No, treba uzeti u obzir da istraživanje nije ispitivalo učinak konkretno PP-a pa se ove činjenice trebaju dodatno istražiti. Prema tome, rod *Scenedesmus* ima potencijala koristiti ugljik koji je i sastavni dio PP-a kao tvar za rast¹¹⁷. Mikroalge mogu razgraditi plastične materijale kroz posebne sustave ili preko enzima koje sintetiziraju same mikroalge. Plastične polimere koriste kao izvore ugljika.¹¹³ Istraživanja pokazuju da je zelena mikroalga *Scenedesmus dimorphus* uspjela razgraditi 3,74% polietilena.¹¹⁸

Slika 14 prikazuje grafove ovisnosti inhibicije rasta mikroalge prema povećanju koncentracije MP-a. Vidljivo je kako za svaku veličinu MP-a vrijedi isti trend, a to je da se inhibicija povećava s povećanjem koncentracije MP-a. Inhibicija rasta pri najmanjoj koncentraciji (50 mg/L) za veličinu 500-710 μm je 5,18%, a pri najvećoj koncentraciji (1000 mg/L) je 8,22%. Za iste koncentracije kod veličine 300-500 μm inhibicija je 5,18 odnosno 8,22. Povećanje inhibicije je primjetno i kod najmanje veličine, <300 μm , gdje je inhibicija s 3,03% porasla na 6,55% (slika 14). Najveća inhibicija rasta (8,22%) primijećena je pri najmanjoj veličini čestica, <300 μm pri koncentraciji od 750 mg/L (slika 14. c). Istraživanja idu u prilog tom rezultatu, jer dokazuju da se toksičnost MP-a povećava porastom koncentracije, i smanjenjem veličine MP-a.^{120,121} Trend porasta inhibicije rasta moguć je iz više razloga. MP može poremetiti mehanizme u tim živim organizmima, reducirajući mogućnost apsorpcije hranjivih tvari.¹¹⁹ Osim toga, dokazano je da čestice MP-a imaju i druge, štetne učinke na mikroalge. Osim inhibicije rasta, vidljive su i druge promjene: smanjenje fotosintetske učinkovitosti i indukcije oksidativnog stresa u mikroalgama⁷.

6. Zaključak

Zbog izvrsnih svojstava i ekonomske isplativosti, plastika ima široku primjenu u industriji. Sve masovnija proizvodnja i upotreba dovode do toga da sve više plastike završava u okolišu, jer sve što se proizvede, kasnije se mora i zbrinuti. Posebice se u posljednje vrijeme počela proučavati MP i njen utjecaj na okoliš. Iako je male veličine i neprimjetna je ljudskom oku, ona ipak predstavlja veliku opasnost za živi svijet, pogotovo u vodama.

Cilj istraživanja bio je odrediti toksičnost mikroplastike PP-a primjenom slatkovodne alge *Scenedesmus* sp. Provedbom pokusa i usporedbom dobivenih rezultata može se zaključiti da toksičan utjecaj mikroplastike na ispitivani organizam postoji. Najveća inhibicija rasta mikroalge *Scenedesmus* sp., 8,22%, prouzročena je pri najmanjoj veličini čestica PP-a, <300 µm, pri koncentraciji od 750 mg/L.

Dobiveni rezultati ukazuju na to da je koncentracija čestica značajni parametar prilikom ispitivanja toksičnosti jer se povećanjem koncentracije jasno uočava i povećana inhibicija rasta, a primijećen je i najveći broj živih stanica (log CFU) pri najvećim koncentracijama.

Prema svemu navedenom može se zaključiti da se povećanjem koncentracije i smanjenjem veličine čestica povećava toksičnost mikroplastike PP-a. Treba ipak uzeti u obzir i činjenicu da ovo područje nije još dovoljno istraženo kako bi se donijeli precizniji zaključci o utjecaju mikroplastike PP-a na žive organizme.

