

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Kristina Bule

**EKOTOKSIKOLOŠKI UČINCI
MIKROPLASTIKE NA OKOLIŠNE ORGANIZME**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije na Zavodu za industrijsku ekologiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić i predan je na natječaj za dodjelu

Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.



Ovaj rad za Rektorovu nagradu 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.

Popis kratica:

3,4-DCA – 3,4-dikloranilin

B – brid zebrica *Danio rerio*

BM – bazalni medij

BPA – bisfenol A

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

DDT – diklordifeniltrikloretan

DIN – *Deutsches Institut für Normung*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DMSO – dimetil sulfoksid

E3 – medij za embrije

EC₅₀ – efektivna koncentracija koja je izazvala učinak na 50 % populacije

ED₅₀ – efektivna doza koja je izazvala učinak na 50 % populacije

FTIR – infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

G – generacija zebrica *Danio rerio*

HA – hranjivi agar

HCH – heksaklorcikloheksana

HDPE – polietilen visoke gustoće

HRN – hrvatske norme

IC – *internal plate controls*

ISO – *International Organization for standardization*

KPS – kalijev persulfat

LC₅₀ – letalna koncentracija koja je izazvala smrt kod 50% populacije

LD₅₀ – letalna doza koja je izazvala smrt kod 50% populacije

LDPE – polietilen niske gustoće

LOEC – najniža koncentracija tvari s vidljivim štetnim učinkom

MAP – makroplastika

MEP – mezoplastika

MDPE – polietilen srednje gustoće

MM – mineralni medij

MP – mikroplastika

NP – nanoplastika

NOEC – najviša koncentracija tvari bez vidljivog štetnog učinka

OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*

OG – optička gustoća

USEPA – *U.S. Environmental Protection Agency*

PAH – policiklički aromatski ugljikovodici

PBC – polikloriranih bifenila

PBDE – polibromirani difenil eteri

PE – polietilen

PET – poli(etilen-tereftalat)

PP – polipropilen

PS – polistiren

PVC – poli(vinil-klorid)

RS – Ramanova spektroskopija

SEM – skeniranje elektronskim mikroskopom

SDS – natrijev dodecilsulfat

T – temperatura, °C

t – vrijeme (sat;h/dan;d)

UV – ultraljubičasto zračenje

γ_{MP} – masena koncentracija mikroplastike, mg/L

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

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Opći dio	2
2.1. Mikroplastika	2
2.1.1. Primarna mikroplastika	3
2.1.2. Sekundarna mikroplastika	3
2.2. Svojstva mikroplastike	5
2.2.1. Veličina i oblik	5
2.2.2. Gustoća	6
2.2.3. Aditivi u (mikro)plastici	7
2.2.4. Adsorpcija onečišćujućih tvari na mikroplastiku	7
2.3. Vrste mikroplastike	9
2.3.1. Polietilen	10
2.3.2. Polipropilen	11
2.3.3. Poli(vinil-klorid)	12
2.3.4. Polistiren	13
2.3.5. Poli(etilen-tereftalat)	14
2.4. Mikroplastika u okolišu	15
2.5. Utjecaj mikroplastike na okolišne organizme	18
2.6. Utjecaj mikroplastike na ljude	22
2.7. Ekotoksikologija	23
2.7.1. Testovi ekotoksičnosti	24
2.7.1.1. Ispitivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	26
2.7.1.2. Ispitivanje ekotoksičnosti mikroplastike na mikroalgama	27
2.7.1.3. Ispitivanje ekotoksičnosti mikroplastike na embrijima zebricama - <i>Danio rerio</i>	29
3. Eksperimentalni dio	33
3.1. Materijali	33
3.1.1. Mikroplastika	33
3.1.2. Testni organizmi	34
3.1.3. Mediji i kemikalije	35
3.2. Mjerni instrumenti i oprema	36
3.3. Metode rada	37

3.3.1.	Priprema mikroplastike	37
3.3.2.	Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	38
3.3.3.	Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom alge <i>Chlorella</i> sp.....	40
3.3.4.	Određivanje toksičnosti mikroplastike primjenom embrija zebrića <i>Danio rerio</i>	42
3.3.5.	Mikroskopska analiza.....	46
4.	Rezultati	47
4.1.	Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom bakterije <i>Pseudomonas putida</i> (P1).....	47
4.2.	Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom mikroalge <i>Chlorella</i> sp. (P2) ..	58
4.3.	Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom embrija zebrića <i>Danio rerio</i> (P3)	69
5.	Rasprava	78
5.1.	Analiza pokusa P1	78
5.2.	Analiza pokusa P2	81
5.3.	Usporedba pokusa P1 i P2	87
5.4.	Analiza pokusa P3	88
6.	Zaključak.....	93
7.	Zahvala	94
8.	Literatura	95
	Sažetak	104
	Abstract	105
	Životopis.....	106

1. Uvod

Plastika je dio ljudskog života od davnina, ali konstantan porast ljudske populacije, povećanje životnog standarda, te sve brža industrijalizacija dovodi do sve veće potrebe za njezinom proizvodnjom. Zahvaljujući maloj težini, visokoj izdržljivosti, otpornosti na različite kemikalije, visokoj ekonomičnosti i mnogim drugim prednostima, ona igra ključnu ulogu u mnogim sektorima kao što su pakiranje, graditeljstvo, transport, proizvodnja električne energije i elektroničkih uređaja, poljoprivreda, medicinske ustanove i sl.^{1,2} Zbog sve veće potražnje, svjetska proizvodnja plastike iz godine u godinu raste. Godine 1950. iznosila je $1,7 \times 10^6$ tona, 2015. godine porasla je 189 puta te je iznosila $3,2 \times 10^8$ tona³. Plastika je stabilan materijal, ali pod utjecajem različitih prirodnih procesa razlaže se na manje dijelove i dolazi do nastajanja mikroplastike (MP) i nanoplastike (NP), koje su sveprisutne onečišćujuće tvari u svim dijelovima okoliša. Često se naglašava i njihova štetnost na žive organizme, iako je vrlo mali broj istraživanja koji to potvrđuje.¹ Različiti aditivi (poput ftalata, bisfenola A (BPA), pigmentata, biocida) sadržani u plastici imaju dokazana štetna svojstva po okoliš, koja doprinose toksičnosti plastike.⁴ Postoji zakonska regulativa koja zabranjuje nepropisno odlaganje makroplastike u okoliš, ali još uvijek ne postoje konkretni zakoni koji propisuju dopuštene količine mikroplastike i nanoplastike u okolišu. S obzirom na navedeno, nameće se pitanje njezine štetnosti na ljude i ostale sastavnice ekosustava. Ispitivanje štetnog učinka nekog spoja ili tvari može se provesti primjenom različitih testova toksičnosti, genotoksičnosti, reproduktivne toksičnosti i dr. Testovi toksičnosti se mogu provesti *in vivo* ili *in vitro*, ovisno o svrsi istraživanja.⁵ Najčešće se primjenjuju *in vitro* testovi toksičnosti poput testa s *Vibrio fischeri*⁶, slatkovodnim i morskim algama⁷, vodenbuhama⁸, zebrafish⁹, te primjenom različitih crva¹⁰ ukoliko se istražuje toksičnost tla. Ispitivanje toksičnosti provodi se kako bi se okarakterizirali potencijalno štetni učinci kemikalija i drugih štetnih tvari po zdravlje ljudi, životinja, odnosno okoliša.¹¹ Testovi toksičnosti provode se u skladu sa standardnim metodama (ISO – *International Organization for standardization*¹², DIN – *Deutsches Institut für Normung*¹², HRN – hrvatske norme¹², OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*⁷, USEPA – *U.S. Environmental Protection Agency*⁷ i dr.).

U ovom radu ispitala se akutna ekotoksičnost 5 različitih vrsta mikroplastike, polietilena (PE), polipropilena (PP), polistirena (PS), poli(vinil-klorid) (PVC) i poli(etilen-tereftalat) (PET) na bakteriju *Pseudomonas putida* (ISO 10712:1995)¹³, slatkovodnu algu *Chlorella* sp. (OECD 201:1984)¹⁴ i embrije zebrice *Danio rerio* (OECD 179:2012)¹⁵.

2. Opći dio

2.1. Mikroplastika

Izraz „*mikroplastika*“ prvi put se pojavio 1968. u publikaciji Američkih zračnih snaga, Laboratorij za materijale (*eng.* US Air Force Materials Laboratory), kao pojam za opisivanje manjih deformacija plastičnog materijala. U istoj publikaciji prvi put je upotrijebljen i pojam „*makroplastika*“ i korišten je za opisivanje većih deformacija plastičnog materijala kao rezultat nekog opterećenja. Godine 1970. znanstvenici su otkrili male komade plastike u vodenim ekosustavima i dali im novo značenje, u kojem se ti termini uglavnom odnose na fizičku veličinu komada plastike.¹⁶ Mikroplastikom se smatraju svi polimerni materijali čija se veličina kreće između 1 μm i 5 mm¹⁶. Plastične čestice manje od 1 μm klasificiraju se kao nanoplastika, a one veće od 5 mm kao mezoplastika¹⁶. Sve čestice veće od 25 mm spadaju pod makroplastiku³ (Tablica 1). Ova podjela je uvedena i opće prihvaćena tek 2004. godine.¹⁶

Tablica 1. Podjela plastike prema veličini čestica.¹⁶

KATEGORIJA	KRATICA	VELIČINA ČESTICA
Makroplastika	MAP	$\geq 25 \text{ mm}$
Mezoplastika	MEP	$< 25 \text{ mm} - 5 \text{ mm}$
Mikroplastika	MP	$< 5 \text{ mm} - 1 \mu\text{m}$
Nanoplastika	NP	$< 1 \mu\text{m}$

Osim prema veličini čestica, mikroplastika se klasificira i prema podrijetlu na primarnu i sekundarnu mikroplastiku.¹⁶

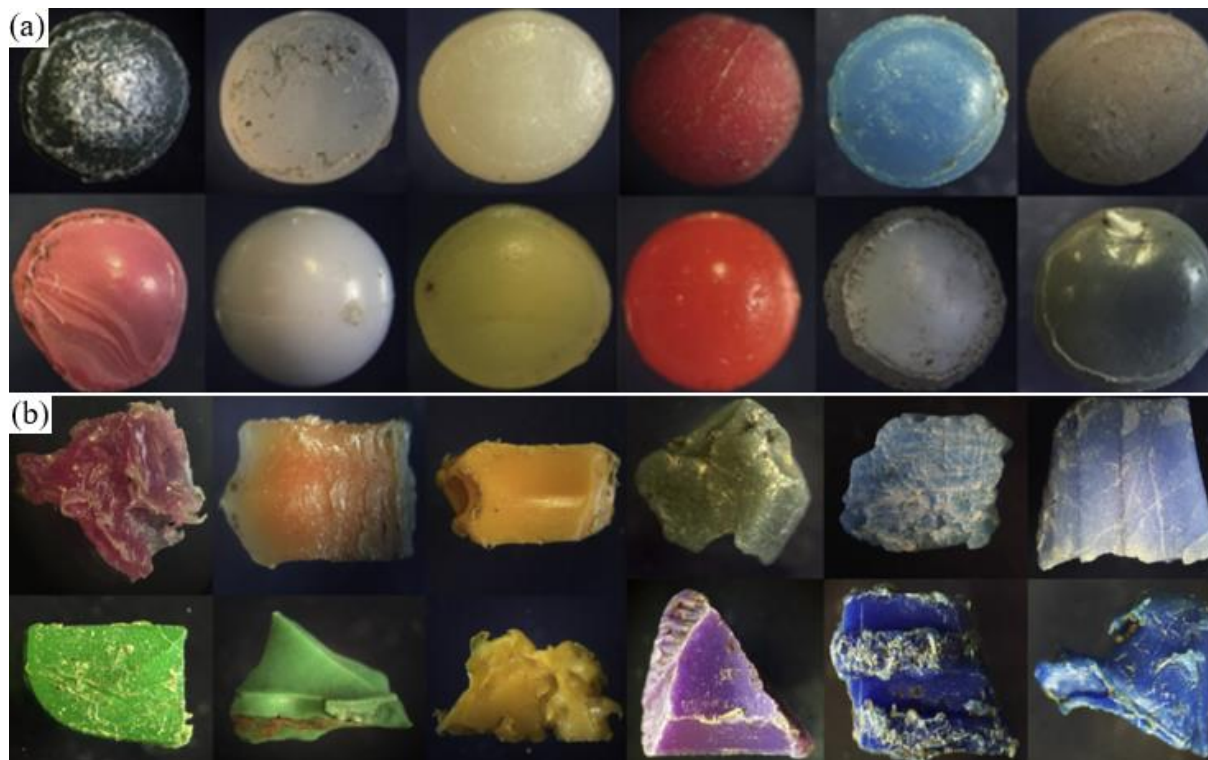
2.1.1. Primarna mikroplastika

Primarna mikroplastika proizvodi se namjerno za potrebe različitih industrija što uključuje pelete od smole, mikro-perlice za abrazive u kozmetici, proizvode za osobnu higijenu poput zubnih pasta, različitih krema, sapuna i šampona, mikročestice proizvedene za tekstil poput sintetičkih vlakna i praška za pranje tekstila te sredstva za lijekove (Slika 1 (a)).^{3,16} Primarna mikroplastika sve češće se koristi i u tehnologiji pjeskarenja, umjesto pijeska, za propuhivanje mašina, motora, brodova i slično kako bi se sa njih otklonila hrđa i boja.¹⁶ Prednost njene uporabe je veća postojanost i ekonomska isplativost. Međutim nakon uporabe ona se ispiranjem i nošenjem vjetra otpušta u različite sastavnice okoliša i time ga onečišćuje.¹⁶ Slijedeći bitan izvor primarne mikroplastike su male obojene kuglice od plastike koje se proizvode na globalnoj razini za industrijske potrebe topljenja i lijevanja, odnosno izradu većih plastičnih materijala. Industrijske plastične sirovine smatraju se glavnim izvorom plastičnog onečišćenja vodenog okoliša. U nekim slučajevima onečišćenje može nastati zbog izravnog oslobađanja primarne mikroplastike iz industrijskih otpadnih voda, dok u ostalim slučajevima njihov ulazak u vodeni okoliš može biti rezultat industrijskog prosipanja.¹⁶ Tekstilna industrija također stvara veliku prijetnju okolišu. U uzorcima prikupljenim iz okoliša, mikrovlakna su jedna od najčešćih oblika mikroplastike.¹⁶ Jedan predmet sintetičke odjeće može otpustiti čak više od 1900 plastičnih vlakana u samo jednom ciklusu pranja. Uz veliki kapacitet bubnja modernih perilica rublja, oko 19 000 vlakana se oslobodi jednim pranjem samo 10 odjevnih predmeta¹⁶. Procijenjeno je da otpadna voda sadrži do 100 vlakana/L¹⁶. Većina industrija upotrebljava u nekom proizvodnom procesu mikroplastiku, i sve se smatraju prijetnjom okolišu. Kao najveći i najopasniji izvor onečišćenja okoliša mikroplastikom smatraju se postrojenja za obradu komunalnih otpadnih voda jer velike količine mikroplastike mogu proći kroz filtere za sakupljanje onečišćujućih tvari, odnosno mogu zaostati u aktivnom mulju, te završavaju u okolišu.^{16,17} Ispiranjem tla mikroplastika može dospjeti u podzemne vode i tako onečistiti izvore pitke vode. Shodno navedenom, potrebno je u pravilnike uvesti praćenje koncentracije mikroplastike i zakonski odrediti maksimalno dozvoljenu koncentraciju mikroplastike u pitkim i otpadnim vodama.¹⁷

2.1.2. Sekundarna mikroplastika

Sekundarna mikroplastika podrazumijeva nenamjernu razgradnju organskih sintetičkih polimernih proizvoda poput plastičnih vrećica, sanduka, boca, užadi i mreža u manje čestice.¹⁶

Iako je plastika stabilan polimerni materijal, tijekom vremena kao rezultat izlaganja UV zrakama Sunca i djelovanjem mehaničkih sila poput vjetra, morskih struja i valova dolazi do njezine degradacije i stvaraju se sve manji i manji komadi plastike.¹⁸ Sekundarna mikroplastika uključuje čvrste plastične fragmente, mikrofibre od tkanine i konopa, prevlake koje su se ogulile i nečistoće od trošenja guma. Čestice koje nastaju abrazijom automobilskih guma u najvećem postotku (85 %) čine čestice veličine 50 - 350 μm ¹⁹. Veliki izvor čine odbačeni tepisi i mreže protiv grabežljivaca koji zbog svoje vlaknaste prirode mogu otpustiti velike količine vlakana u okolnu vodu. Oko 18 % svih vrsta mikroplastika potječe iz razgradnje plastične užadi i mreža¹⁶. Kada govorimo o onečišćenju okoliša, puno veći udio čini sekundarna mikroplastika. Ona onečišćuje oceane, mora, obalne sredine, sediment, pa čak i artičko područje.^{18,20} Procijenjeno je da Europa doprinosi ukupnom onečišćenju okoliša sekundarnom mikroplastikom između 68 500 i 275 000 tona godišnje¹⁶. Činjenica koja zabrinjava je ta, da čak i kada bi se ovoga trenutka obustavila kompletna proizvodnja i odlaganje plastike u okoliš, sekundarna mikroplastika bi nastajala još tisućama godina razgradnjom makroplastike koja je trenutno prisutna u svim sastavnicama okoliša.²¹ Nekoliko primjera sekundarne mikroplastike prikupljene iz različitih vodenih ekosustava prikazani su na slici 1 (b).



Slika 1. Mikroplastika veličine 0 - 5 mm prikupljena iz vodenih ekosustava: (a) primarna mikroplastika, (b) sekundarna mikroplastika.¹⁶

Samo se oko 20 % svjetske otpadne vode obrađuje prije nego što ju se ispušta u prirodne vode, tako da se otpadne vode i otpadni mulj općenito smatraju najvećim izvorima primarne i sekundarne mikroplastike u okolišu¹⁹. U dotoku otpadne vode u postrojenja za obradu istih, istraživanja pokazuju koncentraciju čestica između 15 i 320 čestica/L¹⁹. U nekoliko studija o mikroplastici u postrojenjima za obradu otpadnih voda dokazana je koncentracija mikroplastike u efluentima između < 1 i gotovo 100 čestica/L¹⁹. Daljnje analize pokazuju da otpadni tok zadržava 95 - 99 % čestica¹⁹. Osim ove vrste izvora, problem stvaraju i okolišni uvjeti. Vjetar uzrokuje raznošenje mikroplastike sa izvornog mjesta poput odlagališta otpada ili gradilišta, u druge sastavnice okoliša, dok kiša ispire mikroplastiku sa istih izvora i uzrokuje njezino otjecanje u okoliš.¹⁹

2.2. Svojstva mikroplastike

Izraz *mikroplastika* koristi se kao skupni naziv za opisivanje heterogene mješavine čestica u rasponu veličina od nekoliko mikrometara do nekoliko milimetara promjera, a uključuje čestice raznih oblika, od potpuno sferičnih do izduženih vlakana. Općenito, MP-e sadrži skup čestica koji se razlikuju po veličini, obliku, boji, gustoći, kemijskom sastavu i drugim karakteristikama.²² MP-e se može fizikalno i kemijski okarakterizirati. Fizička karakterizacija odnosi se na određivanje veličine, oblika i boje MP-a, dok se kemijska karakterizacija svodi na istraživanje sastava MP-a, što je vrlo bitan čimbenik jer različite vrste plastike imaju različita svojstva.¹⁷ Za kemijsku analizu MP-a koriste se različite metode i uređaji. Samo neke od metoda su infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR), Ramanova spektroskopija (RS), skeniranje elektronskim mikroskopom (SEM), te tekućinska i plinska kromatografija¹⁷. Kada MP-a i MP-e završe u okolišu, podvrgnuti su različitim vremenskim uvjetima kao što su sunčeva svjetlost, toplinsko zračenje, rast biofilma i oksidacija, koji osim što dovode do njezine razgradnje, dovode i do promjene njihovih fizikalnih i kemijskih svojstva kao što su boja, morfološka površina, kristalna struktura, veličina čestica i gustoća.^{17,20}

2.2.1. Veličina i oblik

Primarna MP-e obično ima pravilan oblik kao što je prikazano na slici 1 (a), dok je sekundarna MP-e najčešće nepravilnog oblika i različitih veličina kao što je prikazano na slici 1 (b). Veličina, oblik i gustoća najvažniji su parametri koji određuju sudbinu i rasprostranjenost MP-a u okolišu, a nakon toga i njihovu dostupnost bioti.²³ Prilikom morfološke karakterizacije čestica plastike potrebno je odrediti pokazatelje navedene u tablici 2.

Tablica 2. Kategorije koje se koriste za opisivanje izgleda čestica plastike.²³

KATEGORIJA	OPIS
Podrijetlo	Primarna ili sekundarna
Tip	Fragmenti, peleti, vlakna, folija, pjena, granule te forma stiropora
Veličina	MAP, MEP, MP ili NP
Oblik	Zaobljeni ili kružni, pravilni ili nepravilni kutovi, nepravilan oblik, slomljeni rubovi
Boja	Prozirna, kristalna, bijela, bistra bijela, bež, crvena, narančasta, plava, neprozirna, crna, siva, smeđa, zelena, ružičasta, žuta, itd.

Vrlo je teško morfološki okarakterizirati čestice pronađene u okolišu jer još ne postoji univerzalna metoda koja može sa sigurnošću potvrditi sve pokazatelje. Znanstvenici najčešće koriste kombinaciju optičke mikroskopije s vizualnom identifikacijom zbog jednostavnosti, ekonomičnosti i mogućnosti provedbe ove tehnike *in situ* odnosno na mjestu uzorkovanja.²³ Međutim, bez komplementarnih spektroskopskih metoda koje su već navedene, izuzetno je teško potvrditi u nekim slučajevima da su identificirane čestice zaista MP-e, posebno za čestice veličine manje od 1 mm.²³ Vizualnom identifikacijom teško je razlikovati plastične čestice od prirodnih čestica tla ili komponenata sedimenta, tako da često dolazi do pogrešne klasifikacije čestica iste morfologije i/ili slične boje. S druge strane, kemijske metode često mijenjaju svojstva čestica te se zbog toga izbjegava njihovo korištenje.²³

2.2.2. Gustoća

Specifična gustoća plastičnih čestica ima širok raspon vrijednosti i znatno se razlikuje ovisno o vrsti polimera i postupku proizvodnje. Obično imaju mnogo nižu specifičnu gustoću od sedimenata čija gustoća iznosi oko 2,65 g/cm³, te veću ili sličnu gustoću kao voda čija gustoća iznosi 0,997 g/cm³.²³ Gustoća MP-a određuje njezinu bioraspoloživost za različite skupine organizama, odnosno njezinu raspodjelu u vodenom stupcu.

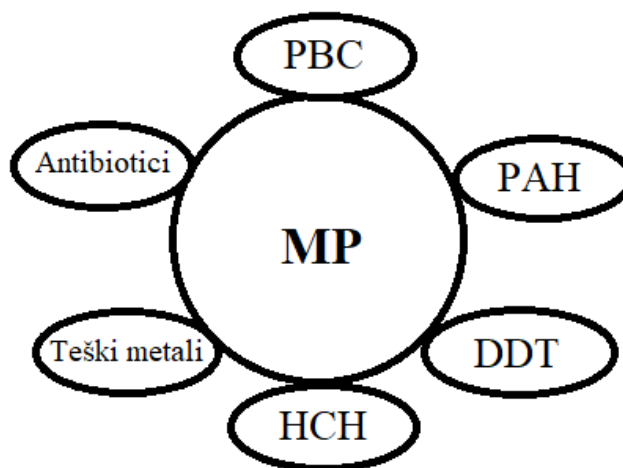
Iako svaka plastika ima određenu specifičnu gustoću, kada završi u okolišu vanjski i biološki čimbenici mijenjaju njezina morfološka svojstva te moduliraju njezino ponašanje, posebice u vodenim sustavima. MP-e je sklona procesima poput adsorpcije tvari, agregacije s fitoplanktonima, kolonizaciji s mikroorganizama i stvaranju biofilma koji dovode do povećanja njezine gustoće, te zbog težine ona tone na dno vode. Upravo zbog stvaranja biofilma, MP-a se često može naći u sedimentu.^{20,23} Prema istraživanju, MP-a manje veličine više podliježe takvim procesima te dopijeva do dubljih slojeva vodenih ekosustava. Na raspodjelu MP-a manje gustoće utječu morska struja, vjetar, odnosno cirkulacija zraka i vode. Na dalje, UV razgradnja, fizička abrazija i/ili biološki procesi mogu promijeniti gustoću mnogih čestica MP-a. Neka istraživanja pokazala su da osim veličine i mase čestica, ulogu u raspodjeli ima i oblik čestica.²³

2.2.3. Aditivi u (mikro)plastici

Aditivi poput plastifikatora, antioksidansa, UV stabilizatora i mnogih drugih, često se dodaju plastici prilikom proizvodnje radi poboljšavanja njezinih fizikalnih i kemijskih svojstava, a dokazano je da štetno utječu na zdravlje ljudi i okoliš.²⁴ U vodenom okruženju spojevi, kao što su bisfenol A (BPA), polibromirani difenil eteri (PBDE), ftalati i nonilfenoli, koji su većinom sastavni dio svih plastičnih aditiva, migriraju od plastike i stvaraju prijetnju vodenim organizmima.⁴ Studija provedena 2016. godine pokazala je da se štetni spojevi iz aditiva lako ispiru iz uobičajene plastike koja se može reciklirati, kao što su vinilni polimeri (PE, PP, PVC), poliesteri (PET) i aromatski polimeri (PS), a značajno su utjecali na preživljavanje ispitivanog organizma *Amphibalanus (Balanus) amphitrite* u toj studiji.²⁵ Aditivi koji se otpuštaju s čestica plastike u okolišu samo su dio njezinog štetnog utjecaja. Veći problem stvaraju toksične tvari koje se u prirodnom okruženju adsorbiraju na njezinu površinu.²⁶

2.2.4. Adsorpcija onečišćujućih tvari na mikroplastiku

Čestice MP-a imaju izrazitu sposobnost adsorbiranja štetnih tvari, što ih čini još opasnijima za žive organizme. Adsorpcija je općenito proces vezanja tvari na površinu nekog materijala.^{21,24} Iako imaju mali promjer, imaju veliku aktivnu površinu i na sebe vežu brojne onečišćujuće tvari poput teških metala, farmaceutika, polikloriranih bifenila (PBC), policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH), heksaklorcikloheksana (HCH), diklordifeniltrikloretan (DDT) te pesticida (Slika 2).^{1,18,26,27,28} Karakteristična fizikalno-kemijska svojstva poput specifične površine, polarnosti, stupanja kristalnosti i raspodjele veličine pora razlikuju se za svaku vrstu MP-a i utječu na adsorpcijski kapacitet.²⁸



Slika 2. Adsorpcija štetnih tvari na mikroplastiku.

Dosadašnja istraživanja ukazala su da se fenantren (vrsta PAH-a) najbolje adsorbira na PE, zatim na PP, a najmanje na PVC.²⁶ Nadalje, utvrđeno je i da PS adsorbira više PAH-ova od ostalih ispitivanih plastika, što se pripisalo aromatskoj skupini na PS-u.²⁶ Na adsorpciju onečišćujućih tvari na MP-u utječe i polarnost MP-a. Tako će PE, PP i PS, koji su nepolarne makromolekule, adsorbirati nepolarne onečišćujuće tvari, dok će polarne makromolekule PVC i PET adsorbirati polarne onečišćujuće tvari.^{28,29} Istraživanja ukazuju da MP-e niske kristalnosti može adsorbirati više hidrofobnih organskih onečišćujućih tvari od onih koje imaju visoku kristalnost. Najveći stupanj kristalnosti ima PE, pa PP, PS i najmanji PVC.²⁸ Osim navedenog, veliki utjecaj na adsorpcijski kapacitet MP-a imaju i okolišni uvjeti. Koncentracije onečišćujućih tvari mogu varirati ovisno o mjestu na kojem se MP-e nalazi i vremenu koje je provela u okolišu. MP-e koja se nalazi bliže izvoru onečišćujućih tvari sadržavat će veće koncentracije istih od one koja je udaljena od izvora, bez obzira na njezina svojstva.^{18,30} Starost MP-a također igra ulogu jer se s vremenom plastika razgrađuje i propada, te se njezina površina mijenja i povećava (nastaju pukotine na površini) što omogućuje bolju adsorpciju onečišćujućih tvari.^{16,18,30} MP-e, PS i PE, su sklonije promjenama uslijed vremenskih neprilika od ostalih.¹⁶ Kao i kod svake druge reakcije, bitni su i uvjeti u kojima se zbiva adsorpcija, poput saliniteta i pH-vrijednosti ako govorimo o adsorpciji onečišćujućih tvari na MP-u u vodenim ekosustavima.^{18,26} Istraživanja su pokazala da povećanjem pH-vrijednosti vode dolazi do veće adsorpcije teških metala, a povećanjem saliniteta dolazi do veće adsorpcije organskih onečišćujućih tvari na PE.¹⁸ Dokazano je i da je adsorpcija antibiotika na MP-u u morskoj vodi manja od adsorpcije u slatkoj vodi, te da se povećanjem saliniteta povećava adsorpcija PAH-a na MP-u.^{26,31}

Nedavna istraživanja ukazuju da uz adsorpciju može doći i do difuzije onečišćujućih tvari u unutrašnjost pojedine vrste MP-a ovisno o njejoj geometrijskoj strukturi.¹⁶ Na primjer, PE i PS imaju više razmaknute polimerne lance u svojoj strukturi, dok su kod PP-a polimerni lanci u strukturi bliže postavljeni i onečišćujuće tvari ne mogu prodirati u njegovu unutrašnjost. U jednom istraživanju zamijećena je difuzija fenatrena u PE, ali ne i u PP.¹⁶ Slično tome, u drugom istraživanju koncentracija PAH-ova bila je različita u PS-u, PE-u, PET-u, PP-u i PVC-u. PS i PE su pokazali najveće koncentraciju PAH-ova, a zatim PP. Daljnjim istraživanjima otkriveno je da je PS pokazao visoku sposobnost adsorpcije PAH-ova koja je bila usporediva s PE-om, te znatno viša od PP-a, PET-a i PVC-a.¹⁶ Međutim, plastika je u globalu čvrst i nepropustan materijal, te onečišćujuće tvari rijetko mogu prodrijeti u nju i zato se difuzija većinom zanemaruje.

2.3. Vrste mikroplastike

Polimeri se prema postanku mogu podijeliti na prirodne ili sintetski dobivene, a po kemijskom sastavu na organske i anorganske.²² Izraz "*plastika*" koristi se za sintetske ili polusintetske organske polimere koji su uglavnom napravljeni od monomera estrahiranih iz fosilnih goriva poput nafte, prirodnog plina i ugljena, a dizajnirani su tako da zadovolje vrlo različite potrebe krajnjih proizvoda.^{2,26} Svojstva polimera određena su monomernim sastavom i duljinom lanca polimera koja utječe na njihovo fizičko stanje. Dulji molekularni lanci omogućuju jače intermolekularne van der Waalsove sile između lanaca, što rezultira većom čvrstoćom i žilavošću polimera.²⁶ Duljina lanca plastičnih polimera utječe i na talište istih.²⁶ Neki plastični polimeri imaju djelomično kristalnu morfologiju, dok se ostali sastoje od nasumično orijentiranih amorfnih lanaca. Amorfnii polimeri poznati su i kao "staklasti" polimeri, a polukristalni polimeri poznati su pod nazivom "gumeni" polimeri.²⁶ Prema podjeli koja se temelji na njihovom ponašanju pri povišenim temperaturama, polimerni materijali se dijele na plastomere, elastomere i duromere.³² U ukupnoj proizvodnji plastike najveći udio čine polietilen (PP) sa 36 %, polipropilen (PE) sa 21 % i polivinilklorid (PVC) sa 12 %, a slijede ih poliester (PES), poliuretan (PU) i polistiren (PS) s < 10 %²⁶ svaki, te polietilen tereftalat (PET).

S obzirom da gotovo 80 %²⁴ ukupne svjetske proizvodnje plastike čine plastomeri: PE, PP, PVC, PS i PET, upravo njihov štetan utjecaj se ispitivao u ovome radu. U tablici 3 prikazani su osnovni podaci za PE, PP, PVC, PS i PET.

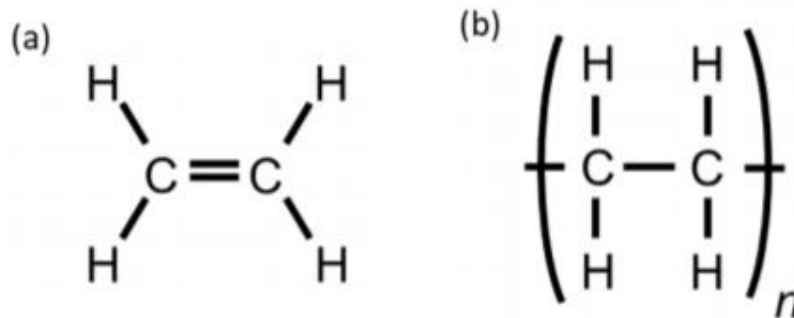
Tablica 3. Fizikalna, kemijska i toplinska svojstva PE, PP, PVC, PS i PET-a.^{33,34}

POLIMER	MONOMER	GUSTOĆA [g/cm ³]	Temperatura staklišta [°C]	Temperatura tališta [°C]	Temperatura raspada [°C]
Polietilen	-CH ₂ -CH ₂ -	0,90 – 0,98	-75	110 – 138	335
Polipropilen	-CH(CH ₃)-CH ₂ -	0,84 – 0,91	-20	120 – 176	328
Polivinil klorid	-CH ₂ -CH(Cl)-	1,37 – 1,53	+80	103 – 230	200
Polistiren	-C ₆ H ₅ CH=CH ₂ -	1,04 – 1,06	+1,6	239 – 275	285
Polietilen terftalat	-O-C(=O)- C ₆ H ₅ -C(=O)-O- CH ₂ -CH ₃	1,33 – 1,46	+0,2	245 – 265	285 – 329

2.3.1. Polietilen

Polietilen (PE) predstavlja najzastupljeniju plastiku u različitim industrijskim djelatnostima ali i u okolišu, poglavito morskom, gdje godišnja stopa rasta iznosi 8,7 %³. Zbog jednostavnosti i jeftinog proizvodnog procesa te dobre kvalitete, svakodnevno se povećeva njegova potražnja na tržištu. PE je termoplastični polimer koji se dobiva polimerizacijom etilena.³⁵ To je elastičan i proziran polimer, nepolarne strukture koji je otporan na vodu i većinu kemikalija, a na sobnoj temperaturi je netopljiv i u otapalima.³⁵ Na slici 3 (a) prikazana je kemijska struktura etilena, a na slici 3 (b) prikazana je kemijska struktura monomera odnosno ponavljajuće skupine polietilena.³⁵ PE se kategorizira prema gustoći na polietilen niske (LDPE), srednje (MDPE) i visoke gustoće (HDPE), a svaki od njih ima različita termička, mehanička, kemijska, električna i optička svojstva.^{35,36} Gustoća PE varira s obzirom na njegovu molekulsku masu i razgranatost. Kada se lanci polietilena sastoje od nekoliko stotina monomera (niska gustoća) ima oblik viskozne tekućine ili mekanog voska, a kada broj monomera iznosi oko stotinu tisuća monomera (visoka gustoća) tada ima oblik čvrste plastike.³⁵ Najčešće se upotrebljava za proizvodnju različitih vrsta ambalaže, plastičnih vrećica, izolaciju električnih kabela i izradu drugog elektromehaničkog pribora, te u kozmetici.

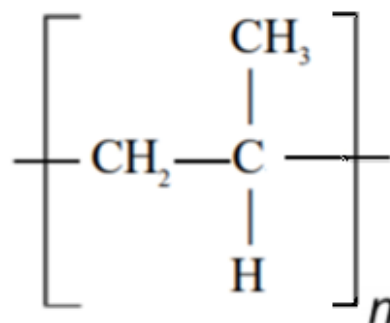
Iako je riječ o stabilnom materijalu, pod djelovanjem ultraljubičastog zračenja, kemijske ili toplinske oksidacije, podložan je procesima razgradnje. To je ujedno i razlog njegove zastupljenosti u okolišu u obliku mikroplastike.³⁷ Drugi nedostatak je prilično niska temperatura vrelišta, npr. PE niske gustoće stabilan je samo pri temperaturama nižim od 50 °C.³⁶



Slika 3. Prikaz (a) kemijske strukture etilena, (b) kemijske strukture monomera PE-a.³⁵

2.3.2. Polipropilen

Polipropilen (PP) je svestran termoplastični materijal, pogodan za različite načine obrade i koristi se u mnogim industrijama. To je polukristalni polimer koji se dobiva polimerizacijom propilena uz prisutnost katalizatora i u uvjetima kontrolirane temperature i tlaka.³⁸ Na slici 4 prikazana je ponavljajuća skupina PP-a. Prihvatljiv trošak proizvodnje i dobra svojstva čine ga jednom od najpoželjnijih vrsta termoplastike na tržištu te je uz PE i PVC jedna od najbrže rastućih klasa plastike.³⁸ Najlakši je od svih vrsta termoplastike tako da ga je potrebno manje za dobivanje novog proizvoda. Osobine mu ovise o uvjetima obrade ili kristalizacije, stupnju kristalnosti, vrsti kristalne strukture i prisutnosti aditiva, odnosno stupnju čistoće.³⁸

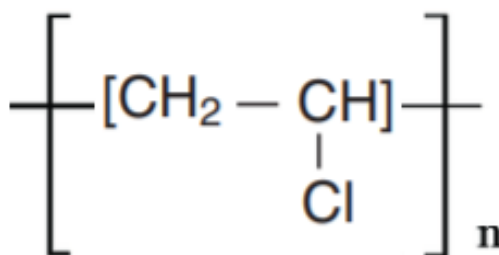


Slika 4. Prikaz kemijske strukture monomera PP-a.³⁸

Općenito, ima visoku čvrstoću i kemijski je otporniji od amorfni polimera. Neproziran je materijal i može se koristiti na višim temperaturama (160 – 170 °C)³⁸, odnosno ima najvišu temperaturu taljenja od svih termoplastika. Najveća mana mu je lomljivost pri niskim temperaturama. Zbog svojih svojstava koristi se u različitim proizvodnim procesima za dobivanje vlakana, folije, niti i dijelova za automobile, krutu ambalažu, dijelova namještaja, različitih uređaja, medicinsku opremu, izradu cijevi za prijenos tekućina i slično.³⁸ PP uz PE spada među najčešće vrste mikroplastike koja onečišćuju morski okoliš.³

2.3.3. Poli(vinil-klorid)

Poli(vinil-klorid) (PVC) je termoplastični materijal sastavljen od ponavljajućih vinilnih skupina (etenila), s jednim vodikovim atomom zamijenjenim klorom kao što je prikazano na slici 5.³⁹ Sadrži 57 % mase klora³⁹.



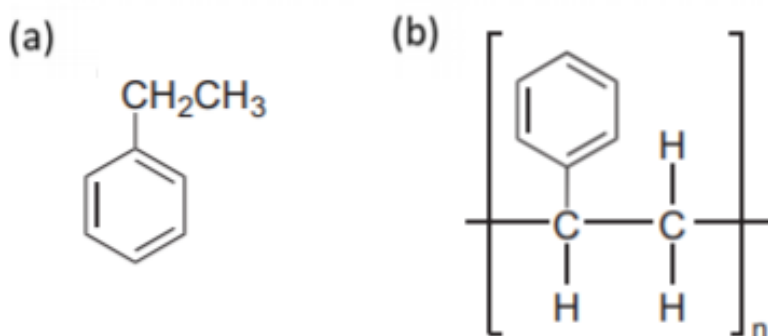
Slika 5. Prikaz kemijske strukture monomera PVC-a.³⁹

Jedan je od važnijih plastičnih materijala u građevinskoj industriji koji se koristi u različitim fazama gradnje (oko 50 %³⁹), kao što su cijevi, okviri prozora i vrata, stropne pločice, razni namještaj i presvlake, prevlake za električne kablove, itd..³⁹ Veliki udio zauzima u proizvodnji medicinskih i kliničkih plastičnih proizvoda, oko 25 %³⁹, ali otvara se pitanje njegove sigurnosti pri uporabi u ovome području. Osim toga, vrlo često ga susrećemo u svakodnevnom životu, kao sastavni dio odjeće, sintetičke kože, različitih ambalaža za prehrambene i druge proizvode. Glavni razlog je niska cijena, trajnost, vodootpornost, jednostavnost obrade i mogućnost prilagodbe njegovih svojstava širokom rasponu primjena.^{39,40} Godišnja proizvodnja PVC-a iznosi oko 40 milijuna tona i očekuje se da će globalno tržište PVC-a nastaviti rasti oko 3 – 5 % godišnje³⁹. PVC pruža izvrsna kemijska i mehanička svojstva. PVC je bijeli, amorfni prah bez mirisa, otporan na različite kemikalije (kiseline, baze, alkohole, mineralna ulja) i stabilan je pri sobnoj temperaturi i tlaku. Kada temperatura pređe 70 – 80 °C³⁹ dolazi do njegove razgradnje te se razvija plin klorovodične kiseline (HCl) i dolazi do promjene boje.

