

Gimnazija in srednja šola Rudolfa Maistra Kamnik

Novi trg 41a, 1241 Kamnik

VPLIV MIKROPLASTIKE IZ POKAJENIH IN NEPOKAJENIH FILTROV NAVADNIH IN ELEKTRONSKIH CIGARET NA VODNE NEVRETEČARJE

Raziskovalna naloga



AVTORJA:

Neža Novak
Tristan Vid Baš

MENTORJA:

Cirila Jeras, prof. biologije
asist. Andraž Dolar, prof. biologije

Kamnik, marec 2023

ZAHVALA

Za pomoč pri izdelavi raziskovalne naloge in vodenju skozi proces raziskovanja se najprej zahvaljujeva najinima mentorjema Cirili Jeras in Andražu Dolarju. Velika zahvala gre izr. prof. dr. Aniti Jemec Kokalj z Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, ki nama je s strokovnimi nasveti pomagala pri izvedbi eksperimentov. Zahvaljujeva se tudi Tatjani Zorman, prof. slov. za lektoriranje naloge in Tini Petrišič za pomoč v laboratoriju. Zahvalila bi se še sošolki Živi Drnovšek, ki nama je pomagala pri prevodu povzetka in vsem prijateljem, ki so nama ob izdelavi naloge stali ob strani.

POVZETEK

V raziskavi smo z akutnimi testi preučevali vpliv mikroplastike (MP) iz pokajenih in nepokajenih cigaretneih filtrov navadnih in elektronskih cigaret na vodne bolhe (*Daphnia magna*) in kotačnike (*Brachionus calyciflorus*). Organizme smo izpostavili različnim koncentracijam MP (1, 10 in 100 mg/L) in po 24, 48, 72 ter 96 urah testa preverili njihovo preživetje. Rezultati so pokazali, da se preživetje poskusnih organizmov zmanjšuje z izpostavitvijo naraščajoči koncentraciji MP. V primeru izpostavitve MP iz pokajenih cigaretneih filtrov je preživeloto izrazito manj vodnih bolh in kotačnikov kot v primeru MP iz nepokajenih cigaretneih filtrov. Domnevamo, da k temu prispevajo tudi kemikalije, ki se izlužujejo iz MP pokajenih cigaretneih filtrov. To smo potrdili s testom, v katerem smo v medij za vodne bolhe dodali izlužke, ki smo jih pridobili iz MP nepokajenih in pokajenih filtrov navadnih cigaret ter iz MP pokajenih filtrov elektronskih cigaret. Rezultati so pokazali manjši odstotek preživetja vodnih bolh, izpostavljenih izlužkom iz MP pokajenih cigaretneih filtrov. Poleg mladih vodnih bolh smo mikroplastiki izpostavili tudi odrasle vodne bolhe. Z analizo aktivnosti encima acetilholinesteraze smo posredno pokazali vpliv nikotina na odrasle vodne bolhe, ki smo jih izpostavili MP iz pokajenih cigaretneih filtrov. Encim acetilholinesteraza je odgovoren za razgradnjo nevrotransmitorja acetilholina, ki se veže na nikotinske receptorje, na te pa se lahko prav tako veže nikotin, ki je prisoten v cigaretah. Predpostavljam, da je povečana koncentracija nikotina v mediju za vodne bolhe izzvala povečano sintezo in aktivnost encima acetilholinesteraze. Generalno lahko na podlagi pridobljenih rezultatov zaključimo, da so za zmanjšano preživetje poskusnih organizmov v primeru izpostavitve mikroplastiki iz cigaretneih filtrov odgovorne predvsem toksične kemikalije, ki se ob kajenju cigaret kopijo v filtrih iz celuloznega acetata. Poleg tega pa k zmanjšanemu preživetju prispeva tudi fizična interakcija med MP in organizmi. Opazili smo namreč, da vodne bolhe zaužijejo MP, ki se kopiji v njihovem črevesju, hkrati pa se MP lahko adsorbira na površini telesa poskusnega organizma in s tem otežuje premikanje le-tega.

ABSTRACT

We researched the effect of microplastic (MP) on water fleas (*Daphnia magna*) and rotifers (*Brachionus calyciflorus*) through acute tests. The MP utilised came from used and unused cigarette filters, which were either traditional or electronic. We placed the organisms into mediums with different concentrations of MP (1, 10, and 100 mg/L). We checked the effects of MP after 24, 48, 72, and 96 hours. The number of affected organisms increased with higher levels of concentration of MP. An additional factor was the presence of used and unused cigarette filters. The number of decayed organisms that had been in the medium with used cigarette filters was significantly higher. We suspected the chemicals in the used cigarette filters had harmed the water fleas and rotifers. We corroborated our suspicion by putting the water fleas into the medium, which contained fragments of used MP from traditional and electronic cigarettes or unused MP from traditional cigarettes. The number of water fleas which had survived was once again higher in the medium with unused cigarette filters. We were interested in the effect of acetylcholinesterase on the animals. Acetylcholinesterase is responsible for decomposing the neurotransmitter acetylcholine, which binds to nicotinic receptors, the same type of receptors nicotine that is found in used cigarette filters binds to. By analysing the activity levels of acetylcholinesterase, we conveyed the effect of nicotine on adult water fleas, which we had exposed to used cigarette filters. Along with comparing the results of acetylcholinesterase and its effect, we looked into the ages of the organisms and how they affected the outcome. We concluded that the concentration of nicotine accelerated the production of acetylcholinesterase, suggesting that aquatic animals absorbed nicotine from the medium. We reckon the cause of the increased death rate is the toxicity cellulose acetate, which cigarette filters are made from, absorbs along with the MP that remains inside the animals' digestive tract and on their bodies. A contributing factor was the physical contact between the organisms and MP. We noticed that the water fleas had consumed the MP, which accumulated inside their intestine. At the same time, their bodies absorb the MP resulting in the animals having difficulty moving.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD..... | 8 |
| 1.1. Namen in cilji raziskovalne naloge | 8 |
| 1.2. Hipoteze | 8 |
| 2. TEORETIČNI DEL..... | 9 |
| 2.1. Mikroplastika | 9 |
| 2.2. Koncentracija mikroplastike v okolju | 10 |
| 2.3. Mikroplastika v cigaretih | 11 |
| 2.3.1. Dodatki in kemikalije v cigaretih..... | 12 |
| 2.3.2. Elektronske cigarete..... | 13 |
| 2.4. Znani vplivi mikroplastike na vodne organizme | 15 |
| 2.5. Poskusni organizmi | 17 |
| 2.5.1. Vodne bolhe | 17 |
| 2.5.2. Kotačniki..... | 20 |
| 2.6. Encim acetilholinesteraza..... | 21 |
| 3. PRAKTIČNI DEL | 22 |
| 3.1. Priprava mikroplastike | 22 |
| 3.2. Karakterizacija izdelane mikroplastike | 24 |
| 3.3. Gojenje poskusnih organizmov | 26 |
| 3.3.1. Vodne bolhe | 26 |
| 3.3.2. Kotačniki..... | 30 |
| 3.4. Priprava medija z mikroplastiko | 31 |
| 3.4.1. Načrt izpostavitve | 31 |
| 3.5. Izvedba poskusov z vodnimi bolhami | 32 |
| 3.5.1. Priprava raztopin testnih koncentracij mikroplastik | 32 |
| 3.5.2. Priprava testnih koncentracij referenčne kemikalije kalijevega dikromata ($K_2Cr_2O_7$) | 32 |
| 3.5.3. Priprava izlužkov kemikalij iz mikroplastik | 33 |
| 3.5.4. Nastavitev poskusa z vodnimi bolhami | 34 |
| 3.6. Meritev aktivnosti encima acetilholinesteraze | 35 |
| 3.7. Izvedba poskusov s kotačniki..... | 37 |
| 3.7.1. Priprava testnih koncentracij mikroplastik | 37 |
| 3.7.2. Nastavitev poskusa s kotačniki | 37 |
| 3.8. Statistična obdelava podatkov..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 4. REZULTATI..... | 39 |
| 4.1. Preživetje mladih vodnih bolh po 24 urah izpostavitve mikroplastiki..... | 39 |
| 4.2. Preživetje mladih vodnih bolh po 48 urah izpostavitve mikroplastiki..... | 40 |
| 4.3. Preživetje mladih vodnih bolh po 72 urah izpostavitve mikroplastiki..... | 41 |
| 4.4. Preživetje mladih vodnih bolh po 96 urah izpostavitve mikroplastiki..... | 42 |
| | 42 |
| 4.5. Preživetje odraslih vodnih bolh po različnih trajanjih izpostavitve 100 mg/L mikroplastike..... | 43 |
| 4.6. Preživetje mladih vodnih bolh po 24 in 48 urah izpostavitve referenčni kemikaliji. | 44 |
| 4.7. Preživetje mladih vodnih bolh po različnih trajanjih izpostavitve izlužkom mikroplastike..... | 45 |
| 4.8. Aktivnost encima acetilholinesteraza v odraslih vodnih bolhah po 96 urah izpostavitve rabljeni mikroplastiki..... | 46 |
| 4.9. Preživetje kotačnikov po 24 urah izpostavitve mikroplastiki | 47 |
| 4.10. Detekcija mikroplastike v črevesju in na površini vodnih bolh po 48 urah izpostavitve RMP | 48 |
| 5. ANALIZA REZULTATOV | 49 |
| 5.1. Primerjava vpliva izpostavitve vodnih bolh mikroplastiki po različnih trajanjih izpostavitve | 49 |
| 5.2. Primerjava rezultatov izpostavitve mladih vodnih bolh mikroplastiki z vezanimi toksičnimi snovmi in izlužki mikroplastike po 96 urah in pri koncentraciji 100 mg/L..... | 51 |
| 5.3. Primerjava preživetja mladih in odraslih vodnih bolh po 48 urah izpostavitve 100 mg/L mikoplastike | 52 |
| 5.4. Vpliv 96 urah izpostavitve rabljeni mikroplastiki na aktivnost encima acetilholinesteraza pri odraslih vodnih bolhah | 53 |
| 5.5. Primerjava preživetja mladih vodnih bolh in kotačnikov po 24 urah izpostavitve mikroplastiki | 54 |
| 6. VREDNOTENJE HIPOTEZ..... | 55 |
| 7. ZAKLJUČEK..... | 56 |
| 8. VIRI..... | 58 |

KAZALO TABEL

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Načrt priprave raztopin testnih koncentracij mikroplastik v RV mediju..... | 32 |
| Tabela 2: Priprava raztopin testnih koncentracij referenčne kemikalije K2Cr2O7. | 32 |

KAZALO GRAFOV

| | |
|--|----|
| Graf 1: Preživetje mladih vodnih bolh po 24 urah izpostavitve različnim koncentracijam mikroplastik in kontrolnemu mediju..... | 39 |
| Graf 2: Preživetje mladih vodnih bolh po 48 urah izpostavitve različnim koncentracijam mikroplastik in kontrolnemu mediju..... | 40 |
| Graf 3: Preživetje mladih vodnih bolh po 72 urah izpostavitve različnim koncentracijam mikroplastik in kontrolnemu mediju..... | 41 |
| Graf 4: Preživetje mladih vodnih bolh po 96 urah izpostavitve različnim koncentracijam mikroplastik in kontrolnemu mediju..... | 42 |
| Graf 5: Preživetje odraslih vodnih bolh po različnih trajanjih izpostavitve 100 mg/L mikroplastike..... | 43 |
| Graf 6: Preživetje mladih vodnih bolh po 48-urni izpostaviti referenčni kemikaliji kalijevega dikromata. | 44 |
| Graf 7: Preživetje mladih vodnih bolh po različnih trajanjih izpostavitve izlužkom mikroplastike, pripravljenih iz 100 mg/L NMP, RMP in RMP-E..... | 45 |
| Graf 8: Aktivnost encima acetilholinesteraza v odraslih vodnih bolhah po 96 urah izpostavite 100 mg/L RMP. | 46 |
| Graf 9: Preživetje kotačnikov po 24 urah izpostavitve mikroplastiki. | 47 |
| Graf 10: Združeni rezultati preživetja mladih vodnih bolh po različnih trajanjih izpostavitve pokajeni in nepokajeni mikroplastiki iz cigaretnih filtrov. | 49 |
| Graf 11: Primerjava preživetja vodnih bolh po izpostavitvi mikroplastiki (levo) in izlužkom mikroplastike (desno), pri najvišji koncentraciji 100 mg/L in po 96 urah..... | 51 |
| Graf 12: Primerjava preživetja mladih in odraslih vodnih bolh po 48 urah izpostavitve 100 mg/L mikroplastike. | 52 |
| Graf 13: Aktivnost encima acetilholinesteraze (AChE) v odraslih vodnih bolhah po 4-dnevni izpostaviti RMP. | 53 |
| Graf 14: Primerjava preživetja mladih vodnih bolh (levo) in kotačnikov (desno) po 24 urah izpostavitve mikroplastiki. | 54 |

1. UVOD

1.1. Namen in cilji raziskovalne naloge

Cilj raziskovalne naloge je preučiti vpliv mikroplastike (MP), pripravljene iz filtrov nepokajenih oziroma nerabljenih (NMP) in pokajenih oziroma rabljenih (RMP) cigaret, na preživetje poskusnih organizmov, tj. vodnih bolh (Crustacea: *Daphnia magna*) in kotačnikov (Rotifera: *Brachionus calyciflorus*). V nalogi smo preučili tudi vpliv izlužkov mikroplastike (tj. kemikalij, ki se spirajo z mikroplastike iz cigaretih filtrov) na poskusne organizme, poleg tega pa tudi odziv poskusnih organizmov po izpostavitvi mikroplastiki iz filtrov pokajenih elektronskih cigaret (RMP-E). Z ugotovitvami raziskave želimo aktualizirati in izpostaviti problem prisotnosti MP v okolju in dokazati potencialne škodljive vplive, ki jih predstavlja za organizme in celoten ekosistemom. Z nalogo želimo dvigniti zavedanje o resnosti posledic onesnaženosti okolja z MP, za kar smo krivi prav vsi.

1.2. Hipoteze

1. Mikroplastika iz cigaretih filtrov vpliva na preživetje poskusnih organizmov, tj. vodnih bolh in kotačnikov.
2. Preživetje poskusnih organizmov v primeru izpostavitve mikroplastiki iz filtrov rabljenih cigaret je nižje kot v primeru izpostavitve mikroplastiki iz filtrov nerabljenih cigaret in kontrolo.
3. Mikroplastika iz filtrov rabljenih elektronskih cigaret ima podoben vpliv na poskusne organizme kot mikroplastika iz filtrov rabljenih navadnih cigaret, a večji vpliv kot pa mikroplastika iz filtrov nerabljenih navadnih cigaret.
4. Kemikalije, ki se izlužujejo iz mikroplastike iz cigaretih filtrov, vplivajo na preživetje poskusnih organizmov.
5. Izpostavitev mikroplastiki iz filtrov pokajenih cigaret vpliva na aktivnost encima acetilholinesteraze v vodnih bolhah.
6. Populacija preiskovanih organizmov v gojišču samo z medijem, brez dodane MP iz cigaretih filtrov, se bo dobro razvila in spolno dozorela.

2. TEORETIČNI DEL

2.1. *Mikroplastika*

V splošnem je mikroplastika skupek majhnih plastičnih delcev, ki so veliki do 5 mm. Ti delci se nahajajo na meji vidnega in nevidnega, torej jih človeško oko delno še lahko zazna. Mikroplastika je na žalost v našem okolju široko razširjena. Uporabljamo jo v številne namene: v kozmetiki, farmaciji (uporablja se jo za dostavo učinkovin do tarčnih celic), v tekstilni industriji (najdemo jo v sintetičnih vlaknih oblačil in v vrveh).

Glede na nastanek mikroplastiko delimo na primarno in sekundarno mikroplastiko.

Primarna mikroplastika so delci, ki so že v osnovi proizvedeni kot zelo majhni delci. V to skupino uvrščamo granule v kozmetičnih izdelkih (piling kreme, zobne kreme, šamponi, tekoča mila, kreme za obraz, kreme za nego rok in nog, izdelki za ličenje (maskare, rdečila za ustnice), ter celo določene tekočine za čiščenje kontaktnih leč), plastične delce, ki se uporabljajo v industrijskih abrazivih, hkrati pa primarno mikroplastiko predstavlja tudi surovina za izdelavo plastičnih materialov.

Sekundarna mikroplastika so delci, ki nastanejo pri razgradnji večjih kosov plastike na manjše kose, npr. zaradi mehanske obrabe (drganje pnevmatik avta ali pri pranje oblačil). Procesi, ki ob tem potekajo, so kemijske, fizikalne ali biološke narave. V morju se recimo večji delci plastike razgradijo v mikroplastiko s preperevanjem, ki ga pospešujejo UV žarki, morski tokovi in delovanje različnih organizmov. Sekundarna mikroplastika, ki nastane s pranjem oblačil, predstavlja velik problem, saj se voda iz pralnih strojev, v katerih peremo oblačila, steka v čistilne naprave, od koder nato potuje v reke in morja. Dijaki gimnazije Vič so v okviru raziskovalne naloge izračunali, da naj bi v Sloveniji tako v obtok vsako leto spustili do 140 kg mikroplastike.

Sestava mikroplastike je enaka plastiki, iz katere nastane. V njej najdemo polivinil klorid, polietilen, celulozo, polipropilen, tereftalat, polistiren in poliamid (najlon). Na plastiko so lahko vezane številne toksične snovi in težke kovine (kot bo kasneje pojasnjeno, so primer tega pokajeni cigaretni filtri). Mikroplastika je lahko tudi različnih oblik. Lahko jo najdemo v obliki peletov, vlaken, tankih plasti in celo v obliki pene (Hartmann in sod., 2019; Duis in Coors, 2016).

2.2. Koncentracija mikroplastike v okolju

Mikroplastika je vseprisotna v našem okolju. Najdemo jo tudi na najodročnejših krajih sveta: na Antarktiki, v jamah, na dnu Marjanskega jarka (najglobja točka svetovnih morij) in v zraku, ki ga dihamo. Slovenski znanstveniki so kot prvi na svetu odkrili prisotnost delcev mikroplastike celo v toči (Neubauer, S., 2022).

Koncentracija mikroplastike v Jadranskem morju znaša približno od 250.000 do 1.000.000 delcev na kvadratni kilometr. Znotraj teh vrednosti se giblje tudi koncentracija mikroplastike v Sredozemskem morju. V Ljubljanicu koncentracija znaša približno 10 delcev na kubični meter, v Blejskem jezeru pa okoli 1,6 delca na kubični meter (Centa, M., 2016).

2.3. Mikroplastika v cigaretih filtri

Cigaretni filtri (Slika 1) so prvič prišli v uporabo med letoma 1860 in 1920. Njihova naloga je bila, da so delcem tobaka preprečevali vstop v usta. Cigaretna industrija je spodbudila uporabo filtrov, ko so znanstvene študije pričele dokazovati negativne vplive tobaka na zdravje kadičev. Filtri so vrsto let služili kot (lažna) zaščita pred nevarnostmi kajenja. Veljalo je, da so cigarete s filtri manj škodljive kot tiste brez njih. S hitrim napredkom človeštva, mehanizacijo, pojavom kroničnega stresa in napetosti v družbi se je povečala tudi potreba po kajenju. Posledica tega je dejstvo, da so cigaretni ogorki postali eden najpogostejsih in družbeno sprejemljivih odpadkov na planetu. (George in Khadtar, 2022).



Slika 1: Cigaretni filtri (Vir: <https://www.safran.si>)

Žal pa mnogi kadilci ne vedo, da je 95 % cigaretnih filtrov narejenih iz celuloznega acetata, ki potrebuje do trideset let, da se, pod določenimi pogoji, razgradi. Pri nepravilnem odlaganju pokajenih cigaretnih filtrov lahko pride do sprostitev vlaken celuloznega acetata in posledično do nastanka sekundarne mikroplastike (Belzagui in sod., 2021).