7. Literatura :

- [1.] R. Geyer, J.R. Jambeck, K. Lawender Law , Production, use, and fate of all plastics ever made, *Science Advances* , 2017., 3 (7)
- [2.] Europski parlament, Plastični otpad i reciklaža u EU-u: Činjenice i brojke <https://www.europarl.europa.eu/news/hr/headlines/society/20181212STO21610/plasticni-otpad-i-reciklaza-u-eu-u-cinjenice-i-brojke> (pristup 8.3.2021.)
- [3.] D. Hoornweg, P. Bhada-Tata, C. Kennedy, Environment: Waste production must peak this century. *Nature* 502, 615–617 (2013).
- [4.] Alimba, C. G., Faggi, C., Microplastics in the marine environment: current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68 (2019) 61-74.
- [5.] Wright S.L., Kelly F.J., Plastic and Human Health: A Micro Issue?, *Environmental Science & Technology*, 2017, 51 (12), 6634– 6647
- [6.] Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Schnekenburger, J., Kanno, J. Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo, *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*, 2017., 51–82.
- [7.] Gabrielson J., Assessing the toxic impact of chemicals using bacteria, *Microbiology and Tumor Biology Center (MTC)*, 2004.
- [8.] Eguchia K., Nagaseb H., Ozawaa M., Endoha Y. S.,Gotoa K.,Hiratab K., Miyamotob K.,Yoshimuraa H., Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae, *57(2004.)*, 1733-1738
- [9.] Das, R. N., & Roy, K., Predictive modeling studies for the ecotoxicity of ionic liquids towards the green algae *Scenedesmus vacuolatus*, *Chemosphere*, 104 (2014), 170–176
- [10.] Bezerra, M. A., Lemos, V. A., Novaes, C. G., de Jesus, R. M., Filho, H. R. S., Araújo, S. A., Alves, J. P. S., Application of mixture design in analytical chemistry, *Microchemical Journal*, 152 (2019) 104336.
- [11.] Lin Y.C., Liu G., A new mathematical model for predicting flow stress of typical high-strength alloy steel at elevated high temperature, *48 (2010)*, 54-58
- [12.] Usahanunth N.,Tuprakay S., The transformation of waste Bakelite to replace natural fine aggregate in cement mortar, *6 (2017)*, 120-133
- [13.] Crawford, C. B., Quinn, B., Microplastics, standardisation and spatial distribution i The interactions of microplastics and chemical pollutants, u: *Microplastic Pollutants*, Amsterdam, 2017., 101–130, 131-157.
- [14.] Nerland I. L.,Halsband C.,Allan I., Thomas K. V., Microplastics in marine

- environments: Occurrence, distribution and effects, *Akvaplan-niva*, 2014., 6754-2014
- [15.] Boucher J., Friot D., Primary Microplastics in the Oceans, A Global Evaluation of Sources, 2017.
- [16.] Westphalen H., Abdelrasoul A., Challenges and Treatment of Microplastics in Water, *Water Challenges of an Urbanizing World*, 2018.,str.72-81
- [17.] Sommer F., Dietze V. , Baum A., Sauer J. ,Gilge S., Maschowski C., Gieré R., Tire Abrasion as a Major Source of Microplastics in the Environment , *Aerosol and Air Quality Research*, 2018., 2014–2028
- [18.] Jaikumara G., Bruna R.N., Vijvera M. G., Boskerab T., Reproductive toxicity of primary and secondary microplastics to three cladocerans during chronic exposure, *Environmental Pollution*, 249 (2019), 638-646
- [19.] Sun, J., Dai, X., Wang, Q., van Loosdrecht, M. C. M., Ni, B. J., Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal, *Water Research*, 152 (2019) 21-37
- [20.] Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T. S., Microplastics as contaminants in the marine environment: A review, *Marine Pollution Bulletin*, 62 (2011) 2588-2597
- [21.] Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. 2009.,364 (1526), 1985–1998
- [22.] Guo, X., Wang, J., The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review, *Marine Pollution Bulletin*, 142 (2019) 1–14.
- [23.] Nguyen, T., Evaluation of environmental conditions on the sorption of PAHs onto synthetic and natural fibres, *University of Science and Technology*, 2019.
- [24.] Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3060–3075.
- [25.] Rogić, A., Čatić, I., Godec, D., *Polimeri i polimerne tvorevine*, Zagreb, 2008.
- [26.] *Plastomeri*. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=48622> (pristup 16.3.2021.)
- [27.] Bozsaky, D., The historical development of thermal insulation materials. *Periodica Polytechnica Architecture*, 41(2), 2010
- [28.] Chubarenko, I., Bagaev, A., Zobkov, M., Esiukova, E., On some physical and dynamical properties of microplastic particles in marine environment, *Marine Pollution Bulletin*, 108 (2016) 105–112.