Budući da je termoplastičan, PVC omekšava ako se zagrijava, te otvrdne dok se hladi. Ima prilično malu gustoću, pa nudi relativno niske troškove materijala s obzirom na količinu, što ga čini ekonomski isplativim. Može se lako miješati s različitim tvarima, stoga ima karakteristike „jednostavnosti formulacije“ zbog postojećih polarnih skupina (klor). Uglavnom se pri PVC formulacijama koriste različiti plastifikatori, aditivi i modifikatori za oblikovanje potrebnih fizičkih svojstava krajnjih proizvoda, kao što su poboljšana fleksibilnost, elastičnost, otpornost na udarce, sprečavanje rasta mikroba, itd. Isti polaritet klora također pridonosi lakoći bojanja, tiskanja i lijepljenja pa se PVC koristi i u raznim dekorativnim primjenama.^{39,40}

2.3.4. Polistiren

Polistiren (PS) je aromatični polimer proizveden od monomera, stirena.³⁴ Stiren je bezbojna tekućina ugodnog mirisa kada je čista. Otapalo je za PS i mnoge sintetičke gume, ali ima ograničenu topivost u vodi. Stiren sudjeluje u velikom broju kemijskih reakcija, ima posebnu sklonost polimerizaciji zagrijavanjem ili izlaganjem ultraljubičastoj svjetlosti.³⁴ Ovisno o načinu na koji je PS polimeriziran, može biti tvrd, ograničene fleksibilnosti i bezbojan poput stakla ili može biti poput pjene i proširiti se u mekani, bijeli izolacijski materijal. Relativno je jeftin i ima nisku temperaturu omekšavanja.⁴¹ Još je jedan u nizu najčešće korištenih plastičnih masa na svijetu. Kemijska struktura stirena prikazana je na slici 6 (a) dok je na slici 6 (b) prikazan monomer polistirena.



Slika 6. Prikaz (a) kemijske strukture stirena i (b) kemijske strukture monomera PS-a.³⁴

PS je termoplastični materijal, koji ima jednostavnu linearnu strukturu koja se ponavlja. Kao i kod PP-a i PVC-a postoji mogućnost različitih stereoregularnih oblika. Amorfne je prirode i otapa se u velikom broju ugljikovodika sa sličnim parametrima topljivosti, poput benzena i toluena. Čista ugljikovodična priroda PS daje mu izvrsne karakteristike električne izolacije. Izolacijske karakteristike zadržavaju se čak i u vlažnim uvjetima.³⁴

Zbog visokog aromatskog sadržaja vrlo je stabilan i otporan na gama zračenje i snop elektrona.⁴¹ Problem stvara niska temperatura vrelišta, jer i pri relativno niskim temperaturama dolazi do njegove deformacije i pucanja (90 °C³⁴). Uglavnom se koristi za izradu ambalaža, zaštitnog pakiranja (za CD-e i DVD-e), poklopca, boca, ladica, jednokratnog pribora za jelo, igračka, kućišta proizvoda, medicinskih aplikacija, britvica za jednokratnu upotrebu, itd..^{34,41} Uzevši u obzir njegove karakteristike, te usporedivši ih s drugim konkurentnim plastikama poput PP-a i PET-a, tržište PS-a na nekim industrijaliziranim tržištima karakterizira smanjenje potražnje. Često ga se zamjenjuje plastikama koje se mogu učinkovito reciklirati.^{34,41}

2.3.5. Poli(etilen-tereftalat)

Poli(etilen-tereftalat), skraćeno PET, jedan je od najčešćih dostupnih polukristalnih termoplastičnih materijala (Slika 7). PET se može proizvesti reakcijom etilen glikola s pročišćenom tereftalnom kiselinom ili s dimetil tereftalatom u prisutnosti metalnog iona odnosno katalizatora.⁴² Njegova upotreba počela je pedesetih godina prošloga stoljeća, kada se koristio za izradu kvalitetnih umjetnih vlakana u tekstilnoj industriji. Od 1970-e godine počela je njegova primjena za izradu spremnika za tekućine, razna pića i hranu, odnosno počeo je zamjenjivati staklo i metal.⁴² Od tada tržište PET-a raste oko 10 % godišnje⁴². Ovaj komercijalno popularni polimer koristi se za proizvodnju različitih proizvoda, uključujući vlakna za odjeću, ambalažu za hranu i piće, različite tehničke tvorevine i drugo. PET ima dobra mehanička, električna i termička svojstva.⁴² Proziran je i lagan polimer, kemijski i na širokom rasponu temperature stabilan, nepropustan za plinove, vlagu i otapala, nelomljiv i žilav materijal, otporan je na mehanička opterećenja, bez mirisa, te u usporedbi s drugim polimerima ima bolji estetski izgled.⁴²

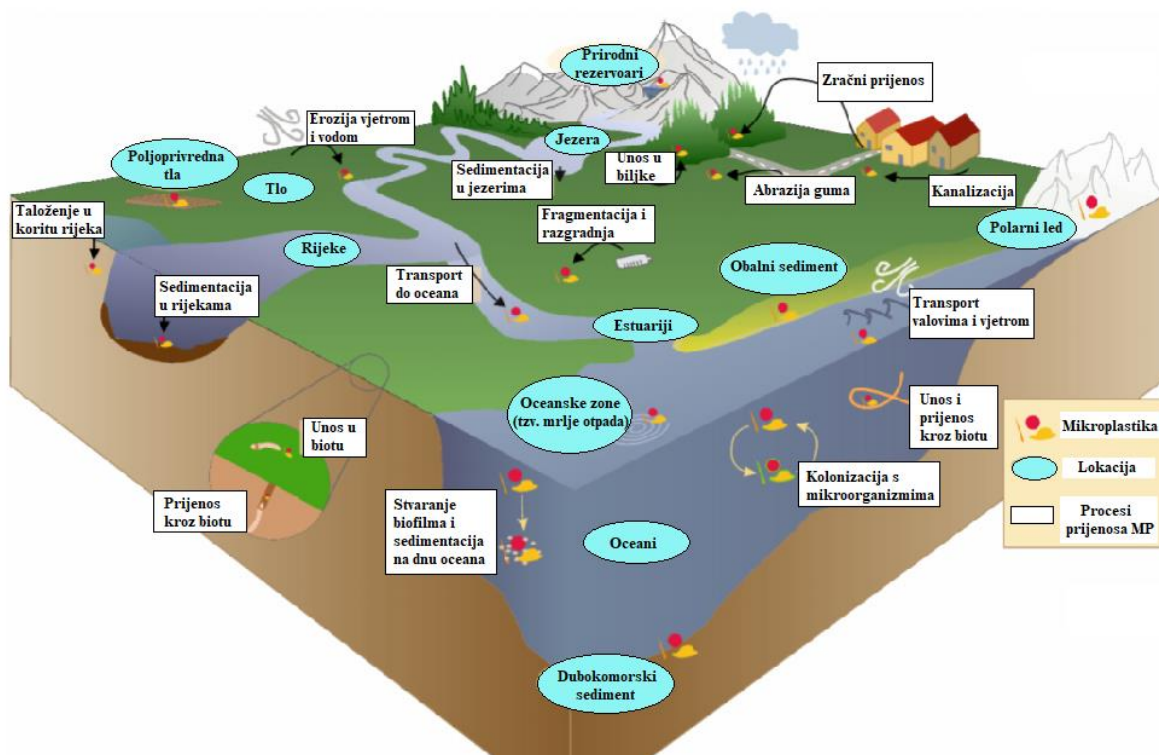


Slika 7. Prikaz kemijske strukture PET-a.⁴³

PET je ekonomski prihvatljiv materijal, jednostavan za dobivanje te ga je moguće reciklirati. Ovisno o načinu proizvodnje odnosno kristalizacije, PET može biti polukristalne ili amorfne prirode. PET s visokim stupnjem kristalizacije ima višu temperaturnu izdržljivost u odnosu na amorfne, te bolja mehanička svojstva kao što su žilavost, krutost, tvrdoća, veća otpornost na otapala i mehanička opterećenja.⁴²

2.4. Mikroplastika u okolišu

Zahvaljujući ubrzanom tempu industrijalizacije, porastu stanovništva i potrebi za poboljšanjem načina života dolazi do sve veće potrebe za plastikom. Procjenjuje se da je u posljednjem desetljeću proizvedeno i korišteno više plastike nego u cijelom prošlom stoljeću.⁴⁴ Na globalnoj razini, Azija je najveći proizvođač plastike sa 50,1 %, od čega Kina čini 29,4 %, dok Europa predstavlja 18,5 % ukupne globalne proizvodnje²⁶. Velika količina proizvedene plastike završi u okolišu, te pod djelovanjem različitih okolišnih procesa dolazi do njene razgradnje i prijenosa u ostale dijelove ekosustava (Slika 8). MP-e je prvi puta otkrivena u uzorcima mora i oceana 1970-e godine i od tada se naglašava njezina potencijalna opasnost za živi svijet. Usprkos tome, i dalje se velike količine plastike i MP-e odbacuju u okoliš.³



Slika 8. Prikaz prijenosa i mjesta nakupljanja mikroplastike u okolišu.¹⁹

Brojna istraživanja dokazala su njezinu prisutnost u svim prirodnim vodama, rijekama, jezerima, morima, oceanima, ali i u tlu, obalnim sredinama, sedimentu te u novije vrijeme čak i u arktičkom području odnosno ledenjacima.^{19,45} MP-e u okoliš dospjeva iz različitih industrija, postrojenja za obradu vode i dr. Izvorima MP-a smatraju se mjesta, proizvodi ili radnje koje dovode do ispuštanja mikroplastike u okoliš. Prilikom određivanja izvora, prije svega se određuje da li je riječ o primarnoj ili sekundarnoj MP.¹⁹ U tablici 4 dani su neki od izvora, vrsta i načina unosa MP-a u okoliš.

Tablica 4. Prikaz izvora, vrsta i načina unosa MP-a u okoliš.¹⁹

IZVOR	VRSTA MP-e prema podrijetlu	NAČIN DOSPIJEVANJA MP-a U OKOLIŠ
Industrijska proizvodnja plastike	primarna	prijenos vjetrom / površinsko otjecanje / gubitak
Proizvodi za osobnu higijenu	primarna	otpadne vode / otpadni mulj
Sintetička vlakna	sekundarna	otpadne vode / otpadni mulj
Odlagališta otpada	sekundarna	prijenos vjetrom / površinsko otjecanje
Graditeljstvo	sekundarna	prijenos vjetrom / površinsko otjecanje
Nepropisno odlaganje otpada	sekundarna	prijenos vjetrom / površinsko otjecanje
Abrazija guma	sekundarna	površinsko otjecanje
Luke, ribolov, prijevoz brodovima	sekundarna	prijenos vjetrom

**gubitak se smatra nenamjerno ispuštanje čestica u okoliš*

Do sada postoji mali broj istraživanja vezan za koncentraciju MP-a u okolišu. Osim toga teško ih je uspoređivati s obzirom da su korišteni različiti načini uzorkovanja, analize i određivanja koncentracije MP-a. Uzorkovanje vodenih sustava vrši se najčešće pomoću mreža čije pore iznose 300 μm i uzorkuje se s površina vode, točnije 25 cm, a brojna istraživanja pokazuju da čak oko 50 % čestica ima promjer manji od 300 μm , te da se brojne čestice plastike raspodjeljuju u vodenom stupcu te se nalaze ispod površinskih 25 cm¹⁹.

Osim načina uzorkovanja, veliki utjecaj na koncentraciju MP-a ima i godišnje doba prilikom kojeg se provodi uzorkovanje te okolišni uvjeti poput vjetera i valova.⁴⁴ Još ne postoji univerzalna i dokazano relevantna metoda za određivanje koncentracije MP-a u nekom vodenom sustavu.¹⁹ U tablici 5 prikazana su područja s maksimalnom koncentracijom MP-a u vodi.

Tablica 5. Prikaz maksimalnih koncentracija MP-a u određenim vodenim ekosustavima.¹⁹

Vodeni ekosustav	Naziv	Koncentracija MP-a u vodi
Rijeka	rijeka Los Angeles (SAD)	12 932 čestica/m ³
	Rajna (Europa)	892 777 čestica/km ²
Jezero	Three - Gorges – Dam (Kina)	12 611 čestica/m ³
	Jezero Taihu (Kina)	6 800 000 čestica/km ²
Estuarij	Yangtze estuarij (Kina)	4 137 čestica/m ³
Duboko more	Marijanska brazda (Tih ocean)	13 510 čestica/m ³
Ocean	Sjeveroistočni Pacifički ocean	9 200 čestica/m ³
	Izraelska obala na Sredozemnom moru	64 812 600 čestica/km ²
Polarni led	Arktička površinska voda	1,31 čestica/m ³

Analizom podataka prikupljenih između 2007. i 2013. godine sa 1571 mjesta na različitim dijelovima svijeta zaključeno je da više od 5,25 biliona komada plastike pliva na površini svjetskih oceana s masom od najmanje 268 940 tona, od čega je 35 450 tona u obliku MP-a¹⁶. Do sada postoji oko 77 istraživanja koja uključuju određivanje koncentracije MP-a u rijekama, te oko 20 istraživanja koja su se bavila određivanjem koncentracije MP-a u sedimentu rijeka. Na temelju numeričkih simulacija, znanstvenici pretpostavljaju da se godišnje od 1,15 do 2,41 milijuna tona plastičnog otpada prenosi iz rijeka u oceane¹⁹. Od 20 najonečišćenijih rijeka, sedam rijeka nalazi se u Kini, četiri rijeke u Indoneziji i tri rijeke u Nigeriji.¹⁹

Velike količine MP-a pronađene su i na obalama i plažama (50 000 čestica/kg na Frizijskim otocima i 285 673 čestica/m³ na plaži u Južnoj Koreji³⁹), Antartiku (0,34 (± 0,31) čestice/m³ na površini arktičke vode odnosno 2,68 (± 2,95) čestica/m³ na dubini od 6 m)¹⁹ kao i u polarnom ledu (12 milijuna čestica po m³ leda u transpolarnom sloju)¹⁹. Prema literaturi, u morskoj vodi, na plažama i u sedimentu najčešće prevladavaju PE te PP i PS, što je u skladu s podacima o potražnji plastike na tržištu.³ Ove vrste polimera plutaju na njezinoj površini, a PVC, PET i druge vrste polimera koji su veće gustoće od vode, češće se nalaze u dubljim slojevima.³ Veliki broj vodenih ekosustava još nije istražen, i pitanje je kolike su točne koncentracije na određenim područjima. Prema dosadašnjim istraživanjima može se zaključiti da je mikroplastika prisutna svuda oko nas i njezina koncentracija u okolišu svakim danom je sve veća.

2.5. Utjecaj mikroplastike na okolišne organizme

Osim estetskih problema, MP-e izaziva i ekološke probleme zbog štetnih svojstava te sposobnosti adsorbiranja različitih štetnih tvari na svoju površinu. MP-e pronađena u organizmima negativno utječe na plodnost, smrtnost, te izaziva promjene u ponašanju, imunološke reakcije, probavne probleme, razne upale i oštećenja crijeva te mnoge druge.⁴⁶ Bioraspoloživost je ključni faktor koji određuje potencijalni utjecaj MP-a na različite vrste organizama, a ovisi o svojstvima MP-a i sklonostima organizama. Fizička svojstva MP-a su ta koja utječu na morfologiju i njezinu pokretljivost unutar vodenog okoliša, a samim time i na bioraspoloživost, mijenjajući njezinu raspodjelu unutar vodenog stupca.^{46,47} Ostali čimbenici koji utječu na rasprostranjenost MP-a jesu: kemijska struktura, gustoća vode, aditivi uključeni u njihovu formulaciju, priroda polimera, ekološki utjecaji i sposobnost fragmentacije.⁴⁸ U prirodnim vodenim ekosustavima MP-a može plutati na vodi, raspršiti se u vodenom stupcu različitih dubina i akumulirati u sedimentu što ju čini dostupnom za široki niz vodenih organizama koji zauzimaju različita staništa.² Jedan od glavnih problema je što organizmi vodenih ekosustava (ličinke zooplanktona, ribe, beskičmenjaci) često ne mogu razlikovati čestice MP-a od planktona te ih koriste kao izvor hrane. MP-e koju organizam unosi može uzrokovati mehanička oštećenja probavnog sustava, poput začepjenja crijeva ili čak probiti crijevnu stjenku ukoliko ima oštre rubove.⁴⁹ Opasnost se povećava kada male životinje koje sadrže određenu koncentraciju MP-a u svome organizmu, postanu plijen većim životinjama poput ptica, morskih sisavaca, kornjača, većih riba te biomagnifikacijom dospijeva u čovjekov organizam u punoj većoj koncentraciji.^{2,49}

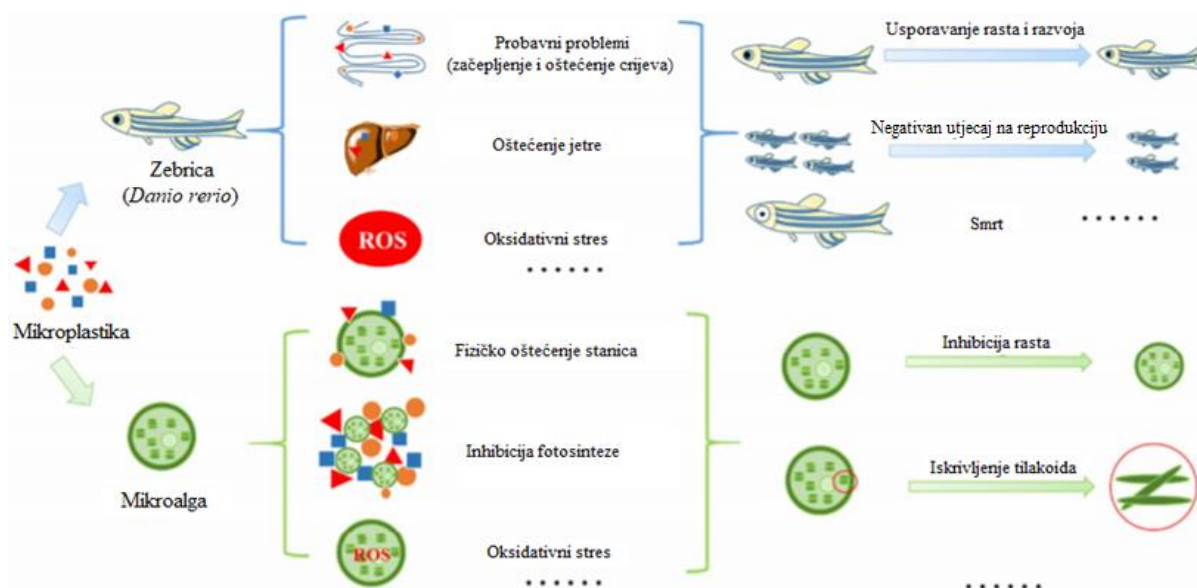
U tablici 6 dani su rezultati istraživanja MP-a u pojedinim organizmima u morskoj i slatkoj vodi.

Tablica 6. MP-a u morskim i slatkovodnim organizmima.²

IZVOR MP-a	ROD ORGANIZMA	VRSTA ORGANIZMA	OPTEREĆENJE MP-om
Morski organizmi			
Pacifički ocean	Rakovi	<i>Neocalanus cristatus</i>	1 čestica na 34 jedinki
		<i>Euphausia pacifica</i>	1 čestica na 17 jedinki
Obala Sjevernog mora	Mnogočetiinaši	<i>Arenicola marina</i>	1,2 ± 2,8 čestica/g (VT*)
Sjeverno more i Atlantski ocean	Mekušci	<i>Mytilus edulis</i>	0,27 ± 0,3 čestica/g (VT)
		<i>Crassostrea gigas</i>	0,47 ± 0,16 čestica/g (VT)
Zapadno Sredozemno more	Ribe	<i>Galeus melastomus</i>	0,34 ± 0,07 čestica po pojedincu
Jugozapadni Indijski ocean	Kornjače	<i>Caretta caretta</i>	96,2 % progutanih krhotina činila je plastika
Nizozemska	Sisavci	<i>Phoca vitulina</i>	0,26 čestica po jedinki
Slatkovodni organizmi			
Rijeka Irwell, Engleska	Maločetiinaši	<i>Tubifex tubifex</i>	129 ± 65,4 čestica/g (VT)
Jezero Taihu, Kina	Sisavci	<i>Corbicula fluminea</i>	0,2 – 12,5 čestica/g (VT)
Jedanaest francuskih rijeka	Ribe	<i>Gobio gobio</i>	12% prikupljene ribe sadržavalo je MP
Ženevsko jezero, Švicarska	Ptice	<i>Ardea cinerea</i> , <i>Cygnus olor</i> , <i>Anas platyrhynchos</i>	4,3 ± 2,6 čestica po ptici

*VT – vlažna tvar

Nekoliko studija je pratilo prijenos mikro i nanoplastike kroz hranidbeni lanac te je otkriveno da veliki broj većih grabežljivaca sadrži MP-e u svome organizmu. MP-e je otkrivena u tkivima antarktičke foke krznašice (*Arctocephalus gazella* i *Arctocephalus tropicalis*) za koje se pretpostavlja da su konzumirale pelagične ribe *Electrona subaspera* koje su u svome organizmu sadržavale MP-e.² Laboratorijska istraživanja pokazala su da kopepoda *Eurytemora affinis* i ličinke polihitisa *Marenzelleria* spp. imaju sposobnost gutanja fluorescentnih čestica PS-a veličine 10 μm .² Progutane čestice PS-a pronađene su u škampima *Mysis mixta* koje se hrane prethodno navedenim organizmima.² Istraživanjem je utvrđeno i da se nanočestice PS-a mogu prenijeti iz algi (*Scenedesmus* sp.), preko zooplanktona (*Daphnia magna*) do riba (*Carassius carassius*).² Zapaženo je i da je došlo do trofičnog prijenosa MP-a između dagnje (*Mytilus edulis*) i rakova (*Carcinus maenas*).² Zabilježeno je da čak više od 690 vrsta vodene faune guta MP-e, ali i MAP². MP-e ima isti raspon veličina kao zrno pijeska, mikroalge i planktoni, koji su dostupni širokom spektru vodenih organizama. Količina čestica koje pojedini organizam guta ovisi o njezinoj veličini. Istraživanja su pokazala da MP-e koju *Daphnia magna*⁴⁶ sadrži u crijevima opada s porastom prosječne veličine čestica. Najčešća veličina MP-a koju guta je 1100 μm ⁴⁶, što je u skladu s preferiranom veličinom njezine hrane. Ribe, *Decapterus muroadsi*, najčešće progutaju MP-e slične veličine kao njihov plijen, otprilike 1300 \pm 100 μm ⁴⁶. Istraživanja provedena na kopepodima *Centropages typicus* i rakovima *Nephrops norvegicus* i *Carcinus maenas* ukazuju da neprekidan unos MP-a u organizam dovodi do smanjenja apetita.² Neprekidno smanjivanje unosa hrane može dovesti do raznih posljedica poput smanjenja tjelesne težine, inhibicije rasta, umanjenja reproduktivnog sustava, oslabljene pokretljivosti pa čak i smrti.² Istraživanja provedena na morskim kornjačama ukazuju da gutanje krhotina MP-a može uzrokovati njihovu smrt uslijed začepjenja gastrointestinalnog trakta.⁴⁸ MP-e malih dimenzija može dospjeti u različite organe poput jetre, gušterače, jajnika i škrge gdje može uzrokovati fizičku štetu. Uz to, zapažano je da NP-a može prelaziti kroz membrane i tkiva u organizmu.²⁶ Nakon gutanja, veličina čestica je presudni faktor koji određuje translokacijsku sposobnost MP-a u tijelu organizma.⁴² Istraživanje na školjkama pokazala su da se MP-e lako može translocirati iz crijeva u cirkulacijski sustav.⁴⁸ Translokacijska sposobnost MP-a u različitim organizmima uvjetovana je temperaturom i pH-vrijednosti. Stopa desorpcije može se povećati pri nižim pH-vrijednostima i višim temperaturama.⁴⁸ Nadalje, istraživanja su potvrdila da izloženost riba PVC-u ili PE-u može uništiti njihov imunološki sustav zbog oksidativnog stresa koji MP-e izaziva u ribljim leukocitima.⁴⁸ Neki od mogućih utjecaja MP-a na mikroalge i zebrice (*Danio rerio*) prikazani su na slici 9.⁴⁹

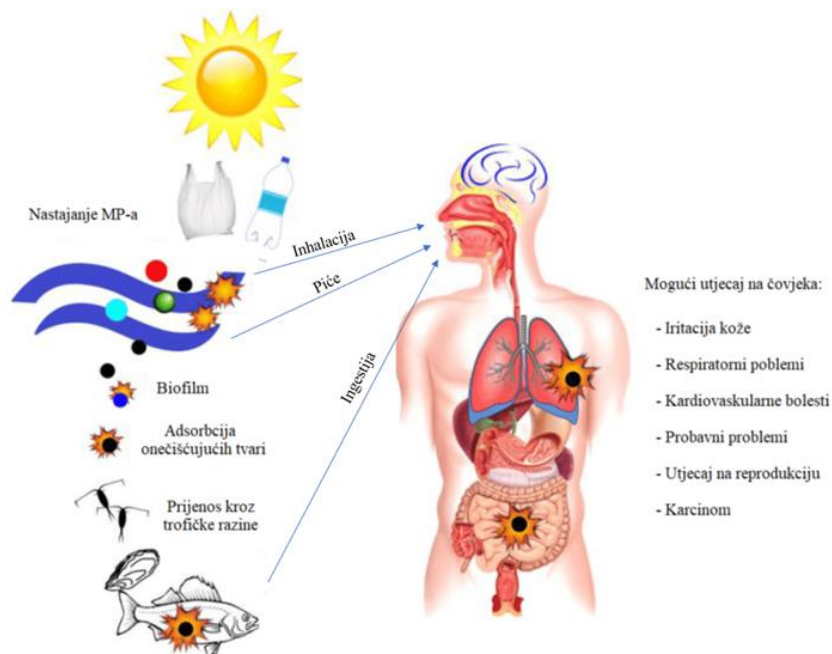


Slika 9. Utjecaj mikroplastike na zebrice i mikroalge.⁴⁹

Osim što su čestice same po sebi štetne, dodatni problem nastaje kada su na njih vezane druge toksične tvari prisutne u okolišu, poput organskih onečišćujućih tvari, teških metala, farmaceutika i drugih koje mogu izazvati još veći negativan utjecaj na organizam od njih samih.^{47,49} Stoga su učinci koje MP-e izaziva kod organizama kategorizirani kao fizički (povezani sa oblikom, bojom i dimenzijama čestica) i kemijski (povezani s prisutnošću aditiva i/ili sorbiranih kemijskih onečišćenja).⁴⁸ Daljnji problem stvaraju patogeni mikroorganizmi koji koloniziraju MP-e, te tako lako mogu završiti u organizmu različitih živih bića.² Jedna od prvih studija koja je proučavala sastav mikrobne zajednice na komadima plastike prikupljenim u sjevernom Atlantskom oceanu ustanovila je da čak 24 % ukupne mikrobne zajednice čini bakterija *Vibrio* sp., što je impliciralo na to da plastika ima moguću potencijal transporta patogena iz morskih sredina⁵⁰. Naknadne studije koje su istraživale mikrobnu zajednicu MP-e prikupljene u Sjevernom i Baltičkom moru potvrdile su prethodne studije, odnosno izolirano je nekoliko vrsta bakterije *Vibrio* među kojima je detektirana potencijalno za ljude patogena vrsta *Vibrio parahaemolyticus*, koja je odgovorna za gastrointestinalne bolesti kod ljudi.⁵⁰ Iako je MP-e prisutna u svim sastavnicama okoliša najviše se istražuju u vodenim ekosustavima. Kao što je već rečeno, na rasprostranjenost MP-a u vodenom okolišu utječu vrsta i njezina svojstva te okolišni uvjeti. Nisu svi organizmi izloženi svim vrstama MP-a. Pelagične vrste (npr. zooplanktoni) izloženi su plastikama niske gustoće, kao što su PE i PP, dok su bentonske vrste (npr. mekušci) izloženi onima veće gustoće, kao što su PVC i PET.²

2.6. Utjecaj mikroplastike na ljude

Čovjek putem hranidbenog lanca (vode, slatkovodnih i morskih riba i drugih životinja) unosi MP-a u organizam (Slika 10).



Slika 10. Izloženost čovjeka mikroplastici i mogući utjecaji na čovjeka.⁵¹

Dokazano je da veliki broj jestivih vrsta sadrži brojne plastične čestice koje uključuju mikro i nanoplastiku. S druge strane, većina čestica nalazi se u probavnom traktu organizama koji se obično uklanjaju prije konzumacije. Problem predstavljaju brojne vrste koje se ne čiste prije konzumacije, poput rakova i školjki, za koje je također dokazano da sadrže velike količine MP-a u svome organizmu.² Pored toga, manje veličine MP-a mogu prodrijeti u tkiva ili krvožilni sustav vodenih organizama, povećavajući na taj način teškoće u uklanjanju istih. Na temelju potrošnje namirnica, procijenjeno je da unos mikroplastičnih čestica godišnje iznosi između 39 000 i 52 000 po osobi⁵², te da bi ljudi u europskim zemljama mogli progutati čak 11 000 čestica² plastike godišnje samo zbog konzumiranja školjkaša. Prisutnost MP-a zabilježena je i u kuhinjskoj soli i šećeru, a procjenjuje se da bi količina MP-a koju osoba unese godišnje kroz konzumiranje kuhinjske soli mogla iznositi između 37 i 100 čestica u Europi i Kini⁵². Studije provedene na miševima, koji imaju sličnu anatomiju ljudskoj, utvrdile su da MP-e koja se nakuplja u jetri, bubrezima i crijevima može uzrokovati nekoliko štetnih učinaka, poput poremećaja energetskeg i lipidnog metabolizma, oksidativnog stresa i neurotoksičnih reakcija.^{49,52}

Nadalje, štetne tvari adsorbirane na MP-u lako se desorbiraju u specifičnim uvjetima u životinjskim crijevima, te se nakon toga mogu prenijeti duž hranidbenog lanca. Otkriveno je da se stopa desorpcije štetnih tvari adsorbiranih na MP-u povećava do 30 puta u crijevima toplokrvnih životinja u usporedbi sa stopom desorpcije u morskoj vodi, a ljudi se mogu promatrati kao toplokrvne životinje.⁴⁹ Osim ingestijom, ljudi plastične čestice unose i inhalacijom. MP-e se u zrak ispušta iz brojnih izvora poput sintetičkih tekstila i abrazije materijala (npr. automobilskih guma, zgrada). Procjenjuje se da čovjek u danu inhalacijskim putem unese između 26 i 130 čestica MP-a⁵². Osobe koje se bave laganim vanjskim aktivnostima unose i veće količine. Muška osoba tijekom vanjske aktivnosti udahne čak 272 čestice MP-a dnevno⁵². Količina udahnutih čestica u zatvorenim prostorijama ovisi o načinu čišćenja, godišnjem dobu, materijalima od kojih je izrađen namještaj i druga oprema. Čestice manje gustoće i veličine doprijet će dublje u pluća i izazvat veće probleme. Nakon što se čestice MP-a u plućima istalože, postoji opasnost od migriranja u cirkulacijski ili limfni sustav te može doći do kronične upale. Istraživanja provedena na štakorima ukazuju da nanočestice PS-a veličine 64 nm dovode do nakupljanja neutrofila i upale pluća, dok mikročestice PVC-a veličine 2 µm izazivaju značajnu citotoksičnost i hemolizu u plućnim stanicama.⁵² Na dalje, dokazano je da izlaganje česticama PS-a i PE-a koncentracije 0,05 - 10 mg/L može izazvati visoku proizvodnju reaktivnih oksidacijskih vrsta u moždanim i epitelnim ljudskim stanicama.⁵² Najugroženijom skupinom smatraju se radnici u tvornicama tekstilne industrije i postrojenjima za polimerizaciju različitih plastika. Kod radnika su uočeni respiratorni simptomi povezani s razvojem dišnih putova koji se pripisuju izloženosti MP-a iz zraka na radnome mjestu.⁵² Iako ovo područje ima još puno prostora za istraživanje, te je sve navedeno samo pretpostavka, potencijale opasnosti za ljude postoje. Brojne studije dokazuju potencijalni štetni učinak MP-a na zdravlje čovjeka.²

Zbog svega do sada navedenoga, jasno je da su potrebna još mnoga istraživanja kako bi se utvrdili svi procesi kojima plastične čestice u okolišu podliježu, njihov prijenos kroz okolišne medije i hranidbeni lanac, te stvarna izloženost i utjecaj MP-a i NP-a na žive organizme.

2.7. Ekotoksikologija

Toksikologija je znanost koja proučava štetne učinke kemijskih tvari na žive organizme. Društvo za toksikologiju široko je definiralo toksikologiju kao „proučavanje štetnih učinaka kemijskih, fizikalnih ili bioloških uzročnika na žive organizme i ekosustav, uključujući sprečavanje i meliorizaciju takvih štetnih učinaka“.⁵³

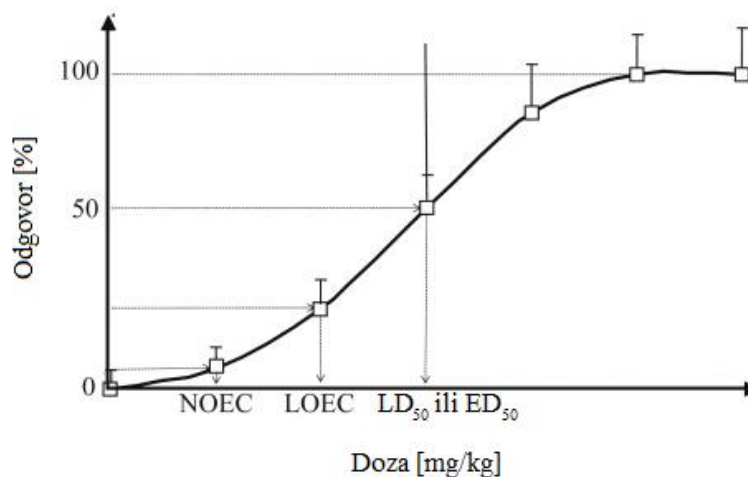
Ključno za svaku toksikološku definiciju je riječ "štetna". Štetni učinak može se definirati kao odgovor na tvar čiji učinak se promatra. Iako neke tvari mogu izazvati vidljivo štetne učinke pod određenim uvjetima, te iste tvari mogu izazvati neku ili nikakvu promjenu, koju je teško definirati kao štetnu, u drugim uvjetima.⁵³ Široki je spektar tvari koje izazivaju toksične reakcije, a mogu se klasificirati ili kao otrovne tvari (prirodno prisutni ili sintetički ksenobiotici) ili kao toksini (tvari koje proizvode drugi živi organizmi koji izazivaju toksične reakcije).⁵³ Postoji više vrsta toksikologije. Na primjer, molekularna toksikologija odnosi se na interakciju između štetnih tvari i biomolekula poput nukleinskih kiselina, proteina i lipida, dok se stanična toksikologija usredotočuje na način na koji stanice, kao osnovna jedinica živih organizama, utječu i ponašaju se u prisutnosti štetnih tvari. Toksikologija organskih sustava proučava utjecaj funkcija različitih organa unutar složenijih vrsta, a toksikologija organizma razmatra ukupne reakcije netaknutih organizama. Ekotoksikologija proučava direktni ili indirektni učinak ksenobiotika na ekosustav u cijelini.⁵³ Cilj je odrediti toksikološki utjecaj onečišćujućih tvari na divljinu (prirodnu faunu i floru), s primarnim ciljem zaštite domorodne flore i faune na razini stanovništva, zajednice i ekosustava. Kako bi se postigao ovaj cilj, istraživanje se provodi pomoću različitih vrsta, uključujući kralježnjake i beskralježnjake, biljke i mikroorganizme.⁵³

2.7.1. Testovi ekotoksičnosti

Za sve potencijalno štetne tvari provode se testovi toksičnosti na različitim organizmima kako bi se odredili potencijalno štetni učinci tih tvari na zdravlje ljudi i životinja ili potencijalni štetni utjecaj na okoliš u cjelini. Cilj je osigurati najsigurniju moguću upotrebu kemikalija i proizvoda koji sadrže kemikalije. Svi testovi toksičnosti moraju se provoditi u skladu s zakonskom regulativom.⁵ Općenito testove ekotoksičnosti možemo podijeliti na *in vivo* i na *in vitro* testove.⁵ Ukoliko želimo odrediti općeniti utjecaj na organizam u cjelini provodi se *in vivo* test, a ukoliko želimo odrediti utjecaj na pojedini dio organizma tada primjenjujemo *in vitro* testove. I *in vitro* i *in vivo* testovi koriste se za procjenu toksičnosti kemikalija i ocjenu osnovnih štetnih utjecaja istih (npr. oksidativni stres, imunotoksičnost, genotoksičnost i dr.).⁵ U početku su se provodili *in vivo* testovi toksičnosti na glodavcima, zečevima, majmunima, psima, pticama i drugim primatima koji nisu ljudi, zbog pretpostavke da su vidljivi štetni učinci na „životinjskim modelima“ relevantni za određivanje štetnog utjecaja na ljude. Nakon što su zakonom zabranjena ispitivanja toksičnosti na većini kralježnjaka u znanstvene svrhe, istraživanja su se počela provoditi *in vitro*.

Najpoznatiji primjeri provođenja *in vitro* testova su na bakterijama (npr. *Vibrio fischeri*; ISO 11348:2007⁵⁴), kvascima (npr. *Saccharomyces cerevisiae*; ISO 19040-1:2018⁵⁵), slatkovodnim i morskim algama (OECD 201:1984)¹⁴, biljkama (OECD 208:2003)⁵⁶ i drugim beskralježnjacima i manjim ribama odnosno njihovim embrijima (ISO 21115:RTgill-W1)^{57,11}. Organizacije ISO i OECD propisuju metode provođenja testova toksičnosti, te dopušteno vrijeme izlaganja organizama tvarima koje se ispituju. Tako se testovi inhibicije rasta na bakterijama mogu provoditi 48 h, na algama 72 h te na ribama i njihovim embrijima 96 h.^{13,14,15} *In vitro* testovi se provode na dijelovima tkiva, izoliranim organima ili stanicama, pa čak i na subcelularnim frakcijama poput mitohondrija, mikrosoma i membranama.⁵⁸ Značaj i popularnost *in vitro* testova je porasla u posljednje vrijeme i često zamjenjuju *in vivo* testove jer štede vrijeme i novac, a biotehnološki napredak omogućuje brze, ponovljive i pouzdane analize. Postavljanje eksperimenata je relativno jednostavno i može se kontrolirati vrijeme i broj uzoraka. Također, brojne organizacije i društva potiču ove testove zbog dobrobiti životinja.⁵⁸ Međutim, na temelju ovih testova ne može se procijeniti potencijalna opasnost za ljude, što predstavlja problem. Zato je i dalje dopušteno provoditi testove toksičnosti na nekim glodavcima zbog njihove anatomije koja je slična ljudskoj.¹¹ Akutna toksičnost, kronična toksičnost, genotoksičnost, mutagenost, reproduktivna toksičnost, teratogenost i drugo, samo su neke od štetnih svojstava tvari koje se ispituju.¹¹

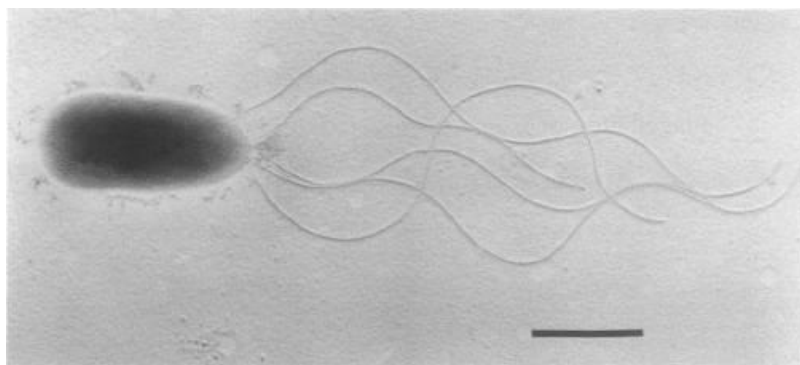
Modeliranje krivulje *doza-odgovor* jedan je od najvažnijih koraka procjene ekološkog rizika. To zahtijeva određivanje odnosa koncentracije na učinak za ispitivanu vrstu.⁵⁹ Uobičajeni testovi toksičnosti provode se tako da se ispitivani organizam izloži potencijalno štetnoj tvari, te se mjeri određeni parametar u vremenskim razmacima (npr. broj živih stanica bakterija). Zatim se uspoređuju dobiveni podaci kod izloženih vrsta u odnosu na neeksponirane vrste.⁶⁰ Na temelju eksperimentalno dobivenih podataka stvara se krivulja *doza-odgovor* kako bi se identificirala najniža doza ili koncentracija tvari koja se ispituje i koja izaziva prvi učinak, kao i najveća doza ili koncentracija bez učinka. Najniža doza koja izaziva učinak naziva se LOEC, a najviša doza koja ne izaziva učinak NOEC.^{11,61} U većini slučajeva cilj ispitivanja je odrediti LD₅₀ i ED₅₀.⁶¹ 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.⁶¹ Na slici 11 prikazana je općenita krivulja *doza-odgovor* s naznačenim parametrima.