Filter za tobačne cigarete je sestavljen iz več kot 15.000 belo obarvanih, vlknastih pramenov celuloznega acetata, tanjših od suanca za šivanje. Ker so vlakna stisnjena tesno skupaj, spominjajo na bombaž. Njihova primarna naloga je absorpcija hlapov in kopiranje delcev dima, ki nastanejo pri kajenju.

Celulozni acetat je sintetični polimer. S postopkom acetilacije ga izdelujejo iz celuloze, naravnega polimera rastlinskega izvora. V nasprotju s celulozo ima celulozni acetat manj kristalno strukturo in je v organskih topilih bolj topen. Organizmi, ki vsebujejo encim celulazo, lahko celulozo biološko razgradijo. Celulozni acetat je razgradljiv na svetlobi, vendar je njegova sposobnost biorazgradnje zaradi modifikacij polimera s kemičnimi postopki, številnih dodatkov in zbitnosti vlaken močno otežena.

2.3.1. Dodatki in kemikalije v cigaretih filtri

Tobačne cigarete vsebujejo več kot 4800 kemičnih spojin, od katerih je več kot 70 rakotvornih in več kot 200 strupenih (Hoffmann in sod., 2001). Približno 75 % se jih nahaja v plinski fazi, preostanek pa v katranski (Belzgui in sod., 2021). Cigaretni dim je kompleksna mešanica plinov in submikronskih delcev. Cigaretni katran je izraz, ki označuje material, ki se odloži na filter. V to kategorijo štejemo vse delce cigaretnega dima, razen alkaloidnih spojin, kot je nikotin. Sestavljen je iz organskih in anorganskih spojin, od katerih so mnoge rakotvorne (Novotny in T.E., Slaughter, E., 2014). Filtri te spojine pri kajenju absorbirajo. Nekatere spojine se lahko hitro izpirajo v okolje, druge pa ostanejo vezane na celulozni acetat za nedoločen čas (Moerman in Potts, 2011; Kurmus in Mohajerani, 2020; Torkashvand in sod., 2020).

O kemikalijah, prisotnih v cigaretih filtri so bile izvedene mnoge raziskave, ki potrjujejo, da naj bi ti vsebovali številne toksične spojine, kot so težke kovine, različni rakotvorni nitrozamini, policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) karbonili, insekticidi, fenoli in druge snovi, ki se lahko izločajo v okolico.

Količina težkih kovin, kot so kadmij, arzen, nikelj, baker, svinec in cink, v cigaretih filtri znaša od nekaj mikrogramov do več sto gramov (Chevalier in sod., 2018). Raziskave so pokazale, da se tudi te kovine izpirajo v okolje (Aeslina in Mohajerani, 2012). Raziskave ocenjujejo, da se jih iz 150 cigaretnih ogorkov v enem mesecu v zemljo izpere od 0,02 pa vse do 1,7 mg (Torkashvand in sod., 2020). V isti študiji (Moriwaki in sod., 2009) so poročali tudi o sproščanju policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAH) iz cigaretih filtrov.

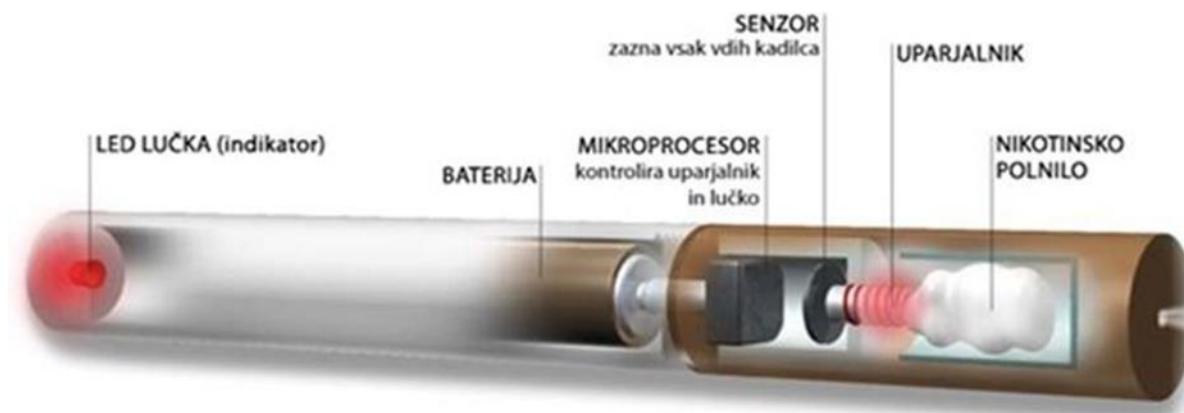
Ugotovljeno je bilo, da se pri namakanju cigarete v stojecu vodi hitro začne izpirati nikotin, strupeni alkaloid, ki se nahaja v listih tobaka in se uporablja tudi v rastlinskih pesticidih. Povprečna cigareta vsebuje od 1 pa do približno 2,3 mg nikotina.

2.3.2. Elektronske cigarete

Elektronske cigarete (Slika 2) so nova vrsta cigaret, ki se je na trgu pojavila pred kratkim. Njihova uporaba je zelo razširjenja in veliko bolj družbeno sprejemljiva, kot kajenje cigaret, saj ob kajenju ne nastaja smrdeči dim. Nesmrdeče kajenje omogoča majhna baterija, ki upari nikotin iz polnila. V klasičnih cigaretah nikotin uparimo iz tobaka ob vžigu (NIJZ).

Poleg nikotina v elektronski cigaretki najdemo tudi številne aromе, ki dajo izdihanemu dimu prijeten vonj. Kljub prijetnemu vonju dima pa elektronske cigarete niso nič manj zdravju škodljive kot navadne. Med snovmi, ki jih vdihne kadilec elektronskih cigaret, najdemo številne rakotvorne in dražilne snovi, kot so formaldehid, acetaldehid, akrolein in različne aromatizirajoče kemične snovi, za katere ni znano, kakšne učinke na zdravje imajo ob vdihavanju. Elektronske cigarete so tudi vir zelo visokih ravni majhnih delcev, ki vstopajo v dihalni sistem uporabnika.

Snovi, ki jih lahko najdemo v elektronskih cigaretah: nikotin, indij, kadmij, klor, kositer, kobalt, krom, magnezij, aluminij, mangan, nikelj, silicij, svinec, talij, vanadij, železo, živo srebro, žveplo, etanol, fenol, glicerol, naftalen, toluen, arzen, barij, baker, bor, verilij, cink, butanal, benzen, aceton, acetaldehid, akrolein, kresol, propanal, stiren (NIJZ).



Slika 2: Zgradba elektronske cigarete (Vir: <http://zadihaj.net>).

Spodnja slika (slika 3) prikazuje nekatere snovi, ki so prisotne v elektronskih cigaretah, in opisuje njihov učinek na človeka. Vplive spodaj navedenih toksičnih spojin lahko prepoznamo tudi na drugih organizmih.

| | |
|---|---|
| Za tobak specifični nitrozamini | So zelo močne rakotvorne snovi in so v aerosolu EC prisotne v nizkih ravneh. |
| Hlapne organske spojine in fenoli (benzen, toluen, ksileni) | Benzen je rakotvoren za človeka, toluen in ksileni pa sodijo med snovi, ki jih še ni možno razvrstiti glede rakotvornosti. |
| Prosti radikali in reaktivne kisikove spojine | Povzročajo oksidativni stres, ki okvarja celice, in je lahko vpletен v razvoj različnih bolezni srca in žilja, respiratornih in nevrodegenerativnih bolezni, pa tudi diabeta, revmatoidnega artritisa in nekaterih vrst raka. |
| Majhni delci | Število delcev je v aerosolu EC podobno kot v tobačnem dimu, značilnosti delcev pa se močno razlikujejo, zato ni možno sklepati, ali so učinki na zdravje pri vdihavanju obeh vrst delcev podobni. |
| Kovine | V aerosolu EC so prisotne tudi številne kovine: nikelj, krom, svinec, kositer, aluminij, kadmij, baker in mangan ter relativno nizke ravni arzena, železa in cinka. Ravni nekaterih kovin so lahko višje kot v tobačnem dimu. Številne od omenjenih kovin (nikelj, krom, kadmij, svinec, aluminij, kositer, baker in mangan) imajo pomembne škodljive učinke na zdravje, predvsem pljuč, jeter, ledvic in možganov. |
| Druge kemične snovi | Posamezne raziskave so v aerosolu EC prikazale furane (furfural, ki draži dihala), ftalate (dietilftalat in dietilheksilftalat-antiandrogene, estrogenu podobne spojine, dietilftalat sodi tudi med potencialno rakotvorne snovi), kofein (o učinkih vdihavanja kofeina je na voljo premalo podatkov, da bi lahko ocenili učinke na zdravje), redko tudi nekatera zdravila. |

Slika 3: Opis snovi, prisotnih v elektronskih cigaretah (vir: NIJZ).

2.4. Znani vplivi mikroplastike na vodne organizme

Vpliv mikroplastike na organizme je zaskrbljujoč, saj najhuje ogroža vodne organizme. Različni plastični polimeri so prisotni tako v abiotskih (voda in sedimenti) kot v biotskih (zooplankton, školjke in ribe) matricah (Cole in sod., 2013). Živali pridejo v stik z mikroplastiko s prehranjevanjem (Cole in sod., 2013), dermalnim vnosom (Wagner in Lambert, 2017) ali vdihavanjem (Watts in sod., 2014). Pogosto se zgodi, da zamenjajo mikroplastiko za hrano (George in Khadtar, 2022). Če pridejo v stik z mikroplastiko organizmi, ki se nahajajo na začetku prehranjevalne verige, so ogrožene tudi živali, ki so višje na tej verigi. Posledično smo v nevarnosti tudi ljudje. Ob večjih količinah zaužite mikroplastike lahko živali dobijo občutek sitosti (prenehajo se prehranjevati in poginejo zaradi izstradanja). Drastičnost vpliva mikroplastike na organizme je odvisna od vrste mikroplastike, gostote, količine in velikosti delcev, kar so dokazale številne študije (Rosenkranz in sod., 2009; Jemec in sod., 2016; Frydkjaer in sod., 2017). Manjši delci lahko prodirajo globje v telo in so bolj trdovratni. Preko prebavil lahko prehajajo v krovna tkiva živali in se vgradijo v tkiva. Večji delci pogosto poškodujejo prebavila manjših organizmov. Poleg tega se lahko na mikroplastiko vežejo še druga organska onesnaževala, ki se sproščajo v okolje in telesa živali.

Zaradi prisotnosti mikroplastike v prehranjevalnem spletu se mikroplastika posledično znajde na naših krožnikih, denimo v ribah, ki jih uživamo. V okviru raziskav o mikroplastiki so na Nacionalnem inštitutu za vode raziskovali količino mikroplastike v ribah. Izkazalo se je, da največ mikroplastike najdemo v cipljih, najmanj pa v morskih listih (Viršek, M. K., objavljeno v Delu, 2019). Na tem mestu je potrebno omeniti tudi to, da narava vedno najde svojo pot in tako lahko na delcih mikroplastike najdemo kolonije mikroorganizmov, ki tvorijo tanek sloj okoli delca, t.i. biofilm. Samo v Piranskem zalivu, sodeč po raziskavah, na delcih mikroplastike najdemo več kot 30 vrst bakterij.

Vpliv mikroplastike na človeka še ni povsem razumljen, a dejstvo je, da nas mora skrbeti, saj so raziskave že potrdile, da je prisotna tudi v našem telesu. Najdemo jo že v materinem mleku in blatu novorojenčkov (Junjie Zhang in sod. 2021).

V naši raziskovalni nalogi smo se osredotočili na vpliv mikroplastike na vodne bolhe (*Daphnia magna*) in kotačnike (*Brachionus calyciflorus*). Organizmi, ki neselektivno "iščejo" delce hrane po postopku filtracije, lahko mikroplastiko zamenjajo za hrano. O izpostavljenosti vodnih bolh različnim tipom, koncentracijam in velikostim mikroplastike je bilo v preteklosti že mnogo raziskav (Jemec in sod., 2016).

V eni od študij (Eltemsah in Bøhn, 2019) so raziskovalci spremljali akutne in kronične učinke poliestrskih kroglic na mlade in odrasle osebke vodnih bolh. Študija je pokazala, da ima mikroplastika po 120 urah negativen vpliv na preživetje organizmov in da naj bi bili mladiči na njo za približno 50 % bolj občutljivi od odraslih. Preučevali so tudi učinek mikroplastike na razmnoževanje. Organizmi, ki so bili mikroplastiki izpostavljeni kot mladi osebki, so v prihodnosti pokazali zmanjšano rast in stimulacijo zgodnjega razmnoževanja na račun kasnejšega razmnoževanja. V raziskavi so sklepali, da lahko te učinke mikroplastike pripišejo mehanskemu motenju živali na ravni hranjenja, na primer zamašitvi filtrirnih funkcij, oziroma na ravni prebave, saj so dokazali, da se mikroplastika kopči v črevesju vodne bolhe. Opazili

so, da se je mikroplastika nahajala na antenah in torakalnih okončinah vodnih bolh, ki vključujejo strukture za gibanje in filtriranje delcev hrane (Eltemsah in Bøhn, 2019).

Rehse in sod. (2016) so preučevali škodljive učinke mikroplastike v dveh različnih velikosti (1 mm in 100 mm) na vodne bolhe. Dokazali so, da so manjši delci izraziteje povečali imobilizacijo vodnih bolh, saj pri izpostavljenosti večjim delcem ni bilo opaziti nobenih učinkov. Do podobnih zaključkov so prišli Rist in sod. (2017), ki so ugotovili tudi, da prisotnost hrane zmanjša obremenitev telesa vodnih bolh z mikroplastiko.

Gambardella in sod. (2017) so z akutnimi testi preučevali vplive 0,1 mm kroglic mikroplastike na stadije ličink *Amphibalanus amphitrite* in morskih kozic *Artemia franciscana* ter ugotovili, da kopiranje mikroplastike v telesih organizmov ni povzročalo smrtnosti, temveč spremembo plavalne aktivnosti pri izpostavljenosti 1 mg/L po 48 urah. V obeh organizmih so se pojavljale tudi spremembe v aktivnosti encimov.

Zaužitje mikroplastike je odvisno od številnih dejavnikov, kot so vrsta, teža, koncentracija in pogostost delcev mikroplastike v mediju.

V raziskavi, ki so jo izvedli Frydkjær in sod. (2017), so pokazali, da je morfologija mikroplastike pomemben dejavnik pri izvajanju poskusov z mikroplastiko na organizme, ki se hranijo s filtrom. Vodne bolhe so zaužile delce pravilnih in nepravilnih oblik, vendar so imele večje težave z izločanjem mikroplastike nepravilnih oblik.

2.5. Poskusni organizmi

2.5.1. Vodne bolhe

RAZŠIRJENOST IN HABITAT

Vodne bolhe najdemo v sladkovodnih habitatih (na primer: jezera, reke, potoki) in pogojno tudi v rahlo slanih vodah (na primer: obmorska močvirja in območja izlivov rek v morje). Čeprav jim najbolj prija temperatura vode od 18 do 22 °C, so sposobne prenašati širši temperaturni razpon. Najgosteje poseljujejo vodna telesa na severni polobli, predvsem v ZDA in Evropi (Slika 4).



Slika 4: Razširjenost vodnih bolh (levo; Vir: www.gbif.org) in vodna bolha *Daphnia magna* (desno) (Avtor: Andraž Dolar).

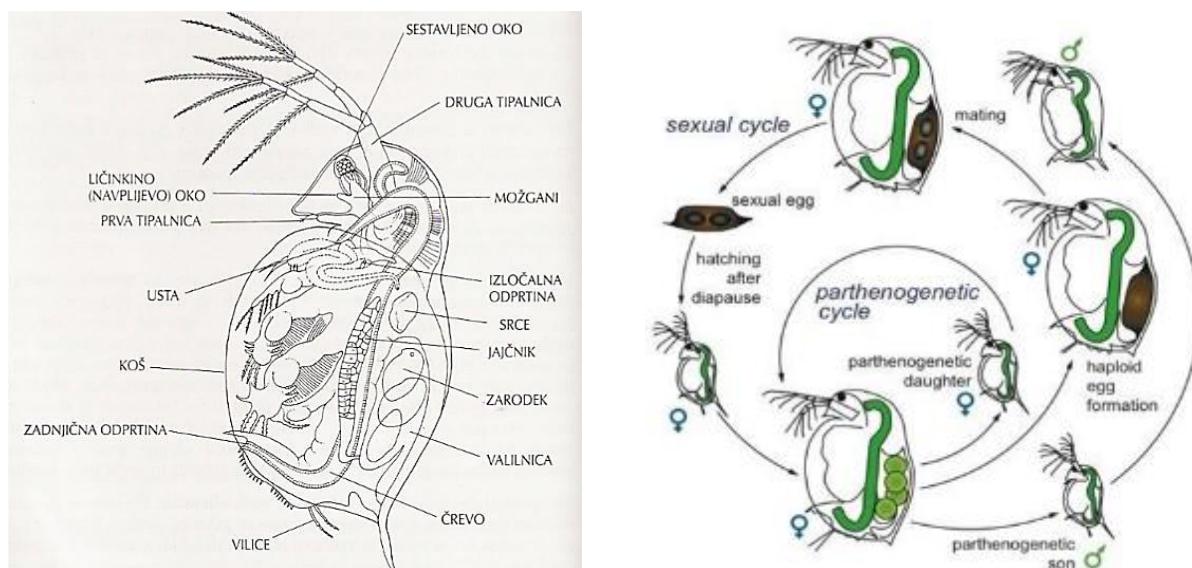
ZGRADBA

Posamezen organizem v dolžino običajno meri od 2 do 5 mm. Samice so nekoliko večje od samcev (Slike 4 in 5). Vodne bolhe vrste *Daphnia magna* spadajo med največje vrste rodu *Daphnia*. Telo vodne bolhe je značilne jajčaste in simetrične oblike in zaščiteno s plastjo hitina, prozornega polisherida, imenovano karapaks. Lahko ga razdelimo na tri glavne dele: glavo, prsnih koš in trebušni koš. Na glavi se nahajajo antene, ki jih uporabljam za zaznavanje hrane. Pod glavo se nahaja sestavljenko oko, ki služi zbiranju svetlobe in orientaciji. Na sprednji strani glave je ustna odprtina, ki vodi v prebavni trakt. Prsnih koš je sestavljen iz petih parov torakalnih okončin, s katerimi si vodna bolha pomaga pri plavanju in prehranjevanju. Vsak par nog se konča s kremlji, ki so prilagojeni za postopek filtriranja (loviljenje in zadrževanje drobnih delcev hrane). Trebušni koš vsebuje prebavni trakt, srce, glavne živčne vozle in reproduktivne organe. Prebavni trakt se začne pri ustni odprtini in konča pri anusni odprtini. Črevo je kavljaste oblike in sestavljen iz treh delov: požiralnika, srednjega in zadnjega črevesa. Hrano skozi črevo prenaša peristaltično gibanje mišic črevesne stene. Epitelne celice ne fagocitirajo delcev, temveč zgolj absorbirajo molekule. Za izločanje je poleg peristaltičnega gibanja zadnjega črevesa potreben še pritisk nedavno pridobljenih delcev hrane. Zaradi prosojnega karapaksa je obarvanost vodne bolhe odvisna od hrane, ki jo je pravkar zaužila. Dobro hranjeni organizmi so močneje obarvani kot sestradijani organizmi. Vodne bolhe imajo odprt krvni obtok. Srce je sestavljeno iz ene črpalke. Pri temperaturi 20 °C utripne približno 200-krat na minuto. Njegova naloga je, da po telesu prečrpa hemolimfo (krvi podobno tekočino). Za uravnavanje telesne temperature uporabljajo toploto, ki jo pridobijo v okolju.

Za živčni sistem je značilen možganski ganglij, ki se nahaja blizu črevesja in očesa. Prenašanje živčnih dražljajev je v primerjavi s telesi bolje razvitih organizmov poenostavljeni, vendar je princip delovanja podoben.