- [29.] Kitahara K. – I., Nakata H., Plastic additives as tracers of microplastic sources in Japanese road dusts, *Science of The Total Environment*, (736)2020, 139694
- [30.] Cherif Lahimer, M., Ayed, N., Horriche, J., Belgaied, S., Characterization of plastic packaging additives: Food contact, stability and toxicity, *Arabian Journal of Chemistry*, 10 (2017) 1938–1954.
- [31.] Nguyen, T., Evaluation of environmental conditions on the sorption of PAHs onto synthetic and natural fibres, Master's thesis in Environmental Toxicology and Chemistry, Norwegian University of Science and Technology, Norveška, 2019., str. 1-26.
- [32.] Ashton, K., Holmes, L., Turner, A., 2010. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 2050–2055.
- [33.] Adsorpcija. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=566> (pristup 22.3. 2021.)
- [34.] Godoy, V., Blázquez, G., Calero, M., Quesada, L., Martín-Lara, M.A., The potential of microplastics as carriers of metals. *Environmental Pollution*. 255 (2019), 113363
- [35.] Purwiyanto A., I., S., Suteja Y., Trisno, Nigrum P. S., Putri W. A. E., Rozirwan, Agustriani F., Fauziah, Cordova M. R., Koropitan A. F., Concentration and adsorption of Pb and Cu in microplastics: Case study in aquatic environment, *Marine Pollution Bulletin*, 158 (2020), 111380
- [36.] Gao, F., Li, J., Sun, C., Zhang, L., Jiang, F., Cao, W., Zheng, L., Study on the capability and characteristics of heavy metals enriched on microplastics in marine environment. *Marine Pollution Bulletin*. 144 (2019)
- [37.] Q. Wang, Y. Zhang, X. Wangjin, Y. Wang, G. Meng, Y. Chen, The adsorption behavior of metals in aqueous solution by microplastics effected by UV radiation, *J. Environmental. Science*. 87 (2020) 272–280.
- [38.] Shen M., Song B., Zeng G., Zhang Y., Teng F., Zhou C., Surfactant changes lead adsorption behaviors and mechanisms on microplastics, *Chemical Engineering Journal*, V 405 (2021), 126989
- [39.] Kauffman G. B., Major industrial polymers, *Encyclopedia Britannica*, 2016.
- [40.] Bailey, M.S., Brauer, D., Polypropylene: New Array of Polymer Variations Expand End-use Applications, *Modern Plastics Encyclopedia 1995*, reference book (M603.1.5) – McGraw-Hill, 1994.
- [41.] Maier C., Calafut T, Polypropylene, 1998., str. 3-9, 27-47
- [42.] Shell Polypropylene Injection Molding Guide, supplier design guide, Shell Chemical Company, 1989.