Slika 11. Opći izgled krivulje toksičnosti.⁶²

2.7.1.1. Ispitivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

Pseudomonas je jedan od najkompleksnijih i najraznolikijih bakterijskih rodova koji obuhvaća preko 250 vrsta. Većina vrsta iz ovog roda sveprisutna je u okolišu i izolirana je s raznih karakterističnih staništa u vodi, tlu i eukariotskim domaćinima.⁶³ *Pseudomonas putida* druga je po broju opisanih vrsta, a izolirana je 1889. godine⁶⁴. *Pseudomonas putida* ima bitnu ulogu u okolišu, često se primjenjuje u bioremedijaciji tla i vode, a posjeduje i biotehnoški potencijal.^{63,64} *Pseudomonas putida* je gram-negativna, štapičasta bakterija, prosječne veličine 2 – 4 μm koja se kreće pomoću biča (Slika 12).^{64,65} Njezina optimalna temperatura rasta je između 25 i 30 °C.⁶⁴ Kao što je već spomenuto, sudjeluje u bioremedijaciji voda i tla onečišćenih ugljikovodicima i ostalim organskim tvarima, te učinkovito bioakumulira teške metale (npr. Cu, Zn).⁶³ *Pseudomonas putida* se često primjenjuje za određivanje toksičnosti ksenobiotika primjenom metode inhibicije rasta (ISO 10712:1995)^{13,61}. Ispitivanje je prikladno za utvrđivanje inhibicijskih učinaka uzoraka površinskih voda, otpadnih voda ili tvari koje se otapaju u vodi, a prisutne su u ili na tlu. Prikladna je i za procjenu ekotoksikoloških učinaka tla, osobito u nepoznatim mjestima, kompostu i otpadu.⁶⁵ U tim slučajevima priređuju se eluati, odnosno provode se *leaching* testovi.⁶⁶ Nedostatak testa je ograničenost za tamno obojene ili mutne uzorke jer se rast bakterija analizira fotometrijski.⁶⁵



Slika 12. Fotografski snimak *Pseudomonas putida* elektronskim mikroskopom, veličine 1 μm .⁶⁷

2.7.1.2. Ispitivanje ekotoksičnosti mikroplastike na mikroalgama

Unatoč činjenici da su na dnu hranidbenog lanca i da je fotosinteza algi glavni izvor zemaljskog kisika, znanje o ekotoksikološkim učincima na primarne proizvođače vrlo je ograničeno.⁶⁸ Mikroalge mogu biti prokariotski i eukariotski fotosintetski jednostanični i višestanični mikroorganizmi jednostavne stanične građe koje čine oko 75 % svih algi, a proizvode oko 40 % kisika koji se nalazi u atmosferi.^{69,70} Karakterizira ih jednostavna stanična struktura koja im osigurava brz i uspješan rast čak i u nepovoljnim uvjetima okoline. Prisutne su u najrazličitijim ekosustavima od vodenih ekosustava (mora, rijeke, jezera, lagune) do staništa u kojima vladaju nepovoljni uvjeti okoline poput pustinja, toplinskih izvora, a pronađene su i ispod leda Antartika.⁶⁹ Smatra se da postoji preko 50 000 različitih vrsta mikroalgi. Njihove različite morfološke i fiziološke karakteristike omogućavaju njihovu primjenu u različitim biotehnološkim procesima.⁶⁹ Morske alge koje se nalaze na dnu hranidbenog lanca služe kao vrlo dobri indikatori onečišćenosti morskih ekosustava.⁶⁸

Testovi na algama koje propisuje OECD 201:1984¹⁴ (engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) općenito se koriste za ekotoksikološko ocjenjivanje kemikalija na temelju inhibicije rasta algi. Osim inhibicije rasta mogu se pratiti i morfološke promjene, oksidativni stres, deformacije tihakoida, oštećenje DNA, smanjenje klorofila i inhibicija fotosinteze.^{49,68,71} Ipak, većina istraživanja usredotočena je na dinamiku rasta fitoplaktona nakon izlaganja mikro i nanoplastici. Dobiveni rezultati ukazuju da MP-e uzrokuje smanjenje rasta mikroalgi, odnosno da s povećanjem koncentracije čestica MP-a i vremena izloženosti dolazi do inhibicije rasta.²

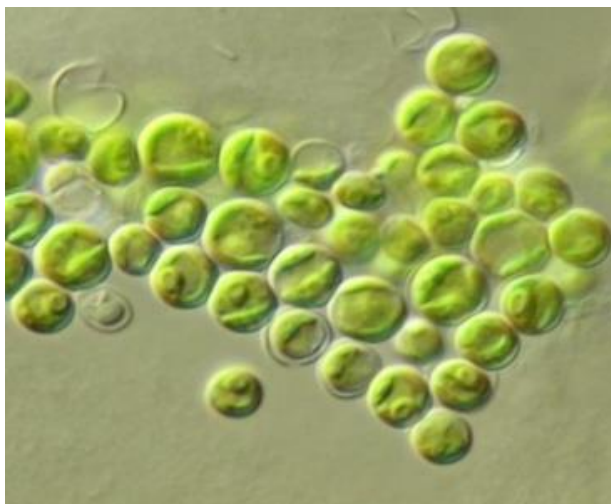
Nadalje, studija koja je proučavala toksičnost PVC-a na mikroalgu *Skeletonema costatum* pokazala je da čestice veličine 1 μm nisu utjecale na rast, dok su čestice manje veličine (1 μm) imale utjecaj.⁶⁸ Ispitivanja slatkovodnih mikroalgi pokazala su da izloženost MP-u može uzrokovati velik broj fizičkih oštećenja i oksidativni stres stanica algi, te ekspresiju gena uključenih u određene metaboličke putove.² MP-e uzrokuje smanjenje sadržaja klorofila, odnosno učinkovitost procesa fotosinteze.² Točni mehanizam toksičnosti nije u potpunosti jasan, ali pretpostavlja se da dolazi do adsorpcije plastičnih čestica na površinu algi koje ometaju izmjenu svjetlosti i plina te na taj način sprječavaju proces fotosinteze.⁶⁸ U nekoliko studija došlo je i do stvaranja heteroagregata između čestica plastike i mikroalgi. Zaključeno je da toksičnost MP-a na fitoplankton varira s obzirom na brojne čimbenike kao što su veličina čestica, vrsta polimera, koncentracija mikroplastike, vrijeme izloženosti i ciljane vrste.²

U tablici 7 prikazane su vrste algi koje se najčešće koriste u testovima toksičnosti MP-a te osnovne karakteristike ispitivanih MP-a i rezultati istraživanja.

Tablica 7. Ekotoksikološka istraživanja MP-a primjenom mikroalgi.^{2,72}

Vrsta alge	Vrsta MP-e	Veličina MP-e [μm]	Koncentracija MP-e [mg/L]	Vrijeme izloženosti [h]	Rezultati istraživanja
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	PS	0,05 – 6	25 i 250	72	Uočena inhibicija rasta algi, ali bez utjecaja na fotosintezu.
<i>Chlorella vulgaris</i>	PS	0,05 – 6	25 i 250	72	Nema utjecaja na fotosintezu.
<i>Tetraselmis chuii</i>	PE	1 – 5	0,046 – 1,5	96	Nema učinka na rast nakon izlaganja.
<i>Skeletonema costatum</i>	PVC	1	0 – 50	96	Inhibirani rast, smanjen klorofil i reducirana fotosinteza.
<i>Scenedesmus obliquus</i>	PS	0,07	44 – 1100	72	Inhibirani rast i smanjen klorofil.
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	PS	0,055 i 0,1	0,1 – 1	72	Uočena inhibicija rasta algi.

Chlorella sp. je jednostavna, jednostanična i uobičajena vrsta zelenih algi, a prikazana je na slici 13. Kuglastog je oblika i promjera između 2 do 10 μm . Razmnožava se nespolno proizvodnjom autospora. Na primjer, *Chlorella vulgaris* ima aseksualnu reprodukciju u kojoj, majka stanica reproducira 4 kćeri stanice.⁷³ Vrste ovog roda rasprostranjene su u slatkoj vodi i moru, te zraku i tlu.⁷⁰ Može se upotrijebiti kao idealni testni organizam za provedbu testova toksičnosti, istraživanje fotosinteze, nitrata, fiziologije redukcije fosfata i biokemije. Poznato je da se ova vrsta mikroalgi koristi u obradi otpadnih voda, proizvodnji biodizela i električne energije, dodacima hrani i sadrže vrijedne ekstrakte za kemijske proizvode.⁷⁰ Zbog sveprisutnosti u okolišu, brzog razmnožavanja i jednostavnosti rada, *Chlorella* sp. se često koristi kao testni organizam u testovima toksičnosti.



Slika 13. Mikroskopska slika *Chlorella* sp..⁷⁴

2.7.1.3. Ispitivanje ekotoksičnosti mikroplastike na embrijima zebričama - *Danio rerio*

Cilj testova toksičnosti koji se provode na ribama je procjena opasnosti za okoliš od pojedinačnih tvari, klasifikacija opasnosti tvari ili u nekim slučajevima, procjena opasnosti otpadnih voda. Kako bi se ti ciljevi postigli, potrebno je procijeniti akutnu i kroničnu toksičnost za ribu, te odrediti tvari koje se potencijalno mogu akumulirati u tkivima ribe. Ribe kao taksonomska skupina su prvenstveno vodeni kralježnjaci, pa se smatraju nezamjenjivom komponentom ispitivanja toksičnosti vodenih uzoraka. Osim toga, one su prve izložene vodenom onečišćenju, pa se često koriste i za monitoring kakvoće voda.⁷⁵ Na razini OECD-a (*Organization for Economic Cooperation and Development*⁷⁾ postoji čitav niz smjernica za upotrebu riba kao ispitnih organizama.

Testovi se mogu provoditi za ispitivanje akutne toksičnosti, toksičnosti u ranom životnom stadiju, kratkoročni testovi toksičnosti na ribljim embrijima i toksičnost prilikom odrastanja odnosno u stadiju larve.⁷⁵ Najčešće se provodi ispitivanje akutne toksičnosti. Akutna toksičnost određuje se na temelju krivulje *doza-odgovor* odnosno određivanja LC_{50} . Neke europske zemlje sve manje koriste ribe za određivanje akutne toksičnosti, te usvajaju alternativne metode ispitivanja, kao što su testiranja na ribljim embrijima.⁷⁵ Ispitivanje toksičnosti na ribama općenito se može provoditi *in vitro* ili *in vivo*. *In vitro* pokusi provode se na ribljim stanicama. Koriste se najčešće u ekotoksikološkim ispitivanjima za rangiranje toksičnosti kemikalija, kemijskih smjesa, uzoraka iz okoliša i u identifikaciji procjene toksičnosti.⁷⁵ Razvijen je niz testova *in vitro* citotoksičnosti pomoću ribljih stanica, a većina njih koristi stanice koje potječu od salmonidnih i ciprinidnih vrsta. Pronađena je dobra povezanost između *in vivo* i *in vitro* testova na ribama u kojima se određivala akutna toksičnost velikog broja kemikalija iz različitih klasa, te se na temelju toga predložila alternativa za ispitivanje akutne toksičnosti na ribama. Prednosti *in vitro* testova su brzina i ekonomičnost, ali su ograničeni osjetljivošću.⁷⁵ Zebrice spadaju pod jednu od najčešćih vrsta riba koje se koriste kao modelni organizmi u testovima toksičnosti. Ova vrsta je dostupna, jeftina, lako održiva i u odgovarajućim uvjetima daje velik broj prozirnih jaja, te se zato često odabire za testove embriotoksičnosti. Zebrice su postale glavni modelni organizmi u neurobiologiji i toksikologiji, kao i općenitoj molekularnoj i razvojnoj biologiji.⁷⁵ Potječu iz rijeke Ganges na sjeveru Indije. Na slici 14 prikazana je muška i ženska odrasla jedinka zebrice, *Danio rerio*. Spol odraslih zebrica može se lako razlikovati po tome što ženke imaju veći trbuh i nemaju crvenkaste nijanse duž srebrnih linija za razliku od mužjaka.^{75,76}

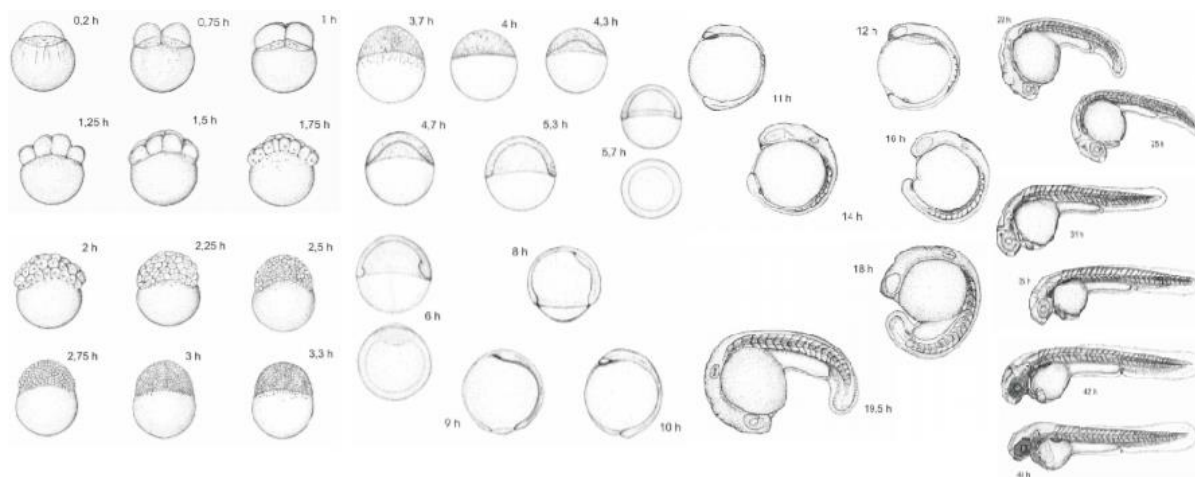


Slika 14. Odrasle zebrice (*Danio rerio*). Gornja jedinka je ženka, a donja mužjak.⁷⁵

Zebrice su male bentopelagičke ciprinidne ribe sa srednjom dužinom odraslih jedinki između 3 i 5 cm⁷⁵. Čuvaju se u cirkulacijskom akvarijskom sustavu koji kontinuirano filtrira i prozračuje vodu kako bi se održavala potrebna kvaliteta vode u sustavu. Cirkulacijski sustav pomaže i u filtriranju viška hrane i izmeta. Za brzi rast i razvoj zebrica, potrebno je održavati temperaturu u sustavu između 26 – 28,5 °C, pH vode u sustavu treba svakodnevno provjeravati i održavati između 6,8 i 7,5 te omogućiti interval svjetlosti 14:10 sati (svjetlo:mrak) jer se njihov mrijest aktivira svjetlošću.^{76,77} Embriji zebrica tijekom 72h prelaze u stadij larve. U stadiju larve se nalaze oko 3 mjeseca, a zatim prelaze u odrasle jedinke koje žive oko 3 godine.⁷⁶

Brojna toksikološka istraživanja provedena na zebricama ukazala su da mikroplastika (~ 70 µm) uzrokuje oštećenje crijeva, uključujući probijanje stijenke crijeva, a izloženost zebrica PP-u (10 mg/L) uzrokovalo je prosječno smanjenje preživljavanja za 27,1 %.⁴⁹ Uočeno je nakupljanje mikroplastičnih čestica PS-a u tkivima, škragama, jetri i crijevima zebrica, što je rezultiralo upalom, nakupljanjem lipida u jetri i povećanjem oksidativnog stresa.⁷²

Prilikom provođenja testova na embrijima treba izbjegavati korištenje divljih zebrica jer su njihove karakteristike često upitne, te postoji mogućnost i da su križanci. Takvi modelni organizmi mogu dovesti do krivih zaključaka. Razlog velikog, odnosno natečenog trbuha kod ženki je taj što jedna ženka rađa između 50 i 200 jaja na dan⁷⁵. Ženske zebrice koje se koriste za mrijest trebaju biti između 4 i 15 mjeseci starosti.⁷⁵ Embriji su prozirni i razvijaju se izvana, te je omogućeno jednostavno promatranje kao što je prikazano na slici 15. Većina organa razvija se unutar jednog dana.⁷⁷ Veličina embrija je mala i mogu se smjestiti u Petrijeve zdjelice. S obzirom da se embrionalni razvoj može pratiti u svim stadijima, osim smrtnosti, moguće je odrediti i subletalni učinak na razvoj repa, veličinu tijela i oka, razvoj uha, cirkulaciju, otkucaje srca, pigmentaciju, razvoj mišića, pokretljivost i mnoge druge parametre karakteristične za određeni stadij.^{75,77} Karakteristike za pojedini stadij razvoja embrija navedeni su u tablici 8. Ta svojstva čine ovu vrstu izvrsnim modelom za embriotoksične testove. Mnogi stručnjaci smatraju kako bi testovi koji se provode na embrijima riba mogli zamijeniti testove koji se provode na glodavcima.⁷⁷



Slika 15. Prikaz embrionalnih stadija razvoja zebrice.⁷⁵

Tablica 8. Embrionalni stadiji razvoja zebrice.⁷⁵

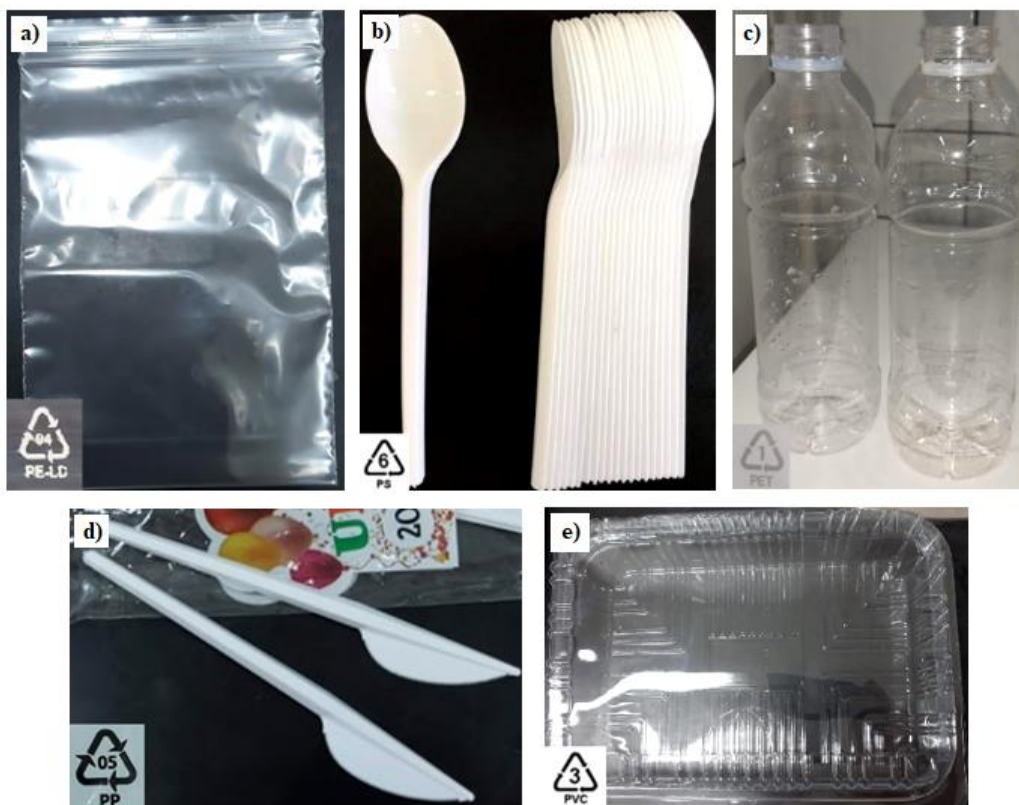
Vrijeme [h]	Stadij	Karakteristike
0	Oplodnja	Zigota
0	Period zigote	Citoplazma se akumulira na životinjskom polu, jednoćelijski stadij
0,75	Dioba	1. (vertikalna srednja) podjela: dvostanični
1		2. (vertikalna) podjela: četverostanični stadij
1,25		3. (okomita i paralelna s prvom ravninom) podjela: 8-stanični stadij
1,5		4. (okomita i paralelna s drugom ravninom) podjela: 16-stanični stadij
2	Blastula	Početak stadija blastule
3		Kasno cijepanje; sadrži otprilike 256 blastomera
4		Ravno sučelje između blastoderme i žumanjka
5,25	Grastula	50 % epiboličkih pokreta; blastoderma se smanjuje i sučelje između periblasta i blastoderme postaju zakrivljeni
8		75 % epiboličkog pokreta
10		Epibolički pokret završava, blastopore su gotovo zatvorene
10,5	Segmentacija	Najprije razvoj somita
12		Somiti su razvijeni, rano tijelo, rep segmentiran
20		Mišićno trzanje; rep dobro ispružen
22		Razvoj unutarnjeg uha (otolita)
24	Faringula	Spontani pokreti, rep se odvaja od jajeta; rana pigmentacija
30		Smanjeno spontano kretanje; mrežnica pigmentirana, stanična degeneracija kraja repa; cirkulacija u aortnom luku vidljiva
36		Pigmentacija repa; formiranja krvožilnog sustava i aortalnih lukova; otkucaji srca
72-96	Period izleganja	Otkucaji srca redoviti; nastavak žumanjka koji se počinje sužavati; ledne i ventralne pigmentirane trake susreću se na repu; razvoj čeljusti, škrge, arterija i vena

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroplastika

Za određivanje ekotoksičnosti mikroplastike (MP) primjenom bakterije *Pseudomonas putida* i mikroalge *Chlorella* sp. koristilo se pet vrsta MP-a koje su dobivene usitnjavanjem makroplastike (MAP). Za dobivanje PE-a koristile su se plastične vrećice, za PS i PP jednokratni plastični pribor za jelo, za PVC jednokratna plastična ambalaža i za PET plastične boce (Slika 16). Svaka MAP imala je oznaku koja je odgovarala traženoj vrsti plastike kao što je prikazano na slici 16.



Slika 16. MAP koja se koristila za dobivanje MP-a: a) vrećice od LDPE-a, b) žlice od PS-a, c) boce od PET-a, d) noževi od PP-a i e) ambalaža od PVC-a.

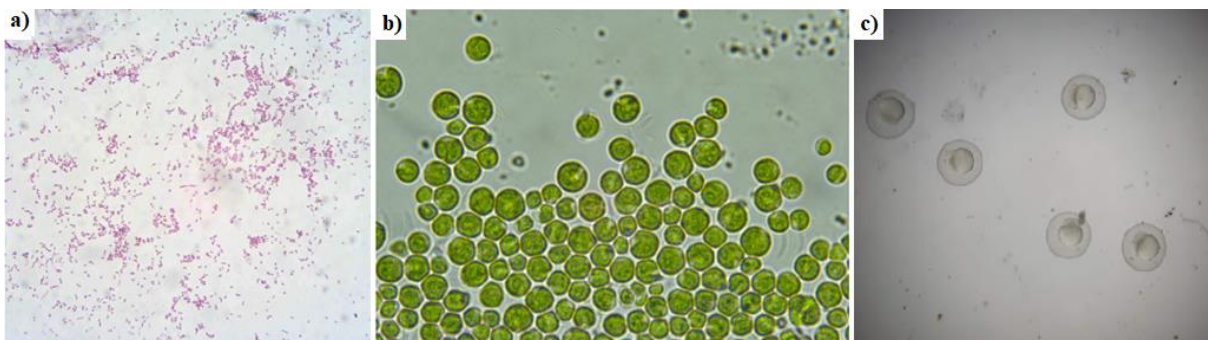
Za ispitivanje ekotoksičnosti mikroplastike na embrijima zebrića – *Danio rerio*, koristila se sintetski dobivena mikroplastika PS-a (Slika 17).



Slika 17. Sintetski dobiven PS.

3.1.2. Testni organizmi

Za provedbu ekotoksikoloških istraživanja korišteni su sljedeći testni organizmi: bakterijska kultura *Pseudomonas putida*, slatkovodna alga *Chlorella* sp. i embriji zebrića *Danio rerio*. Mikrofotografije testnih organizama snimljene u nultome danu prikazane su na slici 18. Navedene kulture pohranjene su u zbirci Zavoda za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, a embriji zebrića u Zavodu za istraživanje mora i okoliša na Institutu Ruđer Bošković, Zagreb.



Slika 18. Mikrofotografija: a) bakterijske kulture *Pseudomonas putida* u nultom danu obojane po Gramu snimljena u prolaznoj svjetlosti, $P = 1000\times$, b) alge *Chlorella* sp. snimljena u nultome danu u polaznoj svjetlosti, $P = 400\times$ i c) embriji zebrića *Danio rerio* nakon mrijesta snimljeni pod povećanjem, $P = 3\times$.

3.1.3. Mediji i kemikalije

➤ Hranjiva podloga

Tekuća hranjiva podloga za uzgoj bakterija je hranjivi bujon koji se dobiva ekstrakcijom goveđeg mesa, uz dodatak peptona, NaCl-a i K_2HPO_4 . U svrhu pripreve čvrste podloge koja se koristila za uzgoj bakterijske kulture *Pseudomonas putida* bilo je potrebno dodati 1 – 2 % agara (15 – 20 g agara/L hranjive podloge)⁷⁸.

➤ Mineralni medij

Mineralni se medij (MM) koristio za pripremu suspenzije bakterijske kulture *Pseudomonas putida* i kao medij za postavljanje pokusa. Pripremao se prema uputama ISO 1072:1995¹³ uz modifikaciju, tj. bez dodatka glukoze. Spojevi, prikazani u tablici 9, pripremali su se u 1 L deionizirane vode. pH – vrijednost MM-a se podesila na 7,0 pomoću 0,1 M natrijeve lužine (NaOH), te je MM prije upotrebe steriliziran.

Tablica 9. Prikaz spojeva i njihovih koncentracija potrebnih za pripravu MM-a.¹³

Naziv spoja	Kemijska formula	Koncentracija [mg/L]
Natrijev nitrat	$NaNO_3$	500
Kalijev hidrogenfosfat	K_2HPO_4	120
Kalijev dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	60
Magnezijev sulfat heptahidrat	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200
Željezo (III) citrat	$C_6H_5FeO_7$	0,5

➤ Bazalni medij

Bazalni medij (BM), *Bold Modified Basal Freshwater Nutrient Solution*, Sigma, Ujedinjeno Kraljevstvo, koristio se za uzgoj mikroalge *Chlorella* 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. Tako pripremljen BM se sterilizirao prije upotrebe.

➤ Medij za embrije

Medij za embrije (E3) koristio se u pokusima određivanja ekotoksičnosti mikroplastike na embrijima zebrića, a sastojao se od spojeva prikazanih u tablici 10, na 1 L deionizirane vode. Tako se dobio E3 medij za embrije 50x, od kojeg se 20 mL dodalo u 980 mL deionizirane vode u svrhu dobivanja E3 medija 1x koji se koristio za provedbu pokusa.⁷⁹ Podešavanje pH – vrijednost E3 medija 1x (na 7,8) postiglo se dodatkom 0,18 g natrijevog hidrogenkarbonata (NaHCO₃) na 1 L E3 medija.

Tablica 10. Prikaz spojeva i njihovih koncentracija potrebnih za pripravu E3 medija 50x.⁷⁹

Naziv spoja	Kemijska formula	Koncentracija [mM]	Masa [g]
Natrijev klorid	NaCl	250	14,610
Kalijev klorid	KCl	8,5	0,634
Kalcijev klorid	CaCl ₂	16,5	1,832
Magnezijev sulfat	MgSO ₄	16,5	1,986

➤ Etanol

Etanol (70 %) koristio se za sterilizaciju mikroplastike prije postavljanja pokusa s *Pseudomonas putida* i *Chlorella* sp..

3.2. Mjerni instrumenti i oprema

- U radu je korištena rotacijska termostatorirana tresilica Heidolph unimax 1010, Heidolph inkubator 1000, Njemačka, za provedbu pokusa u šaržnim uvjetima.
- Za usitnjavanje plastičnih materijala korišten je blender Philips, a za prosijavanje mikroplastike upotrebljen je uređaj za trešenje sita W. S. Tyler RX-86-1 Sieve shaker, USA, i sita istog proizvođača te veličine pora 300 μm, 500 μm i 1000 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) upotrjebljena je Thomina komorica.
- Za sterilizaciju bazalnog i mineralnog medija, hranjive podloge, čistog staklenog posuđa, kao i onečišćenog posuđa, korišten je autoklav Sutjeska, Jugoslavija.
- Za homogeniziranje priređenih decimalnih razrjeđenja korišten je homogenizator EV-100, Tehnica, Slovenija.
- U svrhu aeriranja alge *Chlorella* sp. korištena je aeracijska pumpa Tetratex, a za osvjetljenje alge koristila se lampa.
- Bakterijska kultura *Pseudomonas putida* uzgajana je u termostatu Termomedicinski aparati, Hrvatska, a embriji zebrića u termostatu Liebherr, FKU 1800-20C/774, Njemačka.
- U pokusima provedenim s *Chlorella* sp. i *Pseudomonas putida*, 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.
- U pokusima provedenim s embrijima zebrića, vrijednost pH E3 medija određivana je pomoću pH metra Sartorius Basic Meter PB-11, Njemačka.
- Optička gustoća određivana je na spektrofotometru Hach, Model DR/2400, SAD.
- Alga *Chlorella* sp., kao i bakterijska kultura *Pseudomonas putida* mikroskopirane su pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera).
- Embriji zebrića mikroskopirani su pomoću lupe (Motic SMZ-171, Hong Kong) opremljene kamerom za snimanje mikrofotografija (Moticam 5.0MP, Hong Kong).

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprema mikroplastike

Makroplastika, PE-a, PP-a, PS-a, PVC-a i PET-a, prikazana na slici 16, prvo je usitnjena škarama na manje komade te se zatim usitnjavala u blenderu uz dodatak mokrog leda odnosno suhog leda za PE. Usitnjene čestice MP-e sušile su se na zraku 24 - 48 h pri sobnoj temperaturi, te su se zatim prosijavale mehanički koristeći sita određenih veličina pora u svrhu dobivanja čestica veličine: 300 – 500 µm; 500 – 1000 µm i >1000 µm.

U svrhu sterilizacije mikroplastike, određene mase MP-e izvagale su se u odmjerne 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. Nakon toga čestice MP-e su izdvojene iz etanola i isprane sterilnom deioniziranom vodom primjenom vakuuma filtracije uz sterilnu tehniku rada. MP-a zaostala na sterilnom membranskom filtru (0,45 μm) se zatim pomoću sterilne žlice i pincete prebacila u tikvice volumena 100 mL za postavljanje pokusa s *Pseudomonas putidom* te u tikvice volumena 250 mL za postavljanje pokusa s *Chlorella* sp.. Cijeli postupak prikazan je na slici 19.

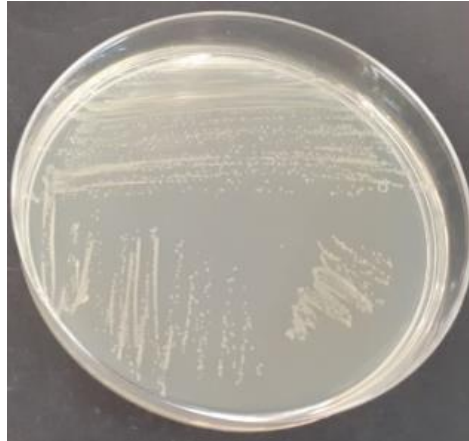


Slika 19. Postupak pripreme MP-a i postavljanje pokusa određivanja ekotoksičnosti MP-e primjenom bakterijske kulture *Pseudomonas putida* i mikroalge *Chlorella* sp..

U cilju određivanja ekotoksičnosti mikroplastike sa embrijima zebrića, sintetizirana je 20 % otopina PS-a bijele boje za veličine čestica 0,43; 0,25 i 0,12 μm . U te svrhe korišten je 6 mM kalijev persulfat (KPS) i 12 mM natrijev dodecilsulfat (SDS). Mikroplastika je sintetizirana u Centru za istraživanje mora (CIM) Instituta Ruđer Bošković u Rovinju.

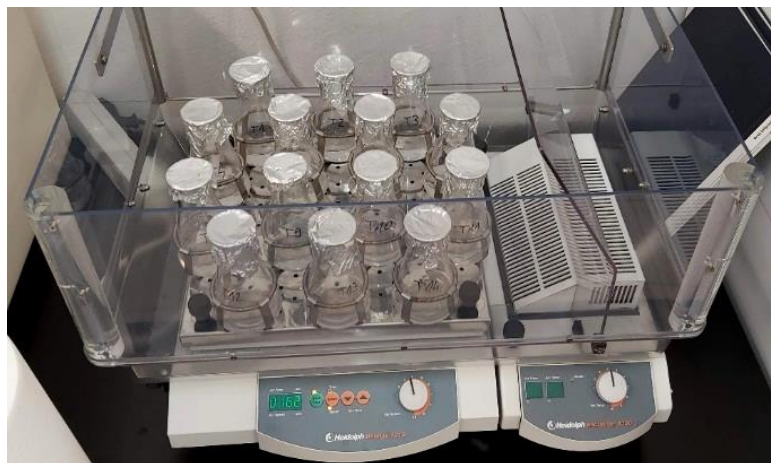
3.3.2. Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom bakterije *Pseudomonas putida* provodio se na termostatoranoj rotacijskoj tresilici pri 25 ± 2 °C, 160 o/min i 48 h u tikvicama volumena 100 mL, odnosno radnog volumena $V_R = 25$ mL (pokos P1). Prije postavljanja pokusa bilo je potrebno uzgojiti bakterijsku kulturu. *Pseudomonas putida* uzgojena je na čvrstoj hranjivoj podlozi (hranjivi agar; HA) čija je priprema opisana u poglavlju 3.1.3. u Petrijevim zdjelicama pri 37 °C i 24 – 48 h (Slika 20). Od uzgojene kulture priređena je suspenzija čija je početna optička gustoća u mineralnom mediju iznosila 0,2 pri $\lambda = 436$ nm⁶⁵.



Slika 20. Fotografski snimak izrasle bakterijske kulture *Pseudomonas putida* dobivene tehnikom iscrpljivanja na HA-u.

Bakterijska kultura koja je precijepljena 24 h prije postavljanja pokusa koristila se za preduzgoj kulture *P. putida*. Preduzgoj se provodio u MM-u tijekom 5 ± 1 h prije postavljanja pokusa, prema metodi ISO 10712:1995¹³. Tikvice, prikazane na slici 21, sadržavale su u svim pokusima suspenziju *P. putide*, MM i MP-u tako da je početna optička gustoća (OG) iznosila 0,2. OG se određivala spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda = 436 \text{ nm}$ ⁶⁵. Za svaki pokus bila je postavljena i slijepa proba koja nije sadržavala MP-u. U tablici 11 dani su početni uvjeti za pokus P1.



Slika 21. Određivanje ekotoksičnosti MP-a primjenom bakterije *Pseudomonas putida* (pokus P1).

Tablica 11. Početni uvjeti za određivanje ekotoksičnosti MP-a primjenom bakterije *Pseudomonas putida* (pokus P1).

POKUS P1	
vrsta MP-e	PE; PP; PS; PVC; PET
γ_{MP} / mg/L	50; 100; 250; 500; 1000
veličina MP-e / μm	500-1000; 300-500
pH-vrijednost / -	6,94
$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	8,00
T / °C	25,60
log CFU ₀ / -	6,72
OG ₀ /-	0,22

Tijekom provedbe pokusa P1, praćena je pH-vrijednost, koncentracija otopljenoga kisika, optička gustoća te broj živih stanica bakterijske kulture (CFU). Broj živih stanica u uzorcima, određivao se pripremom decimalnih razrjeđenja uz sterilnu tehniku rada. Iz pripremljenih razrjeđenja izuzimao se 1 mL koji je prenesen u sterilnu Petrijevu zdjelicu, zaliven HA-om te homogeniziran. CFU (st/mL) bakterije *P. putida* određivao se nakon inkubacije od 24 sata pri temperaturi 37 °C prema formuli:

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj izraslih kolonija}}{1 \text{ mL}} \cdot \frac{1}{\text{razrjeđenje}} \quad (1)$$

3.3.3. Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom alge *Chlorella* sp.

Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom slatkovodne alge *Chlorella* sp. provodio se na termostatiranoj rotacijskoj tresilici pri 25±2 °C, 160 o/min i 72 h u tikvicama volumena 250 mL, odnosno radnog volumena $V_R = 100$ mL (pokus P2). Prije postavljanja pokusa uzgojila se mikroalga *Chlorella* sp. u bazalnom mediju (BM) uz kontinuiranu aeraciju i interval svjetlosti 16:8 (svjetlo:mrak)⁸⁰ tijekom 14 dana. Na slici 22 prikazana je mikroalga uz aeracijsku pumpu i lampu.

Broj živih stanica algi (CFU) iznosio je nakon 14 dana $9,3 \times 10^6$ st/mL. Od uzgojene suspenzije alge priređivala se suspenzija za pokus P2 čiji je početni CFU iznosio 10^5 st/mL, odnosno čija je početna optička gustoća u BM-u iznosila 0,03, a određivala se spektrofotometrijski pri $\lambda = 670 \text{ nm}$ ⁸¹.



Slika 22. Fotografski snimak uzgojene mikroalge *Chlorella* sp. uz aeracijsku pumpu i lampu.

Pokus P2 se provodio isto kao i pokus P1 koji je prikazan na slici 21. Tikvice u pokusu P2 su sadržavale suspenziju *Chlorella* sp., BM i MP-u. Pokus se provodio prema OECD 201:1984¹⁴, te je za svaki pokus bila postavljena i slijepa proba koja nije sadržavala MP-u. U tablici 12 dani su početni uvjeti za pokus P2.

Tijekom provedbe pokusa P2, praćena je pH-vrijednost, koncentracija otopljenoga kisika, optička gustoća (OG) te broj živih stanica alge (CFU). CFU (st/mL) za algu *Chlorella* sp. određivao se izravnim brojanjem u Thominoj komorici, tako da su se brojale alge unutar 3 kvadrata, a ukupan broj živih stanica određivao se prema formuli:

$$N = \frac{m \cdot n \cdot 16 \cdot 10^4}{K} \quad (2)$$

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.

Tablica 12. Početni uvjeti za određivanje ekotoksičnosti MP-a primjenom alge *Chlorella* sp. (pokus P2).

POKUS P2	
vrsta MP-e	PE; PP; PS; PVC; PET
γ_{MP} / mg/L	10; 25; 50; 100; 500; 1000
veličina MP-e / μm	>1000; 500-1000; 300-500
pH-vrijednost / -	5,39
$\gamma(\text{O}_2)$ / mg/L	8,44
log CFU ₀ / -	5,71
OG ₀ /-	0,03

U pokusima P1 i P2, izračunate su vrijednosti logaritamskog broja živih stanica, log CFU, za početne uvjete i nakon 48 h za P1, odnosno 72 h za P2. Za svaku vrstu MP-e računala se inhibicija rasta bakterijske kulture/alge upotrebljavajući log CFU kontrole i uzorka. Inhibicija, izražena u postotku, a računala se prema formuli:

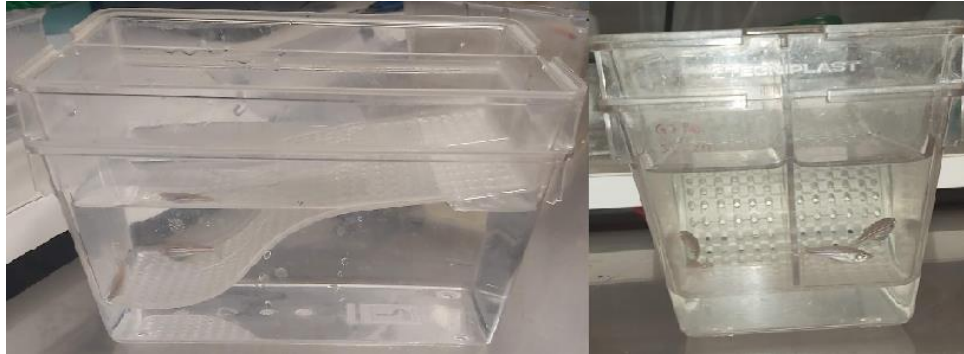
$$\text{INH} = \frac{\log \text{CFU (kontrola)} - \log \text{CFU (uzorak)}}{\log \text{CFU (kontrola)}} \times 100\% \quad (3)$$

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

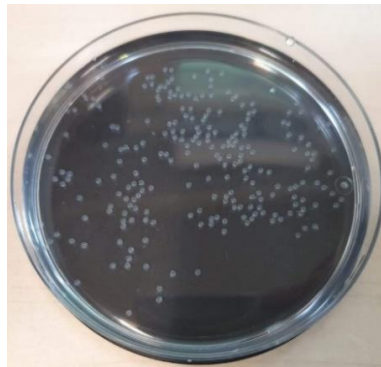
3.3.4. Određivanje toksičnosti mikroplastike primjenom embrija zebrića *Danio rerio*

U pokusima određivanja ekotoksičnosti mikroplastike koristili su se embriji čistokrvnih zebrića *Danio rerio*, podrijetlom iz Njemačke, poznate generacije (G) i brida (B). Embriji su se dobivali na način da su se odrasle zebriće premjestile iz akvarija u mrijestilicu. Mrijestilica se sastojala od mrežice „S“ oblika, kako bi se na jednom dijelu mrijestilice dobio plitki dio jer se zebriće najčešće razmnožavaju u plićaku, i pregrade pomoću koje su se odvojili mužjaci i ženke.