RAZMNOŽEVANJE, RAZVOJ IN ŽIVLJENJSKA DOBA

Vodne bolhe se večinsko razmnožujejo nespolno s partenogenezo, procesom, pri katerem samice proizvedejo diploidna jajčeca, ki se razvijejo brez oploditve (Slika 5). Ta postopek, pri katerem se večinoma izvalijo zgolj samice, jim pride prav, kadar se nahajajo v ugodnih razmerah. Pogosto poteka poleti. Konec poletja (ob ustreznih pogojih, kot so kratek dan, pomanjkanje hrane ali velika gostota populacije) se iz nekaterih jajčec razvijejo manjši samci, ki so sposobni oploditi jajčeca samic. Ta jajčeca imenujemo ‘zimska jajčeca.’ Zanje je značilno, da so manj številčna (le eno ali dve na posamezno samico) in obdana z neprepustnim ovojem (epifijo), ki jim omogoča preživeti zimo ali sušo. Njihov pojav so opazili tudi v stresnih okoliščinah, kot so ekstremne temperature, pomanjkanje hrane ali onesnaženje voda. Pri nespolnem, partenogenetskem razmnoževanju samice lahko izvalijo veliko več jajčec (tudi do 100 jajčec) kot pri spolnem razmnoževanju. Iz njih se v približno tednu dni razvijejo in izvalijo ličinke. Preden se osamosvojijo, jih samice nekaj dni oskrbujejo s hranili. Vodne bolhe so spolno zrele že po šestih do desetih dneh. Njihova življenska doba je močno odvisna od zunanjih dejavnikov, kot so temperatura, raven kisika in razpoložljiva hrana. V naravi preživijo od 1 do 56 dni, v ujetništvu pa od 40 do 56 dni.



Slika 5: Zgradba vodne bolhe (levo) (Vir: <https://dijaski.net>) in razmnoževalni cikel vodne bolhe (desno) (Vir: <http://www.aquareja.si/>).

VEDENJE IN ZAZNAVANJE

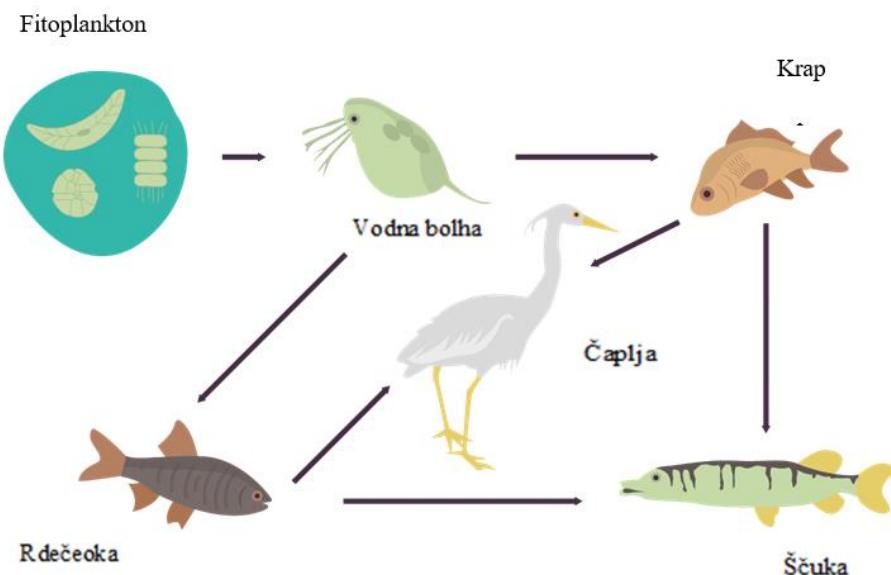
Vodne bolhe v naravi živijo v številčnih skupinah. Ime so verjetno dobile po gibih, podobnih skokom, s katerimi se ponoči premaknejo bližje vodni gladini, da se nahranijo, podnevi pa se spustijo globje, da se izognejo plenilcem. S sestavljenim očesom se odzivajo na svetlobne dražljaje in zaznavajo svetlobo različne valovne dolžine. Omogoča jim tudi slednje gibom. S posebnimi vonjalnimi in kemičnimi signali lahko ocenijo potencialne vire hrane in ogroženost pred plenilci.

PREHRANJEVANJE

Vodne bolhe so filtratorji. Filtriranje je način prehranjevanja, pri katerem se drobni delci hrane z različnimi mehanizmi filtrirajo iz okoliške vode. Hitrost filtracije je odvisna od temperature, velikosti delca (hrane), gostote in kakovosti hrane, koncentracije kisika v vodi in pH vode. V vodi neselektivno iščejo delce v velikosti od 1 µm do približno 70 µm. Z ritmičnim udarjanjem nožic na ščetine zbirajo hrano, kot so alge, bakterije, zooplankton in fitoplankton, ki si jo podajajo proti ustom.

VLOGA V EKOSISTEMU

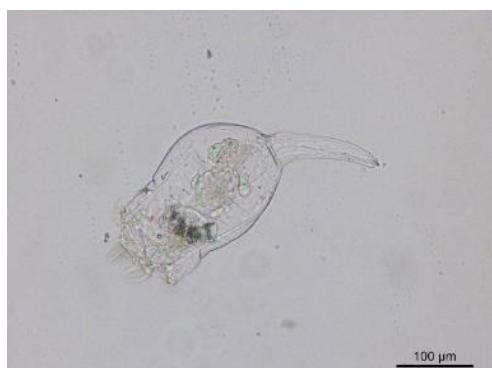
V vodnih ekosistemih vodne bolhe zavzemajo kritično pomemben položaj, saj prenašajo energijo in organske snovi od primarnih proizvajalcev (na primer alg) do višjih porabnikov. Igrajo pomembno vlogo v vodnih prehranjevalnih spletih, saj so pleni rib in različnih nevretenčarskih plenilcev (Slika 6).



Slika 6: Vloga vodne bolhe v prehranjevalni verigi (Vir: <https://w7.pngwing.com>).

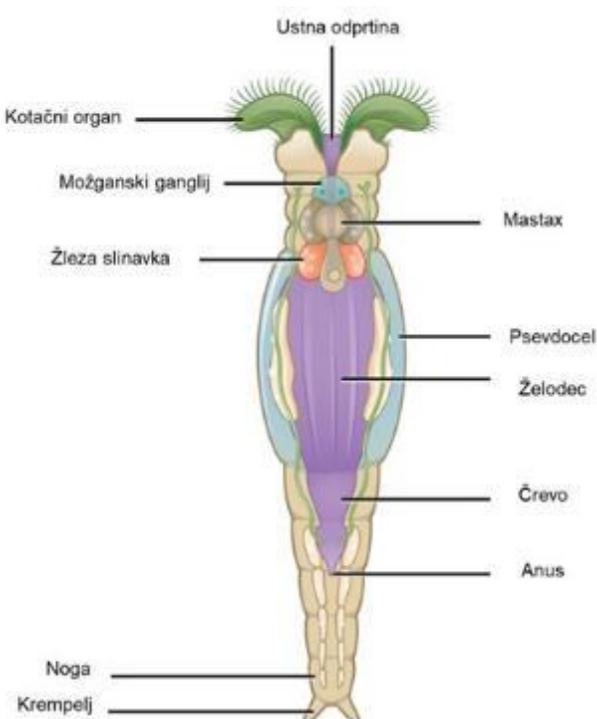
2.5.2. Kotačniki

Kotačniki so majhni, do 1 mm veliki, valjasti črvi. V naravi jih najdemo predvsem v vodnih telesih, kot so jezera, reke in potoki, nekatere izjeme pa živijo tudi v morjih ali na kopnem (Slika 7). V vodi se premikajo s šopom lovki, hranijo pa se z odmrlimi organskimi snovmi in algami. Predstavljajo hrano ličinkam rib. Tako kot za vodne bolhe je tudi za kotačnike značilno nespolno razmnoževanje oziroma partenogeneza (pri njej se lahko zarodek razvije iz neoplojene jajčne celice).



Slika 7: Kotačnik pod svetlobnim mikroskopom (Avtor: Andraž Dolar).

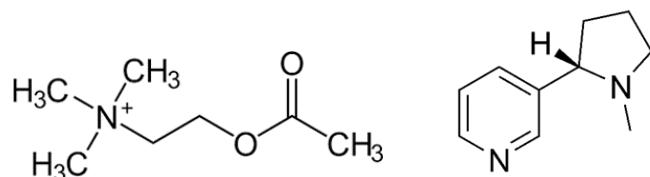
Zgradba kotačnikov se deli na glavo, trup in noge (Slika 8). Telo je valjaste oblike. Na sprednjem delu telesa se nahaja kotačni organ, skupek mitalk, s pomočjo katerih se kotačnik premika in prehranjuje. V glavi se nahajajo tudi majhni možgani, iz katerih izhajajo živci po celiem telesu. Delno imajo razvite tudi oči. Zadnji del telesa, imenovan noga, ima dva izrastka, ki služita pritrditvi kotačnika na podlago. Na koncu noge se nahaja anus, ki je izvodilo prebavil.



Slika 8: Zgradba kotačnika (Vir: <https://upload.wikimedia.org>).

2.6. Encim acetilholinesteraza

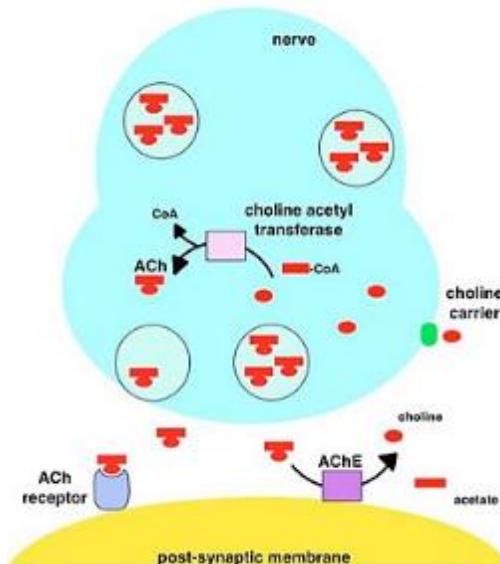
Acetilholinesteraza (AChE) je encim, ki spada v skupino hidrolaz. V telesih organizmov iga ključno vlogo, saj sodeluje pri prenašanju živčnih impulzov, do katerih pride, ko se nevrotransmitor acetilholin (ACh) (Slika 9) sprosti v sinaptično špranjo in veže na nikotinski acetilholinski receptor (nAChRs). AChE hidrolizira ACh s pospešeno hidrolizo do acetata in holina. Prosti holin se prenese nazaj v živec, kjer se ob pomoči acetil-koencima in acetilholin-transferaze zopet sintetizira acetilholin (Slika 10). Če je aktivnost encima onemogočena, je vezava ACh podaljšana (lahko tudi trajna), kar povzroči neprekinjeno vzburjenost živčne celice.



Slika 9: Levo molekula acetilholina (ACh) (Vir: <https://upload.wikimedia.org>) in desno molekula nikotina (Vir: <https://upload.wikimedia.org>).

Poznamo različne zaviralce AChE. Najpogosteje gre za organofosfatne in karbamatne insketicide, ki irreverzibilno (nepovrnljivo) zavirajo njegovo aktivnost. Učinki nevrotoksičnih pesticidov se lahko pojavljajo že pri nizkih koncentracijah. Ena od snovi, ki je bila v preteklosti pogosto uporabljena kot insekticid, je nikotin (Slika 9). Neonikotinoid, ki je po zgradbi podoben nikotinu, je še danes pogosto uporabljen insketicid. Najdemo ga v številnih rastlinah, med njimi tudi v tobaku. V naravi za rastline predstavlja zaščito pred rastlinojedci. Pri sesalcih nikotin v nizkih koncentracijah povzroča stimulativni učinek in je eden glavnih krivcev za zasvojenost s tobačnimi izdelki (Millar in Denholm, 2007).

Nikotin je receptorski agonist na večini nikotinskih acetilholinskih receptorjev. To pomeni, da se lahko veže na isti receptor kakor ACh in ga aktivira tako, da ta sproži biološki odziv.



Slika 10: Mehanizem delovanja AChE (Vir: <https://upload.wikimedia.org>).

3. PRAKTIČNI DEL

3.1. Priprava mikroplastike

Za izdelavo mikroplastike smo uporabili nepokajene in pokajene filtre navadnih cigaret znamke Marlboro Gold 100s (Slika 11), ter pokajene filtre (Heets, Amber selection) elektronskih cigaret IQOS (Slika 11).



Slika 11: Levo navadne cigarete Marlboro Gold 100s (Avtor: Andraž Dolar) in desno filtri elektronskih cigaret (Avtor: Andraž Dolar).

Mikroplastiko smo pridobili s hladnim mletjem cigaretnih filtrov (12), ki smo jih s škarjami najprej razpolovili in dali v jekleni komori s kovinsko kroglico (Slika 13). Komori smo za štiri minute potopili v tekoči dušik, da se je plastika (tj. cigaretni filtri) ohladila na temperaturo primerno za mletje. Nato smo komori vpeli v mlin MillMix 20 (Domel) in plastiko mleli dve minuti in pol pri 28 Hz (Slika 14), da smo pridobili fin prah, tj. mikroplastiko (Slika 14).



Slika 12: Rabljeni (levo) in nerabljeni (desno) filtri navadnih cigaret Marlboro Gold 100s (Avtor: Tristan Vid Baš).



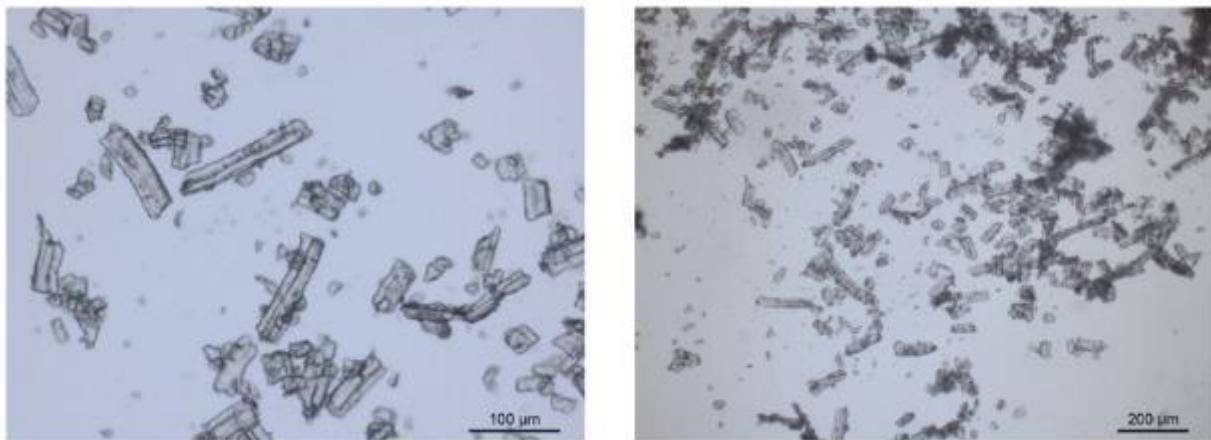
Slika 13: Jeklene komore s kroglico (levo) in mlin MillMix 20 (desno) za mletje plastike (Avtor: Tristan V. Baš).



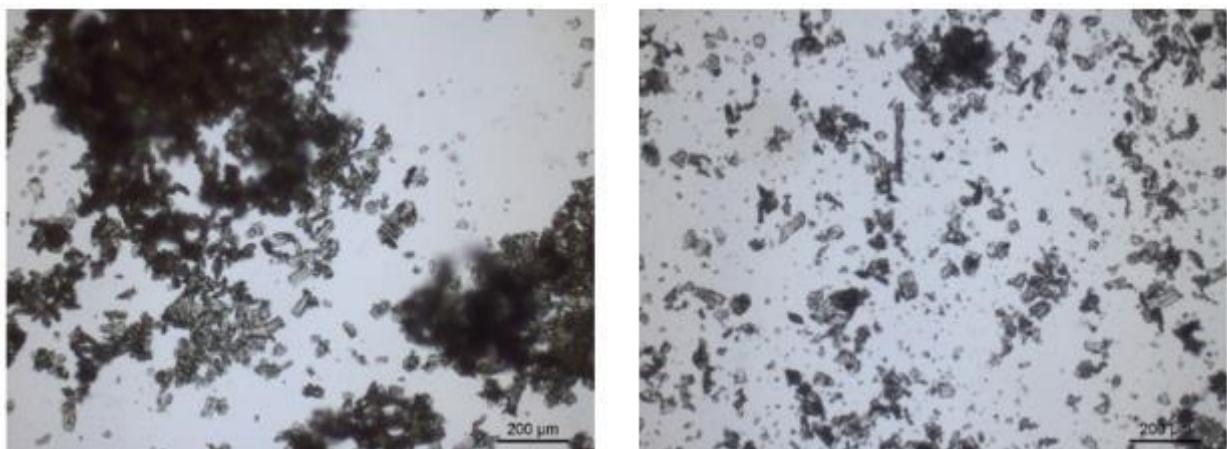
Slika 14: Mikroplastika iz pokajenih filtrov navadnih cigaret (levo) in vzorci nerabljene in rabljene mikroplastike (desno) iz filtrov navadnih cigaret (Avtor: Tristan V. Baš).

3.2. Karakterizacija izdelane mikroplastike

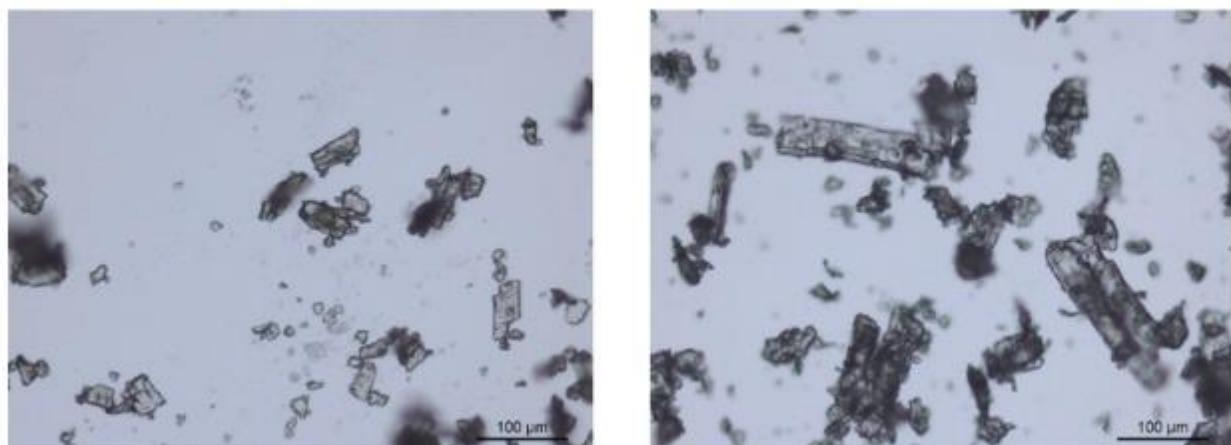
Obliko mikroplastik smo opisali pod svetlobnim mikroskopom Motic Panthera, z uporabo programa za obdelavo slik Motic Images Plus 3.0 ML. Mikroplastike iz vseh treh cigaretnih filtrov so nepravilne oblike, pri čemer prevladujejo paličasto oblikovani delci. Za določitev velikosti treh različnih mikroplastik (NMP, RMP, RMP-E) smo v programu Motic Images Plus 3.0 ML premerili med 30 in 50 delcev mikroplastik in iz podatkov izračunali povprečno velikost delcev plastike. Kot velikost mikroplastike smo uporabili najdaljšo dimenzijo delcev. Povprečna velikost delcev iz nerabljenih filtrov cigaret je 335,73 µm (Slika 15), rabljenih filtrov 493,55 µm (Slika 16) in rabljenih filtrov elektronskih cigaret 221,47 µm (Slika 17).



Slika 15: Mikroplastika iz nerabljenih filtrov navadnih cigaret Marlboro Gold 100s (Avtor: Neža Novak).



