

ROCCA AL MARE KOOL

JOHANNA JUHKAMI

12. KLASS

MIKROPLASTI MÕJU VETIKALE *RAPHIDOCELIS* *SUBCAPITATA*

JUHENDAJAD KRISTEL MÄEKASK JA ELISE JOONAS

SISSEJUHATUS

Uurimistöö on kirjutatud teemal „Mikroplasti mõju vetikale *Raphidocelis subcapitata*“. Autor soovis uurimistöö raames teha bioloogilise laborikatse. TalTechiga konsulteerides sai autor võimaluse osaleda Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudi (KBFI) keskkonnatoksikoloogia labori mikroplastiteemalises esmakatses. Katse läbiviimist juhendas KBFI nooremteadur Elise Joonas. Koos Elise Joonasega, kes on siinse uurimistöö kaasjuhendaja, tehti keskkonnatoksikoloogia laboris mikroplasti katsed, ühtlasi juhendas ta autorit töö tulemuste analüüsimisel. Uurimus andis autorile võimaluse saada teadmisi plastiringlusest ja selle ohtlikkusest keskkonnale.

Iga päev toodetakse maailmas tonnide kaupa plasti, millest suur osa laguneb hiljem keskkonnas UV-kiirguse või füüsikaliste jõudude mõjul väiksemaks. Tuule, vihma ja reoveega kandub plast veekogudesse, kus see võib veesambas või põhjaladestudes ohustada mitmeid veeorganisme. Viimasel ajal on ühiskonnas tähelepanu tekitanud < 5 mm diameetriga plastosakesed ehk mikroplast. Lisaks suurema plasti lagunemisele keskkonnas võivad mikroplastid tekkida näiteks sünteetiliste riiete pesemisel. Ka nii võib mikroplast eelmainitud viisidel veekeskkonda jõuda. Looduskeskkonnas leiduvat mikroplasti on viimastel aastatel rohkem uuritud, kuid Eestis ei ole seda teemat varem põhjalikult käsitletud.

Töö eesmärk on välja selgitada polüstüreenist mikroplasti mõju mikrovetikale *Raphidocelis subcapitata*. Plasti mõju uurimisel kasutatakse mikrovetikaid seetõttu, et need on veeökosüsteemides esmase biomassi tootjad. Nii võib plasti kinnitumine või plasti toksiline mõju kanduda vetikalt edasi ka toiduahela kõrgematele organismidele näiteks vetikatele

kinnitunud plasti allaneelamise või vetikate kui toiduallika vähenemise tõttu. Lisaks on töö autoril soov leida vastused järgnevatele küsimustele:

- Mis on mikroplast ja miks on oluline uurida mikroplasti mõju elusloodusele?
- Kuidas mõjutab mikroplast vetika *Raphidocelis subcapitata* kasvukiirust ja raku morfoloogiat?

Et saavutada püstitatud eesmärk ja leida vastused küsimustele, tehakse katse järgides OECD juhendit 201, milles on kirjeldus vetikate kasvukiiruse inhibeerimistest. Eesmärgi saavutamiseks kasutatakse kvantitatiivset uurimismeetodit. Esmalt tutvuti OECD juhendiga 201 ning seejärel tehti eksperimendid mikroplastiga. Katse tulemusi võrreldakse teaduskirjanduses avaldatud sarnaste eksperimentidega.

Töö alguses on sõnastik erialaste terminitega, millele järgneb teoreetiline osa. Teoreetilise osa esimeses peatükis tutvustatakse mikroplasti teket ja tüüpe, mikroplasti levikut veekeskkonnas ja kuidas see keskkonda satub. Teine peatükk keskendub vetikate olulisusele, nende kasutamisele toksilisustestides ning mikroplasti mõjule mikrovetikale ja veeökosüsteemidele. Töö viimasest peatükist leiab katse kirjelduse ning töö tulemused ja analüüsi. Lisas on katsete käigus tehtud pildid vetikarakkudest.

Töö teoreetilises osas on kasutatud peamiselt ingliskeelseid eelretsenseeritud teadusartikleid, mille leidmiseks kasutati Scopuse andmebaasi.

Autor soovib tänada oma õpetajat ja juhendajat Kristel Mäekaske ning KBFi nooremteadurit Elise Joonast, ilma kelleleta poleks siinne uurimus võimalikuks saanud. Samuti soovib autor tänada Margit Heinlaant, kelle personaalse uurimistoetuse ("*Evaluation of the potential hazardous effects of microplastic to marine and freshwater zooplankton*", projekti nr PUT1512) kaudu rahastas siinset uurimistööd Eesti Haridus- ja Teadusministeerium.

SISUKORD

| | |
|---|----|
| SISSEJUHATUS | 1 |
| SÕNASTIK | 4 |
| 1. MIKROPLAST KESKKONNAS | 6 |
| 1.1. Mikroplasti teke ja tüübid | 7 |
| 1.2. Mikroplast veekeskkonnas | 8 |
| 1.3. Mikroplasti sattumine keskkonda | 9 |
| 2. MIKROPLASTI MÕJU MIKROVETIKATELE NING VEEÖKOSÜSTEEMIDELE | 10 |
| 2.1. Mikrovetikate kasutamine toksilisustestides | 10 |
| 2.2. Mikroplasti mõju mikrovetikatele ning veeökosüsteemidele tervikuna | 11 |
| 2.2.1. Mikroplasti mõju mikrovetikatele | 11 |
| 2.2.2. Mikroplasti mõju vee ökosüsteemidele | 12 |
| 3. MIKROPLASTI KATSE KIRJELDUS | 15 |
| 3.1. Metoodika | 15 |
| 3.1.1. Kemikaalid | 15 |
| 3.1.2. Vetikakasvu inhibitsiooni test | 15 |
| 3.1.3. Proovide võtmine | 17 |
| 3.1.4. Statistiline analüüs | 18 |
| 3.2. Katse tulemused ja analüüs | 19 |
| 3.2.1. Naatriumasiidi mõju | 24 |
| KOKKUVÕTE | 25 |
| POLYSTYRENE MICROPLASTIC IMPACT TO MICROALGAE <i>RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA</i> | 27 |
| KASUTATUD ALLIKAD | 29 |
| LISAD | 31 |
| LISA 1. OECD juhend 201, vetika sööde | 31 |
| LISA 2. Vetikarakud 1 µm mikroplasti osakestega | 32 |
| LISA 3. Vetikarakud 40 nm mikroplasti osakestega | 33 |