Poslije razdvajanja zebrice su ostavljene 24 h na intervalu svjetla 14:10 (svjetlo:mrak)⁸². Nakon toga pregrada se maknula kako bi im se omogućio mrijest. Tijekom mrijesta embriji su prolazili kroz mrežicu na dno mrijestilice, a nakon 1 h zebrice su se vratile u akvarij.⁸² Mrijestilica s odvojenim mužjacima i ženka prikazana je na slici 23. Embriji su se skupljali u Petrijevu zdjelicu s E3 medijem kao što je prikazano na slici 24. Za provedbu pokusa odabrala su se oplodena jajašca odnosno živi embriji.



Slika 23. Mrijestilica s mrežicom „S“ oblika i pregradom pomoću koje su se odvajali mužjaci i ženke zebra 24 h prije mrijesta.



Slika 24. Fotografski snimak embrija zebra *Danio rerio* u Petrijevoj zdjelici nakon mrijesta.

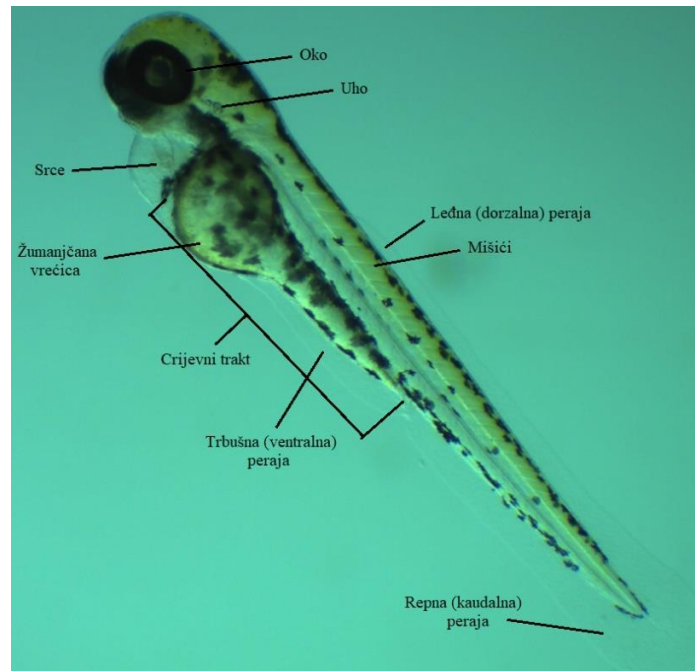
Radi većeg postotka preživljavanja, embriji prikupljeni nakon mrijesta ostavljeni su 24 h u termostatu pri temperaturi 26 ± 2 °C.⁸² Pokusi su se postavljali u pločice od 48 jažica (volumen jažica 1 mL). U svakome pokusu su se uz određene koncentracije i veličine mikroplastike postavljale sljedeće kontrole: 3,4-dikloroanilin (3,4-DCA) koncentracije 20 mg/L i 4 mg/L kao pozitivna kontrola, dimetil sulfoksid (DMSO) 0,1 % i 0,02 % kao (*solvent* kontrola) kontrola otapala, KPS kao (*solvent* kontrola) kontrola otapala zbog pripreme čestica plastike u istom (istih koncentracija kao i ispitivane koncentracije mikroplastike) te E3 medij kao negativna kontrola.

Svaka od navedenih kontrola postavljala se u 20 jažica uz 4 jažice koje su se koristile za kontrolu pločice (*internal plate controls*, IC). Navedene 4 jažice sadržavale su E3 medij i embrije. Ispitivanja su provedena prema metodi OECD 179:2012¹⁵. Na slici 25 a) prikazan je primjer postavljanja 3,4-DCA i DMSO kontrola u pločice od 48 jažica te su vidljive IC kontrole. Proveli su se preliminarni pokusi u svrhu određivanja najniže koncentracije mikroplastike koja ima utjecaj na embrije (pokus P3). Ispitivane su različite veličine PS-a, navedene u poglavlju 3.3.2., s obzirom na veličinu i promjer pora koriona embrija koji iznosi između 0,5 i 0,7 μm ⁸³. Preliminarni pokusi povodili su se na način da su se kontrole 3,4-DCA (20 mg/L), DMSO (0,1 %), E3 i KPS postavljale u 12 jažica kao i ispitivane otopine MP-a. Primjer postavljanja preliminarnog pokusa prikazan je na slici 25 b).



Slika 25. Prikaz 48-pločice: a) s pripremljenom pozitivnom kontrolom 3,4-DCA (desno) i *solvent* kontrolom DMSO (lijevo) i b) preliminarni pokus izlaganja embrija zebrića PS-u, veličine čestica 0,25 μm i koncentracijama 0,1; 0,01; 0,001 i 0,0001 g/L.

Izlaganje embrija zebrića trajalo je 96 h pri 26 ± 2 °C.¹⁵ Praćene su morfološke deformacije, zaostanak zebrića u korionu, razvoj srca, oči, uha, mišića te pigmentacija, duljina tijela i smrtnost embrija. Slika 26 prikazuje kako bi trebao izgledati embrija zebrića nakon 96 h u E3 mediju. U tablici 13 prikazani su početni uvjeti za pokus P3.



Slika 26. Mikrofotografija embrija zeblice *Danio rerio* nakon 96 h u E3 mediju sa označenim dijelovima tijela.

Tablica 13. Početni uvjeti za određivanje ekotoksičnosti MP-a primjenom embrija zebrica *Danio rerio* (pokus P3).

POKUS P3	
vrsta MP-e	PS
$\gamma_{MP} / \text{g/L}$	0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 2; 3; 5; 6; 7; 9; 10
veličina MP-e / μm	0,43; 0,25; 0,12

U pokusima P3, embriji su mikroskopirani nakon 96 h izlaganja PS-u i kontrolama te su svi uočeni utjecaji zabilježeni i prikazani tablično i grafički u poglavlju 4.3. S obzirom na tri ispitivane veličine čestica PS-a u pokusu P3, on će biti podijeljen u daljnjem tekstu na pokuse: P3-1 (0,43 μm), P3-2 (0,25 μm) i P3-3 (0,12 μm).

3.3.5. Mikroskopska analiza

Mikroskopskom su analizom praćene morfološke karakteristike alge *Chlorella* sp. i bakterijske kulture *P. putida* te štetni učinci mikroplastike na embrije zebrića *Danio rerio*.

➤ *Pseudomonas putida*

Od uzorka suspenzije bakterijske kulture *P. putida* i MM-a priređen je trajni preparat koji je obojan po Gramu za nulti i drugi dan provedbe pokusa P1. Tako priređen preparat mikroskopiran je pod ukupnim povećanjem od 1000×

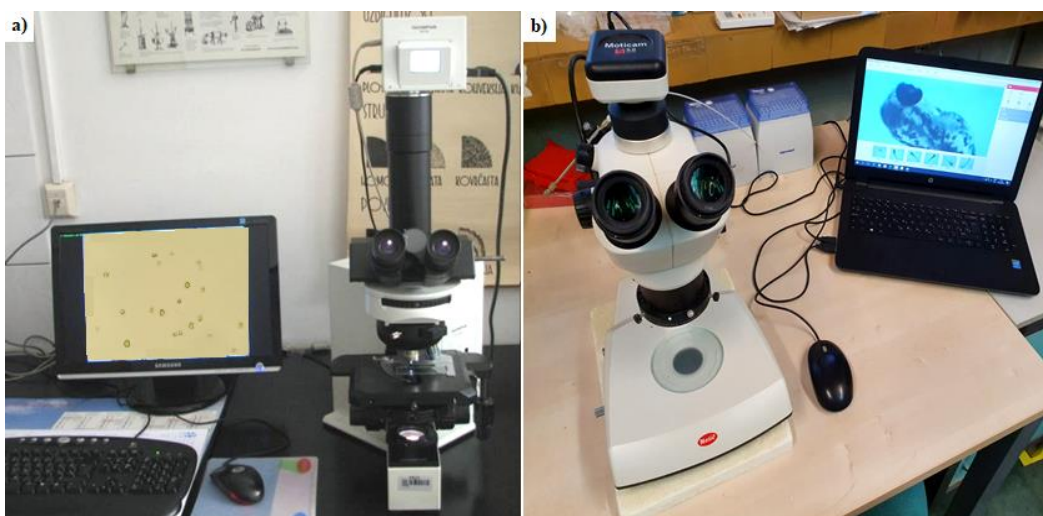
➤ *Chlorella* sp.

Pomoću Pasteur pipete izuzeta je kapljica uzorka suspenzije alge i BM-a te je pripremljen nativni preparat alge nultog i trećeg dana tijekom provedbe pokusa P2. Tako pripremljen preparat je mikroskopiran pod ukupnim povećanjem od 400×

➤ Zebrića *Danio rerio*

Embriji zebrića su se izvadili pomoću Paster pipete iz jažica u Petrijeve zdjelice s E3 medijem u svrhu ispiranja istih od mikroplastike, a zatim su mikroskopirani pod povećanjem od 3×

Na slici 27 a) je prikazan svjetlosni mikroskop s ugrađenom kamerom pomoću kojeg su mikroskopirani *P. putida* i *Chlorella* sp., a na slici 27 b) prikazana je lupa s ugrađenom kamerom pomoću koje su se mikroskopirali embriji zebrića.

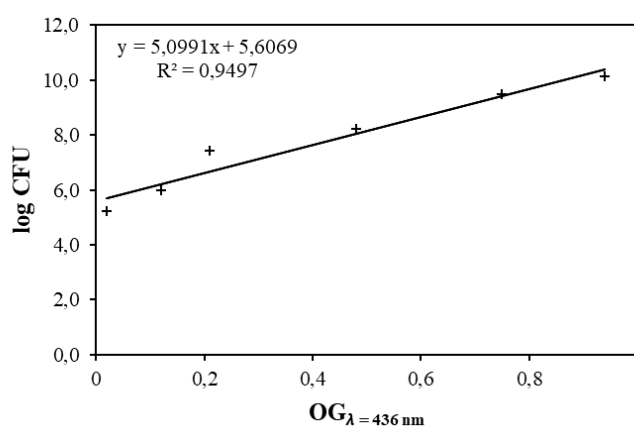


Slika 27. a) Svjetlosni mikroskop s ugrađenom kamerom, b) lupa s ugrađenom kamerom.

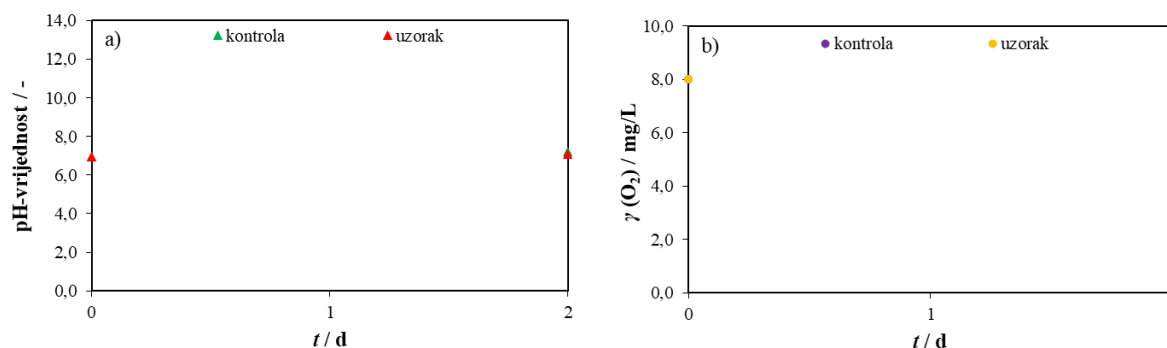
4. Rezultati

4.1. Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom bakterije *Pseudomonas putida* (P1)

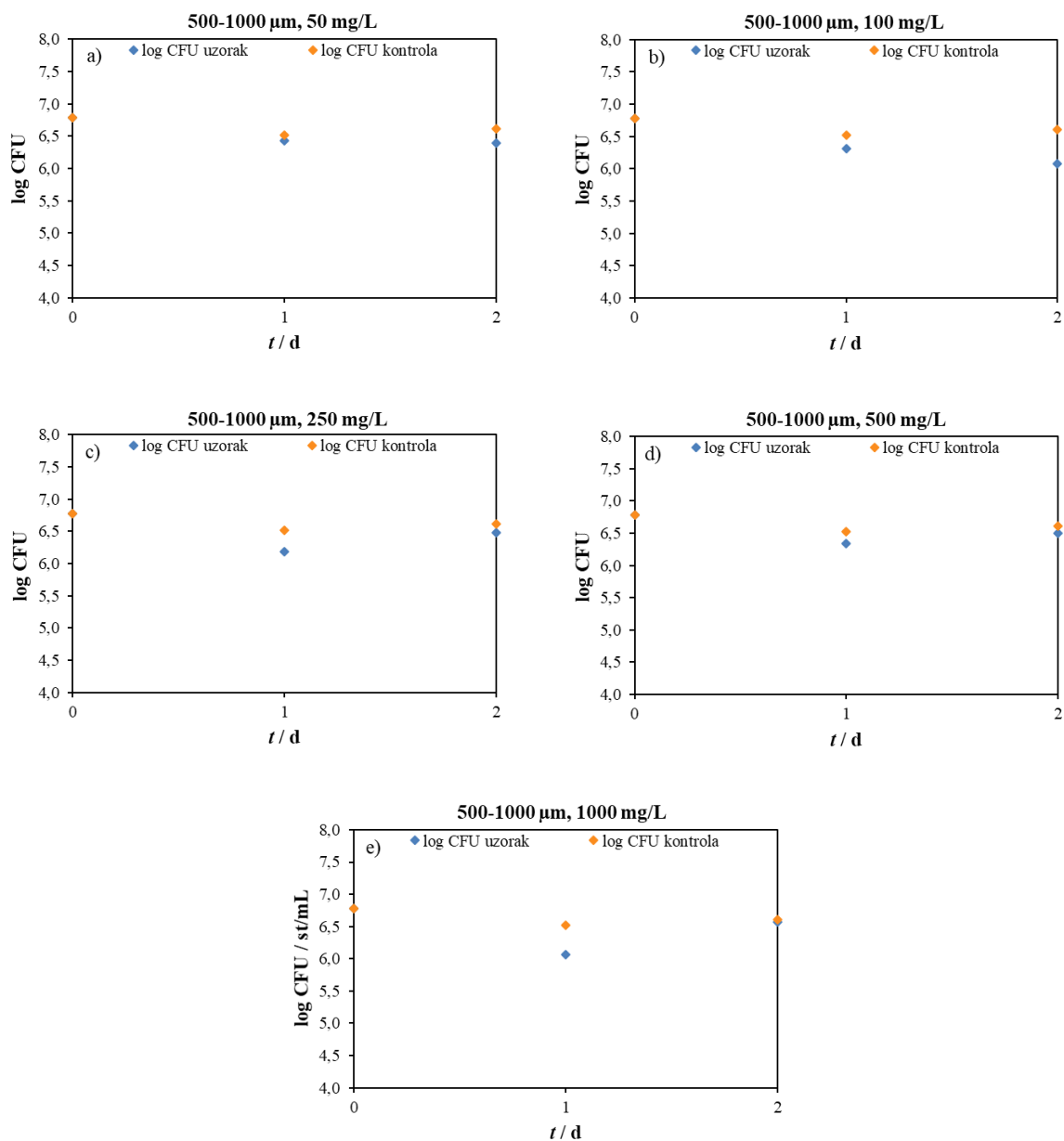
Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.2. uzgojena je bakterijska kultura *Pseudomonas putida* koja se koristila u pokusima za pripremu suspenzije bakterijske kulture. Tijekom pokusa pratila se promjena optičke gustoće, promjena broja živih stanica CFU, temperatura te promjena pH – vrijednosti i koncentracije otopljenoga kisika. CFU se određivao prema baždarnom dijagramu prikazanom na slici 28. Dobiveni rezultati prikazani su grafički na slikama 29 – 39.



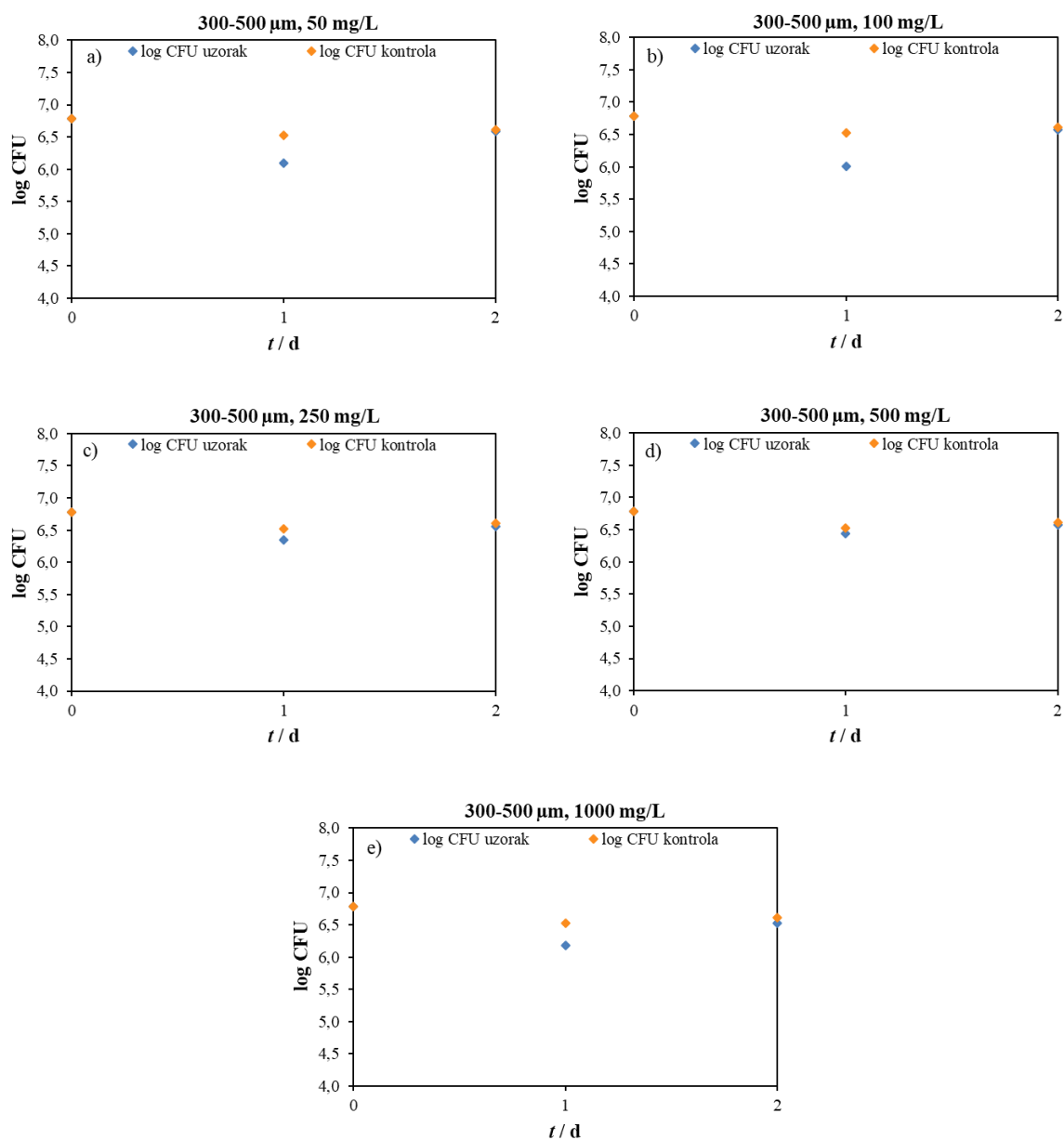
Slika 28. Baždarni dijagram ovisnosti logaritamskog broja živih stanica bakterijske kulture (log CFU) i optičke gustoće (OG) za bakteriju *Pseudomonas putida*.



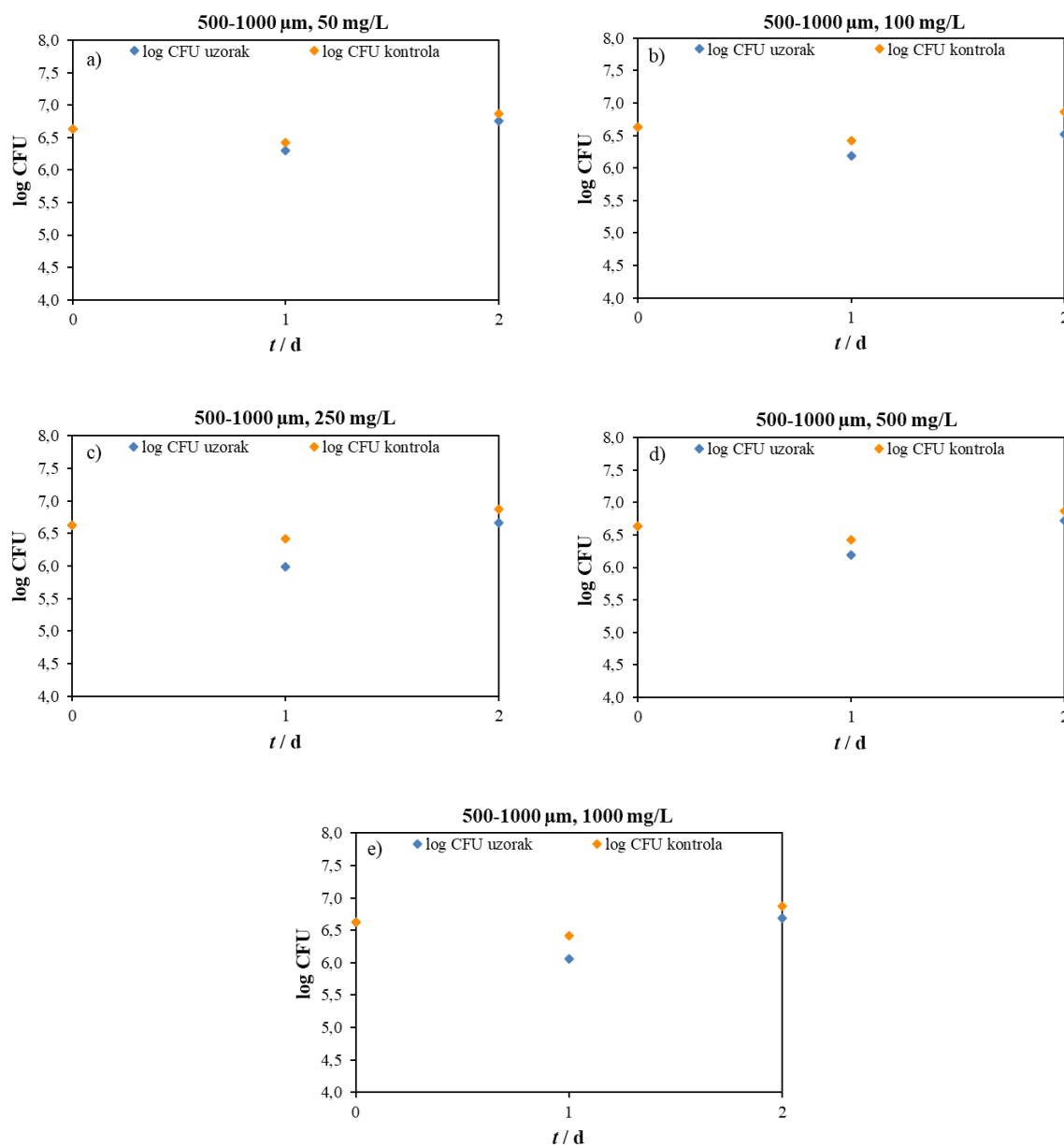
Slika 29. Srednja vrijednost promjene: a) pH – vrijednosti i b) koncentracije otopljenoga kisika, za kontrolu i sve uzorke MP-a u pokusu P1 tijekom 48 h.



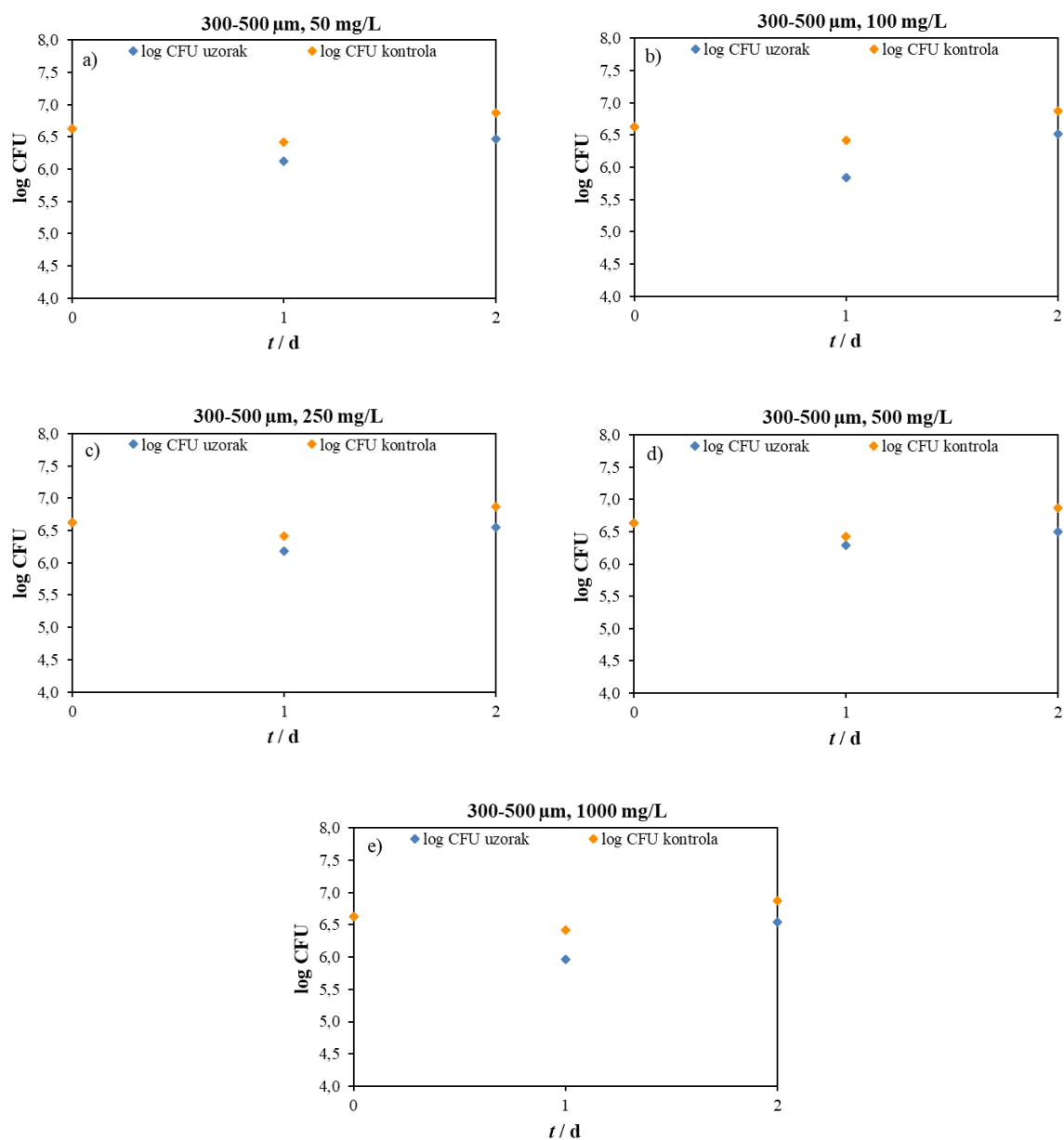
Slika 30. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* za uzorak PE veličine čestica 500 – 1000 μm , koncentracije: a) 50 mg/L, b) 100 mg/L, c) 250 mg/L, d) 500 mg/L i e) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 48 h u P1.



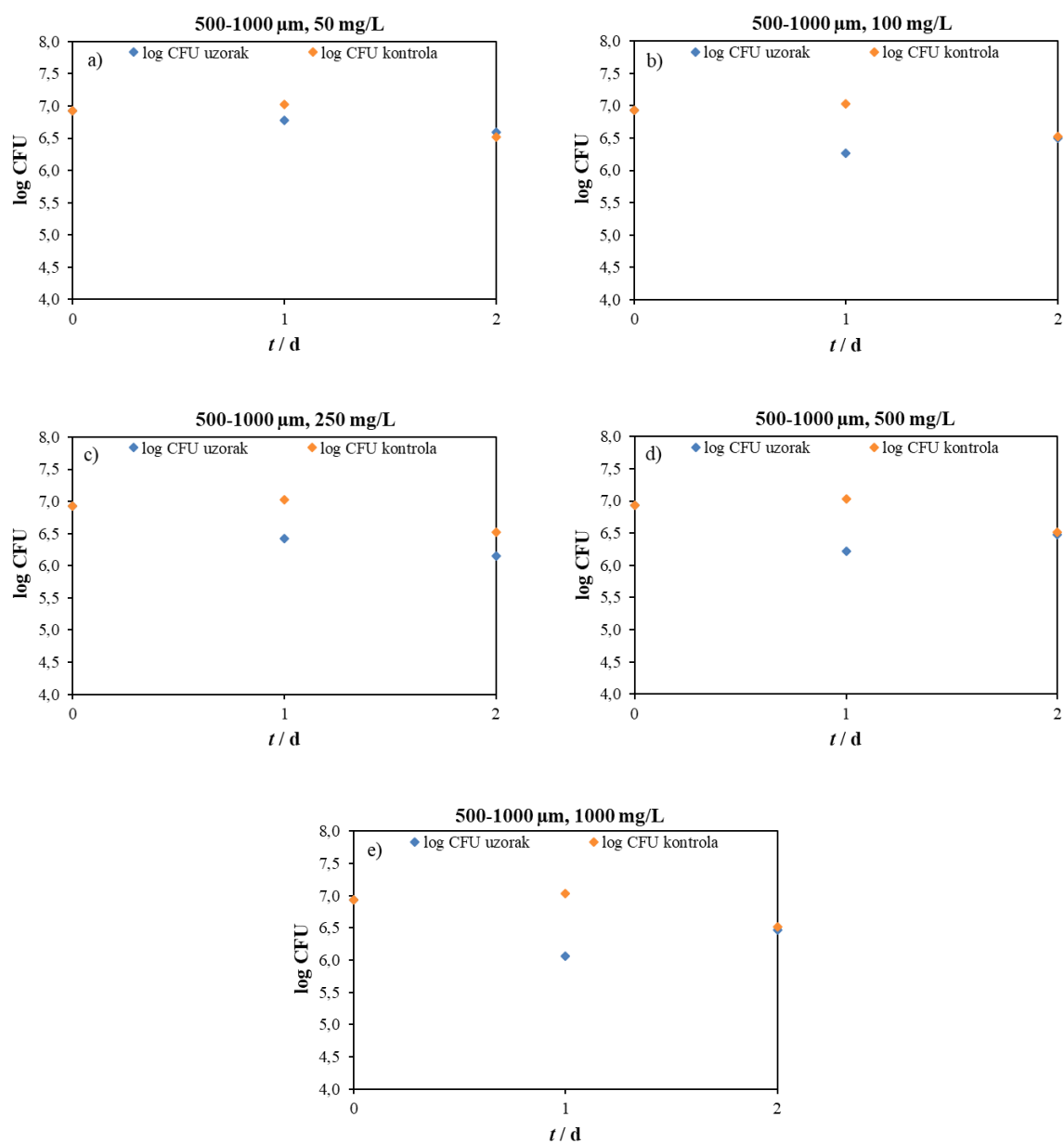
Slika 31. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* za uzorak PE veličine čestica 300 – 500 µm, koncentracije: a) 50 mg/L, b) 100 mg/L, c) 250 mg/L, d) 500 mg/L i e) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 48 h u P1.



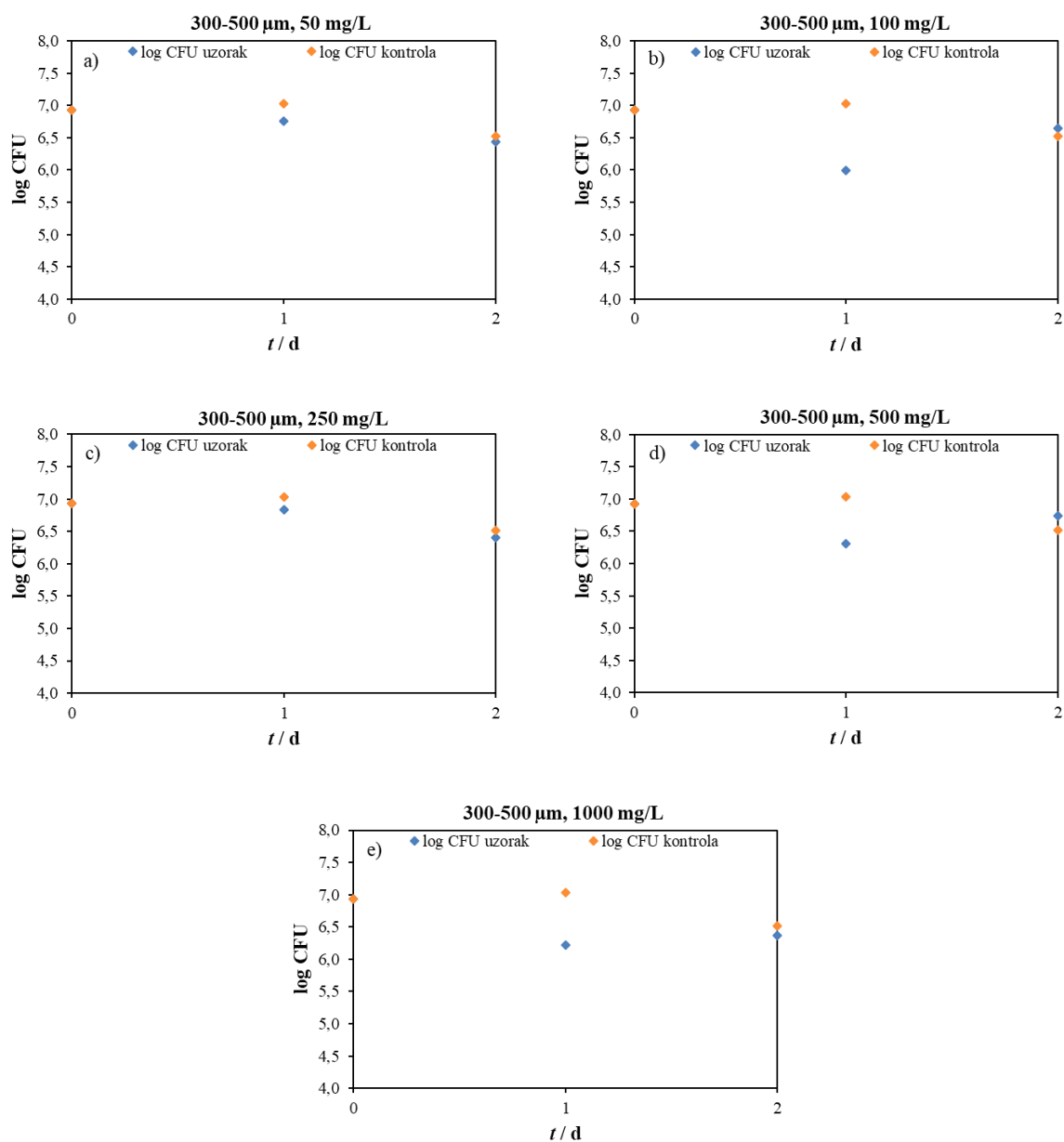
Slika 32. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* za uzorak PP veličine čestica 500 – 1000 µm, koncentracije: a) 50 mg/L, b) 100 mg/L, c) 250 mg/L, d) 500 mg/L i e) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 48 h u P1.



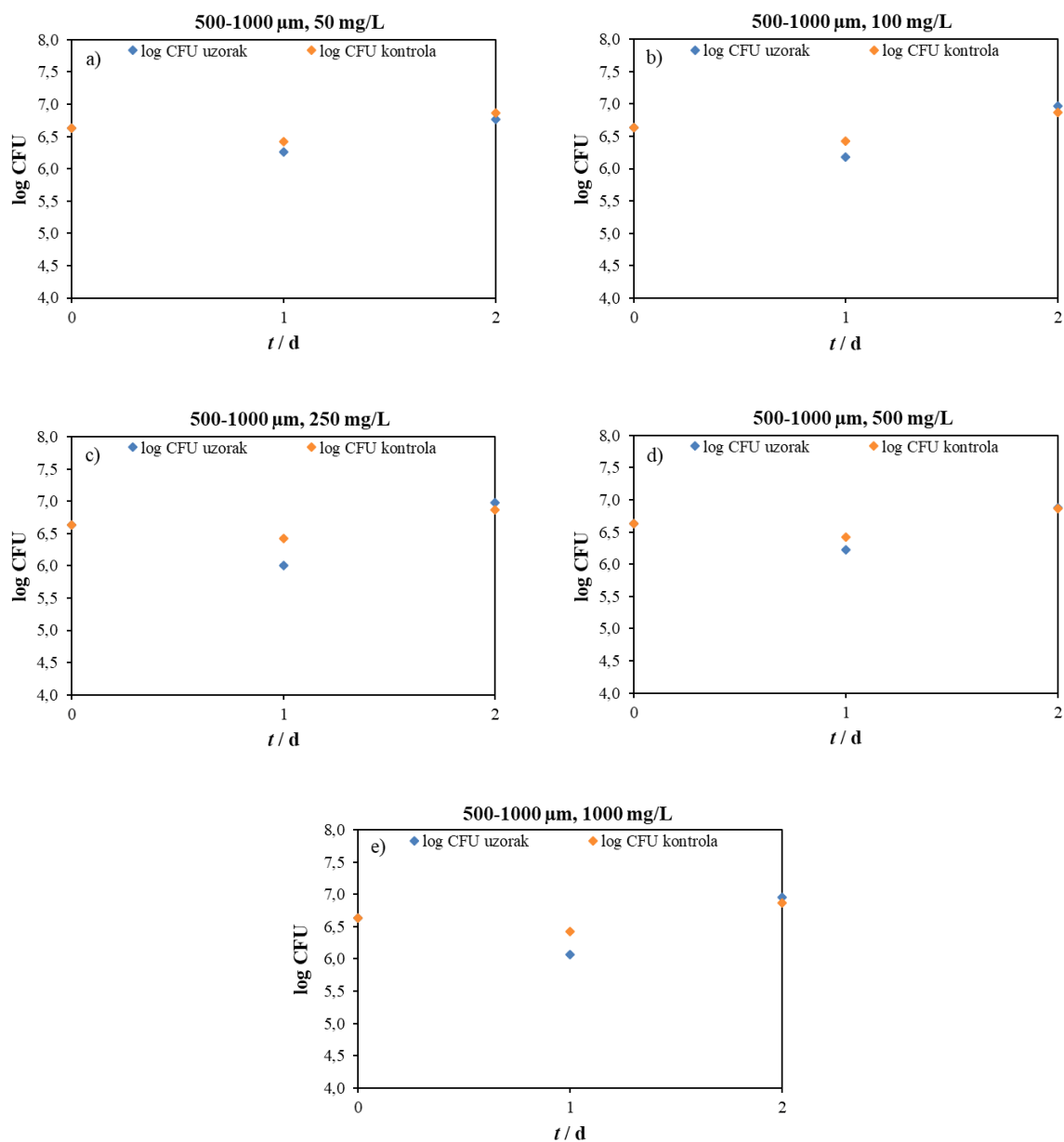
Slika 33. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* za uzorak PP veličine čestica 300 – 500 μm, koncentracije: a) 50 mg/L, b) 100 mg/L, c) 250 mg/L, d) 500 mg/L i e) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 48 h u P1.