Slika 16: Mikroplastika iz rabljenih filtrov navadnih cigaret Marlboro Gold 100s (Avtor: Neža Novak).



Slika 17: Mikroplastika iz rabljenih filtrov Heets (Amber selection) elektronskih cigaret IQOS (Avtor: Neža Novak).

3.3. Gojenje poskusnih organizmov

3.3.1. Vodne bolhe

Za valjenje vodnih bolh (*Daphnia magna*) smo uporabili razredčevalno vodo (RV) (Slika 18). Za 10 litrov medija RV smo v litrsko stekleno bučko odpipetirali naslednje anorganske soli (Slika 18):

- 40 ml raztopine 1.1. ($73,52 \text{ g/l CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 10 ml raztopine 1.2. ($123,3 \text{ g/l MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 10 ml raztopine 1.3. ($5,8 \text{ g/l KCl}$)
- 10 ml raztopine 1.4. ($64,8 \text{ g/l NaHCO}_3$)

in dodali vodo do označbe. Bučko smo zamašili in dobro pretresli. Medij smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4°C .



Slika 18: Anorganske soli za pripravo razredčevalne vode (levo) in razredčevalna voda (desno), tj. medij za vodne bolhe (Avtor: Andraž Dolar).

GOJENJE VODNIH BOLH

Vodne bolhe smo vzgojili iz zimskih jajc, ki smo jih kupili pri proizvajalcu Microbiotests (www.microbiotests.com) (Slika 19). V stekleno petrijevko smo do polovice nalili medij RV, ki smo ga predhodno nasičili s kisikom z uporabo zračne črpalke, nato pa smo dodali zimska jajca vodnih bolh, ki smo jih pred tem dobro sprali na situ z vodovodno vodo (Slike 19 in 20). Po 4-5 dneh so se izvalile vodne bolhe. Za namen izvedbe poskusov kot tudi valjenja vodnih bolh smo vzpostavili komoro, v kateri smo vzpostavljali stabilne pogoje, tj. temperaturo ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) in dnevno nočni režim (16 ur svetlobe in 8 ur teme) (Slike 20 in 21). Temperaturo smo preverjali z rednim merjenje z ročnim termometrom, medtem ko smo čas osvetlitve regulirali z regulatorjem (Slika 21).



Slika 19: Ampula z zimskimi jajci vodnih bolh *Daphnia magna* (levo) in sito za spiranje zimskih jajc pod vodovodno vodo (desno) (Avtor: Neža Novak).



Slika 20: Valjenje vodnih bolh v mediju RV v stekleni petrijevki (levo) in komora za gojenje poskusnih organizmov (desno) z reguliranim časom osvetlitve in stalno temperaturo (Avtor: Neža Novak).



Slika 21: Levo časovni regulator osvetlitve komore (16:8 h = dan/noč) in desno komora za gojenje poskusnih organizmov (Avtor: Neža Novak).

Priprava založne raztopine

Pripravili smo tudi trajno kulturo vodnih bolh v steklenem akvariju (Slika 36). Kot medij smo uporabili raztopino M4, ki smo jo pripravili po naslednjem protokolu:

Založne raztopine:

- 1.1. raztopina CaCl_2
73,52 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 1.2. raztopina $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
123,3 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1.3. raztopina KCl
5,8 g/l KCl
- 1.4. raztopina NaHCO_3
64,8 g/l NaHCO_3

- 2.1. raztopina kationov
7210 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
6120 mg LiCl
1420 mg RbCl
3040 mg $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
335 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
260 mg ZnCl_2
200 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
skupaj v 2 l H_2O

- 2.2. raztopina anionov
548 mg NaNO_3
5719 mg H_3BO_3
32 mg NaBr
126 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
6,5 mg KJ
4,38 mg Na_2SeO_3
1,15 mg NH_4VO_3
skupaj v 1 l H_2O

- 2.3. silikatne raztopine
21,475 mg/l Na_2SiO_3

- 2.4. raztopina Fe/EDTA
500 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
199,1 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Obe raztopini smo pripravili ločeno v 500 ml, ju združili in takoj avtoklavirali.

2.5. raztopina sulfata
286 mg KH_2PO_4
368 mg K_2HPO_4
skupaj v 1 l H_2O (bidest.)

2.6. raztopina vitaminov
750 mg tiamin hidroklorida 10 mg cianobalamina (B12) 7,5 mg biotina
skupaj v 1 l H_2O (globoko zamrznemo razdeljeno po 1 ml).

Založne raztopine smo pridobili na Oddelku za biologijo, Biotehniške fakultete, UL.

Za pripravo 10 litrov medija M4 smo dodali:

- 40 ml raztopine 1.1. (CaCl_2)
- 10 ml raztopine 1.2. (MgSO_4)
- 10 ml raztopine 1.3. (KCl)
- 10 ml raztopine 1.4. (NaHCO_3)
- 1 ml raztopine 2.1. (raztopina kationov)
- 5 ml raztopine 2.2. (raztopina anionov)
- 2 ml raztopine 2.3. (raztopina siliaktov)
- 50 ml raztopine 2.4. (raztopina Fe/EDTA)
- 5 ml raztopine 2.5. (raztopina fosfata)
- 1 ml raztopine 2.6. (raztopina vitaminov/globoko zamrznjena) – vedno dodamo direktno pred uporabo
- 9866 ml destilirane H_2O

V trajni kulturi vodnih bolh (Slika 22) smo iz zimskih jajc vzgojili odrasle, 7 dni ali več stare vodne bolhe, ki smo jih hranili s suspenzijo zelenih alg Spirulina (Slika 22).



Slika 22: Trajna kultura vodnih bolh v mediju M4 (levo) in hrana za vodne bolhe - zelene alge spirulina (desno) (Avtor: Andraž Dolar).

3.3.2. Kotačniki

Kotačnike smo vzgojili iz jajčec, ki smo jih pridobili v kompletu kita Rotoxkit F (Microbiotests) (Slika 23). Gojili smo jih v standardni raztopini, ki smo jo pripravili v litrski stekleni bučki. V bučki smo zmešali kitu priložene solne raztopine (NaHCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in KCl) in dodali destilirano vodo do oznake. V gojitveno luknjico na priloženi poskusni plošči (Slika 24) smo dodali 2 mL standardne raztopine, ki smo jo predhodno dobro nasičili s kisikom z uporabo zračne črpalke, in dodali eno vialo jajčec kotačnikov. Ploščo smo inkubirali 16-18 ur v komori, v kateri smo vzdrževali temperaturo $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in dnevno nočni režim (16 ur svetlobe in 8 ur teme).



Slika 23: Plošča z luknjicami za izvedbo poskusov s kotačniki (Vir: www.microbiotests.com).

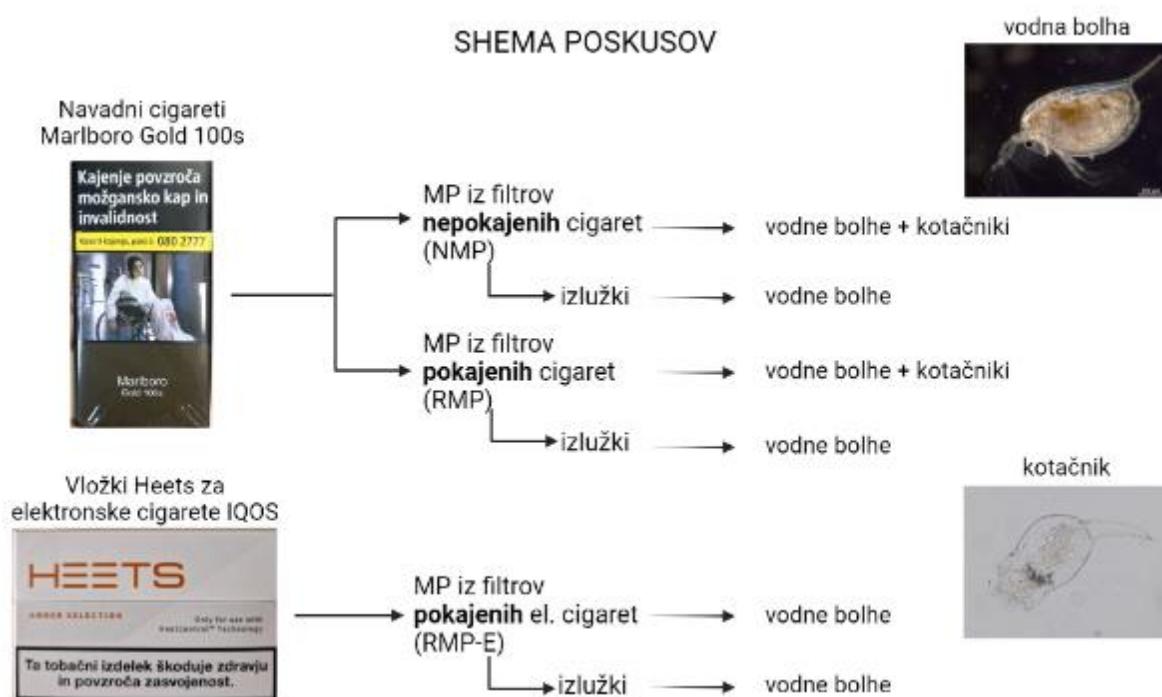


Slika 24: Rotoxkit F za izvedbo poskusov s kotačniki (Vir: www.microbiotests.com).

3.4. Priprava medija z mikroplastiko

3.4.1. Načrt izpostavitve

Vodne bolhe in kotačnike smo izpostavili mikroplastiki iz filtrov nepokajenih in pokajenih cigaret znamke Marlboro Gold 100s, medtem ko smo vodne bolhe izpostavili tudi mikroplastiki iz filtrov pokajenih elektronskih cigaret (Slika 25). V poskusih z vodnimi bolhami smo uporabili mlade (tj. 24 ur stare) vodne bolhe in odrasle, tj. 7 dni stare vodne bolhe. Slednje smo izpostavili zgolj najvišji koncentraciji mikroplastike v mediju (100 mg/L), medtem ko smo mlade bolhe izpostavili trem koncentracijam mikroplastike (1, 10 in 100 mg/L). Poleg mikroplastike smo mlade vodne bolhe testirali tudi z izlužki mikroplastike. Dodatno smo v odraslih vodnih bolhah, ki smo jih izpostavili najvišji testirani koncentraciji mikroplastike iz filtrov pokajenih cigaret, analizirali aktivnost encima acetilholinesteraze.



Slika 25: Načrt poskusov izpostavitve poskusnih organizmov mikroplastiki iz cigaretnih filtrov.

3.5. Izvedba poskusov z vodnimi bolhami

3.5.1. Priprava raztopin testnih koncentracij mikroplastik

Za vse tri tipe mikroplastik (NMP, RMP in RMP-E) smo pripravili založne raztopine (100 mg/L), tako da smo zatehtali 5 mg mikroplastike in jo resuspendirali v 50 mL medija RV z dodanim detergentom Tween 40 (2,4 µL na 100 mL RV). Detergent je izboljšal porazdelitev delcev plastike v mediju, zato smo ostale testne koncentracije mikroplastike lahko pripravili z zaporednimi redčitvami. Medij RV+T smo pred uporabo dobro prezračili z uporabo zračne črpalke in ga s tem nasičili s kisikom. Testne koncentracije mikroplastik smo pripravili v plastičnih centrifugirkah z redčitvijo založne raztopine mikroplastik s koncentracijo 100 mg/L z medijem RV+T, kot prikazuje spodnja tabela 1.

Tabela 1: Načrt priprave raztopin testnih koncentracij mikroplastik v RV mediju.

| Koncentracija (mg/L) | Volumen založna raztopina mikroplastike (mL) | Volumen medija RV+T (mL) | Skupni volumen (mL) |
|----------------------|--|--------------------------|---------------------|
| 100 | 50 | / | 50 |
| 10 | 2,5 | 22,5 | 25 |
| 1 | 0,25 | 24,75 | 25 |
| Kontrola | / | 25 | 25 |

3.5.2. Priprava testnih koncentracij referenčne kemikalije kalijevega dikromata ($K_2Cr_2O_7$)

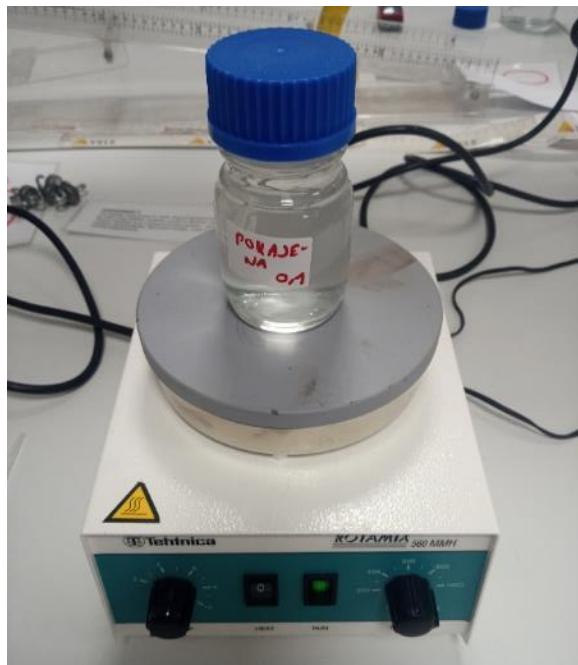
Referenčne kemikalije služijo dokazovanju vpliva nevarnih snovi na organizem in s tem potrdijo maksimalen odziv na dokazane strupene snovi. Testne koncentracije kalijevega dikromata ($K_2Cr_2O_7$) smo pripravili v 100 mL steklenih bučkah, v katere smo odpipetirali ustrezен volumen založne raztopine $K_2Cr_2O_7$ (100 mg/L), tako kot prikazuje spodnja tabela 2, in bučko napolnili z destilirano vodo do oznake ter dobro premešali.

Tabela 2: Priprava raztopin testnih koncentracij referenčne kemikalije $K_2Cr_2O_7$.

| Koncentracija (mg/L) | Volumen založne raztopine $K_2Cr_2O_7$ (mL) | Volumen medija RV+T 40 (mL) | Skupni volumen (mL) |
|----------------------|---|-----------------------------|---------------------|
| 1,8 | 1,8 | 98,2 | 100 |
| 1,3 | 1,3 | 98,7 | 100 |
| 1 | 1,0 | 99,0 | 100 |
| 0,7 | 0,7 | 99,3 | 100 |
| 0,5 | 0,5 | 99,5 | 100 |
| kontrola | 0 | 100 | 100 |

3.5.3. Priprava izlužkov kemikalij iz mikroplastik

Izlužke smo pripravili z namakanjem mikroplastik RMP, NMP in RMP-E, in sicer najvišje koncentracije (100 mg/L) v mediju RV+T za 48 ur na magnetnem mešalu (Slika 26). Nato je sledila filtracija skozi celulozni filter, s čimer smo odstranili vse delce mikroplastike, ostale pa so zgolj spojine, ki so se sprostile z mikroplastik.



Slika 26:Priprava izlužkov iz mikroplastik – 48-urno namakanje MP v mediju RV+T in mešanje na magnetnem mešalu (Avtor: Andraž Dolar).

3.5.4. Nastavitev poskusa z vodnimi bolhami

Pripravljanje testne medije smo s plastično kapalko ali pipeto prenesli v luknjice plastične plošče (angl. 6-well plates) (Slika 27). V vsako od šestih luknjic smo prenesli 5 mL medija in 5 vodnih bolh, ki smo jih 1 uro pred izvedbo poskusa vedno nahranili z raztopino zelenih alg (spirulina). V primeru izpostavitve odraslih vodnih bolh smo v vsako luknjico na plošči prenesli zgolj tri vodne bolhe. Prenos vodnih bolh na plošče smo izvajali nad svetlobno ploščo, ki nam je olajšala prenos (Slika 28). Ploščo z vodnimi bolhami smo hrаниli v komori z dnevno-nočnim ritmom (16 ur svetlobe in 8 ur teme) in stalno temperaturo $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Poskus z mladimi (24 ur stare) in odraslimi vodnimi bolhami (7 dni stare) smo izvajali 24, 48, 72 in 96 ur. Preživetje vodnih bolh smo preverjali vsak dan, tako da smo spremljali mobilnost vodnih bolh po 15 sekundnem tresenju plošče. V kolikor vodne bolhe niso splavale, smo jih tretirali kot nemobilne oziroma poginule, kar smo dodatno preverili tako, da smo pod lupo preverili odsotnost bitja srca. Med poskusom, tj. po dveh dneh, smo vodne bolhe nahranili tako, da smo v medij z vodnimi bolhami dodali 50 μL raztopine zelene alge (spirulina, 11 mg/10 mL RV+T).



Slika 27: Plastična plošča z luknjicami za izvedbo testa z vodnimi bolhami (Avtor: Andraž Dolar).



Slika 28: Svetlobna plošča za pomoč pri prenosu vodnih bolh (Avtor: Neža Novak).

3.6. Meritev aktivnosti encima acetilholinesteraze

Aktivnost encima acetilholinesteraze (AChE) smo merili v telesih odraslih vodnih bolh, ki so bile 4 dni izpostavljene v mediju z dodano MP iz filtrov pokajenih navadnih cigaret (100 mg/L) in v kontroli. V steklene epruvete smo prenesli 4 vodne bolhe, kar predstavlja en vzorec, in dodali 760 µL 100 mM kalij-fosfatnega pufra (KP, pH= 7), ki smo ga pripravili z raztopljanjem baze (K₂HPO₄; m= 9,343 g) in kisline (KH₂PO₄; m= 6,309 g) v 1 litru destilirane vode. V epruvete smo dodali še 40 uL 10 % raztopine detergenta Triton X-100. Tako smo za vsako skupino (kontrola in MP) pripravili 4 vzorce. Vodne bolhe v epruvetah smo homogenizirali 1 minuto z uporabo homogenizerja IKA T10 Ultra Turrax (29), nato pa smo homogenat prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko in ga 10 minut centrifugirali pri 14 000 x g in 4 °C (Slika 30).

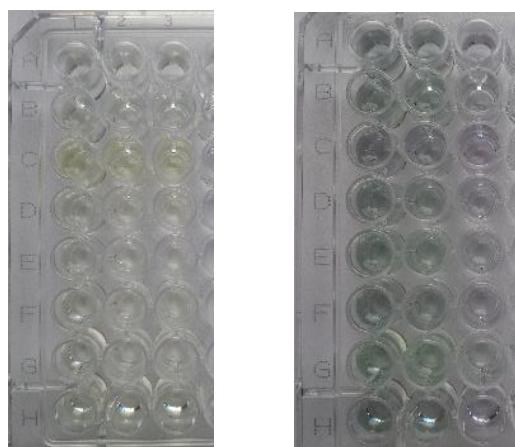


Slika 29: Laboratorijska oprema za homogenizacijo, tj. homogenizer IKA T10 Ultra Turrax) (Avtor.: Andraž Dolar).

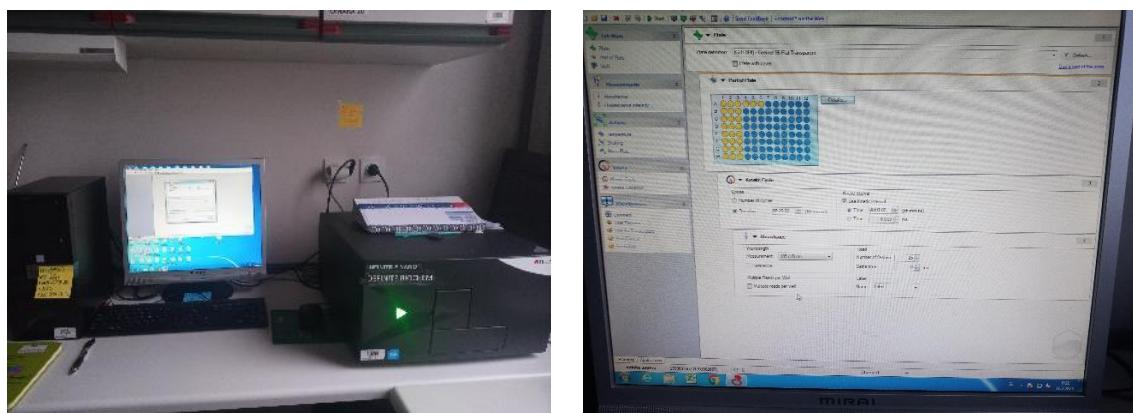


Slika 30: Centrifuga Sigma 3-30 KS (Avtor: Andraž Dolar).