- [43.] Portnoy, R.C., The Gamma Radiation Tolerance of Polypropylene: Measurement and Enhancement, Medical Plastics and Biomaterials, trade journal – Canon Communications, 1996.
- [44.] <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polypropylene-pp-plastic#Properties> (pristup 20. 3. 2021.)
- [45.] <https://pediaa.com/difference-between-propylene-and-polypropylene/> (pristup 20. 3. 2021.)
- [46.] http://gasket.hr/documents/PP_tablica.pdf
- [47.] Svojstva i primjena dielektričnih materijala, 2013., PFST, http://brod.pfst.hr/~ivujovic/stare_stranice/pdf_zip_word/pred_dielek_mat.pdf (pristup 9.5. 2021.)
- [48.] Sangham S., Face mask and medical waste disposal during the novel COVID-19 pandemic in Asia, Case Studies in Chemical and Environmental Engineering , 2020(100052)
- [49.] Leblanc R., An Overview of Polypropylene Recycling, The balance small business, 2019.
- [50.] Ceresana, 2017. In: Market Study: Polypropylene <https://www.ceresana.com/en/market-studies/plastics/polypropylene/polypropylene-market-sharecapacity-demand-supply-forecast-innovation-application-growth-production-sizeindustry.html> (pristup 20. 3. 2021.)
- [51.] Li, W.C., Tse, H.F., Fok, L., Plastic waste in the marine environment: a review of sources, occurrence and effects. Sci. Total Environ 2016., 566–567, 333–349.
- [52.] Galgani, F., Litter on the sea floor along European coasts. Marine Pollution Bulletin 40(2000), 516–527
- [53.] Jegou, A.M., Salomon, J.C., 1991. Couplage imagerie thermique satellitaire-modeles numeriques. application a la manche. Oceanol. Acta 91 (11), 55–61
- [54.] Open University, 1993. Waves, tides and shallow water processes. 4, S330. Pergamon Press, Open University, p. 150
- [55.] Andrady, A.L., Microplastics in the marine environment. Marine Pollution Bulletin, 62(2011.), 1596–1605
- [56.] Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Marine Pollution Bulletin ,62(2011.), 2588–2597
- [57.] Claessens, M., De Meester, S., Landuyt, L.V., De Clerck, K., Janssen, C.R., Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast.. Marine Pollution Bulletin 62 (2011.), 2199–2204

- [58.] Lee, J., Hong, S., Song, Y.K., Jang, Y.C., Jiang, M., Heo, N.W., Han, G.M., Kang, D., Shim, W.J., 2013. Relationships among the abundances of plastic debris in different size, classes on beaches in South Korea. , *Marine Pollution Bulletin*, 77(2013.), 349–354
- [59.] Ivar do Sul, J.A., Spengler, A., Costa, M.F., Here, there and everywhere. Small plastic fragments and pellets on beaches of Fernando de Noronha (Equatorial Western Atlantic)., *Marine Pollution Bulletin*, 58(2009.), 1229–1244.
- [60.] Auta H.S., Emenike C.U., Fauziah S.H., Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ.* 102(2017.),165–176
- [61.] Derraik, J.G.B., The pollution of the marine environment by plastic debris: a review., *Marine Pollution Bulletin* ,44(2002.), 842–852
- [62.] Azzarello, M.Y., Vleet, E.S., 1987. Marine birds and plastic pollution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 37, 295–303.
- [63.] McCauley, S.J., Bjorndal, K.A., 1999. Conservation implications of dietary dilution from debris ingestion: sublethal effects in post hatchling loggerhead sea turtles. *Conserv. Biol.* 13, 925–929.
- [64.] Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Curr. Biol.* 23 (23), 1031–1033
- [65.] Avery-Gomm, S., Provencher, J.F., Morgan, K.H., Bertram, D.F., Plastic ingestion in marine-associated bird species from the eastern North Pacific. , *Marine Pollution Bulletin*, 72(2013), 257–259
- [66.] Abbasi S.,Soltani N., Keshavarzi B., Moore F.,Turner A., Hassanaghahi M., Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf, *Chemosphere*, 205(2018.), 80-87
- [67.] Bojorge-Garcia M. G., Cantoral Uriza E.A., The ecological importance of algae in rivers, *Hidrobiologica* 1 (2016) 1–8.
- [68.] Su Y., Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment, *Science of The Total Environment*, 762(2021.), 0048-9697
- [69.] Chang Y.-H., Chen-Ruei K., Hsiao-Ling L., Effects of aquatic ecological indicators of sustainable green energy landscape facilities,*Ecological Engineering*, 71(2014.), 144-153
- [70.]Falkowski, P.G., Katz, M.E., Knoll, A.H., Quigg, A., Raven, J.A., Schofield, O., Taylor, F.J.R., 2004. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Sci.* 305, 354-360.
- [71.] <https://phyox.com/hr/o-mikroalgama> (pristup 28.3.2021.)