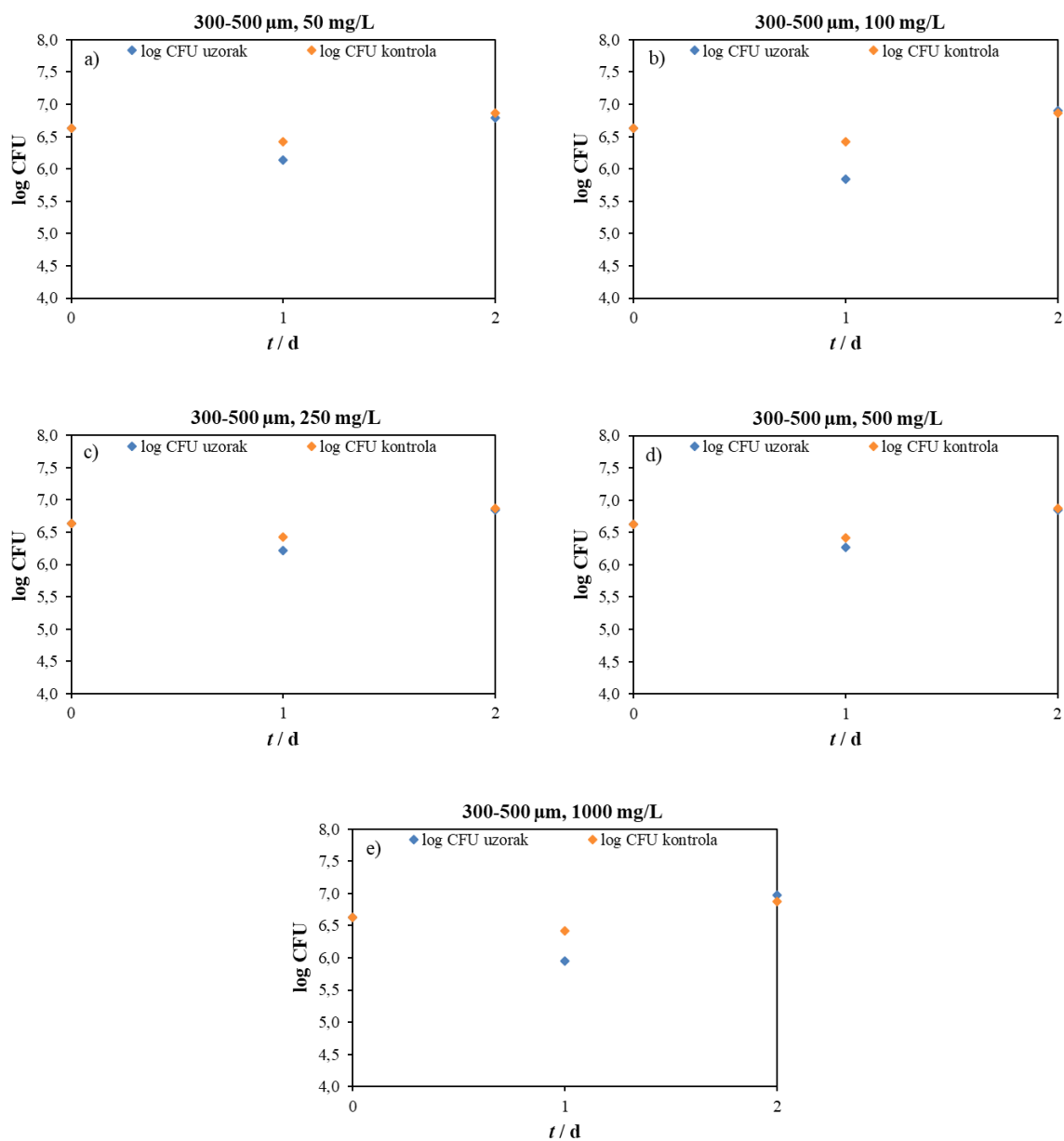
Slika 34. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* za uzorak PS veličine čestica 500 – 1000 μm , koncentracije: a) 50 mg/L, b) 100 mg/L, c) 250 mg/L, d) 500 mg/L i e) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 48 h u P1.



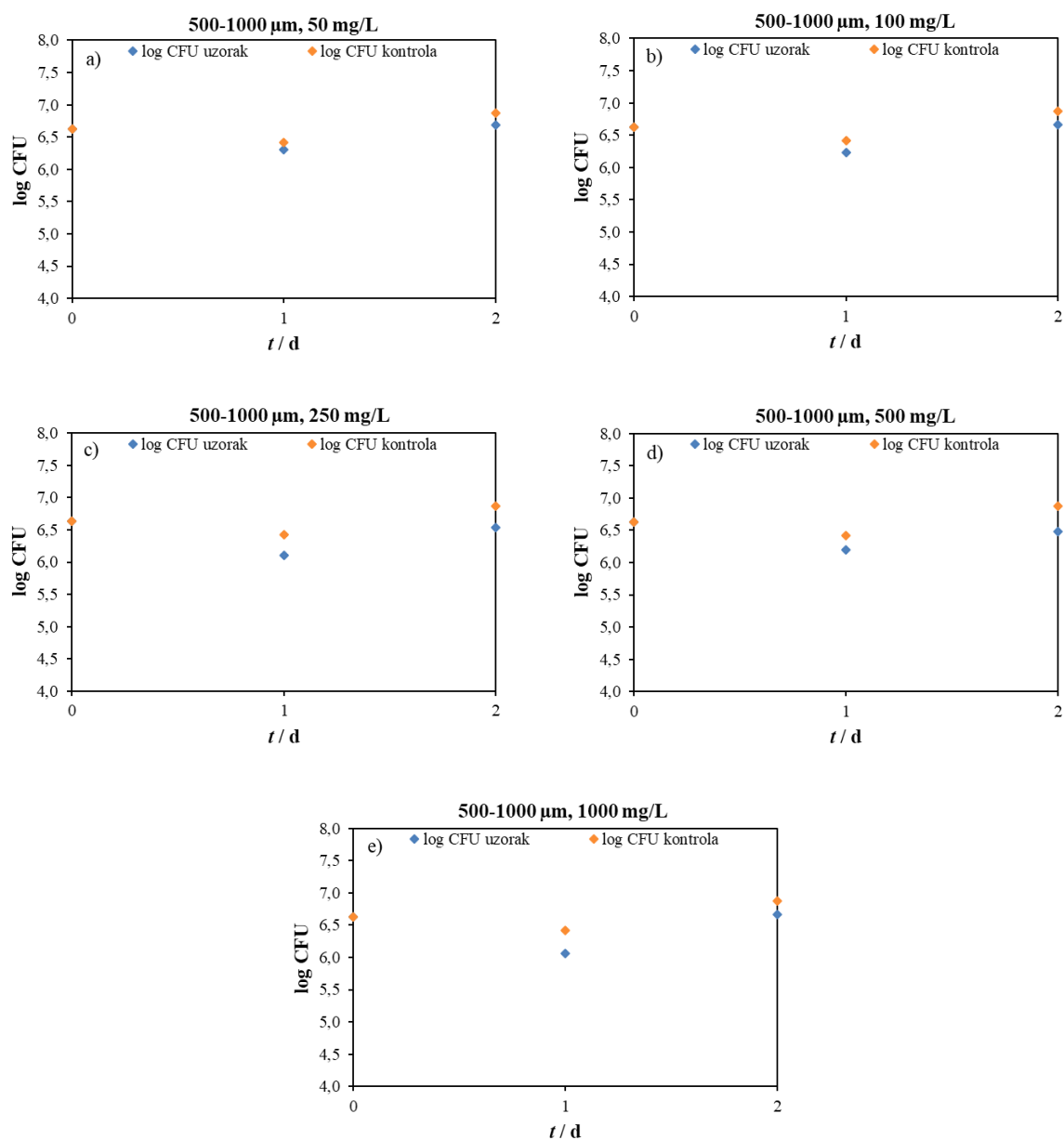
Slika 35. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* za uzorak PS veličine čestica 300 – 500 μm, koncentracije: a) 50 mg/L, b) 100 mg/L, c) 250 mg/L, d) 500 mg/L i e) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 48 h u P1.



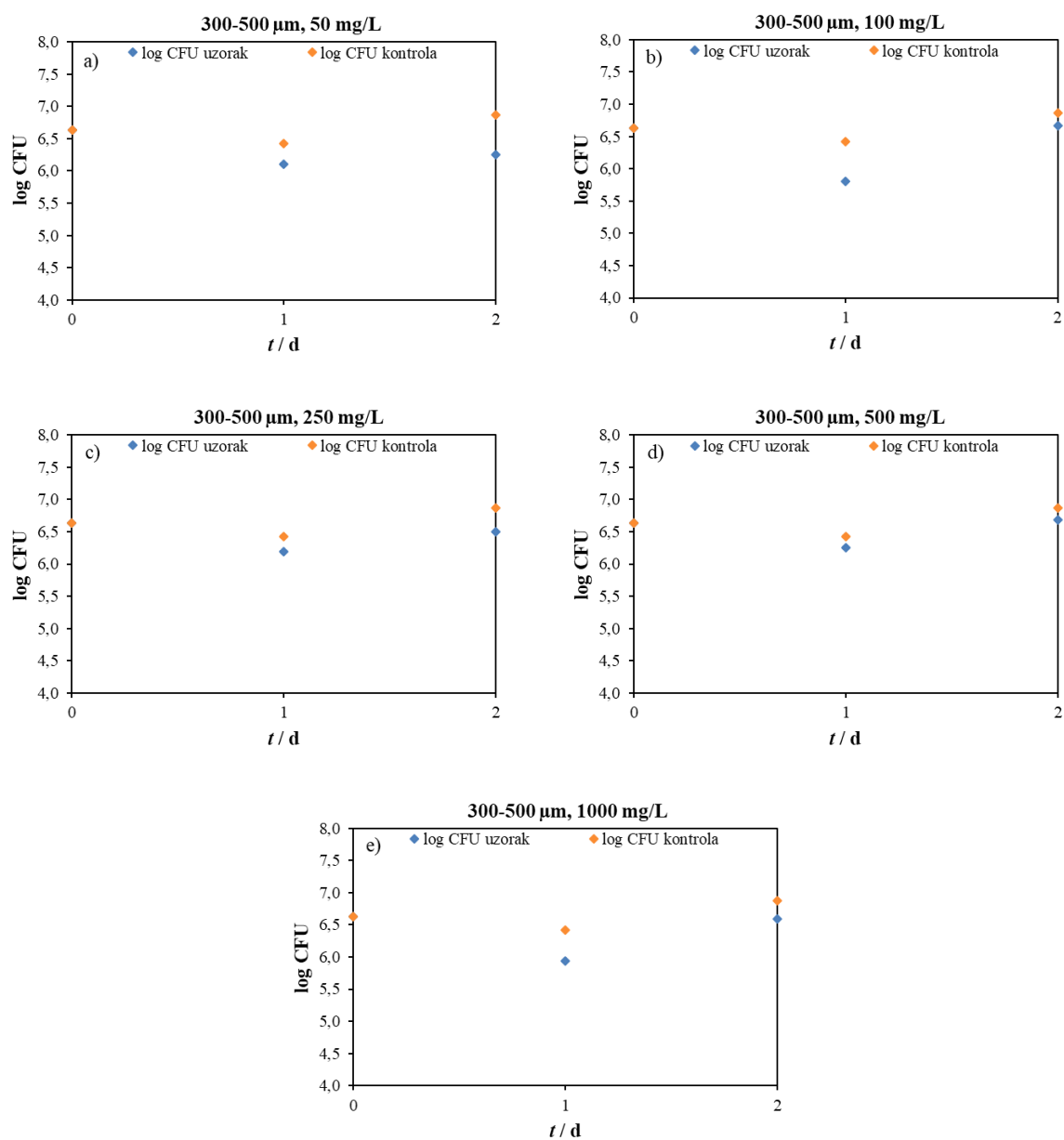
Slika 36. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* za uzorak PVC veličine čestica 500 – 1000 μm , koncentracije: a) 50 mg/L, b) 100 mg/L, c) 250 mg/L, d) 500 mg/L i e) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 48 h u P1.



Slika 37. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* za uzorak PVC veličine čestica 300 – 500 μm, koncentracije: a) 50 mg/L, b) 100 mg/L, c) 250 mg/L, d) 500 mg/L i e) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 48 h u P1.



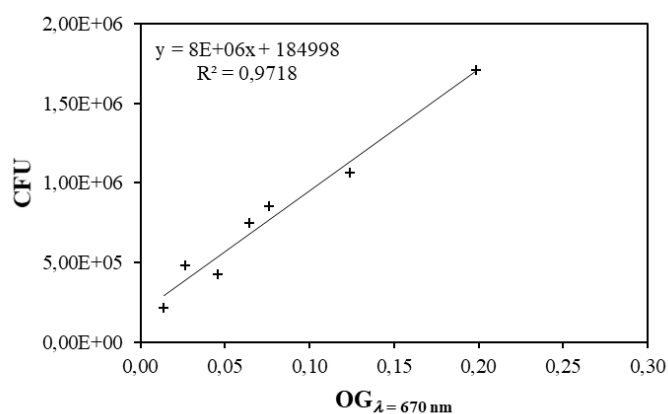
Slika 38. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* za uzorak PET veličine čestica 500 – 1000 μm , koncentracije: a) 50 mg/L, b) 100 mg/L, c) 250 mg/L, d) 500 mg/L i e) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 48 h u P1.



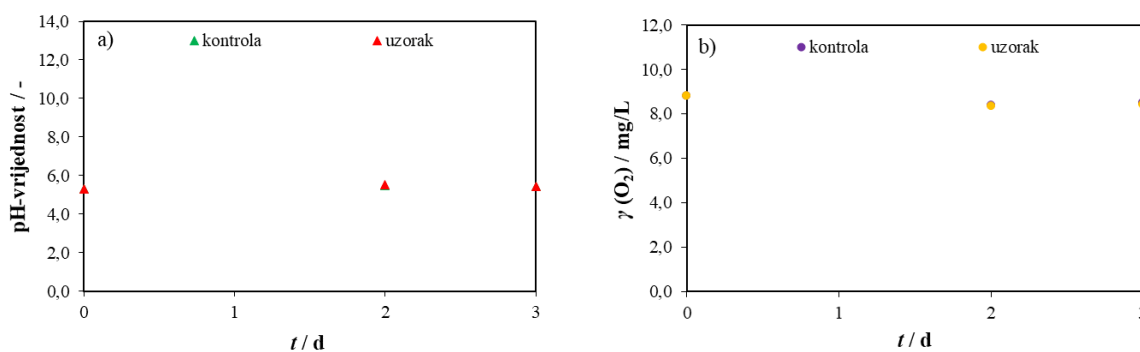
Slika 39. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterije *Pseudomonas putida* za uzorak PET veličine čestica 300 – 500 µm, koncentracije: a) 50 mg/L, b) 100 mg/L, c) 250 mg/L, d) 500 mg/L i e) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 48 h u P1.

4.2. Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom mikroalge *Chlorella* sp. (P2)

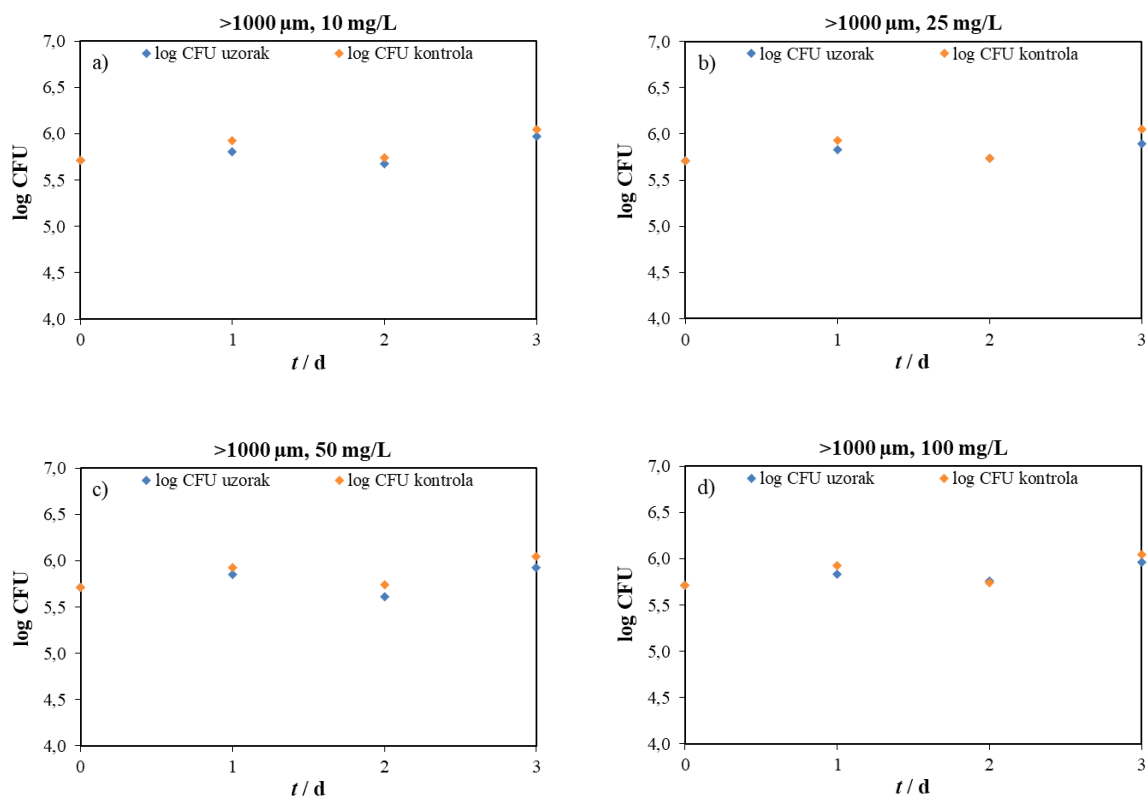
Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.3. uzgojena je alga *Chlorella* sp. koja se koristila u pokusu P2. Tijekom pokusa pratila se promjena optičke gustoće, promjena broja živih stanica CFU, promjena pH – vrijednosti i koncentracije otopljenoga kisika. CFU se određivao prema baždarnom dijagramu prikazanom na slici 40. Dobiveni rezultati su prikazani grafički na slikama 41 – 56.



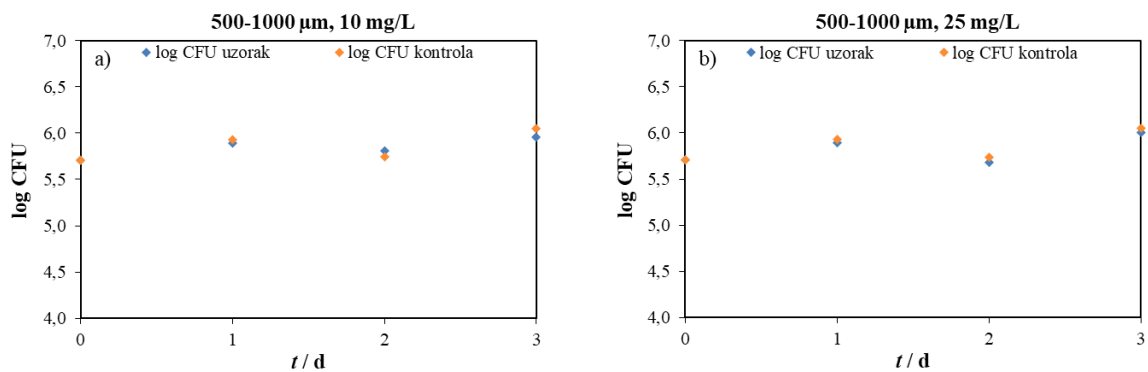
Slika 40. Baždarni dijagram ovisnosti broja živih stanica algi (CFU) i optičke gustoće (OG) za algu *Chlorella* sp.

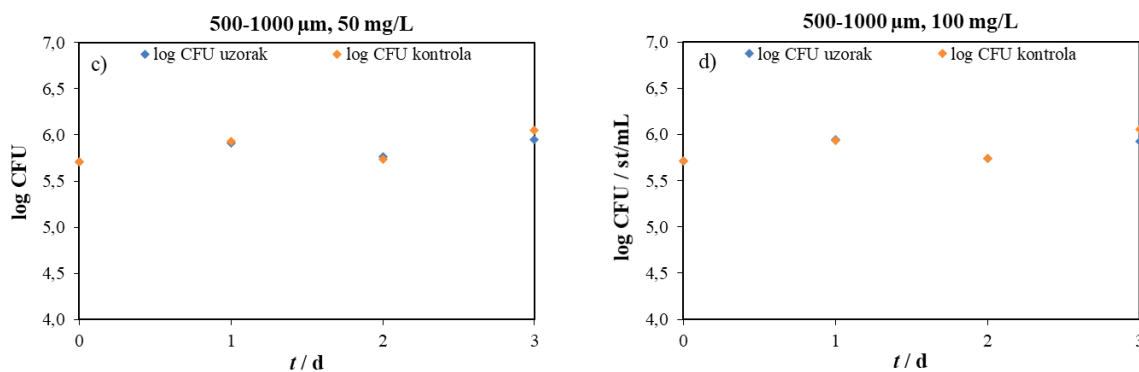


Slika 41. Srednja vrijednost promjene: a) pH – vrijednosti i b) koncentracije otopljenoga kisika, za kontrolu i sve uzorke MP-a u pokusu P2 tijekom 72 h.

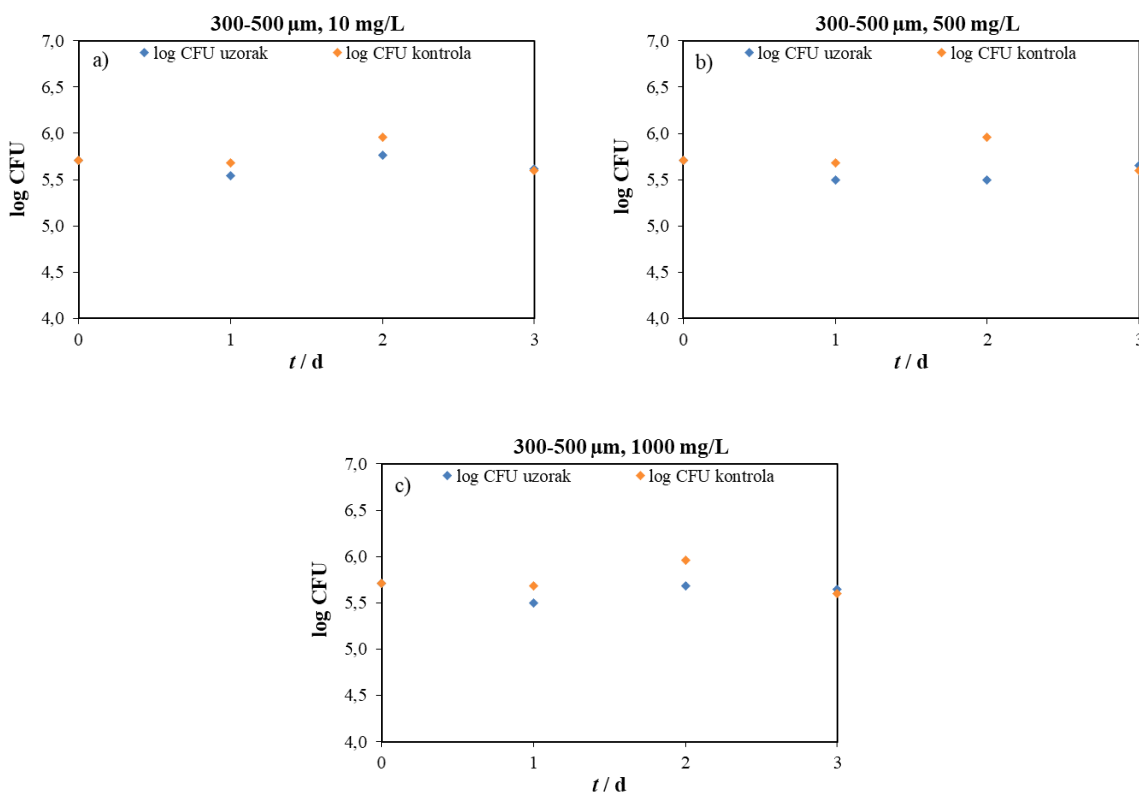


Slika 42. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PE veličine čestica >1000 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 25 mg/L, c) 50 mg/L i d) 100 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

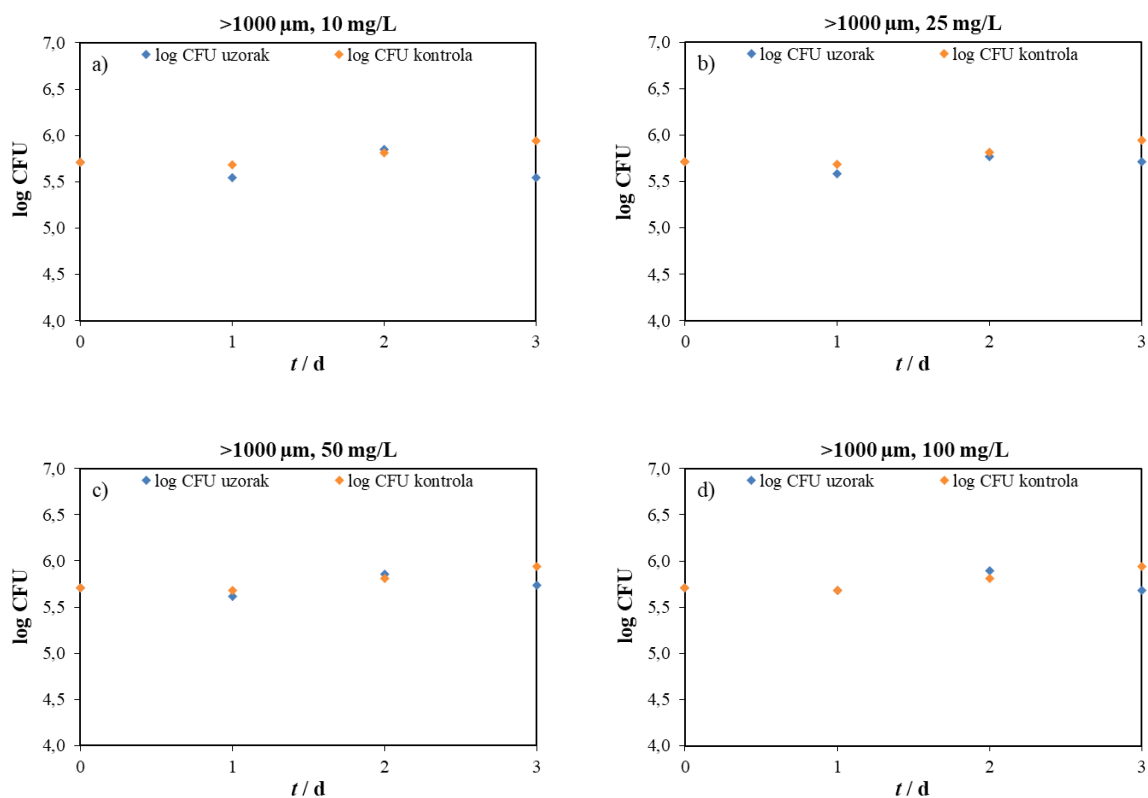




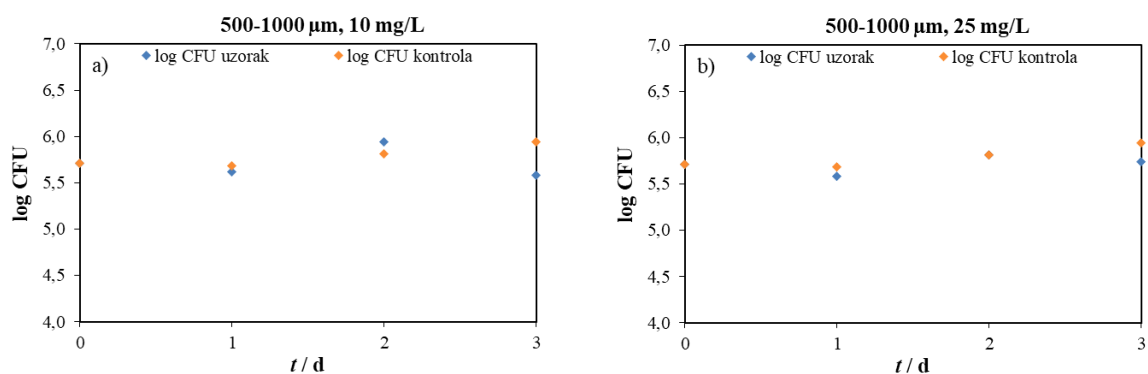
Slika 43. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PE veličine čestica 500 – 1000 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 25 mg/L, c) 50 mg/L i d) 100 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

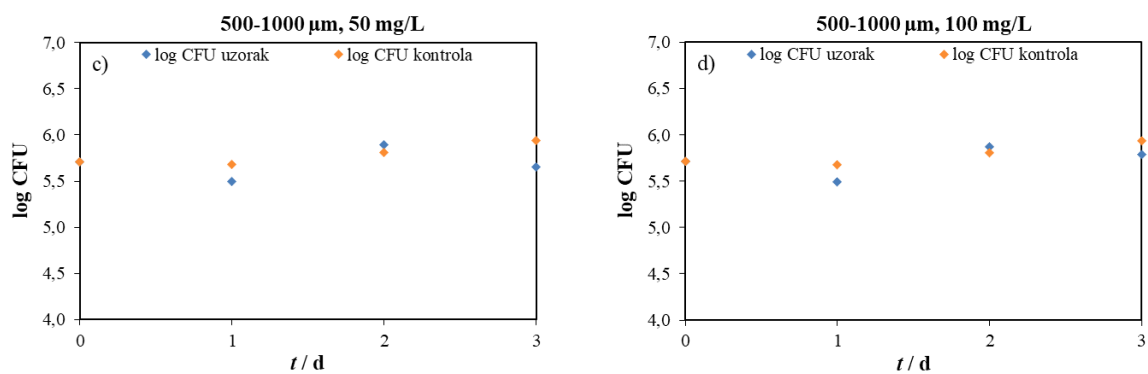


Slika 44. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PE veličine čestica 300 – 500 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 500 mg/L i c) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

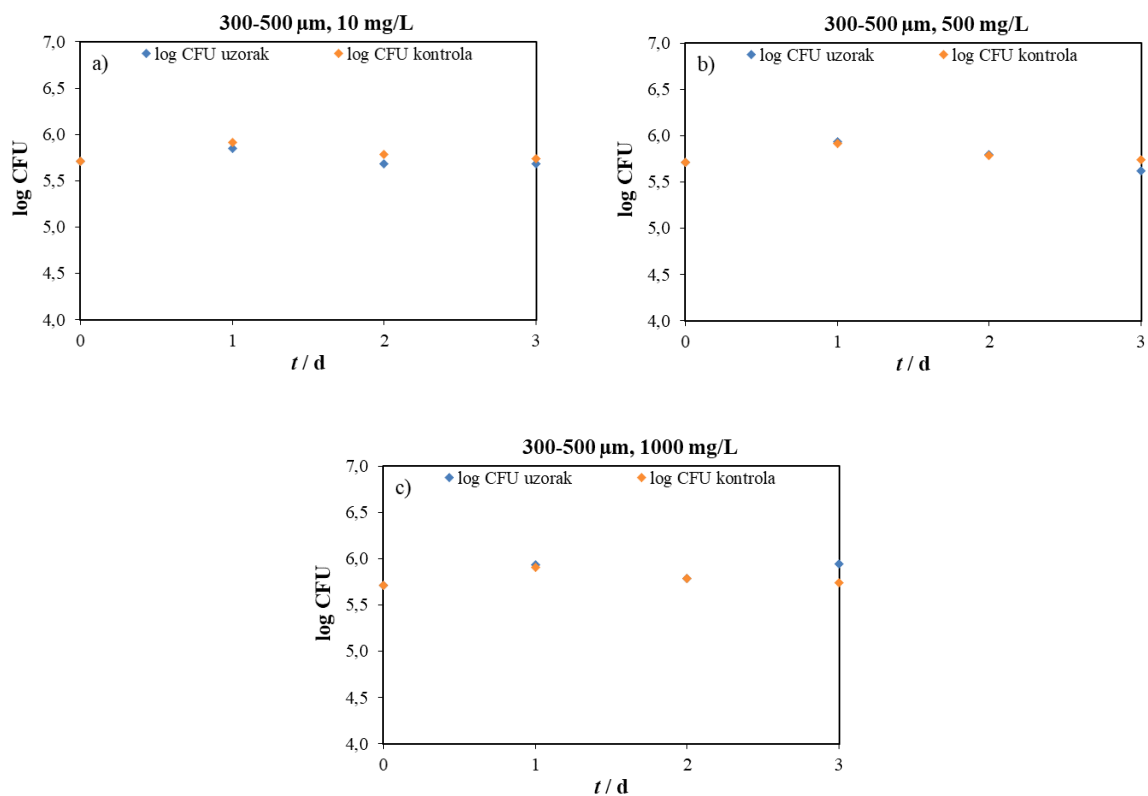


Slika 45. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PP veličine čestica $>1000 \mu\text{m}$, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 25 mg/L, c) 50 mg/L i d) 100 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

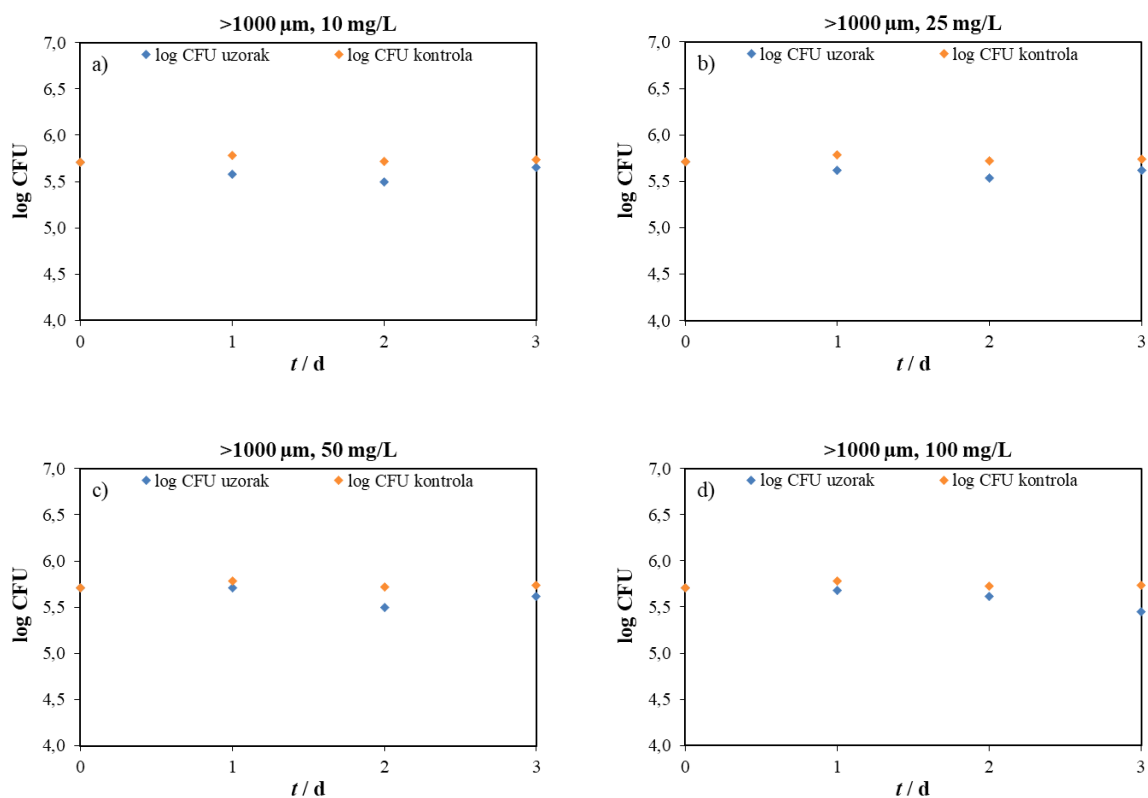




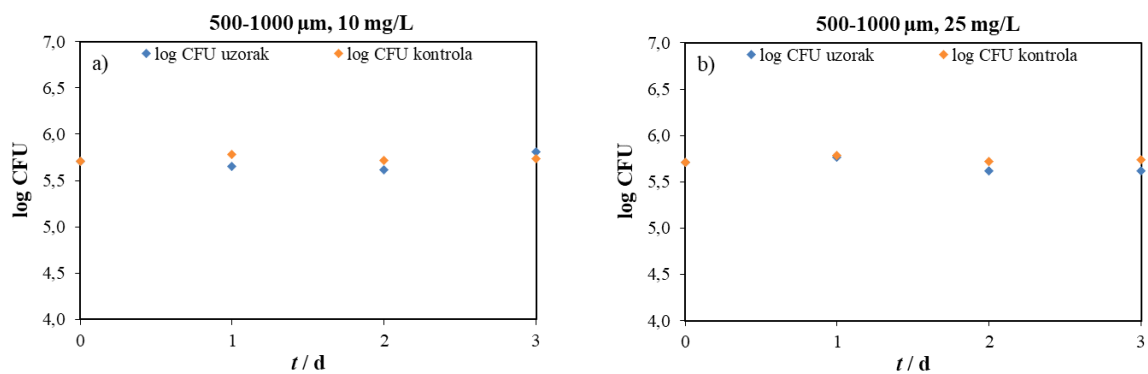
Slika 46. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PP veličine čestica 500 – 1000 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 25 mg/L, c) 50 mg/L i d) 100 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

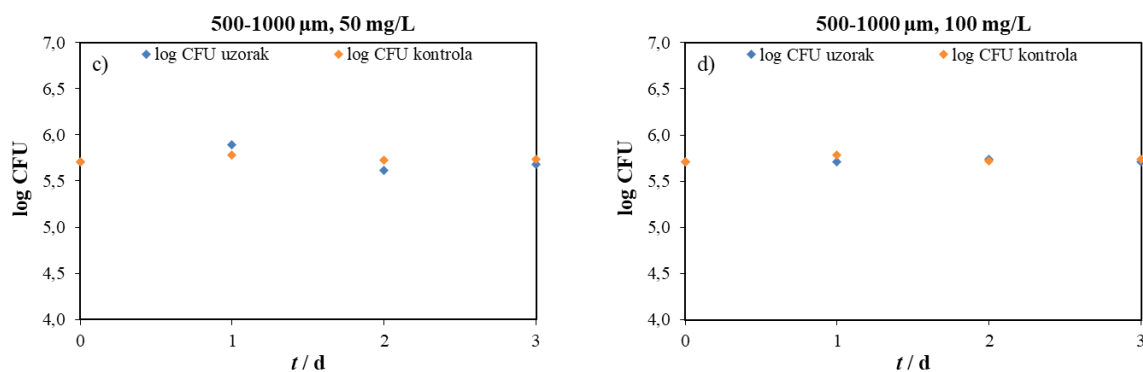


Slika 47. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PP veličine čestica 300 – 500 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 500 mg/L i c) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

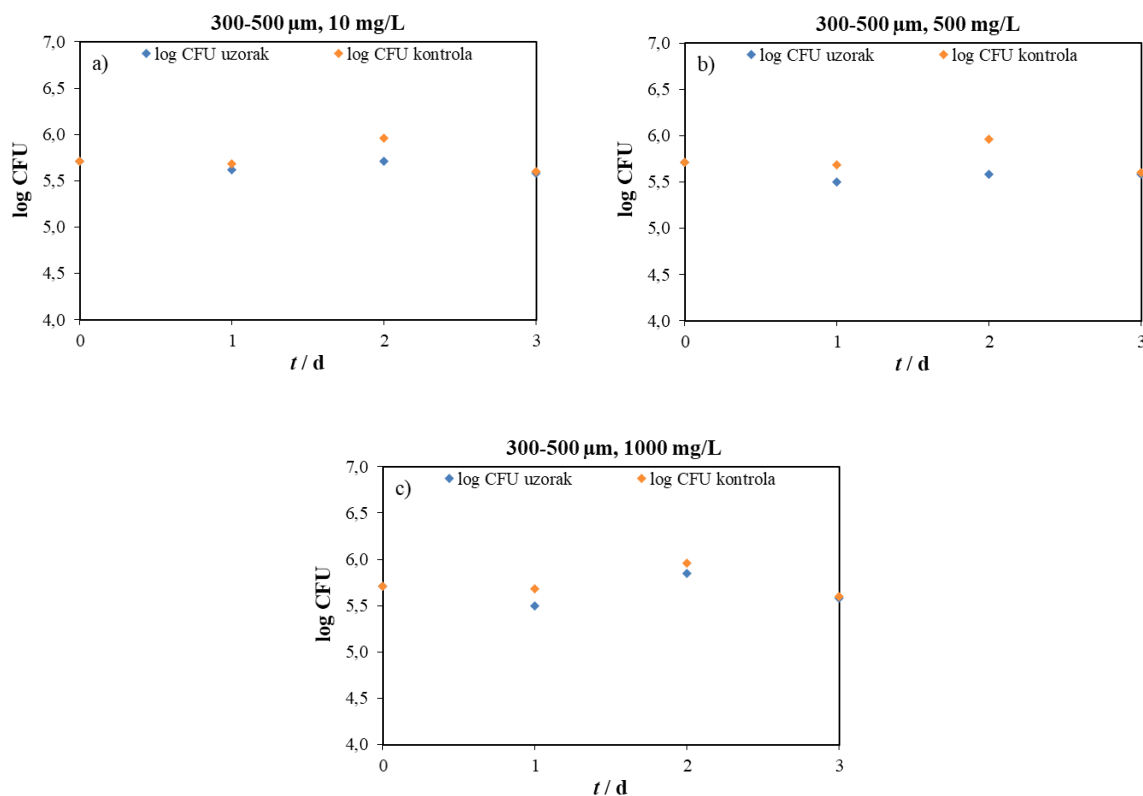


Slika 48. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PS veličine čestica >1000 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 25 mg/L, c) 50 mg/L i d) 100 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