Po centrifugiraju vzorcev smo pridobili bistro rumeno tekočino, t.i. supernatant, v katerem smo merili aktivnost encima po Ellmanovi metodi (Ellman in sod., 1961). Gre za posredno metodo, kjer se meri absorbanca rumenega produkta, kot posledica reakcije med tioholinom (produkt razpada AChCl) in Ellmanovim reagentom (ditriobisnitrobenzoat; DTNB). Ellmanov reagent in AChECl smo pridobili na Oddelku za biologijo, BF. Na mikrotitersko ploščo smo v vsako luknjo prenesli 50 μL supernatanta, 30 μL 100 mM KP pufra in 100 μL Ellmanovega reagenta z dodanim 1 M AChCl. Spremembo absorbance v vzorcih smo merili 20 minut pri 405 nm (Slika 31), z uporabo mikročitalca Tecan Infinite 200 Pro (Sliki 32). V supernatantu vzorcev smo za namen normiranja encimske aktivnosti pomerili tudi količino proteinov z uporabo kita BCA Protein Assay. Na mikrotitersko ploščo smo v luknjo prenesli 20 μL supernatanta in dodali 180 μL mešanice reagentov A in B (v razmerju 50:1). Nato smo ploščo 30 minut inkubirali pri 37°C in pomerili absobranci pri 562 nm (Slika 31). Za standard smo uporabili raztopine govejega serumskega albumina (koncentracije 0 - 2000 $\mu\text{g/mL}$), na podlagi pomerjenih absorbanc za standard pri različnih koncentracijah pa smo zrisali umeritveno krivuljo in iz enačbe izračunali koncentracijo proteinov v vzorcih vodnih bolh. Encimsko aktivnost AChE smo izrazili kot specifično encimsko aktivnost, izraženo v nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteinov, upoštevajoč ekstinkcijski koeficient za produkt tioholin ($\epsilon_{405} = 13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Jemec in sod., 2007).



Slika 31: Mikrotiterska plošča z reakcijsko mešanicou za spektrofotometrično analizo aktivnosti AChE v homogenatu vodnih bolh (levo) in proteinov (desno) (Avtor: Andraž Dolar).



Slika 32: Mikročitalec Tecan Infinite 200 Pro in programska oprema za mikročitalec (Avtor: Andraž Dolar).

3.7. Izvedba poskusov s kotačniki

3.7.1. Priprava testnih koncentracij mikroplastik

Podobno kot pri vodnih bolhah smo tudi za izpostavitev kotačnikov pripravili enake testne koncentracije mikroplastik iz cigaretnih filtrov, pri čemer pa smo s kotačniki testirali zgolj dve mikroplastiki, in sicer mikroplastiko iz nepokajenih in pokajenih filtrov cigaret Marlboro Gold 100s. Založne raztopine mikroplastik in ostale testne koncentracije smo pripravili v standardni raztopini za kotačnike (glej poglavje Kotačniki), brez dodanega detergenta Tween 40. Za kontrolo smo uporabili zgolj standardno raztopino za kotačnike.

3.7.2. Nastavitev poskusa s kotačniki

Poskus s kotačniki smo izvedli na plastični plošči z luknjami (Slika 33), v katere smo prenesli 0,3 mL standardne raztopine za kontrolo in 0,3 ml ustrezne testne koncentracije mikroplastike. Z uporabo stereolupe (Leica) (Slika 33) smo v vsako luknjo s kapalko prenesli 5 kotačnikov, ki so bili stari 24 ur. Za vsako testno koncentracijo mikroplastike kot tudi kontrole smo izvedli 6 ponovitev (tj. 6 x 5 živali). Ploščo s kotačniki smo prekrili s pokrovom in gojili v komori v temi, pri stalni temperaturi 25 ± 1 °C. Po 24 urah smo pod lupo preverili število živih kotačnikov.



Slika 33: Stereolupe Leica za preverjanje preživetja kotačnikov (levo) in plošča z lunjicami za izvedbo poskusov s kotačniki (desno) (Avtor: Andraž Dolar).

3.8. Statistična obdelava podatkov

Podatke smo zbirali in obdelovali v programu Microsoft Excel. Za risanje grafov smo uporabili program OriginPro 2023v (Origin Lab). Za pridobljene podatke iz poskusov smo izračunali povprečje in standardne napake.

Testirali smo statistično značilne razlike med rezultati posameznih skupin (tj. primerjava preživetja kontrole s preživetjem organizmov pri različnih koncentracijah mikroplastike, izlužkih). Aplicirali smo neparametrični test, Mann-Whitney test, ki se uporablja, kadar podatki niso simetrično (normalno) porazdeljeni ali imamo malo podatkov. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo smo označili z zvezdicami (*) nad stolpci, pri čemer je $p < 0.05$.

4. REZULTATI

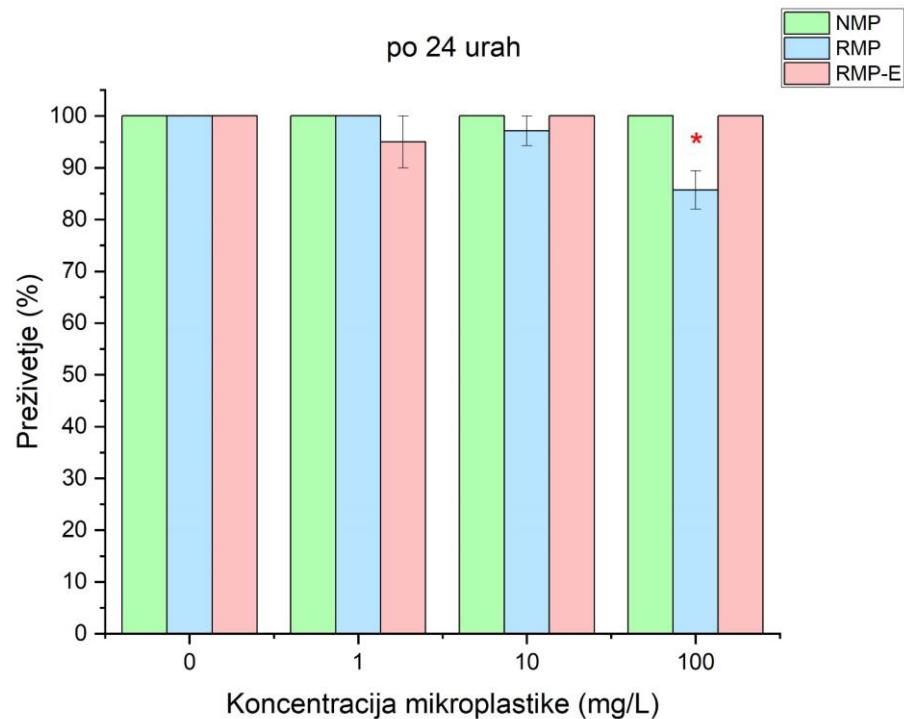
4.1. Preživetje mladih vodnih bolh po 24 urah izpostavitve mikroplastiki

V kontrolnem mediju, kjer je koncentracija mikroplastike 0 mg/L, po 24 urah izpostavitve nismo opazili sprememb v preživetju.

Tudi pri najnižji koncentraciji MP (1 mg/L) so bile opazne zanemarljive spremembe. V mediju z rabljeno mikroplastiko iz elektronskih cigaret (RMP-E) se je preživetje vodnih bolh rahlo zmanjšalo v primerjavi s kontrolo.

Pri testni koncentraciji 10 mg/L smo zaznali manjše spremembe le v mediju z rabljeno mikroplastiko (RMP), tam se je preživetje vodnih bolh rahlo zmanjšalo, a vendar neznačilno v primerjavi s kontrolo.

V mediju z največjo koncentracijo mikroplastike, ki je znašala 100 mg/L, se je preživetje vodnih bolh v mediju z RMP značilno zmanjšalo za več kot 10 %, v primerjavi s kontrolo (Graf 1).



Graf 1: Preživetje mladih vodnih bolh po 24 urah izpostavitve različnim koncentracijam mikroplastik in kontrolnemu mediju.

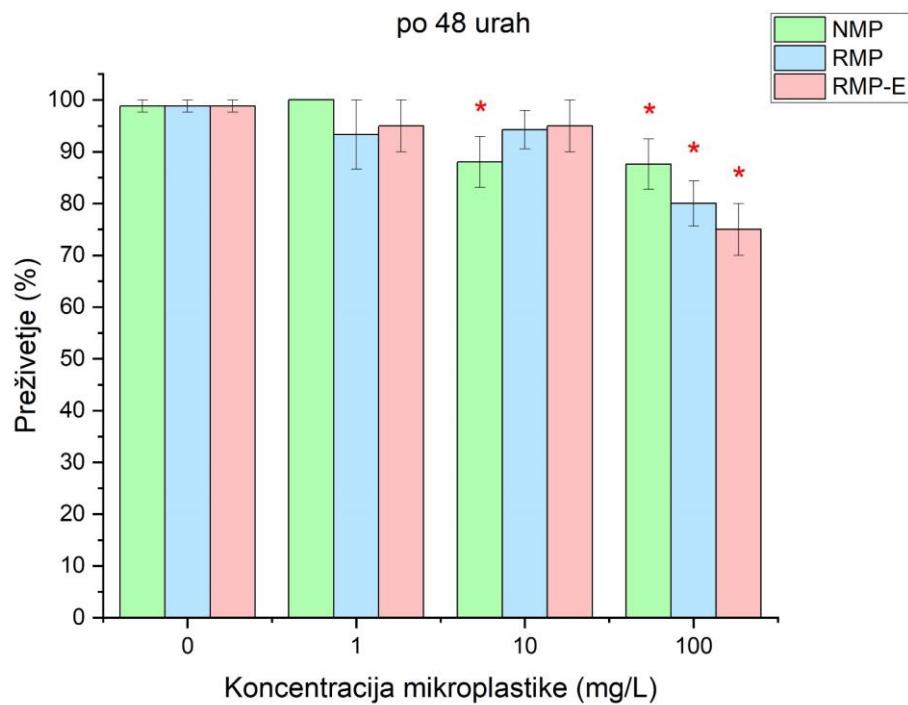
4.2. Preživetje mladih vodnih bolh po 48 urah izpostavitve mikroplasti

V kontrolah (0 mg/L) ni bilo moč zaznati sprememb v preživetju.

Preživetje vodnih bolh se je v mediju z mikroplastiko koncentracije 1 mg/L rahlo zmanjšalo v primerjavi s kontrolo (Graf 2).

Pri koncentraciji 10 mg/L je bilo največje spremembe v preživetju moč opaziti v mediju, kjer je bila prisotna nerabljena mikroplastika (NMP), preživetje se je tam značilno zmanjšalo za približno 10 %, v primerjavi s kontrolo.

V mediju z največjo koncentracijo mikroplastike (100 mg/L) so bile opazne značilne razlike v primerjavi s kontrolo (Graf 2). Največja razlika, v primerjavi z rezultati izpostavitve po 24 urah je vidna v mediju z RMP-E, kjer je po 48 urah preživelih zgolj 80 % organizmov. Odstotek preživelih vodnih bolh v mediju z RMP je variiral znotraj mej 24-urne izpostavitve. Večjo spremembo je bilo moč zaznati tudi v mediju z NMP, kjer se je odstotek preživetja v primerjavi z rezultati po 24-urni izpostavitvi znižal za dobro 10 %.



Graf 2: Preživetje mladih vodnih bolh po 48 urah izpostavitve različnim koncentracijam mikroplastik in kontrolnemu mediju.

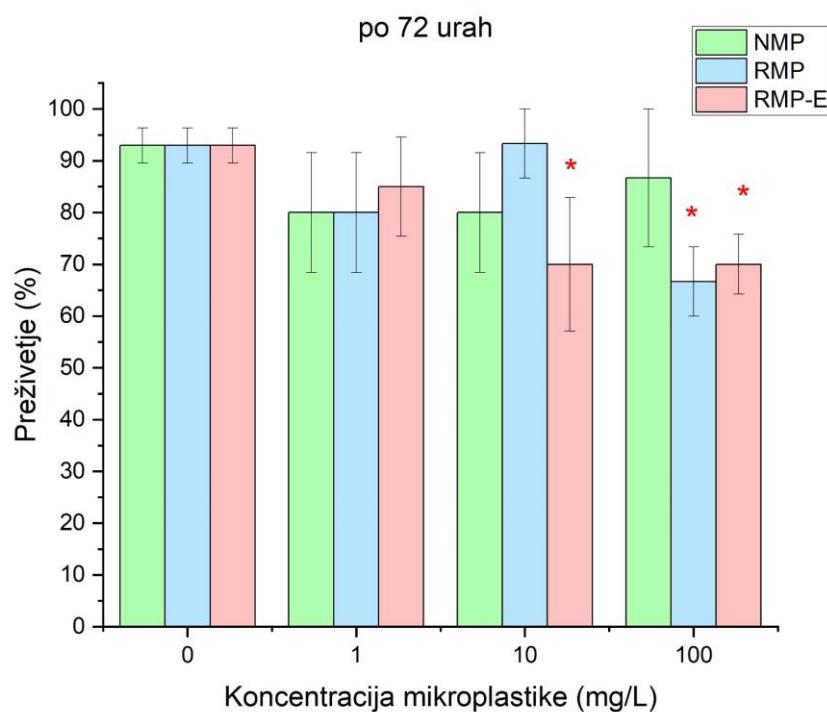
4.3. Preživetje mladih vodnih bolh po 72 urah izpostavitve mikroplastiki

V kontrolah (0 mg/L) ni bilo opaznih večjih sprememb v preživetju vodnih bolh, čeprav se je odstotek preživetja organizmov rahlo zmanjšal, vendar pa je slednja sprememba še vedno znotraj dovoljenih mej veljavnega poskusa (Graf 3).

V mediju s koncentracijo 1 mg/L so bile največje spremembe pri preživetju organizmov opažene v primeru RMP (odstotek preživetja upade za dodatnih 10 %, v primerjavi z 48-urno izpostavitvijo) in NMP (odstotek preživetja upade za 20 %, v primerjavi z 48-urno izpostavitvijo). Rahel upad v preživetju vodnih bolh smo zaznali tudi v mediju z RMP-E (Graf 3).

Pri koncentraciji 10 mg/L se v mediju z RMP preživetje vodnih bolh ni zmanjšalo v primerjavi s kontrolo. Pri enaki koncentraciji se je v mediju z NMP odstotek preživetja rahlo zmanjšal, največja sprememba pa je bila vidna v mediju z RMP-E, kjer se je število preživelih vodnih bolh zmanjšalo za približno 20 %, kar predstavlja statistično značilen upad v primerjavi s kontrolo.

V mediju, kjer je koncentracija mikroplastike znašala 100 mg/L, je bilo možno opaziti večje, statistično značilne spremembe v primeru RMP (odstotek preživetja znaša 65-70 %) in RMP-E (odstotek preživetja znaša približno 70 %), medtem ko ni bilo opaznih sprememb v primeru NMP.



Graf 3: Preživetje mladih vodnih bolh po 72 urah izpostavitve različnim koncentracijam mikroplastik in kontrolnemu mediju.

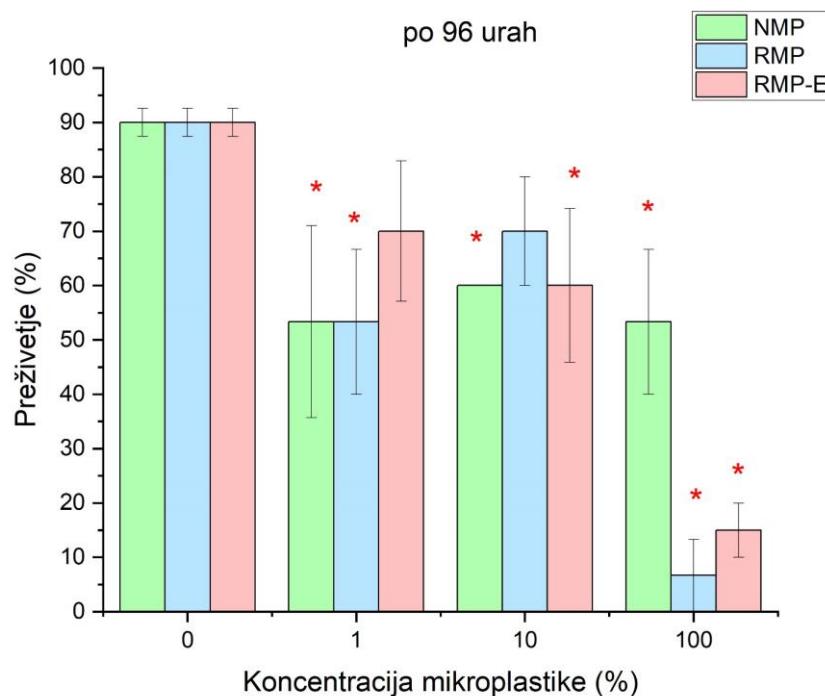
4.4. Preživetje mladih vodnih bolh po 96 urah izpostavitve mikroplastiki

V kontroli (0 mg/L) se je preživetje vodnih bolh zmanjšalo za približno 10 %, kar pa je še znotraj dovoljenih mej, da je poskus veljaven.

V mediju s koncentracijo 1 mg/L so bile opazne številne spremembe (Graf 4). V primeru izpostavitve NMP in RMP je preživelala približno polovica vodnih bolh (50-60 %) v primerjavi s kontrolo, pri čemer je 1 mg/L NMP povzročila statistično značilen upad v preživetju vodnih bolh. V primerjavi z rezultati 72-urne izpostavite RMP se je po 96-urah preživetje vodnih bolh zmanjšalo za dodatnih 20 %.

V mediju, kjer je koncentracija znašala 10 mg/L, se je občutno zmanjšalo število preživelih vodnih bolh v primeru NMP in RMP-E, v obeh primerih jih je preživelilo le še približno 60 %. V primerjavi z rezultati 72-urne izpostavite RMP se je po 96-urah preživetje vodnih bolh zmanjšalo za dodatnih 20 %.

Najbolj značilne spremembe so bile opazne v mediju s koncentracijo mikroplastike 100 mg/L. V mediju z RMP je bilo preživelih manj kot 10 % vodnih bolh. Podoben padec v številu preživelih organizmov je viden tudi v mediju z RMP-E, kjer je preživelilo manj kot 15 % vodnih bolh. V mediju z NMP se je število preživelih vodnih bolh občutno zmanjšalo, saj je ostalo živilih le dobrih 55 % organizmov, a vseeno več kot v primeru rabljene MP.



Graf 4: Preživetje mladih vodnih bolh po 96 urah izpostavitve različnim koncentracijam mikroplastik in kontrolnemu mediju.