SÕNASTIK

1. **abrasiivpuhastus** – puhastustehnoloogia, mille abil eemaldatakse pindadelt suruõhu ja koorivate osakeste abil roostet ning mustust
2. **afiinsus** – ainete võime üksteisega keemiliselt reageerida
3. **agonist** – keemiline ühend, mis avaldab organismis teatud ainega sarnanedes retseptorile (ärrituste vastuvõtja organismis) sama mõju
4. **agregaat** – kogum
5. **agregeerumine** – osakeste liitumine suuremateks kogumiteks
6. **akumuleeruma** – kogunema
7. **androgeen** – meessuguhormoon
8. **anoksügeenne fotosüntees** – bakteriaalne fotosüntees, mille käigus ei eraldu hapnikku
9. **antagonist** – vastand toimeaine
10. **antimikroobne aine** – aine, mis surmab mikroorganisme või pärsib nende kasvu
11. **apoptoos** – protsess, mille käigus hävitatakse programmeeritud rakusurma käigus vigased või nakatunud rakud
12. **arhe ehk ürgid** – prokarüootide rühm
13. **autofluorestsents** – iseeneslik fluorestsents, mis tähendab, et varem (nähtava või UV-) valguse abil ergastatud rakkudes leiduvad molekulid kiirgavad valgust tagasi
14. **bioakumuleerumine** – olukord, kus toksilised ained kogunevad organismi kiiremini, kui ainevahetus neid eritada suudab
15. **biokile ehk biofilm** – õhuke mikroorganismide kiht, mis on ümbritsetud limaga
16. **biosaadavus** – ainete osa, mida elusorganismid suudavad omandada
17. **bisfenool A ehk BPA** – tööstuslik kemikaal, millest valmistatakse plaste
18. **eksponentsiaalne kasv** – populatsiooni eksponentsiaalne suurenemine kasvu piiravate tegurite puudumisel
19. **endokriinne häire** – hormoonide tootmis- või aktiivsushäire
20. **eukarüoot** – päristuumne rakk ehk rakk, millel on olemas tuum
21. **fotolüüs** – ühendite lagunemine valguse toimele
22. **fototroofne toitumine** – toitumine, mille käigus omandatakse valgusenergiat, et sünteesida orgaanilisi toitaineid
23. **ftalaat** – plastifikaatorina kasutatav kemikaal
24. **hemotsüüt** – selgrootutes leiduv punaverelibele
25. **inhibeerimine** – mingi protsessi pärssimine
26. **inokuleerimine** – rakkude või organismide uude söötmesse lisamine
27. **kantserogenees** – vähiteke
28. **kasvu inhibitsioon** – kasvu takistamine või vähendamine

29. **klaasviaal** – väike klaasanum katse proovide jaoks
30. **kloroplast** – pigment, mis neelab valgusenergiat, et tagada energia fotosünteesiks
31. **merelumi** – meredes ülemisest kihist alla vajuvad orgaanilistest ja anorgaanilistest osakestest koosnevad kogumid
32. **mikrokiht** – mereveepinna pealmine 1-millimeetrine kiht
33. **mikropärl** – kosmeetikas kasutatavad väikesed plastosakesed
34. **morfoloogia** – organismide välisehitus
35. **neutraalselt hõljuv** – hõljuva objekti tihedus on sama vedelikuga, milles ta hõljub
36. **polübroomitud difenüüleetrid** – tarbekaupades leegiaeglustina kasutatavad kemikaalid
37. **polümerisatsioon** – keemiline protsess, mille käigus omavahel ühinevad monomeerid moodustavad polümeere
38. **prokarüoot** – eeltuumne rakk ehk rakk, millel puudub tuum
39. **pürenoid** – valguskehakesed, mille ümber on ladestunud varuained, kas süsiniku või tärklise kujul
40. **reagent** – keemilise reaktsiooni lähteaine
41. **rodopsiin** – selgroogsete silmade võrkkestas ning selgrootute fotoretseptorites leiduv nägemispigment
42. **tülakoid** – kloroplasti sisemembraani sopistus
43. **voolutsütomeeter** – masin, mille abil saab tuvastada ja mõõta rakkude ning osakeste arvu vedelproovides

1. MIKROPLAST KESKKONNAS

Süntetilised orgaanilised polümeerid ehk plastid saadakse naftast või gaasist monomeeride polümerisatsiooni teel. Alates 1907. aastal väljaarendatud esimesest tänapäevasest plastist (Bakelite) on odavate tootmistehnikate abil võimalik toota masstoodanguna plaste, mis on kerged, tugevad, inertsed ja söövituskindlad. Plastist tuleneva keskkonnareostuse probleem on süvenenud alates selle masstootmise algusest 1940. aastatel. (Cole, Lindeque, Halsband, Galloway, 2011, lk 2588) Märkimisväärse nõudluse tulemusena on aastane plastitoodang hüppeliselt kasvanud 1,5 miljonilt tonnilt 1950. aastal umbes 280 miljonile tonnile 2011. aastal (Wright, Thompson, Galloway, 2013, lk 483).

2015. aastal jagunesid üleilmse esmase plasti tootmismahud tööstussektorite kaupa järgnevalt: pakendamine (146 mln tonni), ehitus (65 mln t), teised sektorid (59 mln t), tekstiilid (47 mln t), tarbija- ja institutsionaalsed tooted (42 mln t), transport (27 mln t), elektroonika (18 mln tonni) ja tööstusseadmed (3 mln t) (Geyer, Jambeck, Law, 2017). Järgnevad näited illustreerivad üksikisikute plastitoodete kasutamist päevas.

2010. aasta seisuga kasutati enim plasti ühe inimese kohta päevas Trinidadis ja Tobagos (3,6 kg), seejärel Kuveidis (0,69 kg) ning Guyanas (0,69 kg). Vähe kasutati plasti näiteks Rumeenias (0,04 kg), Keenias (0,03 kg), Madagaskaril (0,02 kg) ja Indias (0,01 kg). Eestis kasutas iga inimene 2010. aastal 0,18 kg plasti päevas (Geyer *et al.*, 2017). Võrreldes plasti kasutamist 0,5 l Aura plastpudelite (0,026 ± 0,001 kg) abil, kasutas Eestis üks inimene 7 ning Trinidadis ja Tobagos 139 Aura pudelit päevas.