- [72.] Rezić, T., Filipović, J., Šantek, B., Mikroalge – potencijalni izvor lipida za proizvodnju biodizela, Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 9 (2014) 26–36.
- [73.] Khan, M.I., Shin, J.H. & Kim, J.D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact* 17, 36 (2018)
- [74.] Encyclopaedia. "Scenedesmus". Encyclopedia Britannica, 2018, <https://www.britannica.com/science/Scenedesmus> (pristup 28.3.2021.)
- [75.] Lüring M., The Smell of Water: Grazer-Induced Colony Formation in Scenedesmus. Thesis. Agricultural University of Wageningen, 1999.
- [76.] Lüring Miquel; Van Donk Ellen (2000). "Grazer-Induced Colony Formation in Scenedesmus: Are There Costs to Being Colonial?". *Oikos*. 88 (2000): 111–118
- [77.] https://cronodon.com/BioTech/Algal_Bodies.html (pristup 28.3.2021.)
- [78.] An, S.S., Friedl, T. , Hegewald, E.. Phylogenetic relationships of Scenedesmus and Scenedesmus-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. *Plant Biology*, 2019., 418-428.
- [79.] Brettum, P. ,Andersen, T. ,The use of phytoplankton as indicators of water quality. The Research Council of Norway, Norway., 2005.
- [80.] Shubert, E., Wilk-Woźniak, E. & Ligęza, S.. An autecological investigation of Scenedesmus: implications for ecology and taxonomy. *Plant Ecology Evolution*, 147 (2014.), 202-212.
- [81.] Mandal, S., Mallick, N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2), 281–291.
- [82.] Jena, J., Nayak, M., Panda, H.S., Pradhan, N., Sarika, C., Ku, P., Rao, B.V.S.K., Prasad, R.B.N. & Sukla, L.B.. Microalgae of Odisha Coast as a potential source for biodiesel production. *World Environment*, 2(2012.), 11-16.
- [83.] Komarek, J., Fott, B.. *Chlorophyceae* (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. In G. Huber-Pestalozzi, (Ed) *Das Phytoplankton des Süßwassers*. Stuttgart, Germany, 1983.,1044.
- [84.] Skaloud, P., Neustup a, J.& Skaloudova, M. Species composition and diversity of algae on anthropogenic substrata. *Novitates Botanicae Universitatis Carolinae*. 19(2008.), 33-37.
- [85.] Sakthivel, R. . Biodiversity of Chroococcales (Chlorophyceae) from Cement Factories in and Around Areas of Ariyalur District, Tamil Nadu. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science*. 3(2016.), 267-284.

- [86.] Roy R., Parashar A., Bhuvaneshwari M., Chandrasekaran N., Mukherjee A., Differential effects of P25 TiO₂ nanoparticles on freshwater green microalgae: *Chlorella* and *Scenedesmus* species., *Aquatic Toxicology*, 176(2016.), 161-171
- [87.] Valavanidis, A. ,Vlachogianni, T. ,Ecotoxicity Test Methods and Ecological Risk Assessment. *Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology Tests under the Guidelines of International Organizations.*, 2015.. 1-29.
- [88.] Williams PL, James RC, Roberts SM (Eds). *Principles of Toxicology. Environmental and Industrial Applications.* 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 2003.
- [89.] Hoffman DJ, Rattner BA, Burton, Jr, GA, Cairns J (Eds). *Handbook of Ecotoxicology.* Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1995.
- [90.] Newman MC., Clements WH. *Ecotoxicology: a Comprehensive Treatment.* CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.
- [91.] Newman MC. *Quantitative Ecotoxicology.* CRC Press, Boca Raton., FL, 2nd ed., 2013.
- [92.] Newman MC. *Fundamentals of Ecotoxicology. The Science of Pollution.* CRC Press, Boca Raton, FL, 4th ed., 2015.
- [93.] Truhaut R. *Eco-Toxicology -- objectives, principles and perspectives.* *Ecotoxicol Environ Saf* 1(2): 151–173, 1977.
- [94.] 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
- [95.] OECD, *Guideline for Testing of Chemicals*, 201. *Alga, Growth Inhibition Test*, 1984.
- [96.] Singh, S., Khanna, V. K., Pant, A. B., *Development of In Vitro Toxicology*, *In Vitro Toxicology*, 2018., str. 1–19
- [97.] Eaton, D. L., Gilbert, S. G., *Principles of Toxicology i Faustman, E. M., Omenn, G. S., Risk Assessmentu*, u: Klaassen, C. D., *Toxicology*, 8th (2013) str. 13-49, 133.
- [98.] 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.
- [99.] https://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/Toxicology_Dose_Descriptors.html
(pristup 28.3.2021.)
- [100.] Garrido, S., Linares, M., Campillo, J. A., Albentosa, M., *Effect of microplastics on the toxicity of chlorpyrifos to the microalgae Isochrysis galbana, clone t-ISO*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173 (2019) 103–109.