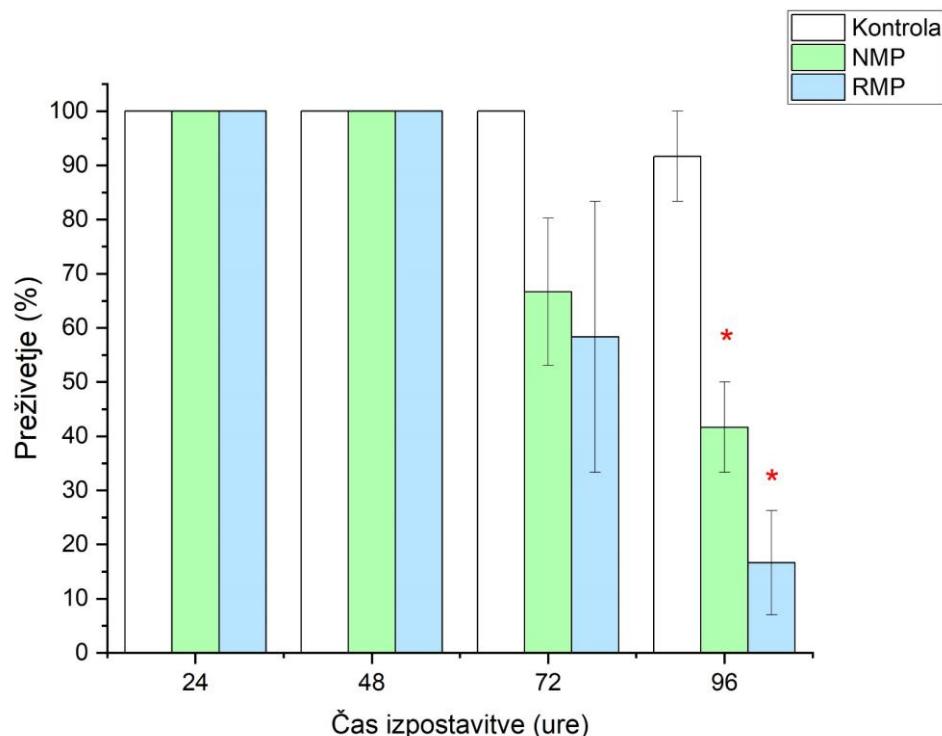
4.5. Preživetje odraslih vodnih bolh po različnih trajanjih izpostavitve 100 mg/L mikroplastike

Graf 5 predstavlja rezultate izpostavitve odraslih (7 dni starih) vodnih bolh mikroplastiki pri koncentraciji 100 mg/L, v odvisnosti od trajanja izpostavitve.

Po 24 urah in 48 urah opazovanja ni bilo vidnih sprememb v preživetju v primerjavi s kontrolo.

Po 72 urah se število preživelih vodnih bolh v kontrolnem mediju ni spremenilo. Za več kot 30 % se je zmanjšalo preživetje vodnih bolh v mediju z NMP. 40 % upad v številu preživelih vodnih bolh smo opazili v mediju z RMP, v primerjavi s kontrolo.

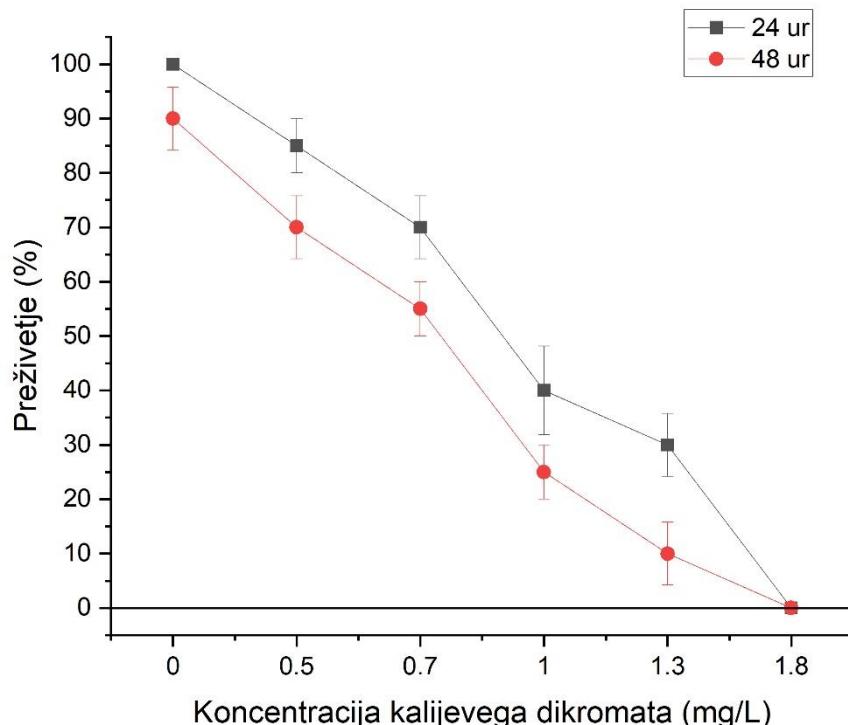
Po 96 urah smo v kontrolni skupini zaznali 5 % upad števila preživelih vodnih bolh. V mediju z NMP je ostalo živih dobrej 40 % vodnih bolh, kar je značilno manj v primerjavi s kontrolo. Značilen upad v preživetju je bilo moč zaznati tudi v mediju z RMP, kjer je ostalo živih le 15 % vodnih bolh.



Graf 5: Preživetje odraslih vodnih bolh po različnih trajanjih izpostavitve 100 mg/L mikroplastike.

4.6. Preživetje mladih vodnih bolh po 24 in 48 urah izpostavitve referenčni kemikaliji

Raziskave so pokazale, da referenčna kemikalija kalijev dikromat ($K_2Cr_2O_7$) letalno vpliva na preživetje vodnih bolh. Smrtnost vodnih bolh se z večanjem koncentracije referenčne kemikalije povečuje (Graf 6). Koncentracija 1,8 mg/L povzroči smrt celotne testirane populacije vodnih bolh že po 24 urah izpostavitve.



Graf 6: Preživetje mladih vodnih bolh po 48-urni izpostavitvi referenčni kemikaliji kalijevega dikromata.

4.7. Preživetje mladih vodnih bolh po različnih trajanjih izpostavitve izlužkom mikroplastike

Graf 7 predstavlja odstotek preživelih vodnih bolh v primeru izpostavitve izlužkom, pridobljenih iz NMP, RMP in RMP-E pri koncentraciji 100 mg/L, v odvisnosti od časa.

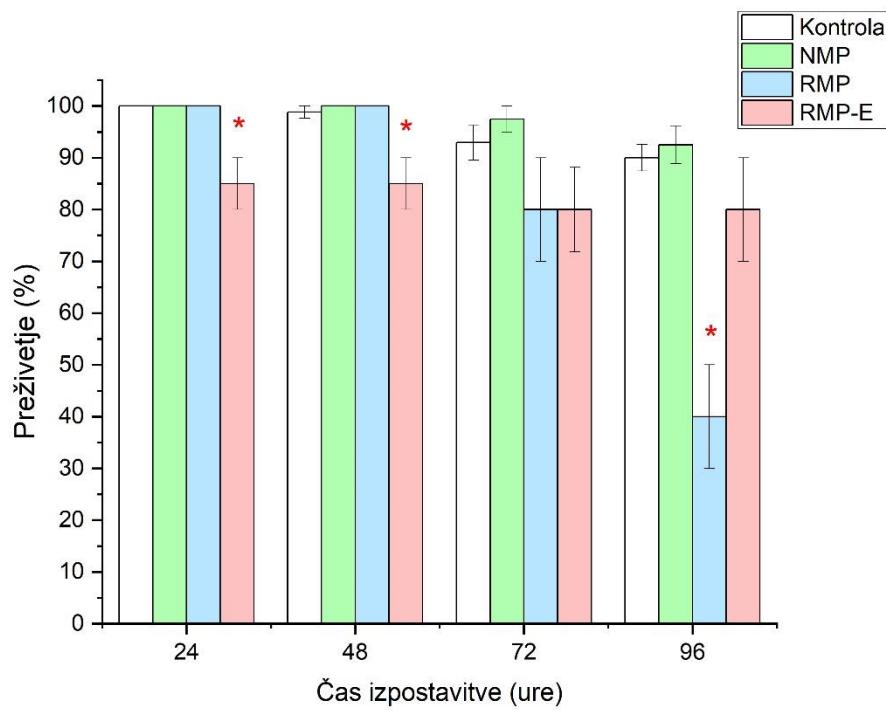
Po 24 urah so se edine opazne spremembe zgodile v mediju z RMP-E, kjer se je odstotek preživetja organizmov značilno zmanjšal za 15 %, v primerjavi s kontrolo.

Po 48 urah je, glede na rezultate po 24-urni izpostavitevi, stanje ostalo dokaj nespremenjeno. Značilno zmanjšano preživetje je v primeru RMP-E, v primerjavi s kontrolo.

Po 72 urah sta se zmanjšala odstotka preživetja v mediju z NMP in RMP. V obeh sta znašala 80 %, v primerjavi s kontrolo.

Po 96 urah je odstotek preživetja v mediju z NMP znašal med 90 % in 95 %. Značilno manjše preživetje vodnih bolh je bilo v mediju z RMP (le 40 %). Število živih organizmov v mediju z RMP-E je ostalo enako kot po 72-urni izpostavitevi.

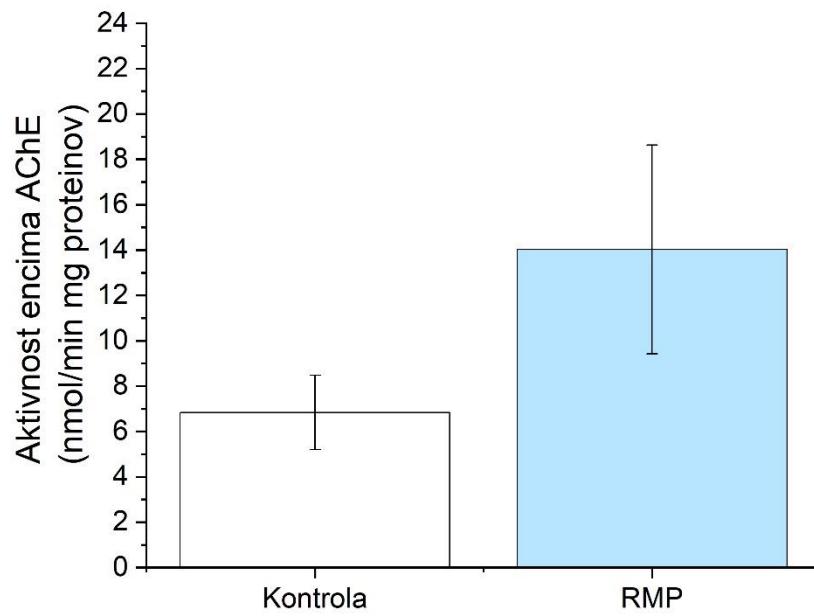
Odstotek preživelih vodnih bolh v kontrolah se je po 72 in 96 urah rahlo zmanjšal, kar pa je še znotraj dovoljenih mej veljavnega poskusa.



Graf 7: Preživetje mladih vodnih bolh po različnih trajanjih izpostavitve izlužkom mikroplastike, pripravljenih iz 100 mg/L NMP, RMP in RMP-E.

4.8. Aktivnost encima acetilholinesteraza v odraslih vodnih bolhah po 96 urah izpostavitve rabljeni mikroplasti

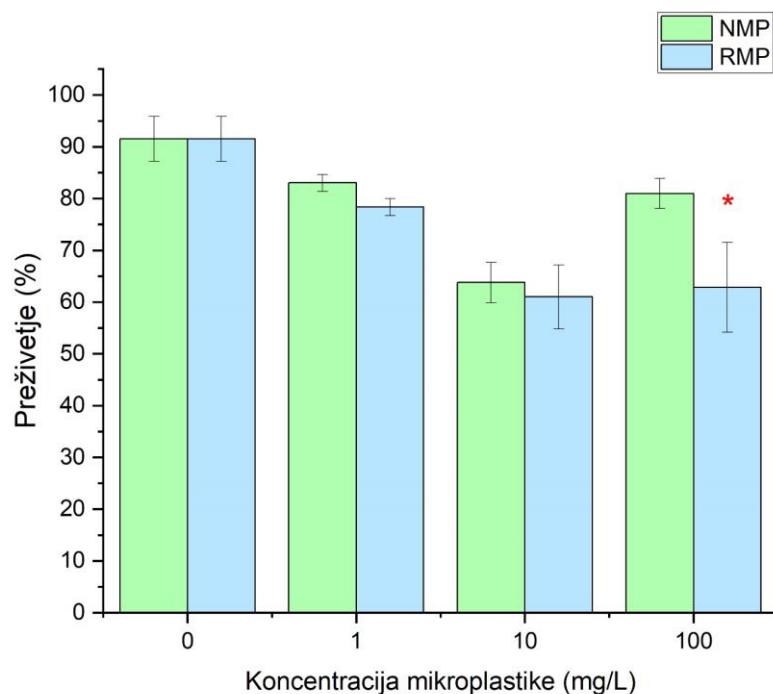
Aktivnosti encima acetilholinesteraze je bila v odraslih vodnih bolhah, ki so bile 96 ur izpostavljene 100 mg/L RMP, rahlo povečana v primerjavi s kontrolo (Graf 8).



Graf 8: Aktivnost encima acetilholinesteraza v odraslih vodnih bolhah po 96 urah izpostavitve 100 mg/L RMP.

4.9. Preživetje kotačnikov po 24 urah izpostavitve mikroplastiki

Preživetje kotačnikov upade po 24 urah izpostavitve v primeru vseh testiranih koncentracij mikroplastik, tj. NMP in RMP. Rahel upad v preživetju smo zaznali tudi pri kontrolah (0 mg/L) (Graf 9), vendar pa je slednje še znotraj mej dopustnega. Najmanj preživelih organizmov je bilo pri koncentraciji 10 mg/L (60-70 %). Iz Grafa 9 je razvidno, da je na preživetje kotačnikov najbolj vplivala RMP, ki je pri koncentraciji 100 mg/L izzvala značilen upad preživetja kotačnikov v primerjavi s kontrolo.



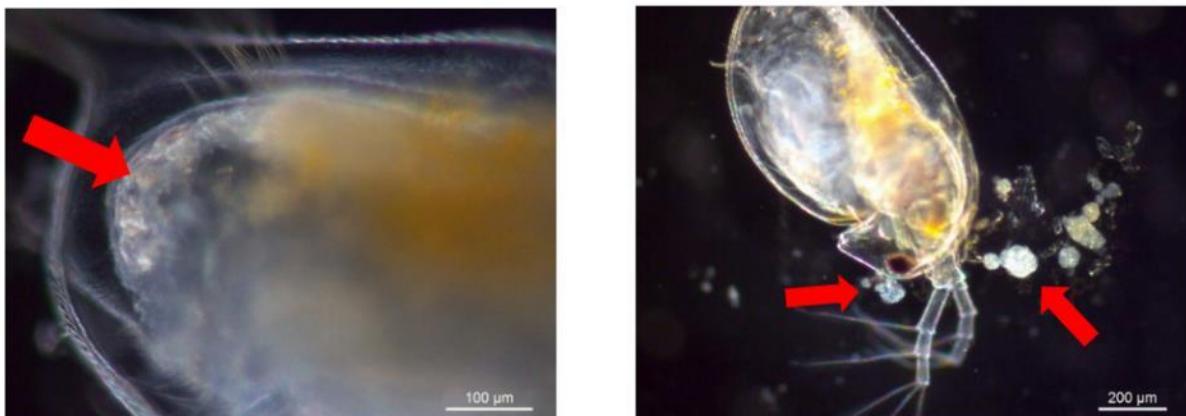
Graf 9: Preživetje kotačnikov po 24 urah izpostavitve mikroplastiki.

4.10. Detekcija mikroplastike v črevesju in na površini vodnih bolh po 48 urah izpostavitve RMP

Vodne bolhe zaužijejo delce mikroplastike že po 48-urni izpostavitvi (Slike 34 in 35), hkrati pa se delci plastike adsorbirajo na površino vodnih bolh ter tako otežujejo gibanje organizma (Slika 35).



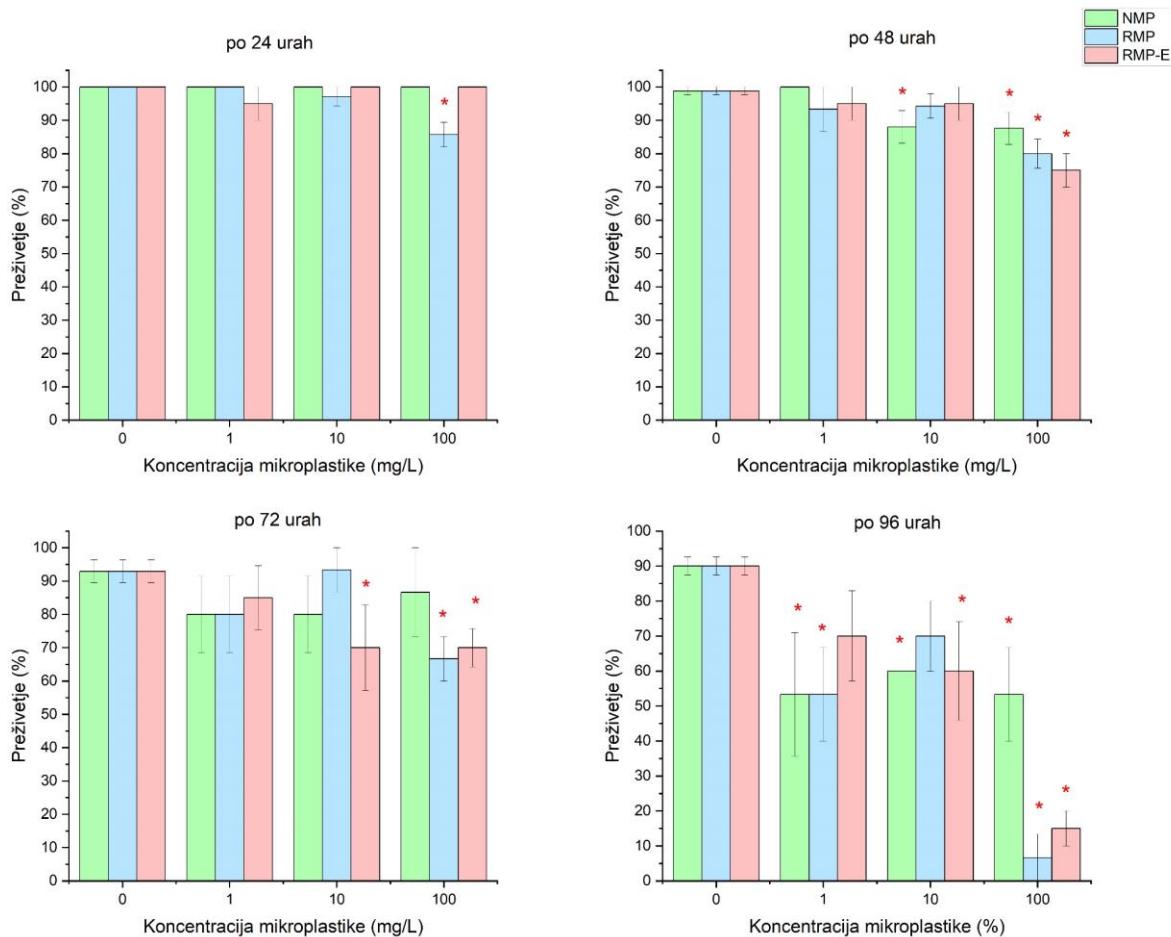
Slika 34: Vodna bolha po 48 urni izpostaviti rabljeni mikroplastiki (Avtor: Neža Novak in Tristan V. Baš).



Slika 35: Mikroplastika v prebavnem sistemu, črevesju, vodne bolhe (levo, rdeča puščica) in na površini, tj. antenah (desna slika, rdeča puščica) (Avtor: Neža Novak in Tristan V. Baš).