Ühtlasi kasutatakse plastitoodetest väga palju kilekotte. Kõige rohkem kasutab üks inimene aastas poekilekotte Põhja-Ameerikas (150 tk), teisel kohal on Ida-Aasia ja Okeania (57 tk), kolmandal kohal Euroopa ja Kesk-Aasia (54 tk) ning neile järgnevad Lõuna-Ameerika (46 tk), Hiina (35 tk), India ja Lõuna-Aasia (33 tk), Aafrika ja Kesk-Ida (22 tk) (Boucher ja Friot, 2017, lk 26).

Karami (2017, lk 842) artiklis toodi välja, et Euroopas toodetavatest polümeeridest moodustavad 73% järgnevad polümeerid: polüpropüleen (PP, tihedusega 0,85–0,92 g/cm³), polüetüleen [(PE), madala tihedusega (LDPE) ja kõrge tihedusega polüetüleen (HDPE), tihedusega 0,89–0,98 g/cm³], polüstüreen (PS, tihedusega 1,02–1,08 g/cm³), polüvinüülkloriid (PVC, tihedusega 1,30–1,58 g/cm³) ja polüetüleentereftalaat (PET, tihedusega 1,29–1,40 g/cm³).

Tillukesed plastgraanulid ehk mikroplastid, mida kasutatakse näiteks koorijatena kosmeetikas ja suruõhupuhastuses (ingl *air-blasting*), ent mis tekivad samuti suurema plasti lagunemisel, on viimastel aastatel oma levikuga keskkonnas palju tähelepanu tekitanud

(Cole *et al.* 2011, lk 2589). Mikroplasti akumulatsioonide tõttu on viimase 40 aasta jooksul tekkinud kõikidesse maailma ookeanidesse erinevate plastikonsentratsioonidega alasid madalamatest tasemetest kuni lokaliseeritud kõrgema kontsentratsiooniga aladeni. Mikroplaste leidub lisaks randadele, pinnaveele, veekogudele ja põhjaveele inimtegevusest väga kaugel asuvates merekeskkondades. (Wright *et al.*, 2013, lk 483)

1.1. Mikroplasti teke ja tüübid

Mikroplast on NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*'i) definitsiooni alusel kuni 5 mm suurune plast, mis võib oma päritolult olla esmane ehk sihipäraselt toodetud või teisene ehk makroplasti lagunemisel tekkinud (Wright *et al.*, 2013, lk 483). Kolme suurde rühma jagatuna leidub plastide seas mikroplaste (1 kuni < 5 mm), mesoplaste (5 kuni < 25 mm) ja makroplaste (üle ≥ 25 mm) (Rezania *et al.*, 2018, lk 191). Arvatavasti tekib mikroplasti lagunemisel ka nanoosakesi, kuid hetkel on ookeanis avastatud väikseima mikroosakese diameeter 1,6 µm (Cole *et al.*, 2011, lk 2590).

Kokkuleppeliselt jagunevad mikroplastid viide rühma: fragmendid (kõvad, sakiliste servadega), mikrograanulid (kõvad, ümardunud osakesed), kiud (kiulised või õhukesed ühetaolised plastitükid), kiled (õhukesed, 2-mõõtmelised plastkiled) ja vahud (st vahtpolüstüreen tüüpi materjal). Materjali alusel jagatakse nad kuueks: polüetüleen (PE), polüpropüleen (PP), polüamiid (PA), polüvinüülkloriid (PVC), polüstüreen (PS), polüuretaan (PUR) ja kõrgemolekulaarne polüetüleen (PET). (Rezania *et al.*, 2018, lk 191)

Esmaseid mikroplaste kasutatakse kas väikeste graanulitena kosmeetikatoodetes (näokoorijas ja hambapastas), abrasiivpuhastuses (näiteks lakkide eemaldamiseks) või suuremate esemete tootmiseks (Wagner ja Lambert, 2018, lk 5). Keskkonnas, eriti merekeskkonnas, on olulised mikroplasti allikad näokoorijad (Rezania *et al.*, 2018, lk 192). Mikroplastide kasutamine kosmeetikas koorijatena on tõusnud hüppeliselt alates nende patentimisest 1980. aastal (Cole *et al.*, 2011, lk 2589). 2015. aasta *Cosmetics Europe* (Euroopa kosmeetika- ja hügieenitoodete tööstuste kaubanduslik ühendus) andmetel kasutati Euroopa kosmeetika- ja hügieenitoodete tööstustes 714 tonni mikropärleid (European Commission, 2017, lk 25).

Suruõhupuhastustehnoloogiate jaoks toodetakse samuti esmaseid mikroplaste. Akrüül-, melamiin- või polüestermikroplastist koorijatega eemaldatakse masinatelt, mootoritelt ja paatide korpustelt roostet ja värvi. Korduvkasutamise tõttu võivad sellises kasutuses osakesed saastuda raskemetallide, näiteks kaadmiumi, kroomi või pliiiga. (Cole *et al.*, 2011, lk 2589)

Suurema plasti lagunemisel tekib mikroplasti teiseseid osakesi mereprügist, prügilatest, sünteetiliste kiudude pesust ja tööstuslikest või põllumajanduslikest allikatest. Teisesed osakesed on tekkinud suurema plastprügi lagunemisel mehhaaniliste jõudude, termilise lagunemise, fotolüüsi, termo-oksüdatsiooni ja biolagunemise teel. (Rezania *et al.*, 2018, lk 192) Polüestrist, akrüülist ja polüamiidist eraldub riiete pesemisel mikroplaste, mis tekitavad üle 100 kiu ühes liitris heitvees (Jiang, 2018, lk 17). Lagunemisega võivad vabaneda lisaained, mis on lisatud töötlemisel, et suurendada plasti vastupidavust ja söövituskindlust (Cole *et al.*, 2011, lk 2589). Kuna mikroplasti võib tekkida erinevatest allikatest ja selle keskkonda jõudmise viise on palju, on mikroplasti teiseste osakeste tuvastamine keeruline. (Rezania *et al.*, 2018, lk 192).