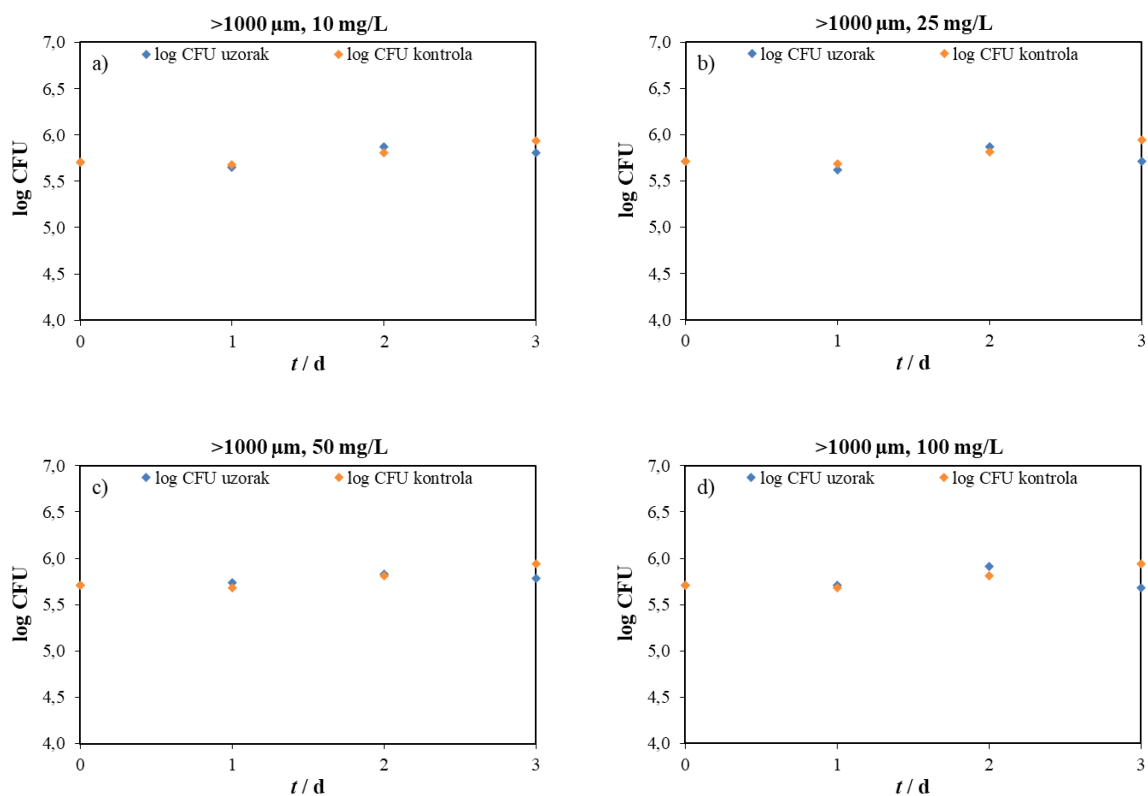




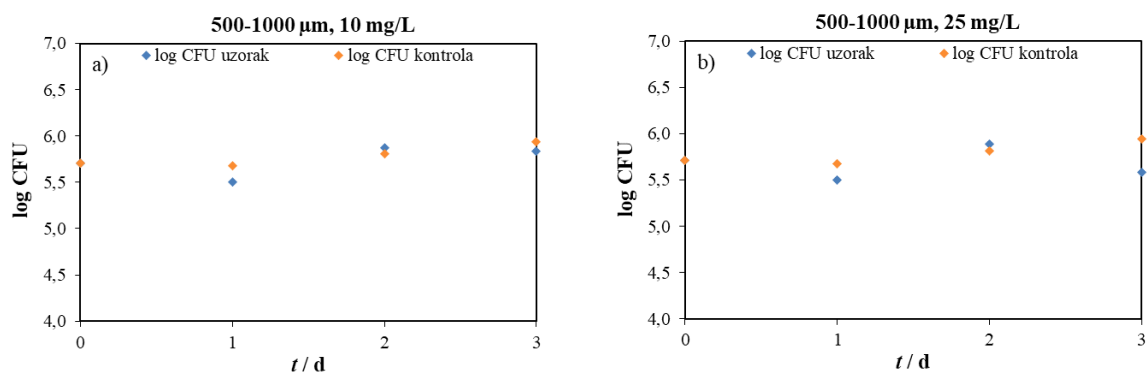
Slika 49. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PS veličine čestica 500 – 1000 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 25 mg/L, c) 50 mg/L i d) 100 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

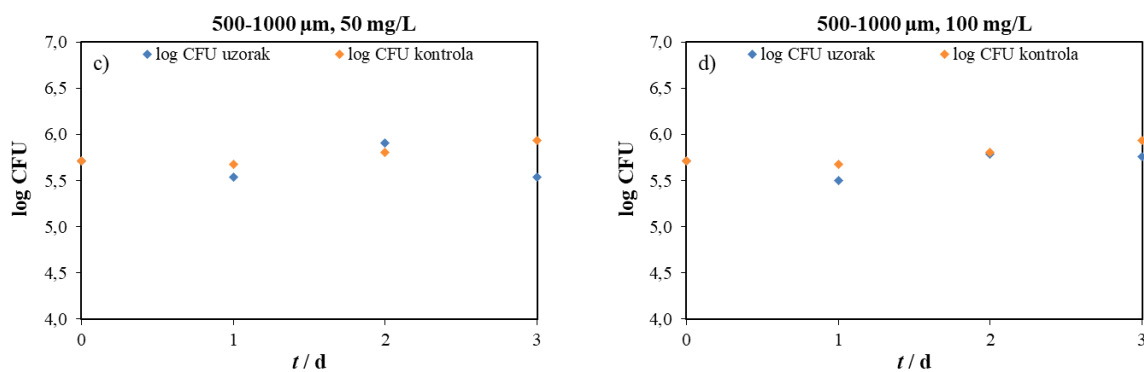


Slika 50. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PS veličine čestica 300 – 500 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 500 mg/L i c) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

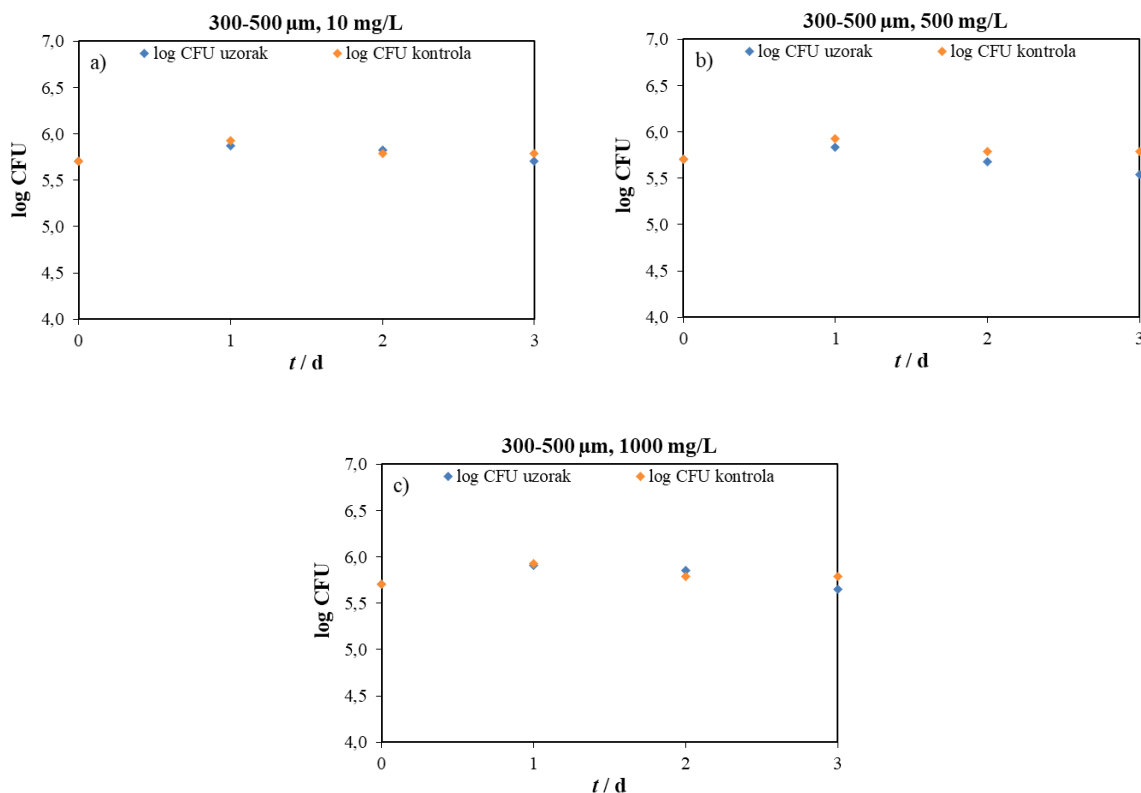


Slika 51. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PVC veličine čestica $>1000 \mu\text{m}$, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 25 mg/L, c) 50 mg/L i d) 100 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

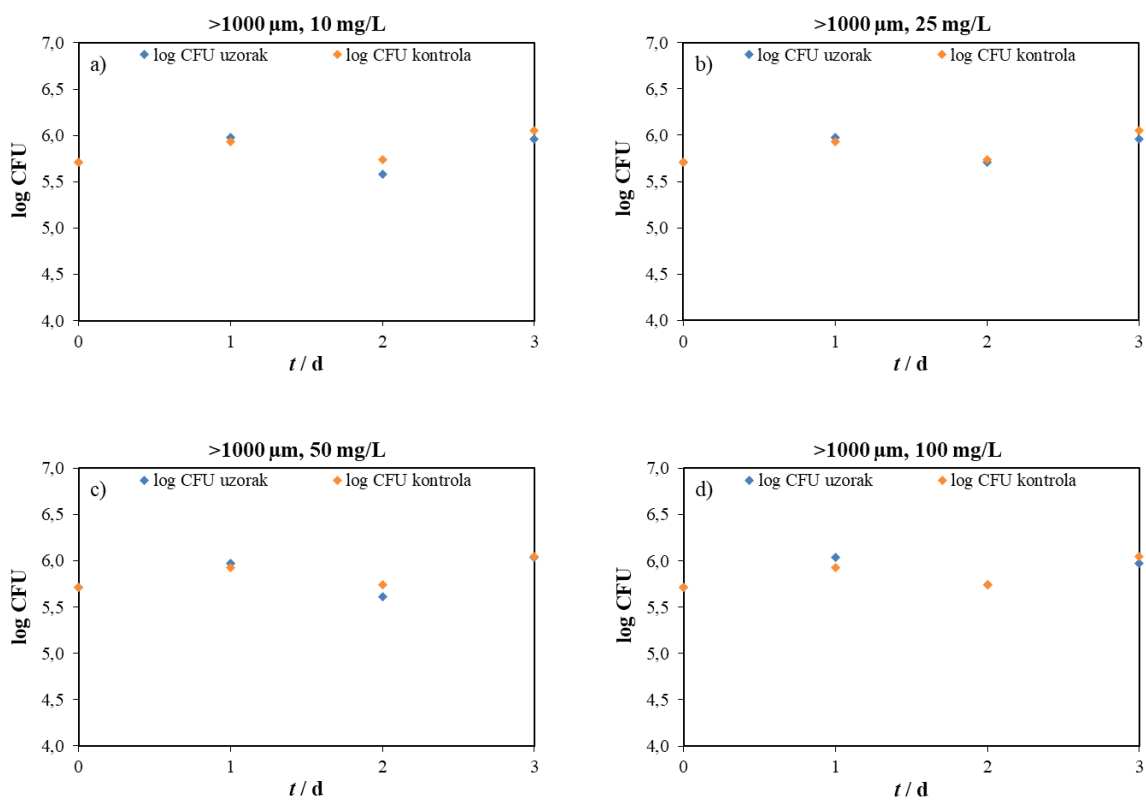




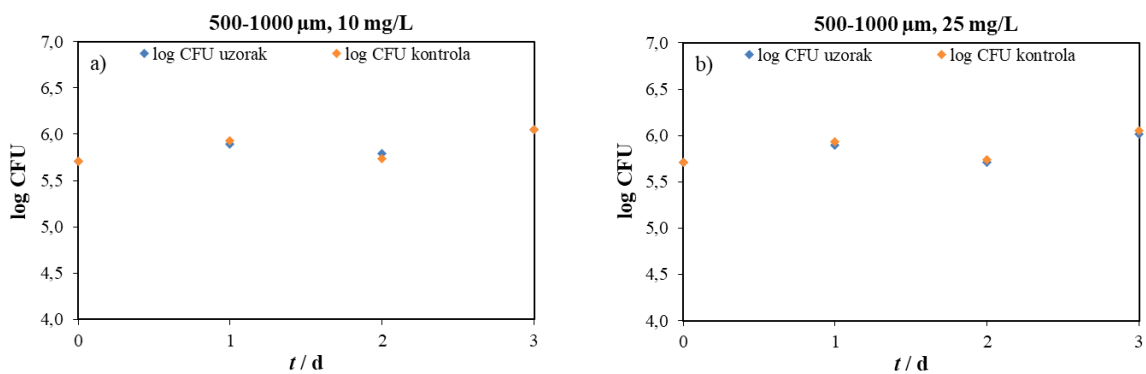
Slika 52. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PVC veličine čestica 500 – 1000 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 25 mg/L, c) 50 mg/L i d) 100 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

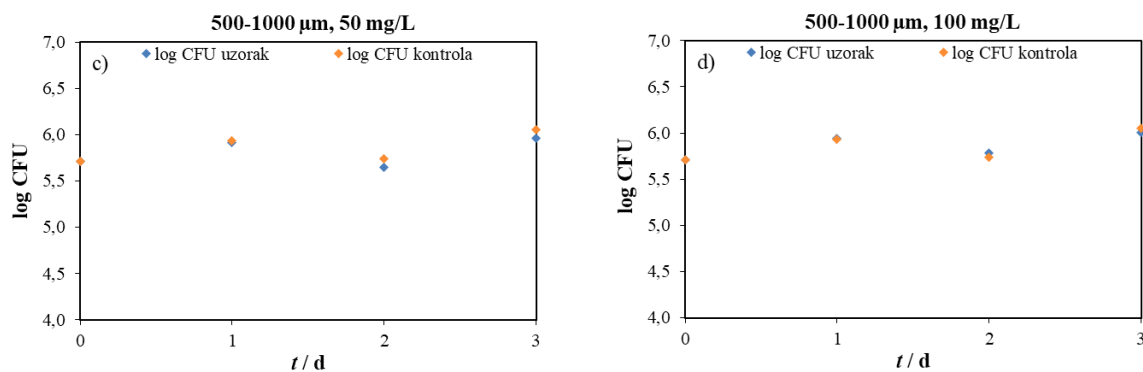


Slika 53. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PVC veličine čestica 300 – 500 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 500 mg/L i c) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

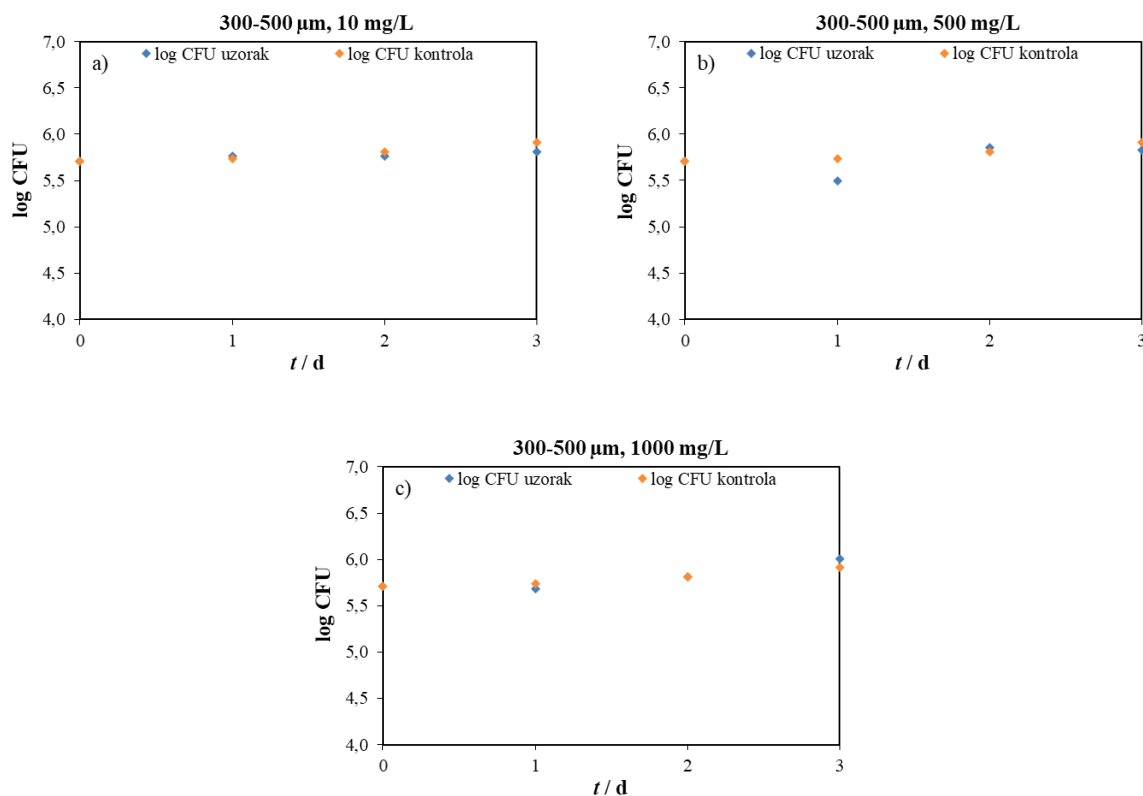


Slika 54. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PET veličine čestica $>1000 \mu\text{m}$, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 25 mg/L, c) 50 mg/L i d) 100 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.





Slika 55. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PET veličine čestica 500 – 1000 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 25 mg/L, c) 50 mg/L i d) 100 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

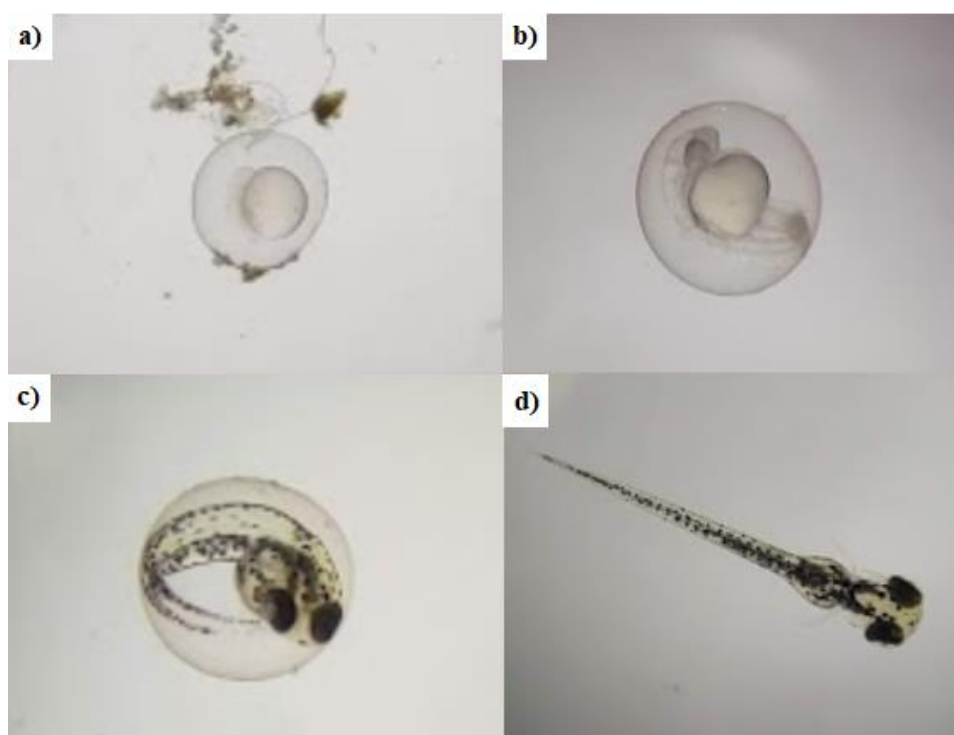


Slika 56. Promjena logaritamskog broja živih stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PET veličine čestica 300 – 500 µm, koncentracije: a) 10 mg/L, b) 500 mg/L i c) 1000 mg/L i za kontrolu tijekom 72 h u P2.

4.3. Određivanje ekotoksičnosti mikroplastike primjenom embrija zebrića *Danio rerio* (P3)

Postupkom opisanim u poglavlju 3.3.4. dobili su se embriji zebrića koji su se koristili u pokusu P3. Na slici 57 prikazan je razvoj embrija zebrića tijekom 96 h. U pokusu P3 pratio se zaostanak embrija u korionu, pigmentacija i razvoj organa vidljivih pod lupom (Slika 26 u poglavlju 3.3.4.).

Provodili su se preliminarni pokusi odnosno sve kontrole kao i otopina PS-a postavljali su se u 12 jažica. S obzirom da su se postavljali preliminarni pokusi nisu se postavljale sve kontrole prema protokolu već pozitivna kontrola 3,4-DCA (20 mg/L), kontrola otapala DMSO (0,1 %), najveća koncentracija u pokusu za kontrolu za otapalo KPS i negativna kontrola E3. Rezultati kontrola prikazani su u tablici 14 te su na slikama 58 i 59 prikazani embriji nakon izlaganja kontrolama. Rezultati pokusa P3 prikazani su grafički na slikama 60, 61 i 62, a ukupni rezultati prikazani su posebno za svaku veličinu PS-a u tablici 15, 16 i 17.

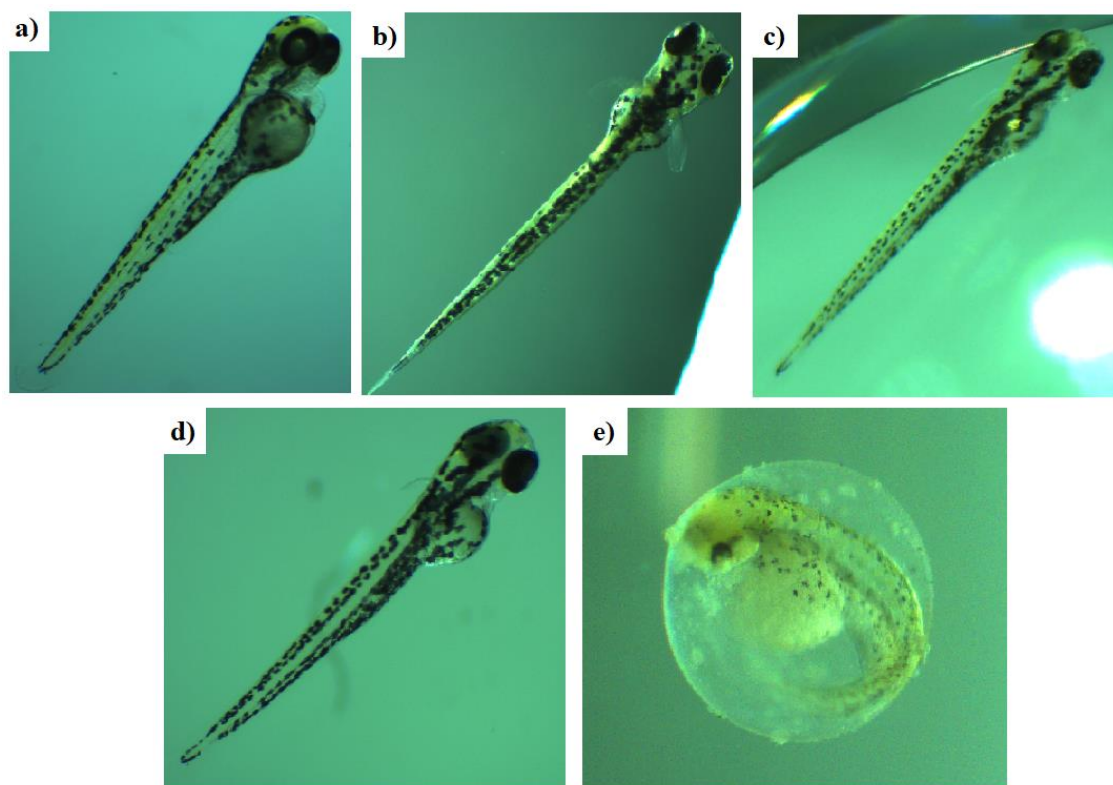


Slika 57. Prikaz razvoja embrija zebrića u E3 mediju: a) nakon mrijesta (0 h), b) nakon 24 h, c) nakon 48 h i d) nakon 72 h.

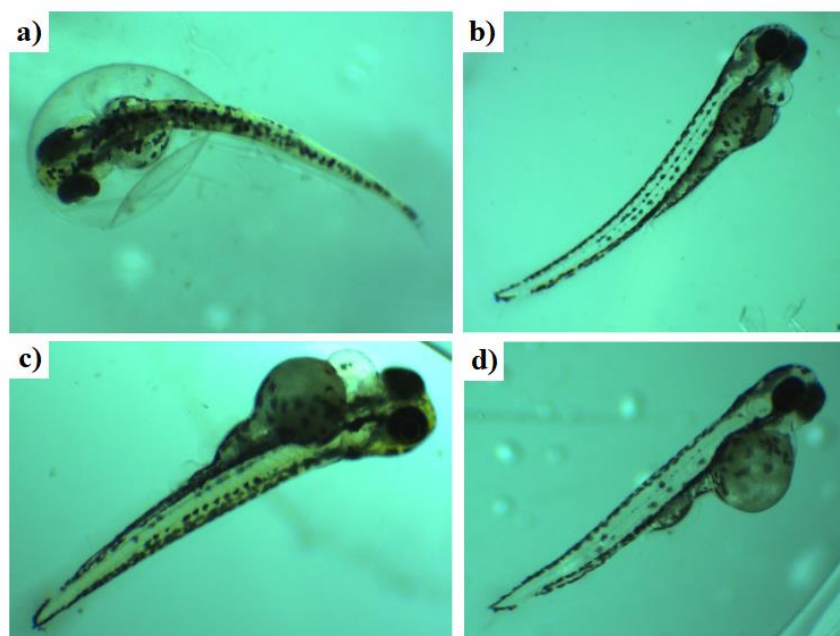
Tablica 14. Rezultati kontrola u P3 pokusu.

KONTROLA	DATUM	KONCENTRACIJA	REZULTAT
3,4-DCA	3.2.2020.	20 mg/L	Svi mrtvi
	10.2.2020.		Svi mrtvi
	24.2.2020.		Svi mrtvi
	2.3.2020.		Svi mrtvi
DMSO	3.2.2020.	0,1%	1 mrtav
	10.2.2020.		Svi živi
KPS	3.2.2020.	10 g/L	2 u korionu
		1 g/L	1 mrtav
	10.2.2020.	0,1 g/L	1 u korionu
E3	3.2.2020.	/	Svi živi
	10.2.2020.		Svi živi
	24.2.2020.		Svi živi
	2.3.2020.		Svi živi; 4 u korionu i većina sumnjiva: jedan ima crvenilo ispod srca, izgleda kao nakupina krvi ; jedan napuhnuto i uočene morfološke deformacije ; jedan u potpunosti siv ; nekoliko ih ima deformiranu žumanjčanu vrećicu ; samo 4 od 12 izgledaju normalno – UPITNA VALJANOST POKUSA (Slika 59)

*ukupno izloženo 12 embrija u svakom pokusu



Slika 58. Mikrofotografije embrija zebrica *Danio rerio* nakon 96 h u: a) i b) E3 mediju, c) negativnoj kontroli DMSO, d) kontroli za otapalo KPS i e) pozitivnoj kontroli 3,4-DCA.

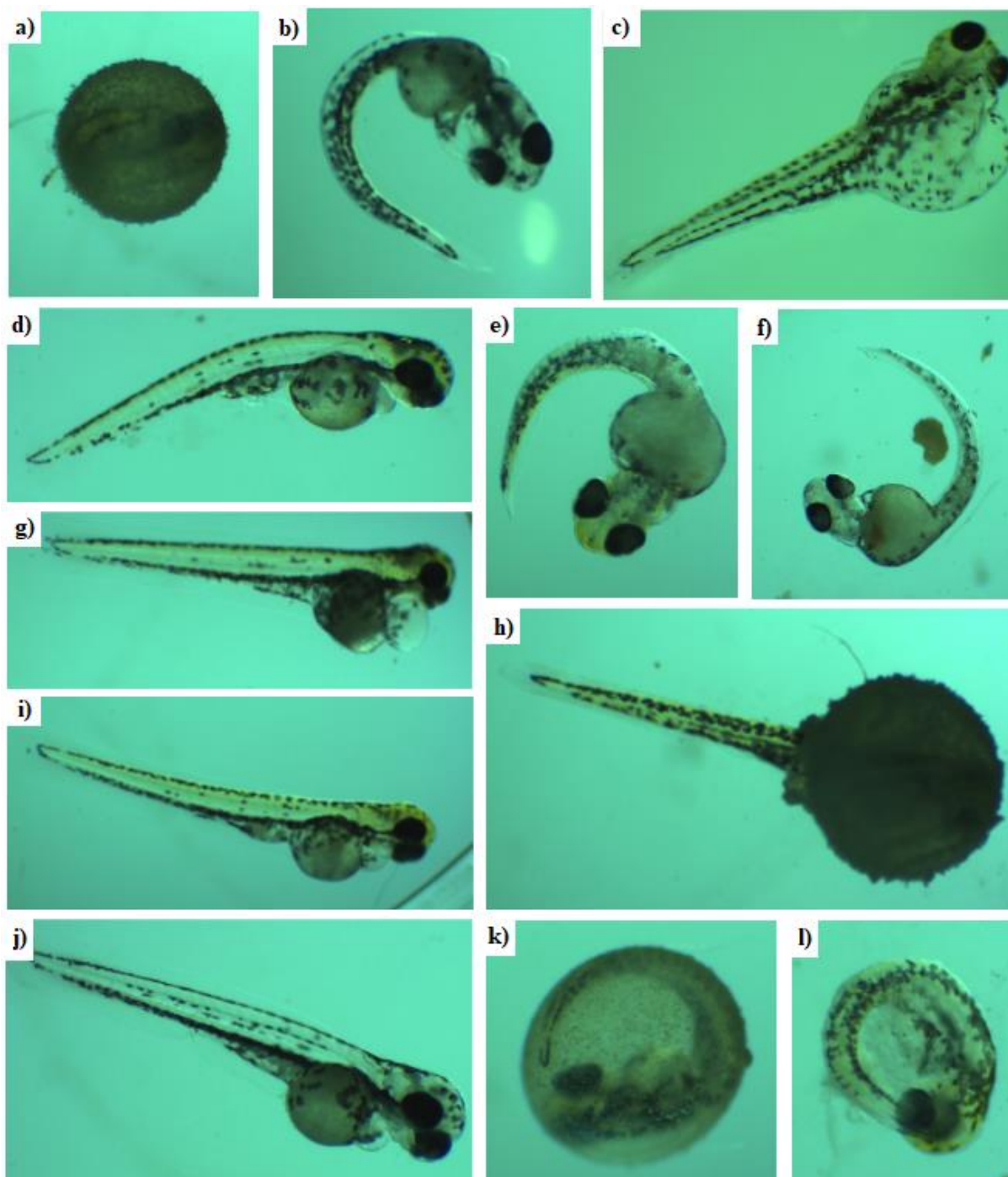


Slika 59. Mikrofotografije embrija zebrica *Danio rerio* nakon 96 h u E3 mediju u pokusu P3: a) zaostanak embrija u korionu, b) izostanak pigmentacije, c) deformirana žumanjčana vrećica i d) izostanak pigmentacije i deformirana žumanjčana vrećica.

Tablica 15. Prikaz ukupnih rezultata pokusa P3-1.

UZORAK	DATUM	γ_{MP} [g/L]	REZULTATI
PS_0,43 μ m	10.2.2020.	0,0001	Svi živi i pokretni
	10.2.2020.	0,001	Svi živi i pokretni
	10.2.2020.	0,01	Svi živi i pokretni
	10.2.2020.	0,1	Svi živi i pokretni
	24.2.2020.	1	9 živih i pokretnih ; 3 u korionu, ali živi
	2.3.2020.	2	6 živih i pokretnih ; 2 u korionu ; 5 ih je imalo glavu u korionu; svi živi, ali s određenim morfološkim deformacijama
	24.2.2020.	3	8 živih i pokretnih ; 4 u korionu, ali živi ; uočen razdvojen žumanjak kod nekih
	2.3.2020.	5	7 izvan koriona ; 5 u korionu ; ukupno ih je živih 5 izvan koriona i 2 unutra koriona ; većina ima crvenilo ispod srca
	24.2.2020.	6	Naizgled svi mrtvi i samo 3 izvan koriona ; nakon otvaranja koriona 4 živa, ali s očiglednim posljedicama
	2.3.2020.	7	2 izvan koriona i živa, ali srce malo sa slabim otkucajima ; kod jednog je zamijećeno nakupljanje MP-e na očima i glavi te je bio napuhnut i imao puno tekućine oko srca dok je drugi bio u potpunosti siv ; 10 unutra koriona od kojih je 6 živih s očiglednim posljedicama: slabi i spori otkucaji srca, nakupina krvi ispod srca, sitno tijelo i uočen je manjak pigmentacije ; samo jedan je bio živ i normalno izgledao
	24.2.2020.	9	Svi mrtvi i samo 2 izvan koriona
3.2.2020.	10	Svi mrtvi i u korionu	

*ukupno izloženo 12 embrija u svakom pokusu

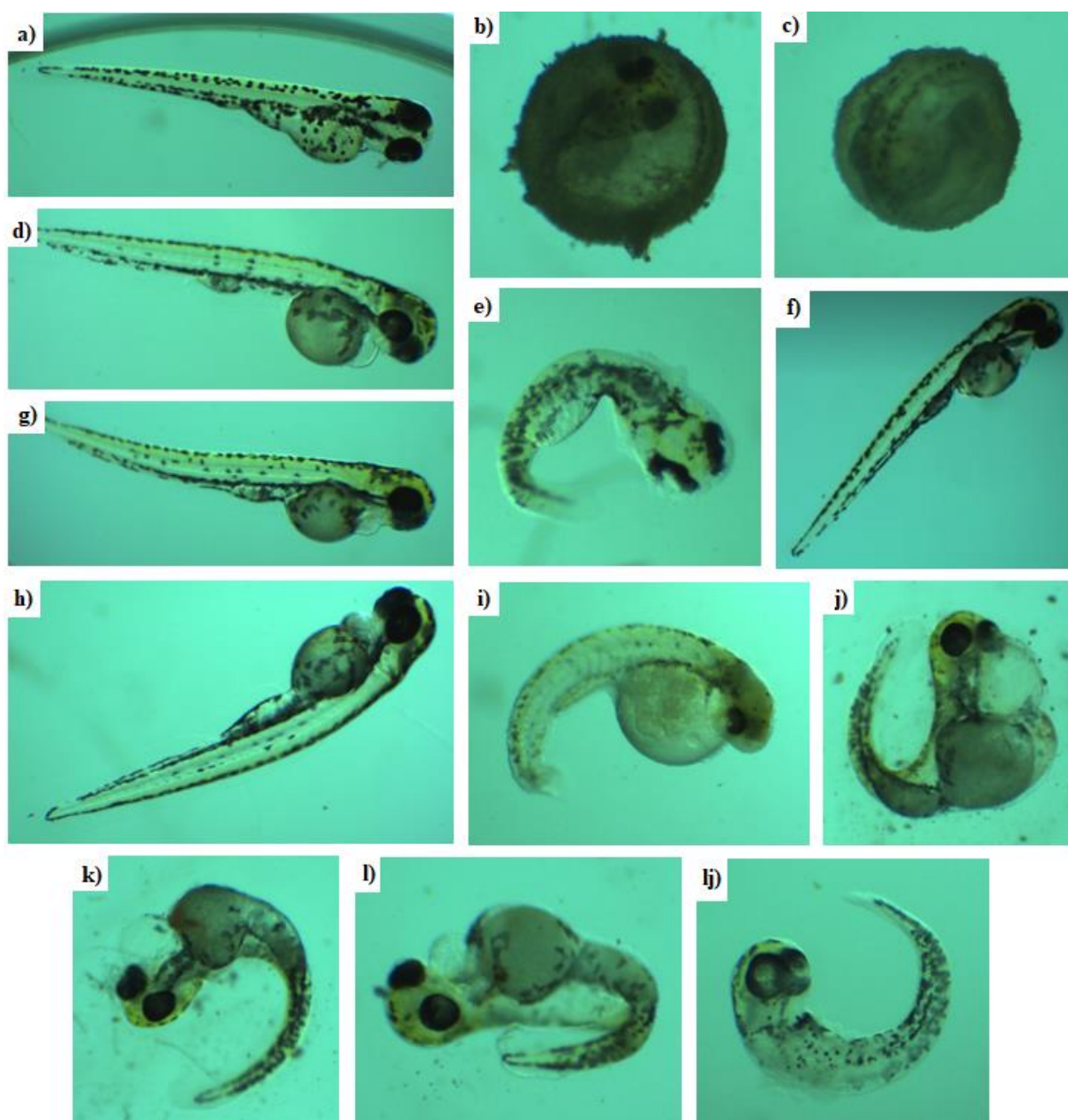


Slika 60. Mikrofotografije embrija zebrića *Danio rerio* nakon 96 h u pokusu izlaganja embrija PS-u veličine čestica $0,43 \mu\text{m}$. Na slikama su prikazani štetni utjecaji PS-a navedeni u tablici 15. Pod a), k) i h) vidljiv je zaostanak embrija u korionu, pod b) i j) prikazan je izostanak pigmentacije, pod d), g) i i) prikazana je deformacija žumanjčane vrećice, pod c) i e) vide se deformacije i zaostanak u razvoju (slabo razvijeno tijelo s obzirom na veličinu), pod f) se vidi nakupina krvi oko srca (crvenilo) i pod l) je prikazan mrtav embrij oslobođen iz koriona nakon 96 h.

Tablica 16. Prikaz ukupnih rezultata pokusa P3-2.

UZORAK	DATUM	γ_{MP} [g/L]	REZULTATI
PS_0,25 μ m	10.2.2020.	0,0001	Svi živi i pokretni
	10.2.2020.	0,001	Svi živi i pokretni
	10.2.2020.	0,01	Svi živi i pokretni
	10.2.2020.	0,1	Svi živi i pokretni
	24.2.2020.	1	9 živih i pokretnih ; 3 u korionu, ali živi
	2.3.2020.	2	9 živih i pokretnih ; 3 u korionu ; samo 1 mrtav ; ostali pomalo napuhnuti i imaju sivi žumanjak
	24.2.2020.	3	7 živih i pokretnih ; 5 u korionu, ali živi
	2.3.2020.	5	Svi u korionu ; 2 živa, ali ne izgledaju dobro
	24.2.2020.	6	Naizgled svi mrtvi i samo 4 izvan koriona ; nakon otvaranja koriona 2 živa (1 iz koriona i 1 koji je bio izvan koriona), ali s očiglednim posljedicama
	2.3.2020.	7	Svi u korionu ; 1 živ, ali jedva
	24.2.2020.	9	Svi mrtvi i samo 2 izvan koriona ; nema živih nakon otvaranja koriona

**ukupno izloženo 12 embrija u svakom pokusu*

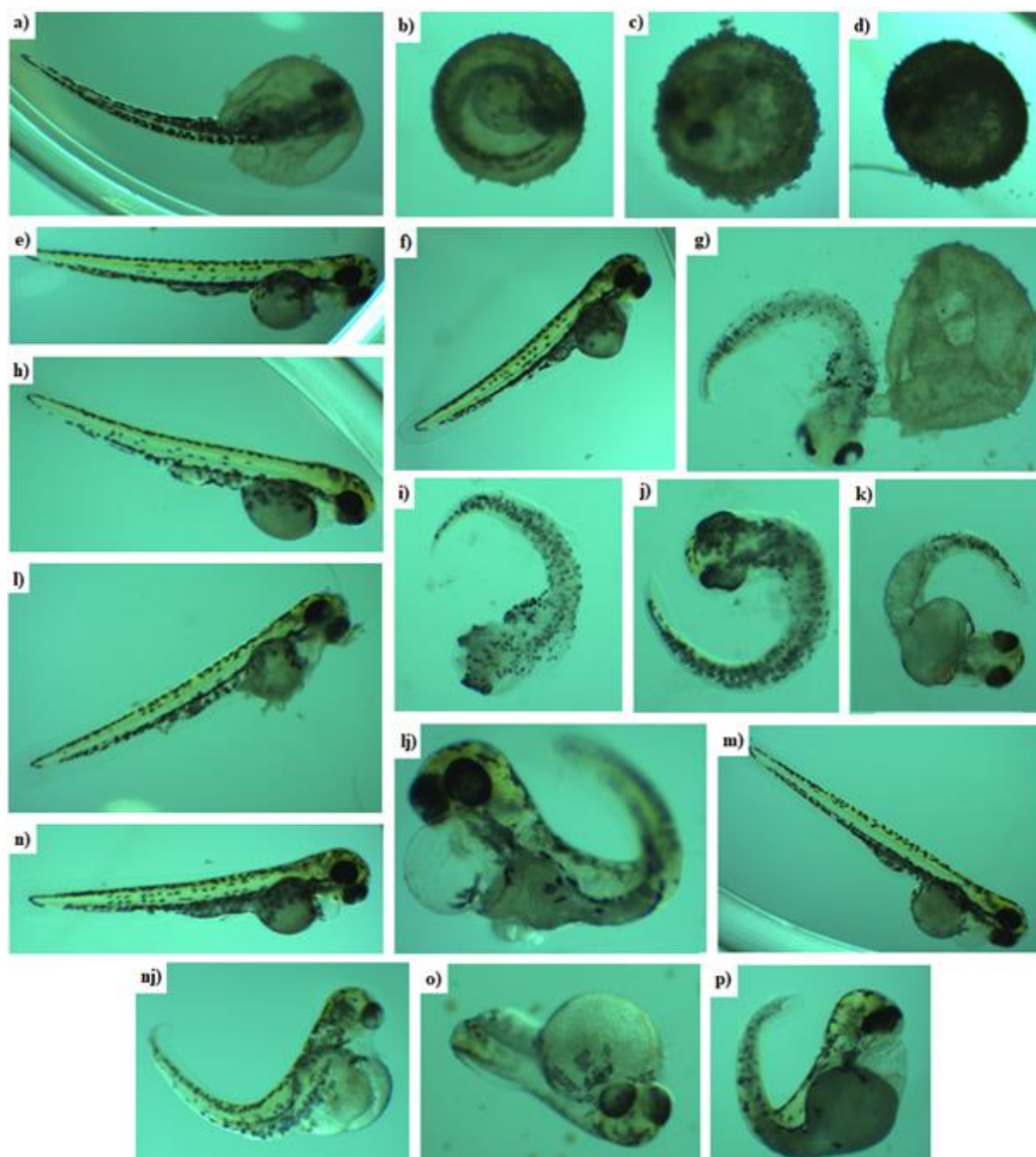


Slika 61. Mikrofotografije embrija zebrica *Danio rerio* nakon 96 h u pokusu izlaganja embrija PS-u veličine čestica 0,25 μm . Na slikama su prikazani štetni utjecaji PS-a navedeni u tablici 16. Pod a), d), f), g) i h) prikazana je deformacija žumanjčane vrećice, pod b) i c) prikazan je zaostanak embrija u korionu, pod e) i l) prikazani su mrtvi embriji nakon otvaranja koriona, pod i), j), k) i l) prikazani su embriji nakon otvaranja koriona s vidljivim deformacijama i zaostankom u razvoju (slabo razvijeno tijelo s obzirom na veličinu), pod j), k) i l) mogu se uočiti čestice PS-a oko embrija.