5. ANALIZA REZULTATOV

5.1. Primerjava vpliva izpostavitve vodnih bolh mikroplastiki po različnih trajanjih izpostavitve



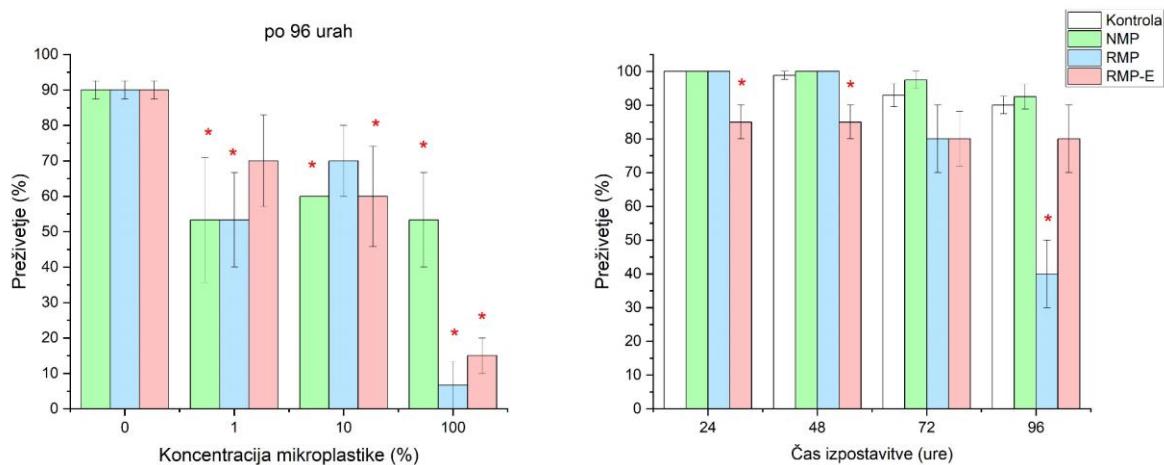
Graf 10: Združeni rezultati preživetja mladih vodnih bolh po različnih trajanjih izpostavitve pokajeni in nepokajeni mikroplastiki iz cigaretnih filtrov.

Z izpostavitvijo vodnih bolih mikroplastiki iz nerabljenih in rabljenih filtrov navadnih cigaret in rabljenih filtrov elektronskih cigaret smo ugotovili, da so se minimalne spremembe v odstotku preživetja organizmov izpostavljenih pokajenim filtrom začele izražati že po 24-urni izpostavitvi, pri najvišji koncentraciji RMP (Graf 10). Ob primerjavi rezultatov preživetja po 48, 72 in 96-urni izpostavitvi mikroplastiki smo opazili, da odstotek preživetja vodnih bolih upade sorazmerno s povečevanjem koncentracije mikroplastike. Hkrati se učinek mikroplastike, tj. zmanjšano preživetje vodnih bolih pri daljših trajanjih izpostavitve, izrazi že tudi pri nižjih testiranih koncentracijah. Večjo smrtnost smo opazili pri mikroplastiki iz rabljenih navadnih in elektronskih cigaret, kar nakazuje na močan vpliv sestavin cigaretnih filtrov, zlasti pokajenih, na delovanje organizma. Rabljeni cigaretni filtri nase vežejo toksične spojine, kot so strupeni alkaloid nikotin, težke kovine (kadmij, cink, arzen, nikelj, baker, svinec), nitrozamini, policiklični aromatski ogljikovodiki, insekticidi in fenoli. Te spojine v

celicah povzročajo oksidativne procese, ki poškodujejo celice. Manjši kot je organizem, večji je učinek in posledično hitrejši propad organizma.

Znano je, da vodne bolhe zaužijejo mikroplastiko, ki se kopiči v njihovem črevesju (Jemec Kokalj in sod., 2016), podobno pa smo dokazali tudi v naši raziskavi. In sicer so vodne bolhe, ki so bile izpostavljene mikroplastiki, zaužile delce mikroplastike, ki se kopičijo v prebavnem traktu, na njihovih antenah in torakalnih okončinah (Slike 34 in 35). Mikroplastika pri organizmih povzroči občutek sitosti oziroma blokado črevesja in mehanske poškodbe, česar mi nismo preučili. Domnevamo pa, da plastični delci kot tudi kemikalije poškodujejo črevesne celice, kar je lahko razlog za opaženo povečano smrtnost pri vodnih bolhah.

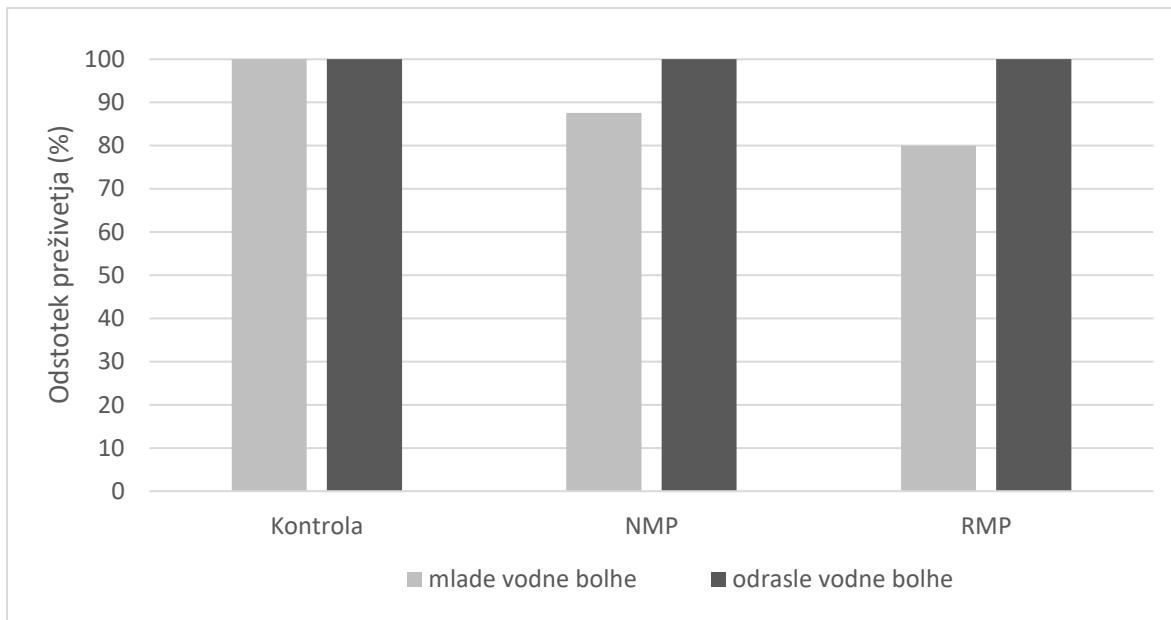
5.2. Primerjava rezultatov izpostavitve mladih vodnih bolh mikroplastiki z vezanimi toksičnimi snovmi in izlužki mikroplastike po 96 urah in pri koncentraciji 100 mg/L



Graf 11: Primerjava preživetja vodnih bolh po izpostavitvi mikroplastiki (levo) in izlužkom mikroplastike (desno), pri najvišji koncentraciji 100 mg/L in po 96 urah.

Pri opazovanju obeh grafov smo se osredotočili na rezultate pridobljene po 96 urah pri koncentraciji 100 mg/L, saj smo predvidevali, da bodo učinki na organizem stvarnejši pri višjih koncentracijah mikroplastike in izlužkov (Graf 11). Vpliv mikroplastike na preživetje vodnih bolh je večji kot vpliv zgolj izlužkov mikroplastike. To smo dokazali s primerjavo odstotka preživetja v medijih z izlužki NMP in delci NMP, kjer opazimo očitno razliko. Več preživelih vodnih bolh je bilo v mediju z izlužki NMP, kar lahko pripisemo zmanjšani vsebnosti toksičnih snovi v NMP, saj le-te nastajajo pri kajenju. Pri vodnih bolhah, ki so bile izpostavljene v mediju z delci NMP, je bil odstotek preživetja občutno manjši. To razliko lahko pojasnimo z že prej opisanimi škodljivimi učinki delcev mikroplastike na organizme. Za najškodljivejšo kombinacijo se je izkazala hkratna izpostavljenost delcem RMP skupaj in njihovim izlužkom. Filtri elektronskih cigaret so se izkazali za manj škodljive, kar lahko pripisemo prisotnosti katrana in nekaterih toksičnih snovi, ki nastajajo zgolj pri kajenju navadnih cigaret.

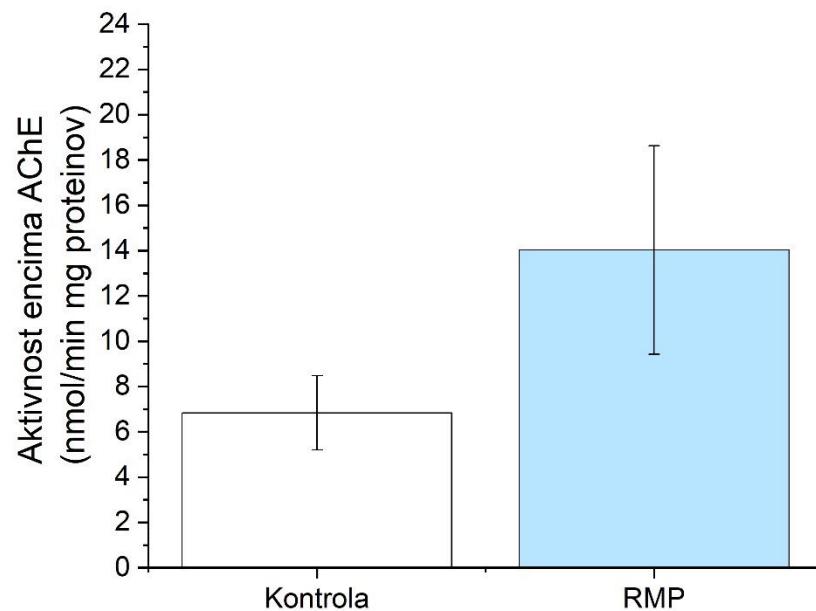
5.3. Primerjava preživetja mladih in odraslih vodnih bolh po 48 urah izpostavitve 100 mg/L mikroplastike



Graf 12: Primerjava preživetja mladih in odraslih vodnih bolh po 48 urah izpostavitve 100 mg/L mikroplastike.

Odrasle vodne bolhe in mlade vodne bolhe smo prenesli v dva različna medija s koncentracijo 100 mg/L mikroplastike in v kontrolni medij, kjer mikroplastika ni bila prisotna. Po 48-urni izpostavitevi se je pokazalo, da je višja smrtnost nastopila pri mladih, 24-ur starih vodnih bolhah, izpostavljenim RMP in NMP (Graf 12). V populaciji starih vodnih bolh nismo zabeležili nobene smrti tako pri NMP kot RMP, kar nakazuje mnogo večjo odpornost na delce mikroplastike in toksične snovi, ki so vezane nanje. Očitno so mlajši in manjši organizmi dovetnejši za negativne učinke mikroplastike.

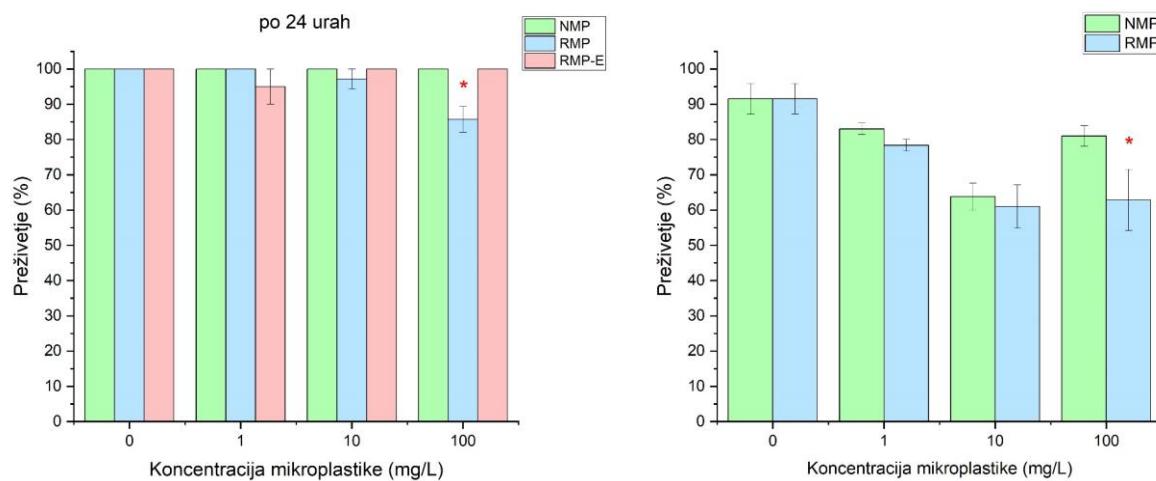
5.4. Vpliv 96-urne izpostavitve rabljeni mikroplasti na aktivnost encima acetilholinesteraza pri odraslih vodnih bolhah



Graf 13: Aktivnost encima acetilholinesteraze (AChE) v odraslih vodnih bolhah po 4-dnevni izpostavitvi RMP.

Encim AChE je zadolžen za razgradnjo nevrotransmitorja acetilholina, po tem ko se ta veže na beljakovinske receptorje v sinapsah živčnega sistema organizmov. Isti princip delovanja je znan tudi pri vodnih bolhah. Nastajanje encima je odvisno od potrebe po razgradnji količine vezanih nevrotransmitorjev. Če pa se na beljakovinske receptorje vežejo acetilholin podobne snovi, kot je na primer nikotin, se bo telo odzvalo tako, da bo povečalo proizvodnjo encima za razgradnjo acetilholina, oziroma v konkretnem primeru nikotina, vendar reakcija razgradnje ne poteče (Graf 13). Vezani nikotin tako povzroči stalno vzdraženost živčne celice. Navedeni pojav smo na vodnih bolhah opazili kot trzajoče nenadzorovano gibanje. Kasneje so prešle v fazo mirovanja, po kateri je pogosto nastopila smrt, domnevamo, da zaradi paralize in pomanjkanja energije. Na ta način lahko razložimo vse naše dobljene rezultate, predvsem negibljivost v primeru RMP in RMP-E in povečan odstotek smrtnosti v medijih z izlužki RMP in RMP-E, v katerih je bil prisoten nikotin.

5.5. Primerjava preživetja mladih vodnih bolh in kotačnikov po 24 urah izpostavitve mikroplastiki



Graf 14: Primerjava preživetja mladih vodnih bolh (levo) in kotačnikov (desno) po 24 urah izpostavitve mikroplastiki.

Ko primerjamo zgornja grafa (Graf 14) ugotovimo, da je odstotek preživetja kotačnikov po 24 urah najbolj padel v mediju z RMP. Najbolj očitna razlika med grafoma je vidna pri koncentracijah 10 in 100 mg/L. V gojiščih s kotačniki je bil odstotek smrtnosti bistveno večji kot pri vodnih bolhah. Razliko med odstotkoma smrtnosti lahko pripisemo manjši velikosti kotačnikov (manj kot 0,2 mm) v primerjavi z vodnimi bolhami (> 0.5 mm). Manjši, kot je organizem, bolj ga delci mikroplastike in nanje vezane toksične snovi prizadenejo. Na grafu to opazimo v nižjem preživetju v mediju z RMP v primerjavi s tistimi z NMP. Razliko med preživetjema lahko pripisemo nikotinu in ostalim strupenim snovem, ki so prisotne v medijih z RMP. Te snovi, kot je opisano v poglavju 5.1, negativno vplivajo na preživetje organizmov.

6. VREDNOTENJE HIPOTEZ

1. Mikroplastika iz cigaretnih filtrov vpliva na preživetje poskusnih organizmov, tj. vodnih bolh in kotačnikov. **POTRJENO!**

Rezultati so pokazali, da so organizmi, ki so bili izpostavljeni mikroplastiki iz cigaretnih filtrov, v primerjavi s kontrolami pogosteje pokazali znake zmanjšane aktivnosti in preživetja.

2. Preživetje poskusnih organizmov v primeru izpostavitve mikroplastiki iz filtrov rabljenih cigaret je nižje kot v primeru izpostavitve mikroplastiki iz filtrov nerabljenih cigaret in kontrolo. **POTRJENO!**

Odstotek smrtnosti pri vodnih bolhah je, sledeč rezultatom naloge, višji pri organizmih, ki so bili izpostavljeni rabljeni mikroplastiki v primerjavi z organizmi, izpostavljenimi nerabljeni mikroplastiki in kontroli.

3. Mikroplastika iz filtrov rabljenih elektronskih cigaret ima podoben vpliv na poskusne organizme kot mikroplastika iz filtrov rabljenih navadnih cigaret, a večji vpliv kot pa mikroplastika iz filtrov nerabljenih navadnih cigaret. **POTRJENO!**

Z eksperimenti smo dokazali, da je odstotek smrtnosti v mediju z rabljeno mikroplastiko navadnih in rabljeno mikroplastiko iz elektronskih cigaret približno enak in nekoliko večji v primerjavi z organizmi, ki so bili izpostavljeni nerabljeni mikroplastiki.

4. Kemikalije, ki se izlužujejo iz mikroplastike iz cigaretnih filtrov vplivajo na preživetje poskusnih organizmov. **POTRJENO!**

Raziskave so pokazale, da izlužki mikroplastike negativno vplivajo na preživetje vodnih bolh (zmanjšal se je odstotek preživetja).

5. Izpostavitev mikroplastiki iz filtrov pokajenih cigaret vpliva na aktivnost encima acetilholinesteraze v vodnih bolhah. **POTRJENO!**

Po 96 urah je bila, v primerjavi z vodnimi bolhami iz kontrolne skupine, aktivnost encima acetilholinesteraze rahlo povečana pri organizmih, ki so bili izpostavljeni mikroplastiki iz rabljenih cigaretih filtrov.

6. Populacija preiskovanih organizmov v gojišču samo z medijem, brez vsebnosti mikroplastike iz cigaretnih filtrov, se bo dobro razvila in spolno dozorela. **POTRJENO!**

Organizmi, ki so bili izpostavljeni v mediju brez vsebnosti mikroplastike, so se normalno razvili in spolno dozoreli.

7. ZAKLJUČEK

Raziskava je pokazala presenetljive, a vendar pričakovane rezultate. Večja smrtnost se je pojavila pri organizmih, ki so bili izpostavljeni v mediju z mikroplastiko ali izlužki mikroplastike iz cigaretnih filtrov. Opazen upad v odstotku preživetja je bil viden zlasti v mediju z mikroplastiko iz pokajenih cigaretnih filtrov. Pojav lahko pripisemo toksičnim spojinam, ki se med kajenjem vežejo na filter iz celuloze acetata in se v stiku z vodo sproščajo v vodno okolje (v našem primeru v medij). Negativne učinke strupenih snovi, ki se sproščajo v vodo, smo dokazali v eksperimentu, v katerem so bili organizmi izpostavljeni v mediju z izlužki mikroplastike. Rezultati so pokazali, da se je odstotek preživetja po 72 urah v mediju z izlužki RMP zmanjšal za 20 % in v naslednjih 24 urah še za dodatnih 40 %. Če primerjamo te rezultate z rezultati iz medija z delci mikroplastike (NMP, RMP) pri koncentraciji 100 mg/L (pri isti koncentraciji so bili izvedeni testi z izlužki), opazimo podoben, oziroma še bolj drastičen upad v odstotku preživetja, ki je po 72 urah znašal 70 % in po 96 urah le še 15 %. Izrazit upad odstotka preživetja v mediju z delci RMP po 96 urah je posledica sočasne prisotnosti toksičnih snovi in mikroplastike.

Delci mikroplastike so, kot kažejo fotografije (slike 34 in 35), vstopili v prebavni trakt vodnih bolh. Raziskava je dokazala, da prisotnost delcev mikroplastike škoduje organizmom in posledično zmanjša njihovo preživetje. Zelo nazorno je to prikazano na primeru izlužkov NMP, kjer je bila smrtnost zanemarljiva v primerjavi z medijem z delci NMP.

Med primerjavo delovanja encima acetilholinesteraze (AChE) pri vodnih bolhah izpostavljenih v mediju brez vsebnosti mikroplastike in tistih, ki so bile v stiku z RMP, smo pri slednjih opazili povišano aktivnost encima. Ta pojav smo pripisali nikotinu, nevrotransmisorju acetilholinu podobni snovi, ki se je sposoben vezati na nikotinske acetilholinske beljakovinske receptorje. Ti se nahajajo v živčnih sinapsah in so prvotno namenjeni vezavi acetilholina. Povišano delovanje encima je povezano z njegovimi domnevno neuspešnimi poskusi razgradnje nikotina, katerega stalna vezava na receptorje sproži dolgotrajno vzdraženost živčne celice. To se je sčasoma odražalo v neobičajnem premikanju in na koncu mirovanju vodnih bolh.