1.2. Mikroplast veekeskkonnas

Mereprügi koosneb peamiselt plastist, kuid sisaldab ka muud inimtekkelist prügi (näiteks klaas, metall, puit) ja looduslikku ujuvlasti (näiteks taimestik) (Cole *et al.*, 2011, lk 2591). Veekogudes mõjutab mikroplasti paiknemist (hõljuvust) ja transporti veesambas tema tihedus, suurus ja kuju. Seda, kus mikroplast veesambas paikneb, määravad lisaks plasti tihedusele tuul ja hoovused. (Karami, 2017, lk 842)

Plastid võivad koosneda erinevatest polümeeridest, mistõttu on nad vastavalt oma koostisele, tihedusele ja kujule kas hõljuvad, neutraalselt hõljuvad või põhja vajuvad. Arvukatest uuringutest saadud pinnatraalimise andmete põhjal leidub väikese tihedusega mikroplaste pigem merepinna mikrokihis. (Cole *et al.*, 2011, lk 2592) Mere põhjaelustikus leidub tõenäolisemalt suure tihedusega mikroplaste, näiteks polüvinüülkloriidi, polüestrit ja polüamiidi (Cole *et al.*, 2011, lk 2593).

Mikroplastide tihedust võib mõjutada pealiskasvu moodustavate organismide kinnitumine. Kui tihedus muutub suuremaks, võib mikroplast vajuda vee põhja. Merekeskkonnas suurendavad osakeste tihedust plasti pinnale kasvavad mikroobsed biokiled. See soodustab olukorda, kus vetikad ja selgrootud koloniseerivad osakesed. (Cole *et al.*, 2011, lk 2592) Polüstüreeni tihedus on merevee omaga võrdne või sellest suurem. Sõltuvalt osakeste suurusest jäävad nad kas veesambasse hõljuma või vajuvad aeglaselt põhja. Mitmete polüstüreeni osakeste suuruste mudelite põhjal hinnati nende paiknemist mere veesambas ning leiti, et osakesed, mis on suuremad kui 100 µm vajuvad põhja ja 10 µm suurused osakesed jäävad hõljuma. (Karami, 2017, lk 842)

Mikroplast ei ole probleem ainult inimtegevuse lähedastel aladel, vaid see levib ning ladestub üle maailma. Jiangi artiklis on esitatud näide, kus Põhja-Jäämere jääsüdamikest kogutud analüüsidesid mõõdeti mikroplasti tasemeid vahemikus 38 kuni 234 osakest/m³, mis on kaks korda suurem Vaikse ookeani keerisest leitud kontsentratsioonidest. Polaaralasad nähakse

koguni ülemaailmse plasti ladestuskohana – vaatlustel on leitud mikroplasti osakesi Antarktika ja Arktika vete pinnal hõljumas, Arktika merepõhjast ja Kanada Arktikas lindude magudest. (Jiang, 2018, lk 18)

1.3. Mikroplasti sattumine keskkonda

Mikroplasti leidub suurtes kogustes nii mageveesüsteemides, merekeskkonnas kui ka setetes. Selle põhjus on halb jäätmekäitlus, suuremate plastijäätmete fragmenteerumine ja minimaalne bioloogiline lagunemine. Kõige rohkem on keskkonnast leitud polüetüleenist (PE), polüstüreenist (PS) ja polüpropüleenist (PP) mikroplasti osakesi. (Mao *et al.*, 2018, lk 60) Et vältida mikroplastide tekitavat keskkonnasaastet, on tarvis aru saada, millistest allikatest ja kust kaudu need keskkonda jõuavad. Mikroplast võib pärineda meresadamatest; tööstuspiirkondadest; inimtegevusest (näiteks turismist ja linnadest tulenevast äravoolust); tekstiilitööstusest või reoveepuhastitest. (Rezania *et al.*, 2018, lk 192) Nad satuvad keskkonda kuuel erineval viisil: läbi reoveepuhastite (kas kehahoodustoodetes sisalduvate mikroplasti osakestena või riiete pesemisel tekstiilidest eralduvate kiududena); reoveepuhastitest pärineva sette kasutamisel põllumajandusmaadel; sademeveest tingitud üleujutustel; juhuslikul vabanemisel (näiteks rehvide kulumisel); tööstuslikest toodetest või protsessidest vabanemisel ning kiudude sadestumisel atmosfäärist (Wagner ja Lambert 2018, lk 5). Makro- ja mikroplasti sisaldavat reoveepuhastite heitvett, kuhu on jõudnud munitsipaal- ja tööstusheitmed, peetakse mikroplasti peamiseks allikaks. Hinnanguliselt jõuab läbi reoveepuhastite merekeskkonda iga päev umbes 8 triljonit plasti mikropärli. (Rezania *et al.*, 2018, lk 194)

2. MIKROPLASTI MÕJU MIKROVETIKATELE NING VEEÖKOSÜSTEEMIDELE

Uurimistöös on tehtud katse üherakulise mikrovetika *Raphidocelis subcapitata* laboratoorse kultuuriga, mida kasutatakse laialdaselt toksilisustestides. *Raphidocelis subcapitata* on magevee rohevetikas, mis kuulub *Chlorophyceae* klassi (SAG, 2019).

Rohevetikad kuuluvad päristuumsete ehk eukarüootide hulka. Neil on kahemembraanilise kattega kloroplastid, kimpudeks koondunud tülakoid ning pigment klorofüll a ja b. Selles mitmekesisel rühmas leidub nii üherakulisi, niitjaid, makroskoopilisi kui ka teisi vetikaid. Nende elupaik võib olla nii neile kõige tüüpilisemas magevees kui ka meres ning lisaks maismaal mullas, kividel, jääl ja lumel. (Olli, 2010, lk 59)

Pigment klorofüll a on oluline vetikate fotoautotroofses toitumises. Klorofüll a teeb oksügeenset fotosünteesi, mille käigus eraldub hapnik, erinedes anoksügeenset fotosünteesist, mis fototroofsetes prokarüootides (osas rohelistes mitteväävlibakterites, rohelistes väävlibakterites, grampositiivsetes bakterites, purpurbakterites, hüperhalofiilsetes arhedes) toimub bakteriklorofüllil kaudu või arhede puhul rodopsiinil hapniku vabanemiseta. (Olli, 2010, lk 11–12)

Mikrovetikate olulisus globaalses ning veekogude perspektiivis tulenebki nende võimest luua fotosünteesi käigus esmast biomassi ning kõrvalproduktina hapnikku väljutada. Ookeanides toodetakse ligi pool globaalsest esmasest biomassist, millest enamiku valmistavad mikrovetikad. (Field, Behrenfeld, Randerson, Falkowski, 1998, lk 237) See tähendab, et mikrovetikad on sealsete toiduvõrgustike alustaladena toiduks veekogude toiduahelas kõrgematele organismidele ning nende elutegevuse käigus vabaneb ligi pool üleilmselt kättesaadavast hapnikust.