Tablica 17. Prikaz ukupnih rezultata pokusa P3-3.

UZORAK	DATUM	γ_{MP} [g/L]	REZULTATI
PS_0,12 μ m	10.2.2020.	0,0001	Svi živi i pokretni
	10.2.2020.	0,001	Svi živi i pokretni
	10.2.2020.	0,01	Svi živi i pokretni
	10.2.2020.	0,1	Većina živa i pokretna ; 1 u korionu
	24.2.2020.	1	Većina živa i pokretna ; 1 u korionu ; 1 ima glavu u korionu
	2.3.2020.	2	5 živih i pokretnih; 7 u korionu, od kojih su 4 mrtva ; druga 3 iz koriona živi, ali smežurani i jako slabo kuca srce
	24.2.2020.	3	7 živih i pokretnih ; 5 u korionu (4 od 5 ih je mrtvo) ; zamijećeno nakupljanje MP-e na embrijima u korionu, ali i na izlegnutim ; razdvojen žumanjak
	2.3.2020.	5	Svi u korionu ; 5 živih, ali svi napuhani i sivkasti, ne izgledaju zdravo te svi imaju povećanu tekućinu oko srca (srčani edem)
	24.2.2020.	6	Većina u korionu i svi mrtvi
	2.3.2020.	7	1 izvan koriona ; 11 unutar ; ovaj izvan koriona živ i jedan nakon oslobađanja – ukupno 2, ali ne izgledaju dobro
	24.2.2020.	9	Svi mrtvi, sivi, smežurani i većina u korionu

**ukupno izloženo 12 embrija u svakom pokusu*



Slika 62. Mikrofotografije embrija zebrića *Danio rerio* nakon 96 h u pokusu izlaganja embrija PS-u veličine čestica $0,12 \mu\text{m}$. Na slikama su prikazani štetni utjecaji PS-a navedeni u tablici 17. Pod a), b), c) i d) prikazan je zaostanak embrija u korionu, pod e), f), h), m) i n) prikazana je deformacija žumanjčane vrećice, pod g), i), j) i k) prikazani su mrtvi embriji nakon otvaranja koriona, pod l) prikazan je embrij na kojem su vidljive nakupine čestica PS-a, pod lj), nj), o) i p) prikazani su embriji nakon otvaranja koriona s vidljivim deformacijama i zaostankom u razvoju (slabo razvijeno tijelo s obzirom na veličinu).

5. Rasprava

Uzevši u obzir sve ekonomske prednosti plastike te potrebe stanovništva koje je u konstantnom porastu, nije neobično da je i proizvodnja plastike isto tako u konstantnome porastu. Problem onečišćenja okoliša plastikom postoji od davnina, ali u novije vrijeme brzina ulaska plastike i mikroplastike u okoliš nadmašuje brzinu njezinog uklanjanja. Samim time dolazi i do sve većeg onečišćenja okoliša.⁸⁴ Postavlja se pitanje koliko je ona zapravo štetna za živa bića i okoliš. U ovome radu ispitao se utjecaj mikroplastike koja nastaje razgradnjom makroplastike na različite organizme. Proveli su se pokusi ispitivanja ekotoksičnosti mikroplastike (PE-a, PP-a, PS-a, PVC-a i PET-a) na bakteriju *Pseudomonas putida*, slatkovodnu algu *Chlorella* sp. te embrije zebrica *Danio rerio*. Način provedbe ovih pokusa kao i praćeni parametri opisani su u poglavlju 3 – *eksperimentalni dio*.

5.1. Analiza pokusa P1

U pokusu P1 određivala se ekotoksičnost mikroplastike primjenom bakterije *Pseudomonas putida*. *P. putida* izlagala se PE-u, PP-e, PS-u, PVC-u i PET-u tijekom 48 h, a početni uvjeti prikazani su u tablici 11.

Na slici 28 prikazan je baždarni dijagram ovisnosti logaritamskog broja živih stanica bakterijske kulture (log CFU) o optičkoj gustoći (OG). S obzirom na R^2 koji iznosi 0,9497 može se zaključiti dobro slaganje ova dva pokazatelja te se tijekom pokusa P1, log CFU određivao prema dobivenom baždarnom dijagramu. Osim CFU-a i OG-e, tijekom 48 h pratila se promjena pH – vrijednosti te promjena koncentracije otopljenog kisika. Na slici 29 a) prikazana je srednja vrijednost promjene pH – vrijednosti, a na slici 29 b) srednja vrijednost promjene koncentracije otopljenog kisika, za kontrolu i sve uzorke MP-a u pokusu P1 tijekom 48 h. Iz grafova je vidljivo da tijekom pokusa nije došlo do značajne promjene niti jednog od ova dva pokazatelja.

Slike 30 – 39 prikazuju promjenu broja stanica *P. putide* za sve uzorke MP-a veličine čestica 300 – 500 μm i 500 – 1000 μm te za koncentracije 50; 100; 250; 500 i 1000 mg/L tijekom 48 h. Iz grafova je vidljivo da je u svim pokusima došlo do smanjenja broja stanica bakterija nakon 24 h u usporedbi s kontrolom dok se nakon 48 h taj broj ponovo povećao. Ovakav trend pripisuje se tome što su bakterije vrlo oportunističke i lako se prilagođavaju novom okruženju zbog bogatog enzimatskog sustava.⁸⁴ Dokazano je da *Pseudomonas* sp. ima sposobnost razgradnje PE⁸⁵, *Pseudomonas aeruginosa* može razgraditi PET i PS⁸⁶, a *Pseudomonas putida* PVC⁸⁷.

Osim toga, mikroorganizmima je općenito potreban dulji vremenski period kako bi se prilagodili na novonastale uvjete, te se i zbog toga test ekotoksičnosti provodi prema normi 48 h. Iako je u svim pokusima sličan trend promjene broja stanica bakterije, ipak postoje određene razlike kada govorimo o utjecaju veličine i koncentracije MP-a.

Na slici 30 može se vidjeti da je do najvećeg smanjenja stanica bakterije došlo pri izlaganju *P. putide* PE-u veličine čestica 500 – 1000 μm pri najvećoj koncentraciji PE-a, tj. 1000 mg/L. Broj stanica bakterije smanjio se nakon 24 h sa početnih 6×10^6 st/mL na $1,2 \times 10^6$ st/mL (Slika 30 e)). S druge strane, prilikom izlaganja *P. putide* PE-u veličine čestica 300 – 500 μm (Slika 31), najveće smanjenje stanica bakterije prouzročila je koncentracija PE-a od 100 mg/L što je prikazano na slici 31 b). Početni broj stanica bakterije smanjio se nakon 24 h na 1×10^6 st/mL. U gotovo svim pokusima izlaganja *P. putide* PE-u, broj stanica bakterije je porastao nakon 48 h, osim pri izlaganju PE-u veličine čestica 500 – 1000 μm pri koncentraciji od 100 mg/L. U tom pokusu se početni broj stanica smanjio na $2,1 \times 10^6$ st/mL nakon 24 h te je nakon 48 h iznosio $1,2 \times 10^6$ st/mL (Slika 29 b)).

Pri izlaganju *P. putide* PP-u veličine čestica 500 – 1000 μm (Slika 32), najveću promjenu stanica bakterije izazvala je koncentracija čestica 250 mg/L gdje se broj stanica bakterije smanjio sa početnih $4,1 \times 10^6$ st/mL na $9,8 \times 10^5$ st/mL nakon 24 h (Slika 32 c)). Na slici 33 vidljivo je da veličina čestica 300 – 500 μm PP-a nije imala isti utjecaj te da je najveće smanjenje stanica bakterije izazvala koncentracija čestica od 100 mg/L. Početni broj stanica se tada smanjio sa početnih $4,1 \times 10^6$ st/mL na $6,8 \times 10^5$ st/mL nakon 24 h (Slika 33 b)). U svim pokusima izlaganja *P. putide* PP-u, broj stanica bakterije je porastao nakon 48 h.

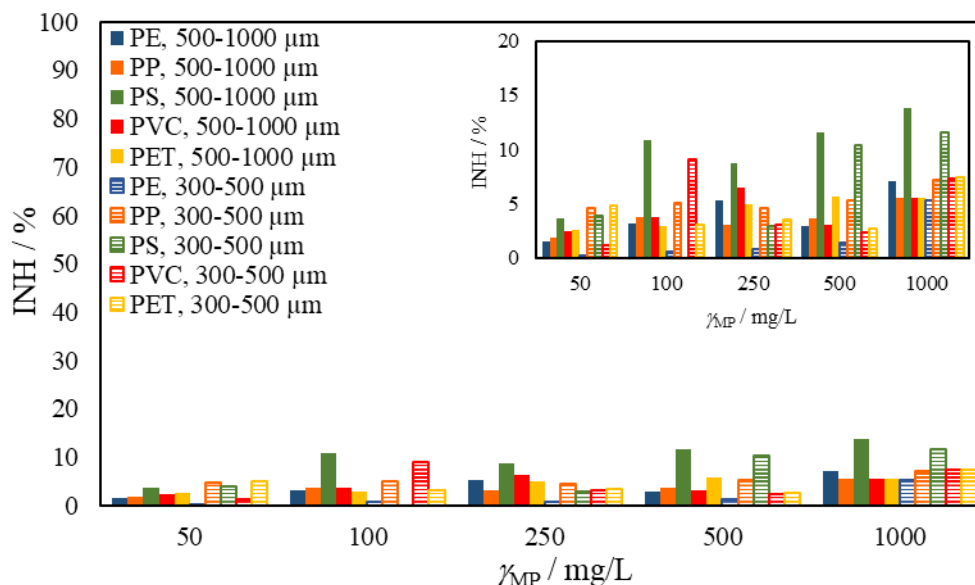
Slika 34 prikazuje promjenu broja stanica *P. putide* nakon izlaganja PS-u veličine čestica 500 – 1000 μm . Pri usporedbi svih grafova može se vidjeti da je do najveće promjene došlo pri izlaganju bakterije koncentraciji od 1000 mg/L gdje se broj stanica bakterije smanjio sa početnih $8,6 \times 10^6$ st/mL na $1,2 \times 10^6$ st/mL nakon 24 h (Slika 34 e)). Prilikom izlaganja *P. putide* manjoj veličini čestica 300 – 500 μm (Slika 35) do najveće promjene došlo je nakon 24 h kod izlaganja koncentraciji od 100 mg/L što je prikazano na slici 35 b). S obzirom na dosadašnja istraživanja prema kojima je dokazano da *P. putida* može rasti uz prisutnost PS-a⁸⁸, zanimljivo je da je u čak četiri slučaja došlo do kontinuiranog pada broja stanica u pokusu odnosno broj stanica bakterije je nastavio padati i nakon 24 h izlaganja. Takav trend je zapažen prilikom izlaganja *P. putide* PS-u veličine čestica 500 – 1000 μm i koncentraciji od 50 mg/L i 250 mg/L te PS-u veličine čestica 300 – 500 μm i koncentraciji od također 50 mg/L i 250 mg/L.

Međutim, dokaz da *P. putida* može koristiti PS kao izvor ugljika potvrđuje činjenica da je u tri pokusa broj stanica bakterije nakon 48 h iznosio više nego broj stanica bakterije u kontrolnim tikvicama koje nisu sadržavale PS. Takva situacija zabilježena je prilikom izlaganja *P. putide* PS-u veličine čestica 500 – 1000 μm i koncentraciji 50 mg/L te veličini čestica 300 – 500 μm i koncentraciji 100 mg/L i 500 mg/L.

Izlaganje *P. putide* PVC-u veličine čestica 500 – 1000 μm prikazano je na slici 36. U ovome pokusu uočen je najveći pad broja stanica bakterije pri izlaganju koncentraciji čestica od 250 mg/L gdje je broj stanica bakterije pao sa početnih $4,2 \times 10^6$ st/mL na 1×10^6 st/mL nakon 24 h (Slika 36 c)). Izlaganje *P. putide* PVC-u veličine čestica 300 – 500 μm rezultiralo je najvećim smanjenjem broja stanica bakterije u odnosu na nulti dan pri izlaganju bakterije 24 h koncentraciji čestica od 100 mg/L što je prikazano na slici 37. Početni broj stanica bakterije pao sa početnih $4,2 \times 10^6$ st/mL na $6,9 \times 10^5$ st/mL (Slika 37 b)). Nekoliko istraživanja je dokazalo kako *P. putida* može koristiti PVC kao izvor ugljika za rast i razmnožavanje.^{87,89,90,91} Ovaj pokus je to i potvrdio jer je pri svim izlaganjima došlo do porasta krajnjeg broja stanica bakterije te je u čak šest pokusa broj stanica bakterije u uzorcima nakon 48 h iznosio više nego broj stanica u kontrolnim tikvicama bez PVC-a (grafovima na slikama 35 i 36).

Pri izlaganju *P. putide* PET-u veličine čestica 500 – 1000 μm (Slika 38), najveću promjenu broja stanica bakterije prouzročila je koncentracija čestica od 1000 mg/L gdje se broj stanica bakterije smanjio sa početnih $4,2 \times 10^6$ st/mL na $1,2 \times 10^6$ st/mL nakon 24 h (Slika 38 a)). Na slici 39 prikazana je promjena broja stanica *P. putide* pri izlaganju PET-u veličini čestica 300 – 500 μm . Najveće smanjenje broja stanica prouzročila je koncentracija čestica od 100 mg/L gdje se početni broj stanica bakterije smanjio na $6,3 \times 10^5$ st/mL nakon 24 h (Slika 39 b)). U svim pokusima izlaganja *P. putide* PET-u, broj stanica bakterije je porastao nakon 48 h.

Slika 63 prikazuje inhibiciju rasta *P. putide* u postotku naspram koncentracije MP-e usporedno za sve vrste, veličine i koncentracije MP-a. Inhibicija se računala prema formuli 3 navedenoj u poglavlju 3.3.4. Najveću inhibiciju rasta izazvao je PS (stupići označeni zelenom bojom). PS veličine čestica 500 – 1000 μm i koncentracije 1000 mg/L izazvao je maksimalnu inhibiciju rasta *P. putide*, čak 13,77 % dok je PS veličine čestica 300 – 500 μm iste koncentracije izazvao inhibiciju rasta od 11,60 %. U svim drugim pokusima izračunata inhibicija rasta *P. putide* nije prelazila 10 %. Najmanja inhibicija rasta zabilježena je prilikom izlaganja *P. putide* PE-u veličine čestica 300 – 500 μm . U tom slučaju inhibicija rasta je pri skoro svim koncentracijama iznosila oko 1 %. Jedinu veću inhibiciju izazvala je koncentracija od 1000 mg/L, 5,37 %.



Slika 63. Inhibicija rasta *Pseudomonas putide* za sve za sve ispitivane vrste, veličine i koncentracije MP-a.

U gotovo svim P1 pokusima, najveća inhibicija rasta zabilježena je prilikom izlaganja *P. putide* najvećoj koncentraciji MP-a od 1000 mg/L, a najmanja inhibicija je zabilježena pri izlaganju najmanjoj koncentraciji odnosno 50 mg/L. Zapaženo je i da su u prosjeku manje veličine čestica uzrokovale veću inhibiciju rasta *P. putide*. Prosječna vrijednost inhibicije rasta svih vrsta MP-a za veličine čestica 500 – 1000 µm i koncentracije 1000 mg/L iznosi oko 7,5 %, a prosječna vrijednosti inhibicije svih vrsta MP-a za veličine čestica 300 – 500 µm i koncentracije 1000 mg/L iznosi oko 8 %.

Promatranjem umanjenog grafa na slici 63 može se bolje uočiti razlika u inhibiciji rasta koju je izazvala MP-a veće veličine čestica i niže koncentracije naspram inhibicije rasta koju je izazvala MP-a manje veličine čestica i veće koncentracije. Može se zaključiti da se smanjenjem veličine čestica i povećanjem koncentracije bilo koje vrste MP-a, inhibicija rasta *P. putide* povećava.

5.2. Analiza pokusa P2

U pokusu P2 određivala se ekotoksičnost mikroplastike primjenom slatkovodne alge *Chlorella* sp.. U ovome pokusu, *Chlorella* sp. izlagala se PE-u, PP-e, PS-u, PVC-u i PET-u tijekom 72 h, a početni uvjeti prikazani su u tablici 12.

Slika 40 prikazuje baždarni dijagram ovisnosti broja živih stanica mikroalge (CFU) o optičkoj gustoći (OG). Prema R^2 koji iznosi 0,9718 može se zaključiti dobro slaganje ova dva pokazatelja te se tijekom pokusa P2, CFU određivao prema dobivenom baždarnom dijagramu.

Tijekom 72 h pratila se i morfološka promjena stanica alge, promjena pH – vrijednosti te promjena koncentracije otopljenoga kisika. S obzirom da prosječni promjer pora stanične stijenke alge roda *Chlorella* iznosi manje od 20 nm⁹² (za *Chlorella vulgaris*) bilo je očekivano da do transporta MP-e kroz staničnu stjenku neće doći. Tijekom pokusa nisu zabilježene niti promjene boje niti oblika stanica alge. Na slici 41 a) prikazana je srednja vrijednost promjene pH – vrijednosti, a na slici 41 b) srednja vrijednost promjene koncentracije otopljenoga kisika, za kontrolu i sve uzorke MP-a u pokusu P2 tijekom 72 h. Iz prikazanih grafova može se zaključiti da tijekom pokusa nije došlo do značajne promjene niti jednog od ova dva pokazatelja.

Slike 42 – 56 prikazuju promjenu broja stanica *Chlorella* sp. za sve uzorke MP-a veličine čestica 300 – 500 µm i koncentracije 10; 500 i 1000 mg/L te veličine čestica 500 – 1000 µm i >1000 µm i koncentracije 10; 25; 50 i 100 mg/L u usporedbi sa kontrolom tijekom 72 h. Nakon provedbe pokusa s većom veličinom čestica i manjim koncentracijama nije zabilježena niti jedna veća inhibicija rasta stanica alge te se zbog toga u nastavku provodio pokus s manjom veličinom čestica i većom koncentracijom MP-a.

Usporedbom svih grafova može se primijetiti različiti trend promjene broja stanica mikroalge *Chlorella* sp. tijekom pokusa. Rast broja stanica alge u uzorcima s MP-om pripisuje se tome što se mikroalge kao i bakterije mogu prilagoditi različitim uvjetima u okruženju. Mogućnost njihove prilagodbe omogućuje im njihova ekspresiji gena koja je specifična za svaku vrstu mikroalgi, a omogućuje im održavanje normalnih životnih funkcija.⁹³ Razmatra se i sposobnost mikroalgi da kao i bakterije mogu koristiti MP-u kao izvor ugljika i energije za rast i razvoj, ali za rod *Chlorella* ne postoji još dovoljan broj istraživanja te je ovo za sada samo pretpostavka.^{94,95} Iz dobivenih rezultata vidljivo je da različite vrste, koncentracije i veličine MP-e imaju različit utjecaj na algu. To se poklapa sa nekoliko istraživanja u kojima je dokazano da toksični učinak MP-e na mikroalge postoji, ali on ovisi o vrsti, koncentraciji i veličini čestica MP-e te vrsti mikroalge na kojoj se istraživanje provodi.^{96,97} Do sada provedena ispitivanja toksičnosti MP-a na mikroalgama roda *Chlorella* ukazuju na to da se toksičnost povećava sa smanjenjem veličine čestica i povećavanjem koncentracije MP-a.^{92,93,96,97}

Na slikama 42, 43 i 44 prikazana je promjena broja stanica alge *Chlorella* sp. za uzorak PE-a veličine čestica >1000; 500 – 1000 i 300 – 500 μm . Usporedbom grafova može se zaključiti da je pri izlaganju alge svim koncentracijama i veličinama PE-a došlo do sličnog trenda promjene broja stanica alge odnosno nakon 24 h došlo je do blagog porasta, nakon 48 h u svim pokusima je došlo do smanjenja broja stanica alge te se nakon 72 h taj broj ponovno povećao. Pri izlaganju *Chlorella* sp. PE-u veličine čestica >1000 μm , najveće smanjenje broja stanica alge nakon 48 h izazvala je koncentracija od 50 mg/L gdje se početni broj stanica smanjio sa $5,1 \times 10^5$ st/mL na $4,1 \times 10^5$ st/mL što je prikazano na slici 42 c). U pokusu izlaganja *Chlorella* sp. PE-u veličine čestica 500 – 1000 μm , niti jedna koncentracija nije izazvala veće smanjenje broja stanica alge tijekom pokusa što je vidljivo na slici 43. Pri izlaganju *Chlorella* sp. PE-u veličine čestica 300 – 500 μm (Slika 44) trend promjene broja stanica alge je malo drugačiji. U ovome pokusu alga se izlagala većim koncentracijama PE-e odnosno koncentracijama od 500 i 1000 mg/L. U oba pokusa se broj stanica alge smanjio već nakon 24 h sa početnih $5,1 \times 10^5$ st/mL na $3,1 \times 10^5$ st/mL te je ostao niži od početnog broja stanica alge do kraja pokusa što je prikazano na slici 44 b) i c). To se poklapa sa činjenicom da će manja veličina čestica MP-e i veća koncentracija imati veći učinak na rast mikroalge.^{92,93,94}

Prilikom izlaganja mikroalge PP-u veličine čestica >1000 i 500 – 1000 μm i koncentracijama 10; 25; 50 i 100 mg/L do najvećeg smanjenja broja stanica alge došlo je nakon 24 h, dok je nakon 48 h broj stanica porastao, a nakon 72 h se ponovno smanjio (Slike 45 i 46). Najveće smanjenje broja stanica alge nakon 24 h izazvala je veličina čestica PP-a 500 – 1000 μm i koncentracija od 100 mg/L. Tada se broj stanica *Chlorella* sp. smanjio sa početnih $5,1 \times 10^5$ st/mL na $3,1 \times 10^5$ st/mL što je prikazano na slici 46 d). Slika 47 prikazuje promjenu broja stanica alge pri izlaganju PP-u veličine čestica 300 – 500 μm i koncentracijama 10; 500 i 1000 mg/L. U ovome pokusu je broj stanica alge porastao nakon 24 h, a do najvećeg smanjenja došlo je nakon 48 h odnosno 72 h. Najveće zabilježeno smanjenje broja stanica alge prouzročila je koncentracija PP-u od 500 mg/L gdje se nakon 72 h početni broj stanica smanjio na $4,1 \times 10^5$ st/mL što je prikazano na slici 47 b). Sličan trend zabilježen je u istraživanju kojeg su proveli *Song i suradnici* 2016. godine⁹³. Oni su izlagali *Chlorella* sp. različitim vrstama MP-e veličine čestica od 74 μm i koncentraciji od 200 mg/L tijekom 96 h. Pratili su promjenu OG pri $\lambda = 680$ nm, a pri izlaganju *Chlorella* sp. PP-u najveći pad OG su zabilježili nakon 72 h.⁹³

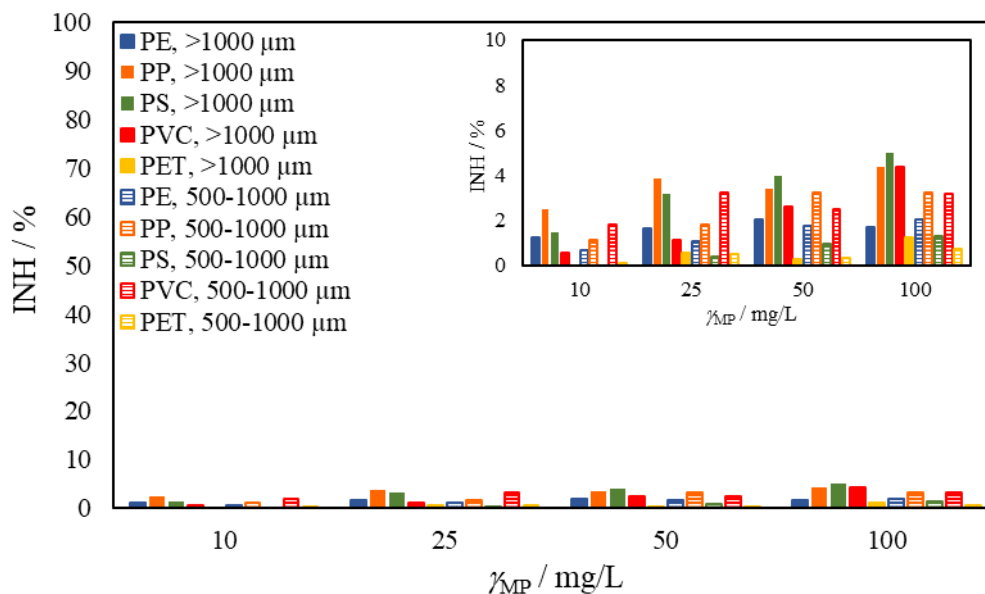
U pokusu izlaganja *Chlorella* sp. PS-u veličine čestica >1000 μm , broj stanica alge se tijekom 72 h smanjivao u svim pokusima (Slika 48). Najveće smanjenje izazvala je koncentracija od 100 mg/L gdje se početni broj stanica alge nakon 72 h smanjio sa $5,1 \times 10^5$ st/mL na $2,8 \times 10^5$ st/mL što je prikazano na slici 48 d).

U pokusu izlaganja alge PS-u veličine čestica 500 – 1000 μm niti jedna koncentracija nije prouzročila veću promjenu broja stanica alge što je vidljivo na slici 49. Najveće zabilježeno smanjenje broja stanica izazvala je koncentracija od 50 mg/L nakon 48 h. Broj stanica alge se u tom pokusu smanjio sa početnih $5,1 \times 10^5$ st/mL na $4,1 \times 10^5$ st/mL (Slika 49 c)). Na slici 49 prikazana je promjena broja stanica alge prilikom izlaganja *Chlorella* sp. PS-u veličini čestica 300 – 500 μm i koncentracijama 10; 500 i 1000 mg/L. Najveće smanjenja broja stanica alge zabilježeno je nakon 24 h u pokusima izlaganja alge većim koncentracijama PS-a odnosno 500 i 1000 mg/L. U oba slučaja početni broj stanica se smanjio sa $5,1 \times 10^5$ st/mL na $3,1 \times 10^5$ st/mL nakon 24 h (Slika 50 b) i c)). *Li i suradnici* proveli su istraživanje u kojem su izlagali *Chlorella pyrenoidosa* PS-u veličine čestica 0,1; 0,55 i 5 μm te koncentracijama 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 mg/L tijekom 96 h⁹⁸. Inhibiciju rasta određivali su prema optičkoj gustoći koju su mjerili također na valnoj duljini 680 nm. Istraživanjem je utvrđeno da su veću inhibiciju rasta *Chlorella pyrenoidosa* izazvale samo manje veličine čestica 0,1 i 0,55 μm dok veličina čestica PS-a od 5 μm nije izazvala gotovo nikakvu inhibiciju rasta alge izlaganjem navedenim koncentracijama.⁹⁸ To je u skladu sa dobivenim podacima u pokusu izlaganja *Chlorella* sp. većim česticama PS-a odnosno >1000 i 500-1000 μm gdje nije zabilježena veća promjena broja stanica alge.

Pri izlaganju *Chlorella* sp. PVC-u veličine čestica >1000 μm nije zabilježeno niti jedno veće smanjenje broja stanica alge kao što je vidljivo na slici 51. Jedino veće smanjenje broja stanica u usporedbi s kontrolom vidljivo je na slici 51 d) gdje je broj stanica alge u uzorku s PVC-om koncentracije od 100 mg/L iznosio $4,8 \times 10^5$ st/mL dok je broj stanica alge u kontrolnoj tikvici iznosio $5,8 \times 10^5$ st/mL. Na slici 52 prikazana je promjena broja stanica alge u pokusu izlaganja mikroalge PVC-u veličine čestica 500 – 1000 μm . U sva četiri pokusa broj stanica se smanjio već nakon 24 h sa početnih $5,1 \times 10^5$ st/mL na oko $3,1 \times 10^5$ st/mL nakon čega je ponovno porastao u svim pokusima. U pokusu gdje se mikroalga izlagala koncentraciji PVC-a od 25 i 50 mg/L, broj stanica alge se nakon porasta, ponovno smanjio nakon 72 h na $3,8 \times 10^5$ st/mL odnosno $3,5 \times 10^5$ st/mL. Pri izlaganju *Chlorella* sp. PVC-u veličine čestica 300 – 500 μm i koncentracijama 10; 500 i 1000 mg/L najveće smanjenje početnog broja stanica alge izazvale su veće koncentracije što je vidljivo na slici 53. Koncentracija od 500 mg/L izazvala je smanjenje početnog broja stanica na $3,5 \times 10^5$ st/mL nakon 72 h dok je koncentracija od 1000 mg/L izazvala smanjenje na $4,5 \times 10^5$ st/mL (Slika 53 b) i c)). Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem kojeg su proveli *Fu i suradnici* u kojem se *Chlorella vulgaris* izlagala mikroplastici PVC-a koncentracijama 10; 100 i 1000 mg/L tijekom 10 dana.⁹⁹ OG pratila se mjerenjem na $\lambda = 680$ nm, a učinak PVC-a se povećavao s povećanjem koncentracije.⁹⁹

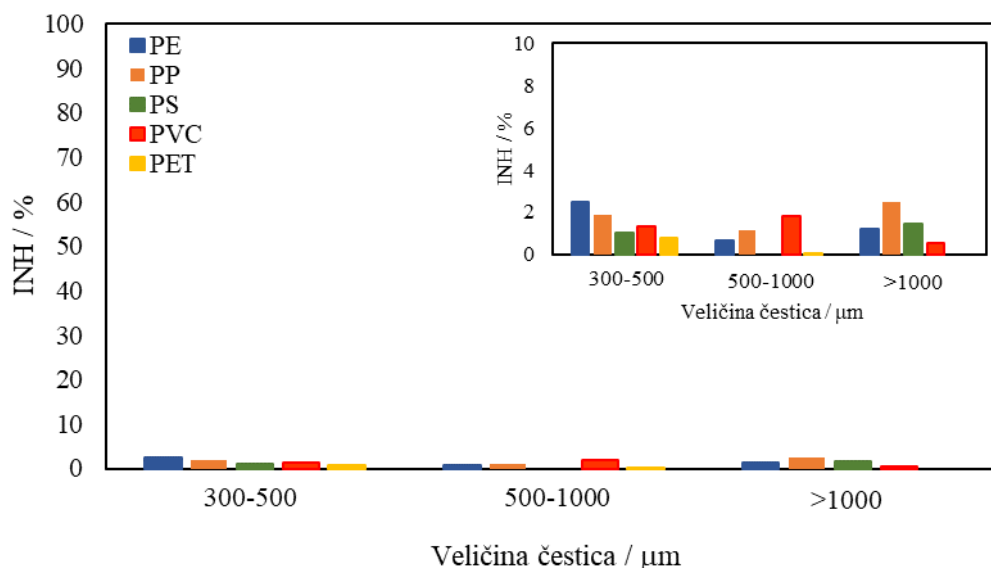
Slike 54, 55 i 56 prikazuju promjenu broja stanica *Chlorella* sp. pri izlaganju PET-u veličine čestica >1000 i 500 – 1000 μm , koncentracijama 10; 25; 50 i 100 mg/L te veličini čestica 300 – 500 μm i koncentracijama 10; 500 i 1000 mg/L. U većini ovih pokusa broj stanica alge u uzorcima i kontroli se nisu previše razlikovali odnosno nisu zabilježena veća smanjenja broja stanica alge u odnosu na početni broj. U nekoliko slučajeva je tikvica sa uzorcima PET-a sadržavala veći broj stanica alge nego kontrolne tikvice. Na slici 56 c) može se vidjeti da je čak i u pokusu izlaganja mikroalge PET-u veličine čestica 300-500 μm i najvećoj koncentraciji odnosno 1000 mg/L, broj stanica alge uzorka iznosio više nego broj stanica alge u kontroli nakon 72 h. Ova pojava se može objasniti činjenicom da *Chlorella* sp. može koristiti PET kao izvor ugljika za rast i razvoj. *Muslihuiddin i suradnici* potvrdili su to istraživanjem u kojem su izlagali *Chlorella Pyrenoidosa* PET-u veličine čestica 0,25-1 mm² tijekom 14 dana. U uzorke s mikroalgom su dodali 500 mg PET-a i pratili OG tijekom 14 dana pri $\lambda = 680$ nm. U uzorcima sa PET-om, OG se povećala sa početnih 0,103 na 0,551 dok je OG kontrole iznosila oko 0,400 nakon 14 dana.¹⁰⁰ U istraživanju koje su proveli *Song i suradnici* gdje se ispitivao utjecaj različitih vrsta MP-a na mikroalgu *Chlorella* sp., pri usporedbi dobivenih rezultata također je zabilježeno da je PET potaknuo rast *Chlorella* sp. odnosno OG u tom pokusu najviše je porasla tijekom 96 h.⁹³

Slika 64 prikazuje postotak inhibicije rasta mikroalge *Chlorella* sp. s obzirom na koncentraciju MP-e u pokusima u kojima se ispivala ekotoksičnosti MP-a veličine čestica >1000 i 500 – 1000 μm . Inhibicija rasta računala se prema formuli 3 navedenoj u poglavlju 3.3.4. Usporedbom inhibicije rasta pojedinih vrsta MP-a i različitih veličina čestica može se uočiti kako se u svim pokusima inhibicija povećala s porastom koncentracije što je u skladu s literaturom.^{92,93,96,97} Najveća inhibicija rasta zabilježena je pri izlaganju *Chlorella* sp. PS-u veličine čestica >1000 μm i koncentracije 100 mg/L (stupići označeni zelenom bojom na slici 64). Inhibicija rasta u tom pokusu dosegla je 5,01 %, zatim slijede PVC i PP veličine čestica >1000 μm i koncentracije 100 mg/L s inhibicijom rasta od 4,38 % i 4,36 %. Pretpostavlja se da veće čestice MP-e i visoke koncentracije zaklanjaju svjetlost mikroalgama i izazivaju tako zvani *efekt sjene* (eng. *Shading effect*), te na taj način dolazi do negativnog utjecaja na fotosintezu i rast algi jer su one fototrofni organizmi.¹⁰¹ Potrebno je uzeti u obzir i mogući utjecaj MP-e na smanjenje sadržaja klorofila pri čemu dolazi do negativnog utjecaja na fotosintezu i samim time i do smanjenja rasta. U više istraživanja ova činjenica je potvrđena, na primjer, istraživanje koje su proveli *Wu i suradnici* u kojem su izlagali *Chlorella pyrenoidosa* PVC-u i PP-u, PVC je izazvao smanjenje klorofila za čak 55,23 %.¹⁰¹



Slika 61. Inhibicija rasta *Chlorella* sp. s obzirom na različite vrste i koncentracije MP-a pri veličini čestica >1000 i 500 – 1000 μm.

Na slici 65 prikazana je inhibicija rasta *Chlorella* sp. s obzirom na veličinu čestica za koncentraciju 10 mg/L.



Slika 65. Inhibicija rasta *Chlorella* sp. s obzirom na različite vrste i veličine čestica MP-a pri koncentraciji od 10 mg/L.

Pri izlaganju *Chlorella* sp. različitim koncentracije MP-a (10; 25; 50 i 100 mg/L) vidljiv je drugačiji učinak veličine čestica MP-a na inhibiciju rasta mikroalge (Slika 64) u odnosu na pokuse u kojima se mikroalga izlagala najmanjoj koncentraciji čestica od 10 mg/L (Slika 65). Usporedbom grafova na slikama 64 i 65 može se vidjeti da pri izlaganju alge većim koncentracijama čestica (100 mg/L), veći učinak na inhibiciju rasta imale su čestice veće veličine (>1000 μm), ali usporedbom pokusa u kojima se alga izlagala najnižoj koncentraciji čestica (10 mg/L) i različitim veličinama čestica vidljivo je da je najmanja veličina čestica 300 – 500 μm izazvala najveću inhibiciju rasta mikroalge (Slika 65). Najveću inhibiciju izazvao PE veličina čestica 300 – 500 μm (stupići označeni plavom bojom na slici 65). U tom pokusu inhibicija rasta iznosila je 2,46 %.

Može se zaključiti da različite vrste, veličine čestica i koncentracije MP-a imaju različit utjecaj na inhibiciju rasta mikroalge *Chlorella* sp., ali ovo područje je još uvijek nedovoljno istraženo te je potrebno provesti dodatna istraživanja kako bi se mogao odrediti točan utjecaj MP-a na rast mikroalge.

5.3. Usporedba pokusa P1 i P2

U pokusima P1 i P2 određivala se ekotoksičnost MP-e primjenom bakterije *Pseudomonas putida* (pokus P1) i slatkovodne alge *Chlorella* sp. (pokus P2). U oba pokusa ispitivao se utjecaj istih vrsta MP-a, a usporediti se mogu pokusi u kojima se ispitivala veličina čestica 500 – 1000 μm i koncentracije 50 i 100 mg/L te veličina čestica 300 – 500 μm i koncentracije 500 i 1000 mg/L. U tablici 18 prikazani su rezultati tih pokusa, a u daljnjem tekstu su u zagradama označene boje kojima su pojedini podatci označeni u tablici.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je bakterija *P. putida* bila osjetljiviji testni organizam jer je u većini prikazanih pokusa, MP-a izazvala veću inhibiciju rasta prilikom izlaganja bakterije, nego kod alge *Chlorella* sp.. Iako organizmi nisu jednako osjetljivi na iste vrste, veličine i koncentracije MP-a, usporedbom pokusa može se primijetiti da je manja veličina čestica i viša koncentracija MP-e izazvala veću inhibiciju rasta kod *P. putide* u svim pokusima (brojevi označeni crvenom bojom), ali kod *Chlorella* sp. takav trend pratili su samo PE i PS (brojevi označeni zelenom bojom). Uspoređujući iste veličine čestica, ali nižu i višu koncentraciju također je uočljivo da se s povećanjem koncentracije MP-e, povećala inhibicija rasta u većini pokusa.

Tablica 18. Usporedba inhibicije rasta testnih organizama u pokusima P1 i P2 u kojima se ispitivala ista veličina i koncentracija mikroplastika.

Veličina čestica / μm		500-1000				300-500			
$\gamma_{\text{MP}} / \text{mg/L}$		50		100		500		1000	
Testni organizam		<i>P. putida</i>	<i>Chlorella</i> sp.	<i>P. putida</i>	<i>Chlorella</i> sp.	<i>P. putida</i>	<i>Chlorella</i> sp.	<i>P. putida</i>	<i>Chlorella</i> sp.
INH / %	PE	1,54	1,75	3,23	2,02	1,35	3,17	5,37	4,68
	PP	1,93	3,25	3,76	3,25	5,31	2,05	7,17	0,00
	PS	3,62	0,93	10,87	1,29	10,39	3,17	11,60	3,17
	PVC	2,42	2,46	3,77	3,17	2,37	1,86	7,37	2,38
	PET	2,62	0,73	2,98	0,73	2,75	1,32	7,42	0,99

U svim pokusima izlaganja *P. putide* MP-i, PS je izazvao značajnu inhibiciju njezinog rasta (brojevi zaokruženi plavom bojom). Međutim, u pokusima izlaganja *Chlorella* sp. veličini čestica 500 – 1000 μm , najveću inhibiciju izazvao je PP (broj zaokružen crnom bojom), dok je pri izlaganju manjoj veličini čestica 300 – 500 μm i višim koncentracijama, najveću inhibiciju izazvao PE (brojevi zaokruženi narančastom bojom).

Ovi rezultati dokazuju da nisu sve vrste MP-a jednako štetne za oba testna organizma, te da veličina i koncentracija čestica MP-e imaju znatnu ulogu na inhibiciju rasta pojedinog organizma. Potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se mogao odrediti točan utjecaj veličine, koncentracije i vrste MP-a na ispitivane organizme.

5.4. Analiza pokusa P3

U pokusu P3 određivala se ekotoksičnost mikroplastike primjenom embrija zebrića *Danio rerio*. Embriji su se izlagali PS-u tijekom 96 h, a početni uvjeti prikazani su u tablici 13.