V eksperiment smo vključili tudi kotačnike. Ker gre za organizme, ki so veliko manjši od vodnih bolh, je bilo delo z njimi zahtevnejše, vidni rezultati zmanjšanja preživetja pa so se pokazali že po 24 urah tudi že pri nižjih koncentracijah.

Velikost organizma je bila ključen dejavnik za višji odstotek preživetja tudi v poskusu, v katerem smo različnim koncentracijam mikroplastike izpostavili odrasle (7 dni stare) vodne bolhe. Po 48 urah v populaciji ni prišlo do smrti niti ene od njih.

Sklepamo lahko, da so vrsta mikroplastike s pridruženimi kemikalijami, koncentracija te mikroplastike in velikost, oziroma starost organizma poglavitni dejavniki pri vplivu na preživetje vodnih bolh in kotačnikov. Naše ugotovitve lahko postavimo v širši kontekst in si skušamo zamisliti prisotnost mikroplastike v celotnem ekosistemu. Modelni organizmi, na katerih smo izvajali eksperimente, so porabniki na začetku prehranjevalne verige. Predvsem vodne bolhe predstavljajo hrano številnim drugim živalim. V primeru, da je potencialna hrana višjih porabnikov nasičena s katerokoli toksično snovjo, na primer z mikroplastiko in z nanjo

vezanimi kemikalijami, se lahko te strupene snovi in njihovi negativni učinki prenašajo po prehranjevalni verigi. Tako lahko drobni delci mikroplastike dosežejo organizme na višjih trofičnih nivojih. V vodnem ekosistemu so med najbolj izpostavljenimi bitji ribe, te pa se pogosto znajdejo tudi na naših krožnikih. Vpliv mikroplastike na človeka še vedno velja za pretežno neraziskano področje, vemo pa, da so bili mikroplastični delci že najdeni v človeški krvi, v pljučih in v blatu novorojenčkov (Junjie Zhang in sod., 2021). Tam se je lahko znašla zaradi vdihavanja delcev prisotnih v zraku ali zaužitja mikroplastike preko vode, ki jo pijemo, oziroma hrane, ki jo uživamo. Najbolj zaskrbljujoče posledice predstavljajo kemikalije, ki so vezane na delce mikroplastike, kar smo dokazali tudi z našim eksperimentom.

Ker mikroplastika postaja vse bolj pereč problem, si številne institucije in raziskave prizadevajo k večji ozaveščenosti splošnega prebivalstva. V naši raziskovalni nalogi smo pod drobnogled vzeli mikroplastiko iz cigaretnih filtrov. Ti veljajo za enega najpogostejših odpadkov na svetu in so v naravi in urbanem okolju pogosto spregledani, celo sprejemljivi. Z rezultati, ki so nam jih dali eksperimenti, želimo opozoriti na nevarnost nepravilno odvrženih cigaretnih ogorkov in filtrov navadnih ter elektronskih cigaret, saj so se sprememb v odstotku preživetja modelnih organizmov pojavljale pri obeh vrstah cigaret. Zaradi prepovedi kajenja v notranjih prostorih in dostopnosti tobačnih izdelkov, je kadilcev vedno več, s tem pa se je povečala tudi količina cigaretnega odpada. Potrebno je najti način, da le ta ne bo pristal v naravi in postal del ekosistema in prehranjevalne verige, na koncu katere smo ljudje. Vložiti bi morali veliko truda v izobraževanje družbe ne le o negativnih posledicah uporabe tobačnih izdelkov, temveč tudi o njihovem pravilnem odlaganju v za to namenjene zabojnike. Ponekod po svetu na javnih mestih nameščajo požarnovarne posode za odlaganje ogorkov in k ceni zavojčka cigaret prištejejo še odstotek za stroške čiščenja. Znanstveniki in inženirji iz različnih področij iščejo rešitve za ustrezno reciklažo cigaretnih ogorkov. Za predelavo cigaretnega ogorka je potrebno cigaretto razpoloviti na dva dela. Organski material, kot so pepel, tobak in papir, se kompostira. Iz njega ponekod izdelujejo gnojila. Iz mletih cigaretnih filtrov je mogoče ustvariti nov plastični material in ga združiti z drugimi vrstami plastike (na primer polietilenom in polipropilenom). Novonastala snov se lahko uporabi v številnih plastičnih izdelkih. V Franciji so našli način, da iz vlaken cigaretnih ogorkov izdelajo jopiče in klopi. Še posebej inovativne so zamisli o uporabi cigaretnih ogorkov v gradbeništvu. Žganje ogorkov v opeke je zanimiv način reševanja tega okoljskega problema, ki naj bi hkrati znižal proizvodne stroške za izdelavo opeke.

Naša raziskovalna naloga služi kot dokaz, da so cigaretni filtri vir mikroplastike, ki se sprošča v okolje, problematičen odpadek in da je nujno ukrepanje proti smetenju s katerokoli mikroplastiko. Pri tem iga ključno vlogo ozaveščenost kadilcev in izvajanje reciklaže. Potrebno je poudariti tudi to, da organizmi, kot so vodne bolhe in kotačniki, predstavljajo pomemben člen v ekosistemih po vsem svetu in da nam njihov odziv na mikroplastiko iz cigaretnih filtrov sporoča, da lahko propad teh preprostih organizmov sprožijo tudi druga okoljska onesnaževala, katerih učinkov se morda danes sploh še ne zavedamo.

8. VIRI

1. Register, M. K. Cigarette Butts as Litter - Toxic as Well as Ugly. <http://www.longwood.edu/cleanva/ciglitterarticle.htm> (pridobljeno 3. 2. 2023).
2. Belzgui, F., Buscio, V., Gutiérrez-Bouzán, C., & Vilaseca, M. (2021). Cigarette Butts as a microfiber source with a microplastic level of concern. *Science of The Total Environment*, 762, 144165. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144165>.
3. Frydkjær, C. K., Iversen, N., & Roslev, P. (2017). Ingestion and egestion of microplastics by the Cladoceran *Daphnia magna*: Effects of regular and irregular shaped plastic and sorbed phenanthrene. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(6), 655–661. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2186-3>.
4. De Felice, B., Sabatini, V., Antenucci, S., Gattoni, G., Santo, N., Bacchetta, R., Ortenzi, M. A., & Parolini, M. (2019). Polystyrene microplastics ingestion induced behavioral effects to the cladoceran *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 231, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.115>.
5. Hylton, C.A., Tsui, M.TK. (2021). Alteration of acute toxicity of inorganic and methyl mercury to *Daphnia magna* by dietary addition. *Sci Rep* 11, 22865. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02300-4>.
6. Eltemsah, Y. S., & Bohn, T. (2019). Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 254, 112919. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.087>.
7. Fei, P., Liao, L., Cheng, B., & Song, J. (2017). Quantitative analysis of cellulose acetate with a high degree of substitution by FTIR and its application. *Analytical Methods*, 9(43), 6194–6201. <https://doi.org/10.1039/c7ay02165h>.
8. George, M., & Khadtar, R. (2022). Review on Recycling of Microplastics in Cigarette Butts. *IOP Conference Series*, 1084(1), 012027. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1084/1/012027>.
9. Jemec, A., Horvat, P., Kunej, U., Bele, M., & Kržan, A. (2016). Uptake and effects of microplastic textile fibers on freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 219, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.037>.
10. Joly, F., & Coulis, M. (2018). Comparison of cellulose vs. plastic cigarette filter decomposition under distinct disposal environments. *Waste Management*, 72, 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.023>.

11. Kurmus, H., & Mohajerani, A. (2020). The toxicity and valorization options of cigarette butts. *Waste Management*, 104, 104–118. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.01.011>.
12. Canniff, P. M., & Hoang, T. C. (2018). Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth. *Science of the Total Environment*, 633, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.176>.
13. Schwarzer, M., Brehm, J., Vollmer, M., Jasinski, J., Xu, C., Zainuddin, S., Fröhlich, T., Schott, M., Greiner, A., Scheibel, T., & Laforsch, C. (2021). Shape, size, and polymer dependent effects of microplastics on *Daphnia magna*. *Journal of Hazardous Materials*, 426, 128136. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128136>.
14. Shen, M., Li, Y., Song, B., Zhou, C., Gong, J., & Zeng, G. (2021). Smoked cigarette butts: Unignorable source for environmental microplastic fibers. *Science of the Total Environment*, 791, 148384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148384>.
15. Parmentier, J., & van Egmond Wim (1999). Water fleas. <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artjun99/wflea.html>.
16. Bonanomi, G., Incerti, G., Cesarano, G., Gaglione, S., & Lanzotti, V. (2015). Cigarette butt decomposition and associated chemical changes assessed by ¹³C CPMAS NMR. *PLOS ONE*, 10(1), e0117393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117393>.
17. Kadir, A. A., & Sarani, N. A. (2015). Cigarette Butts Pollution and Environmental Impact – A Review. *Applied Mechanics and Materials*, 773–774, 1106–1110. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amm.773-774.1106>.
18. CleanVirginiaWaterways. (n.d.). <http://www.longwood.edu/cleanva/>.
19. Torkashvand, J., Farzadkia, M., Sobhi, H. R., & Esrafili, A. (2020). Littered cigarette butt as a well-known hazardous waste: A comprehensive systematic review. *Journal of Hazardous Materials*, 383, 121242. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121242>.
20. Novotny, T.E., Slaughter, E. Tobacco Product Waste: An Environmental Approach to Reduce Tobacco Consumption. *Curr Envir Health Rpt* 1, 208–216 (2014). <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0016-x>.
21. Dobaradaran, S., Schmidt, T. C., Kaziur-Cegla, W., & Jochmann, M. A. (2021). BTEX compounds leachates from cigarette butts into water environment: A primary study. *Environmental Pollution*, 269, 116185. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116185>.
22. Carmines, E. (2002). Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 1: Cigarette design, testing approach, and review of results. *Food and Chemical Toxicology*, 40(1), 77–91. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(01\)00084-9](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(01)00084-9).

23. Grana, R., Benowitz, N. L., & Glantz, S. A. (2014). E-Cigarettes. *Circulation*, 129(19), 1972–1986. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.114.007667>.
24. Lerner, C. A., Sundar, I. K., Watson, R. T., Elder, A., Jones, R. M., Done, D. H., Kurtzman, R., Ossip, D. J., Robinson, R. J., McIntosh, S. W., & Rahman, I. (2015). Environmental health hazards of e-cigarettes and their components: Oxidants and copper in e-cigarette aerosols. *Environmental Pollution*, 198, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.033>.
25. Montalvão, M. F., Chagas, T. Q., Da Silva Alvarez, T. G., Mesak, C., Da Costa Araújo, A. P., Gomes, A. S., De Andrade Vieira, J. E., & Malafaia, G. (2019). How leachates from wasted cigarette butts influence aquatic life? A case study on freshwater mussel *Anodontites trapesiali*. *Science of the Total Environment*, 689, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.385>.
26. Quéméneur, M., Chifflet, S., Akrout, F., Bellaaj-Zouari, A., & Belhassen, M. (2020). Impact of cigarette butts on microbial diversity and dissolved trace metals in coastal marine sediment. *Estuarine Coastal and Shelf Science*; Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106785>.
27. Chevalier, Q., Hadri, H. E., Petitjean, P., Coz, M. B., Reynaud, S., Grassl, B., & Gigault, J. (2018). Nano-litter from cigarette butts: Environmental implications and urgent consideration. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.158>.
28. Hoffmann, D., Djordjevic, M. V., & Hoffmann, I. E. (1997). *Preventive Medicine*. Elsevier. <https://doi.org/10.1006/pmed.1997.0183>.
29. Elenbaas, M. (2013). "Daphnia magna" (On-line), Animal Diversity Web. https://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/.
30. Ebert, D. Daphnia as a versatile model system in ecology and evolution. (2022) *EvoDevo* 13, 16. <https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0>.
31. Reynolds, C. S. (2011). Daphnia: development of model organism in ecology and evolution-2011. *Freshwater Reviews*, 4(1), 85-87. <https://doi.org/10.1608/FRJ-4.1.425>.
32. Ebert, D. (2005). Introduction to Daphnia Biology. *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia* - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>.
33. *Daphnia magna* Straus, 1820. (n.d.-e). <https://www.gbif.org/species/2234822>.
34. *Daphnia magna* Straus, 1820. <https://www.gbif.org/species/165415499>.

35. Brain Sizes and Cognitive Abilities of Micrometazoans. (n.d.-c). <https://reducing-suffering.org/microinvertebrate-brains/>.
36. Introduction to the Rotifera. (n.d.).
<https://ucmp.berkeley.edu/phyla/rotifera/rotifera.html>.
37. E, B. (2022). Mikroplastika: »nevیدni«sovražnik okolja | Bodi eko. Bodi Eko Spletno Mesto Za Zdrav Življenjski Slog. <https://www.bodieko.si/mikroplastika>.
38. Masura, J. (2015). Laboratory methods for the analysis of microplastics in the marine environment : recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments. <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/10296>.
39. Kosovsky, L. (n.d.). The Chemical Characterization of Microplastic Polymer Composition from Various Littoral Environments on Cape Cod, Massachusetts. Digital Commons Connecticut College. <https://digitalcommons.conncoll.edu/chemhp/32>.
40. Uurasjärvi, E., Hartikainen, S., Setälä, O., Lehtiniemi, M., & Koistinen, A. (2020). Microplastic concentrations, size distribution, and polymer types in the surface waters of a northern European lake. Water Environment Research, 92(1), 149–156. <https://doi.org/10.1002/wer.1229>.
41. Lovšin, M. K. V. M. N. (n.d.). Mikroplastika onesnažuje tudi slovensko morje. <https://old.delo.si/znanje/znanost/mikroplastika-onesnazuje-tudi-slovensko-orje.html>.
42. Panjan, J. (2016). Ugotavljanje koncentracij mikroplastike v slovenskih vodotokih in jezerih. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=slv&id=83781>.
43. NIJZ, Pridobljeno s <https://nijz.si/>.
44. Millar, N. S., & Denholm, I. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. Invertebrate Neuroscience, 7(1), 53–66. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10158-006-0040-0>.
45. Acetilholinesteraza - Wiki FKKT. (n.d.).
<http://wiki.fkkt.unilj.si/index.php/Acetilholinesteraza>.
46. Plošnik, P. (2010) Lipidna peroksidacija kot pokazatelj stresa pri modelnem organizmu *Porcellio scaber* zaradi imidakloprida v hrani. <https://www2.ung.si/~library/diplome/OKOLJE/64Plosnik.pdf>.
47. Crossthwaite, A. J., Bigot, A., Camblin, P., Goodchild, J. T., Lind, R. H., Slater, R., & Maienfisch, P. (2017). The invertebrate pharmacology of insecticides acting at nicotinic acetylcholine receptors. Journal of Pesticide Science, 42(3), 67–83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6183333/#R14>.

48. Birsa, T. Poletna aktivnost acetilholinesteraze, Glutation-s-transferaze in katalaze v klapavicah (*Mytilus galloprovincialis*) iz slovenskega morja. <https://www2.ung.si/~library/diplome/OKOLJE/142Birsa.pdf>.
49. Marinello S., Lolli F., GamberiniR., Rimini B. (2020). A second life for cigarette butts? A review of recycling solutions, Journal of Hazardous Materials, 384, art. no. 121245, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121245>.
50. Zhang, J., Wang, L., Trasande, L., & Kannan, K. (2021). Occurrence of polyethylene terephthalate and polycarbonate microplastics in infant and adult feces. Environmental Science & Technology Letters, 8(11), 989-994. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.1c00559>.
51. Jemec, A., Drobne, D., Tišler, T., Trebše, P., Ros, M., & Sepčić, K. (2007). The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology, 144(4), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.10.002>.
52. Gambardella C, Morgana S, Ferrando S, Bramini M, Piazza V, Costa E, Garaventa F, Faimali M. (2017). Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans. Ecotoxicol Environ Saf. Nov;145:250-257. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28750293/>.
53. Rist S, Baun A, Hartmann NB. (2017). Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. Environ Pollut. ;228:398-407. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28554029/>.
54. Rehse S, Kloas W, Zarfl C. (2016). Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. Chemosphere ;153:91-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27010171/>.
55. Viršek, M. K. (n.d.). Pri mikroplastiki še veliko neznank. <https://www.delo.si/novice/znanoteh/pri-mikroplastiki-se-veliko-neznank/>.
56. Rosenkranz P, Chaudhry Q, Stone V, Fernandes TF. (2009). A comparison of nanoparticle and fine particle uptake by *Daphnia magna*. Environ Toxicol Chem.; 28(10):2142-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19588999/>.
57. Frydkjær CK, Iversen N, Roslev P. (2017). Ingestion and Egestion of Microplastics by the Cladoceran *Daphnia magna*: Effects of Regular and Irregular Shaped Plastic and Sorbed Phenanthrene. Bull Environ Contam Toxicol. 99(6):655-661. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29027571>.

58. Watts AJ, Lewis C, Goodhead RM, Beckett SJ, Moger J, Tyler CR, Galloway TS. (1014). Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. Environ Sci Technol;48(15):8823-30.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24972075/>.
59. Wagner, M., & Lambert, S. R. (2018). Freshwater Microplastics. The Handbook of Environmental Chemistry. <Https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5>.
60. Cole, M. T., Lindeque, P., Fileman, E. S., Halsband, C., Goodhead, R. M., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic Ingestion by Zooplankton. Environmental Science & Technology, 47(12), 6646–6655. <https://doi.org/10.1021/es400663f>.
61. Torkashvand, J., Farzadkia, M., Sobhi, H. R., & Esrafili, A. (2020). Littered cigarette butt as a well-known hazardous waste: A comprehensive systematic review. Journal of Hazardous Materials, 383, 121242. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121242>.
62. Neubauer, S. (2022, Oktober 6). Mikroplastiko v toči prvič odkrili v Sloveniji. N1. <https://n1info.si/novice/slovenija/mikroplastika-z-neba-slovenski-znanstveniki-so-joprvi-na-svetu-nasli-v-toci>.
63. Centa, M., (2016). Ugotavljanje koncentracij mikroplastike v slovenskih vodotokih in jezerih. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo. (mentor Panjan, J., somentor Drev, D.): 115 str.
64. Hartmann NB, Hüffer T, Thompson RC, Hassellöv M, Verschoor A, Daugaard AE, Rist S, Karlsson T, Brennholt N, Cole M, Herrling MP, Hess MC, Ivleva NP, Lusher AL, Wagner M. Are We Speaking the Same Language? (2019). Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. Environ Sci Technol. 53(3):1039-1047. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30608663/>.
65. Duis K, Coors A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. Environ Sci Eur. 28(1):2 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27752437/>.
66. Millar NS, Denholm I. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. Invert Neurosci 7, 53–66. <https://doi.org/10.1007/s10158-006-0040-0>.

VIRI SLIK

Slika 1: https://www.safran.si/151425_picture/share-500-2000pcs_20-8-mm-premium_cigaretni-filter-dr %C5 %BEalo_6.jpg

Slika 2: <http://zadihaj.net/wp-content/uploads/2018/04/tobak9.png>

Slika 3: NIJZ, Elektronske cigarete - podrobnejše informacije za zdravstvene delavce (2020) (stran 7):

https://nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacijedatoteke/elektronske_cigaret_e_podrobnejse_in_fo_za_zdr_delavce.pdf

Slika 4: <https://www.gbif.org/species/2234822>

Slika 5: https://dijaski.net/gradivo/bio_vaj_primerjava_strukture_in_funkcije_01 in <http://www.aquareja.si/slike/images/vodne-bolhe-33.jpg>

Slika 6: <https://w7.pngwing.com/pngs/261/45/png-transparent-food-web-ecosystem- phytoplankton-common-water-fleas-food-chain-energy-food-web-ecosystem-phytoplankton- thumbnail.png>

Slika 8: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/58/Figure_28_03_05.jpg

Slika 9:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/64/Acetyl_cholin.svg/330px-Acetylcholin.svg.png in
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c7/Nicotine-2D-skeletal.png/330px-Nicotine-2D-skeletal.png>

Slika 10:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/89/AChe_mechanism_of_action.jpg

Sliki 23 in 24: <https://www.microbiotests.com/>