2.1. Mikrovetikate kasutamine toksilisustestides

Mikrovetikaid kasutatakse laialdaselt tööstuslikult toodetavate kemikaalide keskkonnaohu hindamisel. Euroopa Kemikaaliameti regulatsiooni REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*) raames peab kõiki Euroopa Liidus üle 1 tonni toodetavaid või imporditavaid kemikaale testima muu hulgas ka veetaimedele (harilikult mikrovetikate) kasvu inhibitsiooni testiga (ECHA, 2019a). Mikrovetikate kasvu inhibitsiooni test tehakse avaldatud standardite järgi, näiteks vastavalt OECD juhendile nr 201 „*Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*“ (magevee vetikate ja tsüanobakterite kasvu inhibitsiooni test) (OECD, 2011).

OECD testi eesmärk on uurida millist mõju avaldab valitud toksikant 72 tunni jooksul eksponentsiaalses kasvufaasis olevale organismile (magevee mikrovetikas või tsüanobakter). Testis uuritakse aine mõju vetikakultuuridele toksikandi erinevatel kontsentratsioonidel. Tulemuste hindamisel võrreldakse omavahel toksikandita ja toksikandiga proovide kasvukiirust. Oluline mõõdetav parameeter on OECD 201 testis biomassi juurdekasv ajas ehk vetikate kasvukiirus. Vetikate biomassi, mis on kuivmass (mg vetikat liitris proovis), on raske määrata. Seetõttu kasutatakse kuivmassiga korreleeruvaid asendusparameetreid: rakkude arv, rakkude maht, fluorestsents, optiline tihedus jt. Harilikult tehakse vetikate biomassi hindamiseks mõõtmisi mikroskoobi või voolutsütomeetriga. Lisaks kasutatakse mikroskoopi, et näha võimalikke tekkinud morfoloogilisi muutusi. (OECD, 2011)

2.2. Mikroplasti mõju mikrovetikatele ning veeökosüsteemidele tervikuna

Merekeskkonnas on mikroplasti täielik saatus ja mõju jäänud veel tuvastamata. Olulised tegurid on mikroplasti keemiline struktuur, tema tihedus merevees, ilmastikutingimused, nende koostises sisalduvad lisandid, polümeeride olemus, ökoloogilised mõjud ja killustusvõime. Mikroplasti kõrgetasemeline reostus merekeskkonnas kujutab endas ka potentsiaalset ohtu inimeste ja loomade elule, mistõttu tuleks kavandada plaan mikroplasti mõju vähendamiseks linnapiirkondade magevees. (Rezania *et al.*, 2018, lk 194)

2.2.1. Mikroplasti mõju mikrovetikatele

Kuna mikroplasti mõju vetikatele on uus teema, leidub teaduskirjanduses selle kohta infot piiratud hulgal. Mikrovetikad ei ole valdavalt võimelised fagotroofiaks ehk osakeste neelamiseks (Olli, 2010, lk 39), mistõttu ei ole tõenäoline, et mikroplasti osakesed satuksid mikrovetika raku sisse. Sellegipoolest on tuvastatud, et 70 nm polüstüreenist mikroplasti osakesed võivad vetika kasvu kontsentratsioonil 3 mg/l 4–5% ulatuses pidurdada (Besseling, Wang, Lüring, Koelmans, 2014, lk 12338). Plasti polüvinüülkloriidi (PVC) kontsentratsioon 50 mg/l piiras merevetika *Skeletonema costatum* kasvu 96-tunnise katse jooksul maksimaalselt 40% ulatuses (Zhang, Chen, Wang, Tan, 2017, lk 1284).

Mao *et al.* (2018) ei leidnud seevastu rohevetika *Chlorella pyrenoidosa* 30-päevase kokkupuute järel kahe suurusega polüstüreeni MP osakestel negatiivset mõju vetikate kasvule ega fotosünteesile, kuigi algses kasvufaasis oli vetikate kasv mikroplasti juuresolul piiratud. Sellist efekti põhjendati artiklis vetikate kohastumisega mikroplasti sisaldavas keskkonnas rakuseina paksenemise ja vetikate agregeerimisega.

2.2.2. Mikroplasti mõju vee ökosüsteemidele

On täheldatud, et selgroogsed võivad takerduda makroplastist ehk suurtest plastitükkidest esemetesse või neid suisa alla neelata. Usutakse, et plasti allaneelamisest on mõjutatud üle 250 mereorganismi liigi. (Wright *et al.*, 2013, lk 484)

Makroplastidest tingitud seadmete kahjustustel ja keskkonnaprobleemidel on tagajärjed turismitööstusele ning paljudele tööstusharudele (näiteks laevandus, kalapüük, energiatootmine, vesiviljelus). Makroplastid võivad põhjustada merelindude, imetajate, kalade ja roomajate haigestumist ning hukkumist kui need jäävad nende elukeskkonnas kuhugi kinni või kui loomad neid neelavad. Hulpivad plastitükid võivad transportida võõrliike (näiteks sammalloomi) ja põhja vajunud plast võib takistada merepõhjas gaasivahetust või luua tehislikke pinnaseid. (Cole *et al.*, 2011, lk 2589)

Mikroplastide reostust peetakse kasvavaks keskkonnaprobleemiks nii meres kui ka magevees. Seda seetõttu, et mikroplast laguneb aeglaselt; vees elavad organismid võivad seda alla neelata ja mikroplasti osakesed võivad kanda orgaanilisi saasteaineid (sh püsivaid orgaanilisi saasteaineid). (Jiang, 2018, lk 16–17). Potentsiaalseid mikroplasti transpordi viise ja nende vastastikuseid mõjusid elustikuga on kokkuvõtlikult kujutatud joonisel 1.