- [101.] César C., Jorge P., Marisa F., Manfred K., Nereida C., Ecotoxicological and biochemical effects of environmental concentrations of the plastic-bond pollutant dibutyl phthalate on *Scenedesmus* sp., *Aquatic Toxicology*, 215(2019.), 105281
- [102.] Babu, B., Wu, J.T., 2010. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria. *Sci. Total Environ.* 408, 4969–4975.
- [103.] Sjollema S.B., Redondo-Hasselerharm P., Leslie H.A., Michiel H.S. Kraak, Vethaak A. D., Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth?, *Aquatic Toxicology*, 170(2016.), 259-261
- [104.] 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*, 374(2019.), 219-227
- [105.] Guo P., Liu Y., Liu C., Effects of chitosan, gallic acid, and algicide on the physiological and biochemical properties of *Microcystis flos-aquae*, *Environ. Sci. Pollut. R.*, 17 (2015) 13514–13521
- [106.] Chen L., Mao F., Kirumba G. C., Jiang C., Manefield M., He Y., Changes in metabolites, antioxidant system, and gene expression in *Microcystis aeruginosa* under sodium chloride stress, *Ecotox. Environ. Saf.*, 122 (2015) 126–135
- [107.] Bhattacharya P., Lin S., Turner J. P., Ke P.C., Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis, *J. Phys. Chem. C* 39 (2010), 16556–16561.
- [108.] Davarpanah E., Guilhermino L., Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 167(2015.), 269-275
- [109.] Patrick M. Canniff, Tham C. Hoang, Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth, *Science of The Total Environment*, 633(2018), 500-507
- [110.] Nava V., Leoni B., A critical review of interactions between microplastics, microalgae and aquatic ecosystem function, *Water Research*, 188(2021), 116476
- [111.] Ogonowski, M., Motiei, A., Ininbergs, K., Hell, E., Gerdes, Z., Udekwu, K.I., Bacsik, Z., Gorokhova, E., 2018. Evidence for selective bacterial community structuring on microplastics. *Environ. Microbiol.* 20, 2796–2808
- [112.] Chunfeng S., Zhengzheng L., Chenlin W., Shuhong L., Yutaka K., 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

- [113.] 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
- [114.] OECD, Guideline for Testing of Chemicals, 201. Alga, Growth Inhibition Test, 1984.
- [115.] G.G.N. Thushari, J.D.M. Senevirathna, Plastic pollution in the marine environment, *Heliyon*, 2020, Vol 6, e04709
- [116.] Cunha C., Faria M., Nogueira N., Ferreira A., Cordeiro N., Marine vs freshwater microalgae exopolymers as biosolutions to microplastics pollution, *Environmental Pollution*, 249(2019), str. 372-380.
- [117.] W.Y.Chia, D.Y.Y.Tang, K.S.Kho, A.N.K.Lup, K.W.Chew, Nature's fight against plastic pollution: Algae for plastic biodegradation and bioplastics production, 2020., Vol 4, 100065
- [118.] R.V. Kumar, G. Kanna, S. Elumalai, Biodegradation of polyethylene by green photosynthetic microalgae, *J. Biorem. Biodegrad.* 8 (2017) 2.
- [119.] 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*, 665 (2019) , str. 400–405
- [120.] Chen Q., Li Y., Li B., Is color a matter of concern during microplastic exposure to *Scenedesmus obliquus* and *Daphnia magna*?, *Journal of Hazardous Materials*, 383(2020) 121224
- [121.] 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*, 246 (2018),str. 134–152.