Na slici 57 prikazan je razvoj embrija zebrića tijekom 72 h, a u tablici 8 (poglavlje 2.7.1.3.) opisani su embrionalni stadiji razvoja zebriće ukoliko se ona razvija u pogodnom okruženju.

S obzirom da su se provodili preliminarni pokusi, u svim pokusima su se postavljale iste kontrole koje su navedene u tablici 14, a na slikama 58 i 59 prikazane su mikrofotografije embrija nakon 96 h izlaganja pojedinoj kontroli. Na slici 58 a) i b) prikazani su embriji zebrica nakon 96 h izlaganja E3 mediju, odnosno kako bi one trebale izgledati nakon 96 h u pogodnom okruženju. Na tim se slikama mogu uočiti razvijeno tijelo, peraje, oči, uši i mišići zebrica. Izlaganjem embrija zebrica negativnoj kontroli DMSO 0,1 % (Slika 58 c)) i kontroli otapala KPS (Slika 58 d)) većina embrija je pratila normalan razvoj tijekom 96 h te nisu zamijećene nikakve negativne promjene. Izlaganjem embrija negativnoj kontroli 3,4-DCA u koncentraciji 20 mg/L smrtnost embrija iznosila je 100 % nakon 96 h izlaganja u svim pokusima (Slika 58 e)).

Na slici 59 prikazani su embriji zebrica nakon izlaganja E3 mediju u pokusu P3 u kojem se ispitala ekotoksičnost PS-a koncentracije 2; 5 i 7 g/L i veličini čestica 0,43; 0,25 i 0,12 μm . Usporedbom tih slika sa slikom 58 a) i b) mogu se uočiti mnoge nepravilnosti u razvoju embrija, odnosno uočen je zaostanak embrija u korionu (Slika 59 a)), izostanak pigmentacije (Slika 58 b) i d)), srčani edem (Slika 58 c)) i edem odnosno napuhnutost u području žumanjčane vrećice (Slika 58 c) i d)). Zbog navedenog, valjanost ovoga pokusa je upitna. U ostalim pokusima, preživljavanje i pokretljivost embrija izlaganih E3 mediju bilo je zadovoljavajuće, kako je i navedeno u tablici 14.

U tablici 15 prikazani su rezultati pokusa P3-1 u kojem su se embriji zebrica izlagali PS-u veličine čestica 0,43 μm . Koncentracija čestica u rasponu od 0,0001 do 0,1 g/L nije imala nikakvog utjecaja na embrije zebrica tijekom 96 h. Prvi zabilježeni utjecaj PS-a na embrije uočen je pri koncentraciji 1 g/L gdje je 25 % embrija zaostalo u korionu nakon izlaganja (Slika 60 k)), ali preživljavanje embrija je bilo 100 %-tno. Nakon rastvaranja koriona nisu uočene druge promjene u usporedbi s kontrolom. Izlaganjem 12 embrija koncentraciji od 2 g/L uočen je zaostanak 50 % embrija u korionu (2 u potpunosti u korionu i 4 su imala glavu u korionu, kako je prikazano na slici 60 h)). Koncentracija od 3 g/L izazvala je kod nekih embrija razdvajanje žumanjčane vrećice, kao što je prikazano na slici 60 i)). U ovome pokusu preživljavanje embrija bilo je također 100 %-tno, ali 33 % ih je zaostalo u korionu. Prilikom izlaganja 12 embrija koncentraciji od 5 g/L primijećeno je crvenilo oko srca kod većine embrija (Slika 60 f)) i manjak pigmentacije kod nekih (Slika 60 j)). Izvan koriona ih je bilo 7, od kojih su 2 bila mrtva, te 5 embrija unutar koriona od kojih su nakon rastvaranja koriona, 3 bila mrtva (Slika 60 e) i l)). Ukupno preživljavanje u ovom pokusu iznosilo je 58 %. Pri izlaganju embrija koncentraciji PS-a od 6 g/L, uočene su značajni negativni utjecaji na zebrice u odnosu na prethodno navedene koncentracije PS-a.

75 % embrija bilo je u korionu, a nakon rastvaranja koriona, ukupno preživljavanje iznosilo je 33 %. Nakon rastvaranja koriona, kod živih embrija su uočene mnoge nepravilnosti poput deformacije i napuhnutosi žumanjčane vrećice te srčanog edema (Slika 60 g) i d)). Izlaganje embrija koncentraciji PS-a 7 g/L izazvalo je zaostanak 83 % embrija u korionu. Preživjelo ih je 67 %, ali je većina bila nedovoljno razvijena, uočen je manjak pigmentacije, napuhnuto tijelo, nakupine krvi ispod srca, srčani edem te općenito malo srce sa slabim otkucajima. Samo je jedan embrij preživio uvjete izlaganja u ovome pokusu te za njega nisu primijećene morfološke promjene. Na slici 60 a), b), c), e) i l) prikazane su posljedice izlaganja embrija koncentraciji PS-a od 7 g/L. Smrtnost embrija tijekom izlaganja koncentracijama PS-a od 9 i 10 g/L bila je 100 %-tna.

Zaostanak embrija u korionu pri izlaganju embrija zebrica PS-u veličine čestica 0,43 μm u skladu je s istraživanjem kojeg su proveli *Lee i suradnici* u kojem je također uočeno zadržavanje čestica fluorescentnog PS-a veličine čestica 0,50 μm na korionu zebrica i zaključeno je da im je PS na taj način onemogućio normalno daljnje razvijanje.¹⁰² Nekoliko istraživanja koja su sumirali *Bhagat i suradnici* dokazuju da se MP-a i NP-a može kod embrija zebrica izazvati morfološke promjene, smanjenje broja otkucaja srca, te se može nakupljati u tijelu embrija.¹⁰³

U tablici 16 prikazani su rezultati pokusa P3-2 u kojem su se embrija zebrica izlagali PS-u veličine čestica 0,25 μm . Kao i u pokusu P3-1, nisu primijećeni značajni utjecaji prilikom izlaganja embrija koncentracijama PS-a u rasponu 0,0001 – 0,1 g/L tijekom 96 h. Pri koncentraciji od 1 g/L uočena je zaostanak 25 % embrija u korionu, što je prikazano na slici 61 c), uz 100 %-tno preživljavanje embrija (Slika 61 a)). Izlaganje embrija koncentraciji PS-a od 2 g/L rezultiralo je zaostankom 25 % embrija u korionu uz smrtnost jednog embrija. Kod nekih je uočena napuhnuta, deformirana i siva žumanjčana vrećica (Slika 61 g) i h)) što može biti posljedica nakupljanja PS-a u ili na njoj jer je inače žučkaste boje¹⁰⁴. U nekoliko istraživanja je dokazano da se čestice PS-a (i drugih ksenobiotika) najčešće skupljaju u jetri, žumanjčanoj vrećici i općenito gastrointestinalnom traktu zebrica.^{105,106,107} Istraživanje koje su proveli *Pitt i suradnici* zabilježili su i adsorbiranje čestica PS-a većih od 0,05 μm na epidermu i gastrointestinalni trakt što također objašnjava promjenu boje žumanjčane vrećice.^{107,108} Zaostanak 42 % embrija u korionu uz 100%-tno preživljavanje, primijećeno je tijekom izloženosti embrija PS-u od 3 g/L, te je ponovno kod nekih embrija uočena siva, napuhnuta i razdvojena žumanjčana vrećica (Slika 61 d)). Nisko preživljavanje (17 %) embrija nakon otvaranja koriona, kao i zaostanak gotovo svih embrija u korionu uočen je za koncentraciju od 5 g/L.

Nadalje, uočen je i zaostanak embrija u razvoju, to jest, kraća duljina tijela u odnosu na kontrolu te crvenilo oko srca i edem u području žumanjčane vrećice (Slika 61 k) i l)). Slične posljedice izazvala je i koncentracija od 6 g/L za koju se odokativno mogla procijeniti visoka smrtnost embrija, (Slika 61 lj)), uz zaostanak 67 % embrija u korionu (Slika 61 b)). Nakon promatranja embrija pod lupom ustanovljeno je 17 %-tno preživljavanje, s time da je jedan bio izvan koriona, dok je za drugog trebalo otvoriti korion. Živi embriji su imali očigledne posljedice utjecaja PS-a. Uočeno je razdvojena i siva žumanjčana vrećica (Slika 61 f)) te napuhnutoast tijela, zaostanak u razvoju s obzirom na dužinu tijela i manjak pigmentacije (Slika 61 i)). Izlaganje embrija 7 g/L PS-a, uzrokovalo je 100%-tni zaostanak embrija u korionu, uz jednog preživjelog embrija za kojeg su se mogle odokativno primijetiti brojne značajne morfološke promjene (Slika 61 j)). Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji PS-a, 9 g/L, zabilježena je 100 %-tna smrtnost izloženih embrija. Svi su zaostali u korionu, a nakon otvaranja koriona nisu pronađeni nikakvi znaci života (Slika 61 e)).

Lee i suradnici ispitali su i utjecaj fluorescentnog PS-a veličine čestica 0,20 μm te utvrdili da i ova veličina čestica ima tendenciju zadržavanja na korionu embrija zebrica što je u skladu i s rezultatima dobivenim u pokusu P3-2.¹⁰²

U tablici 17 dani su rezultati pokusa P3-3 u kojem su se embriji zebrica izlagali PS-u veličine čestica 0,12 μm . Živi i pokretni embriji primijećeni su pri najnižim ispitivanim koncentracijama PS-a od 0,0001 do 0,1 g/L. Izlaganjem embrija koncentraciji PS-a od 0,1 g/L, 8 % embrija je zaostalo u korionu nakon 96 h izlaganja, a nakon rastvaranja koriona embriji je bio živ i pokretan. Izlaganje embrija koncentraciji od 1 g/L rezultiralo je zaostankom jednog cijelog embrija u korionu (Slika 62 b)) te zaostankom glave jednog embrija u korionu (Slika 62 a)). U tom pokusu svi su embriji bili živi i pokretni, uključujući i one oslobođene iz koriona. U pokusu izlaganja embrija koncentraciji PS-a 2 g/L, 42 % embrija je bilo živo i pokretno, a 58 % ih je zaostalo u korionu (Slika 62 c)). Nakon rastvaranja koriona preživjelih je bilo 43 % (3 od 7). Promatranjem jednog embrija (prikazanog na slici 62 n)) primijećena je tamna i malo napuhnuta žumanjčana vrećica, dok su druga dva, vidljiva na slici 62 lj) i p), imali napuhnuto i nerazvijeno tijelo te slabe otkucaje srca. Kod embrija koji su bili izvan koriona primijećena je razdvojena i napuhnuta žumanjčana vrećica te srčani edem (Slika 62 f) i m)). Od 12 embrija izloženih koncentraciji od 3 g/L, 7 ih je bilo živih i pokretnih, uz 42 %-tnu smrtnost (Slika 62 j)). Pri ovoj koncentraciji PS-a, primijećeno je nakupljanje PS-a na embrijima u korionu, ali i na onim izlegnutima (Slika 62 l)), kao i razdvojena žumanjčana vrećica kod nekih embrija (Slika 62 h)). 100%-tni zaostanak u korionu, uočen je za koncentraciju PS-a od 5 g/L.

Nakon otvaranja koriona, preživljavanje je iznosilo 42 %, a embriji su imali napuhnuto i sivkasto tijelo uz nakupinu tekućine (srčani edem) i crvenilo oko srca, kao što je prikazano na slici 62 k). Prilikom izlaganja embrija koncentraciji PS-a od 6 g/L, također je zabilježen 100%-tni zaostanak u korionu, a nakon otvaranja koriona i 100 %-tna smrtnost embrija (Slika 62 g) i i)). 92 % embrija je zaostalo u korionu prilikom izlaganja PS-u 7 g/L (Slika 62 d)). Na slici 62 e) prikazan je embrij koji je bio izvan koriona. Vidljiva je razdvojena, sivkasta i deformirana žumanjčana vrećica te edem u području srca i žumanjčane vrećice. Nakon rastvaranja koriona kod ostalih 11 embrija, samo je jedan preživio uz slične posljedice kao i ovaj izvan koriona. Na slici 62 nj) prikazan je jedan od mrtvih embrija nakon rastvaranja koriona. Koncentracija od 9 g/L izazvala je 100%-tnu smrtnost embrija. Svi su bili u korionu, a nakon oslobađanja svi su bili sitnog izgleda, smežurani i gotovo bez pigmentacije te je uočena nakupina čestica PS-a na njima (Slika 62 o)).

Usporedbom podataka u tablicama 15, 16 i 17 može se zaključiti da su u provedenom istraživanju koncentracije od 2; 5 i 7 g/L prouzročile najveće posljedice za embrije zebrića, međutim, te koncentracije se neće komentirati u daljnjem tekstu s obzirom na već spomenutu upitnost valjanosti tih pokusa zbog uočenih sličnih abnormalnosti i kod kontrolne skupine.

Izlaganjem embrija koncentracijama 0,0001; 0,001 i 0,01 g/L bez obzira na veličinu čestica nisu zabilježeni nikakvi štetni utjecaji. Prvi zabilježeni utjecaj dogodio se u pokusu izlaganja embrija PS-u veličine čestica 0,12 μm i koncentraciji 0,1 g/L gdje je jedan embrij zaostao u korionu. U pokusima izlaganja embrija istoj koncentraciji čestica, ali većim veličinama nije zabilježen niti jedan štetni utjecaj na embrije. Prva smrt embrija zabilježena je prilikom izlaganja koncentraciji od 3 g/L i veličini čestica 0,12 μm . U tom pokusu zabilježena su čak 4 mrtva embrija dok veće veličine čestica u istoj koncentraciji nisu izazvale smrt niti jednog embrija. Izlaganjem embrija veličini čestica 0,43 μm , prvu smrt prouzročila je koncentracija od 6 g/L. U tom pokusu 8 embrija je umrlo dok su ostalih 4 izgledali poprilično loše što upućuje na to da bi prvu smrt ova veličina čestica prouzročila pri koncentraciji između 3 i 6 g/L. Veličina čestica 0,25 μm imala je slični utjecaj. Prva zabilježena smrt bila je u pokusu izlaganja embrija koncentraciji od 6 g/L gdje je 10 od 12 embrija bilo mrtvo nakon izlaganja. Najmanja veličina čestica (0,12 μm) uzrokovala je smrt svih 12 embrija prilikom izlaganja koncentraciji od 6 g/L. Koncentracija 9 g/L uzrokovala je smrt svih embrija u svim pokusima.

Usporedbom dobivenih rezultata može se zaključiti da se smanjenjem veličine čestica i povećanjem koncentracije čestica PS-a, povećava štetan utjecaj na embrije zebrića *Danio rerio*, što je i u skladu s literaturom odnosno dosadašnjim istraživanjima.^{83,102,103,105,108,109}

6. Zaključak

Problem onečišćenja okoliša plastikom postoji od davnina, ali u posljednje vrijeme sve više pažnje pridaje se mikroplastici. Mikroplastika naizgled ne stvara probleme u okolišu jer nije uočljiva te se zato do sada i provlačila kroz sve sastavnice okoliša neopaženo. Iako ne stvara estetski problem, njezina štetna svojstva stvaraju veliku prijetnju živim bićima, posebice onima u vodenim ekosustavima. Brojna istraživanja su to već dokazala, a ovo istraživanje je to i potvrdilo.

Cilj istraživanja bio je odrediti ekotoksičnost mikroplastike primjenom bakterije *Pseudomonas putida* (pokus P1), slatkovodne alge *Chlorella* sp. (pokus P2) i embrija zebrića *Danio rerio* (pokus P3). Provedbom svih pokusa i usporedbom dobivenih rezultata može se zaključiti da toksičan utjecaj mikroplastike na ispitivane organizme postoji, ali ovisi o vrsti, veličini i koncentraciji čestica kao i o vrsti testnog organizma.

U pokus P1 najveću inhibiciju rasta *P. putide* (13,77 %) prouzročio je PS veličine čestica 500 – 1000 μm i koncentracije 1000 mg/L. U pokusu P2 najveća inhibicija rasta (5,01 %) zabilježena je pri izlaganju mikroalge PS-u veličine čestica $>1000 \mu\text{m}$ i koncentracije 100 mg/L. Usporedbom utjecaja najmanjih koncentracija čestica (50 mg/L u P1 i 10 mg/L u P2) i različitih veličina čestica, najveću inhibiciju rasta izazvala je najmanja veličina čestica od 300 – 500 μm . U tom slučaju PET je izazvao inhibiciju rasta *P. putide* od 4,88 %, a pratio ga je PP sa 4,66 %, dok je najveću inhibiciju rasta *Chlorella* sp. prouzročio PE sa 2,46 %. U pokusu P3 praćena je smrtnost i druge promjene na embrijima zebrića tijekom izlaganja PS-u. Najveći štetni utjecaj zabilježen je prilikom izlaganja embrija najmanjoj veličini čestica (0,12 μm), a utjecaj se povećavao s povećanjem koncentracije. Ova veličina čestica prouzročila je prvi vidljivi utjecaj na embrije pri izlaganju koncentraciji 0,1 g/L kao i prvu 100 %-tnu smrtnost embrija pri izlaganju koncentraciji 6 g/L.

Može se zaključiti da se povećanjem koncentracije i smanjenjem veličine čestica povećava ekotoksičnost MP-a te da nisu svi organizmi jednako osjetljivi na sve vrste MP-a. U ovome istraživanju ispostavilo se da je PS najveće veličine čestica i najveće koncentracije imao najštetniji učinak i na *P. putidu* i na *Chlorella* sp. dok su pri manjim koncentracijama veći utjecaj imali PET i PP na bakteriju, a PE na mikroalgu. U pokusu P3 ispitivao se samo utjecaj PS-a pa se utjecaj vrste MP-a ne može komentirati.

Međutim, ovo područje je još uvijek nedovoljno istraženo i potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdio precizniji utjecaj mikroplastike na žive organizme pa tako i čovjeka.

7. Zahvala

Prije svega, zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić što me primila pod svoje mentorstvo i omogućila mi izradu rada za Rektorovu nagradu pod njezinim stručnim vodstvom te se zahvaljujem na svojoj podršci, strpljenju, savjetima, uloženom trudu i vremenu.

Zahvaljujem se asistentici Martini Miloloži koja je također uložila puno truda, strpljenja i vremena te mi pružila veliku pomoć prilikom izrade rada.

Zahvaljujem se i komentoru dr. sc. Tvrtku Smitalu, voditelju Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Zavoda za istraživanje mora i okoliša na Institutu "Ruđer Bošković" u Zagrebu, poslijedoktorandici Jeleni Dragojević kao i njihovom cijelom stručnom timu koji su mi također pomogli pri izradi rada.

Zahvaljujem se i tehničarki Marijani Vidaković na svim savjetima i pozitivnoj energiji kojima je olakšala izradu ovog rada.

Za kraj, veliko hvala mojoj obitelji, dečku Igoru i prijateljicama, posebno Kristini i Mateji, koji su mi bili velika podrška prilikom cjelokupnog dosadašnjeg studiranja.

Hvala svima od srca, a ponajviše hvala što ste vjerovali u mene!

8. Literatura

1. 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.
2. Wang, W., Gao, H., Jin, S., Li, R., Na, G., The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173 (2019) 110–117.
3. Shim, W. J., Hong, S. H., Eo, S., Marine Microplastics: Abundance, Distribution, and Composition, *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*, 2018., str. 1–26.
4. Walpitagama, M., Carve, M., Douek, A. M., Trestrail, C., Bai, Y., Kaslin, J., Wlodkovic, D., Additives migrating from 3D-printed plastic induce developmental toxicity and neuro-behavioural alterations in early life zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology*, 213 (2019) 105227.
5. Dusinska, M., Rundén-Pran, E., Schnekenburger, J., Kanno, J. Toxicity Tests: In Vitro and In Vivo, *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*, 2017., 51–82.
6. Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Iqbal, M., *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of The Total Environment*, 626 (2018) 1295–1309.
7. 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.
8. Lee, B. Y., Choi, B. S., Kim, M. S., Park, J. C., Jeong, C. B., Han, J., Lee, J. S., The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*: A potential use for freshwater molecular ecotoxicology, *Aquatic Toxicology*, 210 (2019) 69–84.
9. Nishimura, Y., Inoue, A., Sasagawa, S., Koiwa, J., Kawaguchi, K., Kawase, R., Maruyama, T., Kim, S., Tanaka, T., Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing, *Congenital Anomalies*, 56 (2016) 18–27.
10. Li, M., Yang, Y., Xie, J., Xu, G., Yu, Y., In-vivo and in-vitro tests to assess toxic mechanisms of nano ZnO to earthworms, *Science of The Total Environment*, 687 (2019) 71–76.
11. 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.
12. <https://www.hzn.hr/default.aspx?id=165> (pristup 15.3.2020.)

13. International-Standard (ISO 10712), Water quality — *Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test), 1995.
14. OECD, Guideline for Testing of Chemicals, 201. Alga, Growth Inhibition Test, 1984.
15. OECD, Guideline for Testing of Chemicals, 179. Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II, Series on Testing and Assessment, 2012.
16. Crawford, C. B., Quinn, B., Microplastics, standardisation and spatial distribution i The interactions of microplastics and chemical pollutants, u: Microplastic Pollutants, Amsterdam, 2017., str. 101–130, 131–157.
17. 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.
18. Silva, A. B., Costa, M. F., Duarte, A. C., Biotechnology advances for dealing with environmental pollution by micro(nano)plastics: Lessons on theory and practices, *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1 (2018) 30–35.
19. Waldschläger, K., Lechthaler, S., Stauch, G., Schüttrumpf, H., The wayof microplastic through the environment – Application of the source-pathway-receptor model (review), *Science of the Total Environment*, 713 (2020) 136584.
20. Guo, X., Wang, J., The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review, *Marine Pollution Bulletin*, 142 (2019) 1–14.
21. 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.
22. 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.
23. Rodríguez-Seijo, A., Pereira, R., Morphological and Physical Characterization of Microplastics, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 75 (2017) 49–66.
24. 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.
25. Li, H. X., Getzinger, G. J., Ferguson, P. L., Orihuela, B., Zhu, M., Rittschof, D., Effects of toxic leachate from commercial plastics on larval survival and settlement of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*, *Environmental Science & Technology*, 50 (2016) 924–931.
26. 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.

27. Barletta, M., Lima, A. R. A., Costa, M. F., Distribution, sources and consequences of nutrients, persistent organic pollutants, metals and microplastics in South American estuaries, *Science of The Total Environment*, 651 (2019) 1199–1218.
28. Li, J., Zhang, K., Zhang, H., Adsorption of antibiotics on microplastics, *Environmental Pollution*, 237 (2018) 460–467.
29. Chang, S., Zhou, X., Xing, Z., Tu, T. Probing polarity of flame retardants and correlating with interaction between flame retardants and PET fiber, *Journal of Colloid and Interface Science*, 498 (2017) 343–350.
30. Rochman, C. M., Hentschel, B. T., Teh, S. J., Long-Term Sorption of Metals Is Similar among Plastic Types: Implications for Plastic Debris in Aquatic Environments, *PLoS ONE*, 9 (2014) e85433, 1–9.
31. Guo, X., Chen, C., Wang, J., Sorption of sulfamethoxazole onto six types of microplastics, *Chemosphere*, 228 (2019) 300–308.
32. Rogić, A., Čatić, I., Godec, D., *Polimeri i polimerne tvorevine*, Zagreb, 2008.
33. Wypych, G., *Handbook of Polymers*, 2016., str 349–354, 398–403, 497–504, 560–566, 618–624.
34. Satterthwaite, K., *Plastics Based on Styrene*, u: Gilbert, M., Brydson's *Plastics Materials*, 2017., str. 61–62, 311–328.
35. Paxton, N. C., Allenby, M. C., Lewis, P. M., Woodruff, M. A., Biomedical applications of polyethylene, *European Polymer Journal*, 118 (2019) 412–428.
36. Kissin, Y. V., *Crystallinity Degree and Density of Polyethylene Resins*, *Polyethylene*, 2012., str. 73–81.
37. *Tehnička enciklopedija*, svezak 10, Leksikografski zavod M. Krleža, Zagreb, 1986.
38. Maier, C., Calafut, T., *Introduction; Morphology and Commercial Forms*; u *Polypropylene*, 1998., str. 1–9, 11–25.
39. Akovali, G., *Plastic materials: polyvinyl chloride (PVC)*, u: Pacheco-Torgal, F., Jalali, S., Fucic, A., *Toxicity of Building Materials*, Turska, 2012., str. 23–53.
40. Sastri, V. R., *Commodity Thermoplastics*, u: Sastri, V. R., *Plastics in Medical Devices*, 2010., str. 73–119.
41. McKeen, L. W., *Plastics Used in Medical Devices*, u: Modjarrad, K., Ebnesajjad, S., *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*, 2014., str. 21–53.
42. 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.

43. Rorrer, N. A., Nicholson, S., Carpenter, A., Bidy, M. J., Grundl, N. J., Beckham, G. T., Combining Reclaimed PET with Bio-based Monomers Enables Plastics Upcycling, *Joule*, 3 (2019) 1006–1027.
44. Laskar, N., Kumar, U., Plastics and microplastics: A threat to environment, *Environmental Technology & Innovation*, 14 (2019) 100352.
45. He, P., Chen, L., Shao, L., Zhang, H., Lü, F., Municipal solid waste (MSW) landfill: A source of microplastics? -Evidence of microplastics in landfill leachate, *Water Research*, 159 (2019) 38–45.
46. Hui, M., Shengyan, P., Shibin, L., Yingchen, B., Mandal, S., Baoshan, X., Microplastics in aquatic environments: Toxicity to trigger ecological consequences, *Environmental Pollution*, 261 (2020) 114089.
47. Godoy, V., Martín-Lara, M. A., Calero, M., Blázquez, G., Physical-chemical characterization of microplastics present in some exfoliating products from Spain, *Marine Pollution Bulletin*, 139 (2019) 91–99.
48. Rezania, S., Park, J., Md Din, M. F., Mat Taib, S., Talaiekhosani, A., Kumar Yadav, K., Kamyab, H., Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies, *Marine Pollution Bulletin*, 133 (2018) 191–208.
49. Yu, Q., Hu, X., Yang, B., Zhang, G., Wang, J., Ling W., Distribution, abundance and risks of microplastics in the environment, *Chemosphere*, 249 (2020) 126059.
50. Amaral-Zettler, L., Plastics: Colonization and Degradation, Reference Module in Life Sciences, (2019) 639–644.
51. Carbery, M., O'Connor, W., Palanisami, T., Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health, *Environment International*, 115 (2018) 400–409.
52. Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T., Environmental exposure to microplastics: an overview on possible human health effects, *Science of The Total Environment*, 702 (2019) 134455.
53. Pope, C. N., Schlenk, D., Baud, F. J., History and basic concepts of toxicology; Belden, J., Introduction to ecotoxicology; Scott, J., Minghetti, M., Toxicity testing: in vitro models in ecotoxicology, u: Pope, C. N., Liu, J., An Introduction to Interdisciplinary Toxicology, 2020., str. 3–15, 381–393, 477–486.
54. International-Standard (ISO 11348), Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test), 2007.

55. International-Standard (ISO 19040-1), Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water — Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*), 2018.
56. OECD, Guideline for Testing of Chemicals, Terrestrial Plant Test, 208. Seedling Emergence and Seedling Growth Test, 2003.
57. International-Standard (ISO 21115), Water quality — determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1), 2019.
58. Singh, S., Khanna, V. K., Pant, A. B., Development of In Vitro Toxicology, In Vitro Toxicology, 2018., str. 1–19.
59. Fahd, F., Khan, F., Veitch, B., Yang, M., Aquatic ecotoxicological models and their applicability in Arctic regions, Marine Pollution Bulletin, 120 (2017) 428–437.
60. McCarty, L. S., Borgert, C. J., Posthuma, L., The regulatory challenge of chemicals in the environment: Toxicity testing, risk assessment, and decision-making models, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 99 (2018) 289–295.
61. 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.
62. Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C., Predictive Ecotoxicology and Environmental Assessment. Aquatic Ecotoxicology, (2015) 463–496.
63. Keshavarz-Tohid, V., Vacheron, J., Dubost, A., Prigent-Combaret, C., Taheri, P., Tarighi, S., Taghavi, S. M., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas allopūtida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov., Systematic and Applied Microbiology, 42 (2019) 468–480.
64. Jayabalan, J., Mani, G., Krishnan, N., Pernabas, J., Devadoss, J. M., Jang, H. T., Green biogenic synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Pseudomonas putida* culture and its In vitro antibacterial and anti-biofilm activity, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 21 (2019) 101327.
65. Hafner, C., *Pseudomonas putida* Growth Inhibition Test, u: Moser, H., Römbke, J., Ecotoxicological Characterization of Waste, Njemačka, 2009., str. 153–159.
66. Berra, M., Ippolito, N. M., Mangialardi, T., Paolini, A. E., Piga, L., Leaching test procedure for assessing the compliance of the chemical and environmental requirements of hardened woody biomass fly ash cement mixtures, Waste Management, 90 (2019) 10–16.

67. Harwood, C. S., Fosnaugh, K., Dispensa, M., Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior, *Journal of Bacteriology*, 171 (1989) 4063–4066.
68. Thiagarajan, V., Iswarya, V. P. A. J., Seenivasan, R., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., Influence of differently functionalized polystyrene microplastics on the toxic effects of P25 TiO₂ NPs towards marine algae *Chlorella* sp., *Aquatic Toxicology*, 207 (2019) 208–216.
69. 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.
70. Ponnuswamy, I., Madhavan, S., Shabudeen, S. P. S., Isolation and Characterization green microalgae for Carbon Sequestration Waste water treatment and bio-fuel production, *International Journal of Bioscience and Biotechnology*, 5 (2013) 17–26.
71. 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.
72. Harmon, S. M., The Effects of Microplastic Pollution on Aquatic Organisms, u: Zeng, E. Y., *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*, 2018., str. 249–270.
73. Daliry, S., Hallajani, A., Roshandeh, J. M., Nouri, H., Golzary, A., Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth, *Global Journal of Environmental Science and Management*, 3 (2017) 217–230.
74. Roberts, K. P., Anaerobic digestion of marine microalgae, 2015., str. 34.
75. Braunbeck, T., Lammer, E., Fish embryo toxicity assays, *Njemačka*, 2015., str. 1–27.
76. Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G., Martins, R. N., Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction, *Journal of Visualized Experiments*, 69 (2012) 4196.
77. Halili, J. F. A., Quilang, J. P., The zebrafish embryo toxicity and teratogenicity assay, *The Philippine BIOTA*, 44 (2011) 63–71.
78. *Mikrobiologija*, Interna skripta, Zavod za industrijsku ekologiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, str. 2.
79. Rochard, L. J., Ling, I. T. C., Kong, Y., Liao, E. C., Visualization of Chondrocyte Intercalation and Directional Proliferation via Zebrafish Clonal Cell Analysis in the Embryonic Meckel's Cartilage, *Journal of Visualized Experiments*, 104 (2015).

80. Chia, M. A., Ana T. Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media, *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 85 (2013) 1427–1438.
81. 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.
82. Dhillon, S. S., Torell, F., Donten, M., Lundstedt-Enkel, K., Bennett, K., Rännar, S., Trygg, J., Lundstedt, T., Metabolic profiling of zebrafish embryo development from blastula period to early larval stages, *PLoS ONE*, 14 (2019) 1–13.
83. Pelka, K. E., Henn, K., Keck, A., Sapel, B., Braunbeck, T., Size does matter – Determination of the critical molecular size for the uptake of chemicals across the chorion of zebrafish (*Danio rerio*) embryos, *Aquatic Toxicology*, 185 (2017) 1–10.
84. 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, *Environment International*, 102 (2017) 165–176.
85. Singh, G., Singh, A. K., Bhatt, K., Biodegradation of polyethylene by bacteria isolated from soil, *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*, 5 (2016) 2056–2062.
86. Asmita, K., Shubhamsingh, T., Tejashree, S., Isolation of plastic degrading microorganisms from soil samples collected at various locations in Mumbai, India. *Current World Environment*, 4 (2015) 77–85.
87. Caruso, G., Plastic degrading microorganisms as a tool for bioremediation of plastic contamination in aquatic environment, *Pollution Effects and Control*, 3 (2015) e112.
88. Ward, P. G., Goff, M., Donner, M., Kaminsky, W., O'Connor, K. E., A Two Step Chemo-biotechnological Conversion of Polystyrene to a Biodegradable Thermoplastic, *Environmental Science & Technology*, 40 (2006) 2433–2437.
89. Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N., Fava, F., Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*, *New Biotechnology*, 52 (2019) 35–41.
90. Verce, M. F., Ulrich, R. L., Freedman, D. L., Characterization of an Isolate That Uses Vinyl Chloride as a Growth Substrate under Aerobic Conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2000) 3535–3542.
91. Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., Biological degradation of plastics: A comprehensive review, *Biotechnology Advances*, 26 (2008) 246–265.

92. 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.
93. 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.
94. Sarmah, P., Rout, J., Role of algae and cyanobacteria in bioremediation: prospects in polyethylene biodegradation, u: Singh, P., Kumar, A., Singh, V. K., Shrivistava, A., *Advances in Cyanobacterial Biology*, Indija, 2020., str. 333–349.
95. Deviram, G., Mathimani, T., Anto, S., Ahamed, T. S., Ananth, D. A., Pugazhendhi, A. Applications of microalgal and cyanobacterial biomass on a way to safe, cleaner and a sustainable environment, *Journal of Cleaner Production*, 253 (2020) 119770.
96. 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) 400–405.
97. 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) 134–152.
98. Li, Z., Yi, X., Zhou, H., Chi, T., Li, W., Yang, K., Combined effect of polystyrene microplastics and dibutyl phthalate on the microalgae *Chlorella pyrenoidosa*, *Environmental Pollution*, 257 (2019) 113604.
99. Fu, D., Zhang, Q., Fan, Z., Qi, H., Wang, Z., Peng, L., Aged microplastics Polyvinyl chloride interact with copper and cause oxidative stress towards microalgae *Chlorella vulgaris*, *Aquatic Toxicology*, 216 (2019) 105319.
100. 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.
101. Wu, Y., Guo, P., Zhang, X., Zhang, Y., Xie, S., & Deng, Effect of microplastics exposure on the photosynthesis system of freshwater algae, *Journal of Hazardous Materials*, 374 (2019) 219–227.

102. Lee, W. S., Cho, H.-J., Kim, E., Huh, Y. H., Kim, H.-J., Kim, B., Kang, T., Lee, J.-S., Jeong, J., Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos, *Nanoscale*, 11 (2019) 3173–3185.
103. Bhagat, J., Zang, L., Nishimura, N., Shimada, Y., Zebrafish: An emerging model to study microplastic and nanoplastic toxicity, *Science of The Total Environment*, 728 (2020) 138707.
104. Higaki, S., Kawakami, Y., Eto, Y., Yamaha, E., Nagano, M., Katagiri, S., Takada, T., Takahashi, Y., Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions, *Cryobiology*, 67 (2013) 374–382.
105. Van Pomeran, M., Brun, N. R., Peijnenburg, W. J. G. M., Vijver, M. G., Exploring uptake and biodistribution of polystyrene (nano)particles in zebrafish embryos at different developmental stages, *Aquatic Toxicology*, 190 (2017) 40–45.
106. Seok, S.-H., Baek, M.-W., Lee, H.-Y., Kim, D.-J., Na, Y.-R., Noh, K.-J. Park, J.-H., In vivo alternative testing with zebrafish in ecotoxicology, *Journal of Veterinary Science*, 9 (2008) 351–357.
107. Brun, N. R., van Hage, P., Hunting, E. R., Haramis, A.-P. G., Vink, S. C., Vijver, M. G., Schaaf, M. J.-M., Tudorache, C., Polystyrene nanoplastics disrupt glucose metabolism and cortisol levels with a possible link to behavioural changes in larval zebrafish, *Communications Biology*, 2 (2019) 382.
108. Pitt, J. A., Kozal, J. S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Trevisan, R., Geitner, N., Wiesner, M., D Levin, E., Di Giulio, R. T., Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology*, 194 (2018) 185–194.
109. Qiang, L., Cheng, J., Exposure to microplastics decreases swimming competence in larval zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 176 (2019) 226–233.

Sažetak

Autor: Kristina Bule

Ekotoksikološki učinci mikroplastike na okolišne organizme

Globalno povećanje proizvodnje i odlaganje plastike u okoliš rezultiralo je ogromnim količinama plastike i mikroplastike u svim sastavnicama okoliša što predstavlja opasnost za sadašnje i buduće generacije.

U ovome radu provela su se ekotoksikološka ispitivanja utjecaja mikroplastike (MP) na tri okolišna organizma s ciljem utvrđivanja štetnosti MP-a na iste. Bakterija *Pseudomonas putida* (*P. putida*) i slatkovodna alga *Chlorella* sp. izlagali su se različitim koncentracijama i veličinama mikroplastičnih čestica polietilena (PE), polipropilena (PP), polistirena (PS), poli(vinil-klorida) (PVC) i poli(etilen-tereftalata) (PET), a embriji zebrica *Danio rerio* izlagali su se trima različitim veličinama mikročestica PS-a.

P. putida izlagala se veličinama čestica 300 – 500 i 500 – 1000 μm i koncentracijama 50; 100; 250; 500 i 1000 mg/L, a *Chlorella* sp. veličinama čestica 300 – 500 μm i koncentracijama 10; 500 i 1000 mg/L te veličinama čestica 500 – 1000 i >1000 μm i koncentracijama 10; 25; 50 i 100 mg/L. Najveću inhibiciju rasta *P. putide* (13,77 %) i *Chlorella* sp. (5,01 %) izazvao je PS veličine čestica 500 – 1000 μm i koncentracije 1000 mg/L odnosno veličine čestica >1000 μm i koncentracije 100 mg/L. Uspoređujući rezultate najmanje ispitivane koncentracije čestica (najbliže stvarnim koncentracijama MP-a u okolišu) i različitih veličina čestica, najveću inhibiciju rasta kod oba organizma prouzročila je najmanja veličina čestica 300 – 500 μm . Embriji zebrica izlagali su se veličinama PS-a 0,43; 0,25 i 0,12 μm i koncentracijama između 0,0001 i 10 g/L. Prvi učinak na embrije izazvala je veličina čestica 0,12 μm i koncentracija od 0,1 g/L. Ova veličina čestica uzrokovala je i prvu 100 %-tnu smrtnost embrija pri koncentraciji 6 g/L.

Prema dobivenim rezultatima zaključeno je da toksičan utjecaj na ispitivane organizme ovisi o veličini, koncentraciji i vrsti MP-a.

Ključne riječi: Mikroplastika; Ekotoksičnost; *Pseudomonas putida*; *Chlorella* sp.; *Danio rerio*

Abstract

Author: Kristina Bule

Ecotoxicological effects of microplastics on environmental organisms

The global increase in plastic production and disposal in the environment has resulted in vast amounts of plastics and microplastics in all components of the environment, which possess a danger to present and future generations.

In this paper, the ecotoxicological research of the impact of microplastics (MP) on three environmental organisms was conducted in order to determine the harmful effect of MP on them. The bacterium *Pseudomonas putida* (*P. putida*) and the freshwater algae *Chlorella* sp. were exposed to different concentrations and sizes of microplastic particles of polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS), poly(vinyl-chloride) (PVC) and poly(ethylene-terephthalate) (PET). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos were exposed to three different PS microparticle sizes.

P. putida was exposed to particle sizes of 300 – 500 and 500 – 1000 μm and concentrations of 50; 100; 250; 500 and 1000 mg/L. *Chlorella* sp. was exposed to particle sizes 300 – 500 μm , 500 – 1000 μm and >1000 μm at concentrations of 10; 500 and 1000 mg/L, and 10, 25; 50 and 100 mg/L, respectively. The greatest inhibition of growth of *P. putida* (13.77 %) and *Chlorella* sp. (5.01 %) was obtained at PS particle sizes of 500 – 1000 μm and >1000 μm at concentrations of 1000 mg/L and 100 mg/L, respectively. Comparing the results of the lowest tested particle concentration (closest to the actual concentrations of MP in the environment) and different particle sizes, the greatest growth inhibition in both organisms was caused by the smallest particle size of 300 – 500 μm . Zebrafish embryos were exposed to PS sizes of 0.43, 0.25 and 0.12 μm and concentrations between 0.0001 and 10 g/L. The first effect on embryos was caused by particle size of 0.12 μm and a concentration of 0.1 g/L. This particle size also caused the first 100 % mortality of the embryos at a concentration of 6 g/L.

According to the obtained results, it was concluded that the toxic effect on the tested organisms depends on the size, concentration and type of MP.

Key words: Microplastic; Ecotoxicity; *Pseudomonas putida*; *Chlorella* sp.; *Danio rerio*

Životopis

Kristina Bule rođena je u Zagrebu, 20. rujna 1995. godine. Pohađala je osnovnu školu „OŠ Vukomerec“ i srednju školu „X. gimnazija Ivan Supek“, u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu završila je sa odličnim uspjehom. Nakon završetka srednje škole, 2014. godine, upisala se na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, na preddiplomski studij Ekoinženjerstvo. Završni rad radila je u Zavodu za analitičku kemiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Danijele Ašperger, a stručnu praksu odradila je u tvrtki „JANAF“ (Jadranski naftovod d.o.o.) u Zagrebu u odjelu „Sigurnost i zaštita okoliša“. Po završetku preddiplomskog studija, 2018. godine upisala je diplomski studij Ekoinženjerstvo na istoimenom Fakultetu.