On leitud, et mikroplasti kas otseselt või kaudselt (toiduahelas alamate organismide söömise kaudu) neelavad alla erinevatel troofilisel tasemetel olevad organismid, näiteks imetajad, kalad, koorikloomad ja zooplankton. Mikroplasti neelamise tulemusena on märgatud organismide kasvu vähenemist, viljakuse inhibeerimist, muutusi hapnikutarbimises, eluea vähenemist, piiratud toitumisvõimet ning suurenenud antioksidantidega seotud ensüümide aktiivsust. (Mao *et al.*, 2018, lk 60)

Mikroplasti on mereorganismidel lihtne neelata seetõttu, et mikroplast on väike ja seda leidub nii veesamba eri kihtides kui ka veekogude põhjakihtides. (Cole *et al.*, 2011, lk 2593). Mikroplastid on setete ja mõnede planktiliste organismidega sarnase suurusega, mistõttu on nad potentsiaalselt biosaadavad suurele hulgale organismidele. Paljude organismide seas on osakeste neelamise selektiivsus piiratud ning omandavad nad valimatult osakesi, mis on neile sobiva suurusega. (Wright *et al.*, 2013, lk 484)

Mikroplasti üht allaneelamise füüsilist efekti organismides mõjutab ka nende võime akumulereuda. Mereselgrootutes võib mikroplasti osakeste kogunemine põhjustada ummistusi kogu seedesüsteemis ning vähendada küllastumise tõttu toitumist. Samuti võib mikroplasti edasikandumine toiduahelas toimuda mereselgrootuga, kellele on kinnitunud saastunud mikroplasti osake. (Wright *et al.*, 2013, lk 488)

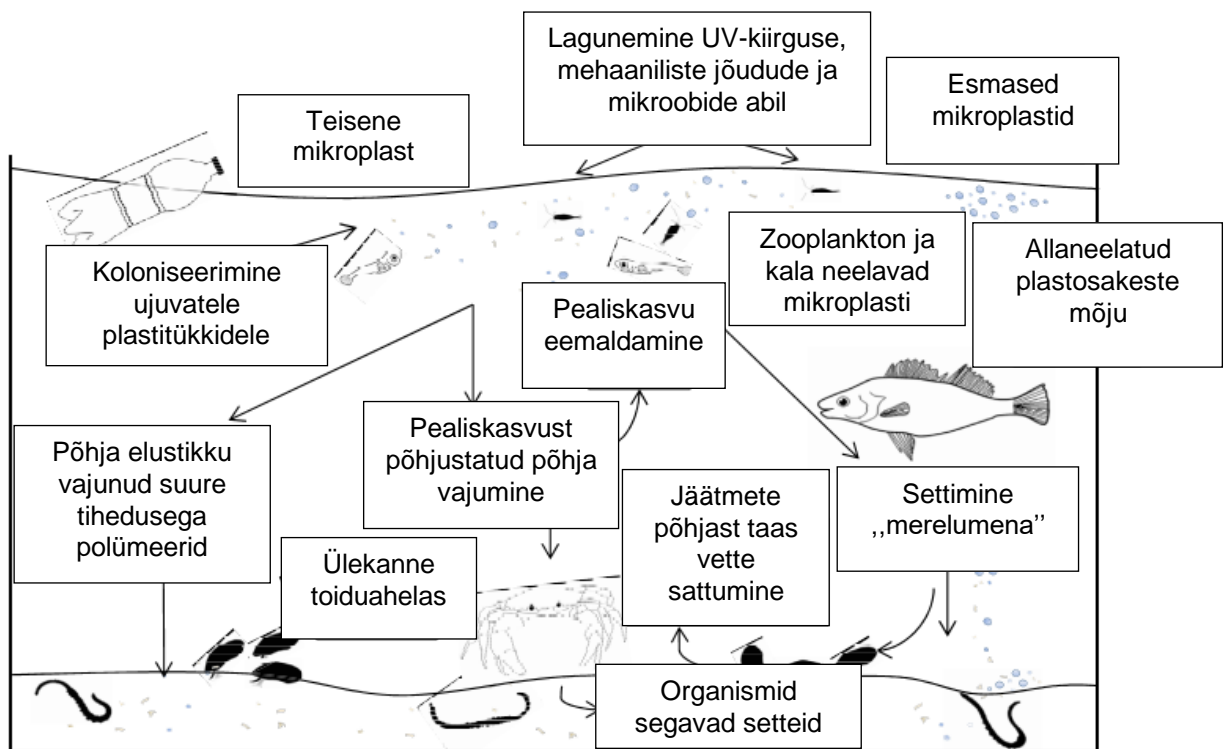
Merekeskkonnas on enim levinud mikroplastikiud, kuigi leidub veel teisi vorme fragmentidest kuulikesteni (Wright *et al.*, 2013, lk 483). Keskkonnas on väikestele planktoniliikidele veest omandatavad sealsed plastikiud, diameetriga 1 µm ja pikkusega 15 µm. Taolised kiud võivad

olla eriti ohtlikud, sest need võivad seedeelundkonnas klompuda ja sõlmi moodustada, takistades seega nende väljutamist. (Cole *et al.*, 2011, lk 2594)

Mikroplastist toksikantide, näiteks monomeeride ja plastilisandite, leostumise puhul võivad lisaks füüsilisele kahjule tekkida kantserogenees ja endokriinsed häired. Ühtlasi arvatakse, et mikroplastid võivad kontsentreerida hüdrofoobseid püsivaid orgaanilisi saasteaineid (POS), mis on rohkem afiinsed plasti kui merevee suhtes. Seetõttu võivad POS-id toiduahela kaudu bioakumuleeruda ja toiduahelas kuhjuda. (Wright *et al.*, 2013, lk 484)

Polümeerides leidub lisaainetest täiteaineid, värvaineid, leegiaeglusteid, katalüsaatoreid, kõvendavaid aineid, antioksüdante ja antimikroobseid aineid, mis lisatakse plastile vastava rakendusega kohandamiseks. Lisaks plasti tiheduse muutusele muutub lisandite mõjul nende biosaadavus ja saastamise potentsiaal. (Karami, 2017, lk 845) Endokriinseid häireid põhjustavad kemikaalid, polübroomitud difenüüleetrid, ftalaadid ja plasti monomeer bisfenool A on tavapärased plasti lisandid, mis võivad jäljendada, konkureerida või häirida endogeensete hormoonide sünteesi. Hormonaalne tasakaalustamatus võib põhjustada arengustaadiumis organismidel püsivaid morfoloogilisi probleeme või täiskasvanutel seksuaalseid häireid. Veeselgrootute ja kalade puhul on ftalaate seostatud molekulaarsete ja organismiüleste mõjudega, kaasa arvatud genotoksiliste kahjustustega (mikrotuumad ja rannakarpide hemotsüütide apoptoos), selgrootute pärsitud liikumisega ja kaladel mõlema sootunnuste korruga esinemisega. Alates kontsentratsioonist suurusjärgus µg/l võib bisfenool A olla toksiline nii koorikloomadele kui ka putukatele, mõjutades nende paljunemist ja arengut, kuna bisfenool A on nii östrogeeni agonist kui androgeenide antagonist. (Cole *et al.*, 2011, lk 2595)

Arvatakse, et mikroplastidele võivad kinnituda mikroorganismid, sealhulgas patogeenid, kes moodustavad osakestele biokilesid. Jiangi artiklis kirjeldati Atlandi ookeani põhjaosas plastist prahi tõttu ühendatud mitmekesisist mikroobikogukonda („plastisfäär“). „Plastisfääris“ leidub süsivesinikke lagundavad baktereid, mis võivad soodustada plastjäätmete lagunemist. Plastosakestelt on leitud ka patogeene, näiteks perekonna *Vibrio* esindajaid. Mikroplasti osakesed võivad seega käituda veekeskkonnas inimestele patogeenide kandjatena ning seega mõjutada vee hügieenilist kvaliteeti. (Jiang, 2018, lk 19)



Joonis 1. Mikroplasti transport ja bioloogiline koostoime merekeskkonnas (Wright *et al.*, 2013, lk 485). Muudetud.

3. MIKROPLASTI KATSE KIRJELDUS

Uurimistöö viimases peatükis on esitatud polüstüreenist mikroplastiga (PS MP) tehtud katse tingimused, etapid, tulemusete analüüs ja arutelu. Arutelus võrreldakse tehtud katse tulemusi teadusartiklitega, mis kajastavad tulemusi teiste sarnaste organismide ja osakestega tehtud katsetes.

Oma olemuselt naftabaasiline stüreeni monomeerist saadud plast polüstüreen (*Styrofoam*) võib kontrollimata jäätmekäitlusel keskkonda reostada. Selle plastitüübi üks omadusi on kiire fragmenteerumine, mille järel jäävad tekkinud osakesed pikaks ajaks keskkonda. Laialdaselt kasutusel olevast polüstüreenist valmistatakse ühekordselt kasutatavaid topse, jahutuskaste, kalakaste, poisid ja ujukeid, vahtplaste ja ühekordseid toidupakendeid. (IEEP, s.a)

3.1. Metoodika

Metoodika alapeatükis on esitatud täpsem kirjeldus katse tingimustest. Katse läbiviimisel on järgitud vetikate kasvukiiruse inhibeerimise testi, OECD juhendi 201, eksperimendi tingimusi, mida kirjeldatakse ka peatükis 2.1. Siinsetes katsetes on uuritud polüstüreenist mikroplasti mõju üherakulisele mikrovetikale *Raphidocelis subcapitata*.

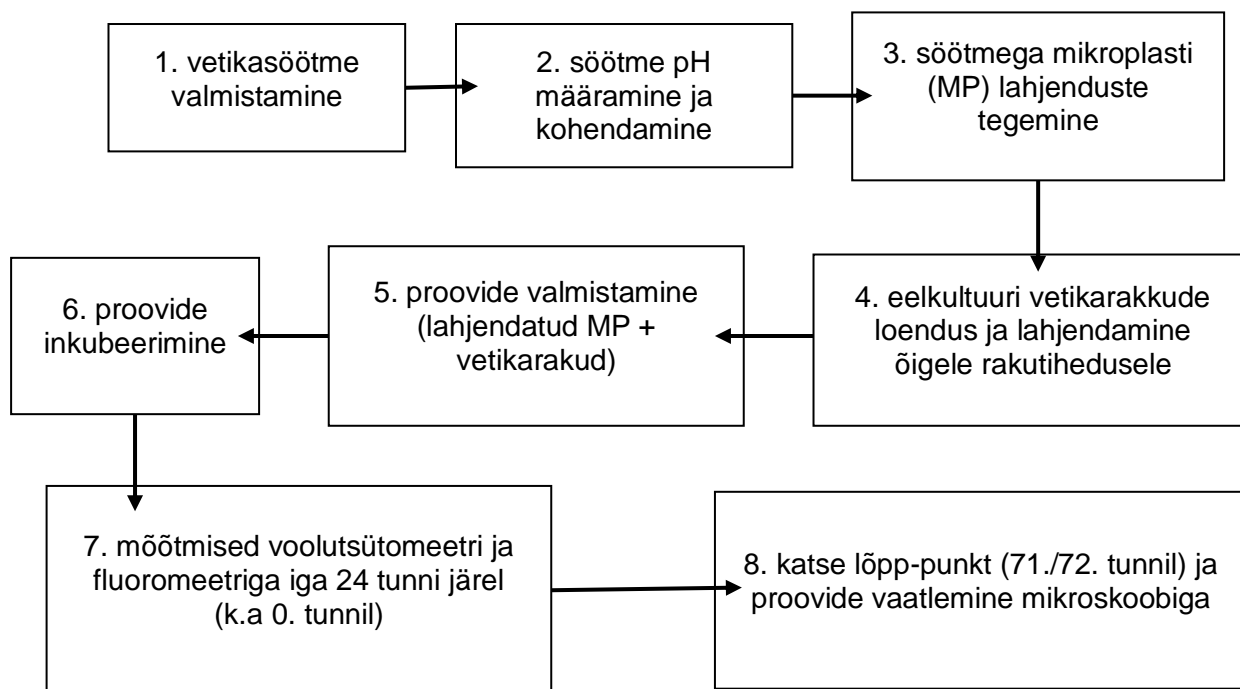
3.1.1. Kemikaalid

Katses kasutatud 40 nm ja 1 µm polüstüreenist mikroplasti osakesed saadi firmast Magsphere Inc (Ameerika Ühendriigid). Mõlemat tüüpi osakesed olid karboksüülitud ehk kaetud karboksüülrühmaga. Osakeste tihedus oli 1,05 g/ml ning esialgne lahus sisaldas massiprotsendina 10% plasti. Bakteriaalse saastatuse vältimiseks sisaldasid ained algses koostises 0,09% naatriumasiidi (NaN₃). Vetikasöötme mineraalsed komponendid (LISA 1) on keemilise puhtusastmega > 97%. CuSO₄ (*Riedel-de-Haën*) oli analüütilise reagenti puhtusega.

3.1.2. Vetikakasvu inhibitsiooni test

Vetikakasvu inhibitsiooni testi sooritamise etapid on esitatud joonisel 2. Katses kasutatud vetikas on pärit Algal Toxkit F'ist (MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgia). OECD juhendi järgi kasvatati vetikaid eelkultuuris 2–4 päeva, et tagada vetikate eksponentsiaalne kasv

katse algul. Vetikakultuuri rakutihedus mõõdeti Neubaueri hemotsütomeetriga (rakuloenduskamber) ning kultuuri lahjendati, et katse algne rakutihedus oleks igas proovis 10 000 rakku/ml (10 ml proovis kokku 100 000 vetikarakku).



Joonis 2. Vetika kasvu inhibitsiooni testi sooritamise etapid.

Vetikasööde valmistati OECD juhendi 201 järgi (lisa 1). Katse proovid valmistati klaasviaalidesse, millele tagati inkubeerimisel õhu ligipääs auguga korkide abil. Söötme pH-ks saadi juhendi järgi $8 \pm 0,1$. Söötmega lahjendati mikroplasti 10-kordsete lahjendustena, millele lisati varem kirjeldatud vetikakultuur. Katsetes oli nelja erineva kombinatsiooniga proove (tabel 1).

Katse positiivne kontroll on proov, milles on kasutatud varem uuritud ja seega teadaoleva toksikandi mõju. Siinses katses on positiivne kontroll vetikaproov vasksulfaadiga (CuSO_4). Negatiivses kontrollis puudub igasugune toksikant ehk sellises proovis leidub ainult vetikas koos vetikasöötmega. Positiivseid ja negatiivseid kontrolle on oluline katsetesse kaasata, et näha kontrollproovi puhul, kas vetikate kasvukiirus on normaaltingimustes tavapärane ning positiivse kontrolli puhul, kas teadaoleval toksikandil on vetika kasvule oodatav mõju. Iga kontsentratsioon oli esindatud 3 replikaadi ehk kordusega kõigis katsetes. Mikroplasti proovide kontsentratsioonid on esitatud kahel eri viisil (tabelis 2): esimene väljendab mikroplasti osakeste arvu ühes milliliitris ja teine osakeste kaalu mikrogrammides ühes liitris.

Tabel 1. Katses tehtud proovide kombinatsioonid.

| proov | vetika <i>Raphidocelis subcapitata</i> populatsioon | sööde OECD | mikroplast (MP) | CuSO ₄ |
|------------------------|---|------------|--------------------|-------------------|
| MP (1µm) | + | + | + | - |
| MP (40 nm) | + | + | + | - |
| positiivne kontroll | + | + | - | + |
| negatiivne kontroll | + | + | - | - |

Tabel 2. Mikroplasti kontsentratsioonid proovides.

| | | | | | |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 µm; (osakest/ ml) | 1,83 x 10 ⁵ | 1,83 x 10 ⁴ | 1,83 x 10 ³ | 1,83 x 10 ² | 1,83 x 10 |
| 1 µm; (µg/l) | 100 | 10 | 1 | 0,1 | 0,01 |
| 40 nm; (osakest/ ml) | 2,86 x 10 ⁷ | 2,86 x 10 ⁶ | 2,86 x 10 ⁵ | 2,86 x 10 ⁴ | 2,86 x 10 ³ |
| 40 nm; (µg/l) | 1 | 0,1 | 0,01 | 0,001 | 0,0001 |
| CuSO ₄ ; (µg/l) | 0,05 | 0,04 | 0,03 | 0,02 | 0,01 |

Valmistatud proove inkubeeriti 72 tunni jooksul klaasviaalides pideva loksutamise ja juhendis ettenähtud valgustugevuse juures. Seejuures oli ruumi temperatuur OECD juhendit 201 järgides 24 ± 1 °C.

OECD teste tehti kokku kolm: esimene 1 µm polüstüreenist mikroplasti osakestega, teine 40 nm polüstüreenist mikroplasti osakestega ning kolmas paralleelselt mõlema suurusega mikroplasti osakestega.

3.1.3. Proovide võtmine

Iga 24 tunni möödudes, k.a katse algus päev, tehti mõõtmisi fluoromeetri ja voolutsütomeetriga ning viimasel päeval vaadeldi proove ka mikroskoobi abil. Fluoresentsi

mõõtmiseks kasutati fluoromeetrit Fluoroskan Ascent (Thermo Fischer Scientific Inc. Ameerika Ühendriigid). Voolutsütomeetriks oli BD Accuri Flow Cytometer (BD Biosciences, Šveits), millega mõõdeti proove alates 80 000 FCS-H väärtusest. Iga päev eemaldati proovidest 100 µl voolutsütomeetria ning 50 µl fluoromeetria mõõtmiseks. Viimasel päeval võrreldi mikroskoopimisel samade mikroplasti osakestega proovide kõrgemaid kontsentratsioone kontrolliga.

Fluoromeetri abil mõõdeti iga päev proovide klorofüll a sisaldust, mille järgi saab kaudselt hinnata vetikarakkude hulka proovis. Klorofüll a sisaldus on sarnane kõigis sama vetikaliigi rakkudes, mistõttu selle sisalduse suurenemine korreleerub vetikarakkude hulga suurenemisega. Enne proovide mõõtmist fluoromeetris sooritati KBFI keskkonnatoksikoloogia labori standardprotseduuri järgides klorofüll a ekstraheerimine vetikarakkudest. Ekstraheerimiseks ehk aine (klorofüll a) eraldamiseks pipeteeritakse 96-augulise musta mikroplaadi eraldi aukudesse igast proovist 50 µl ning lisatakse aukudesse 200 µl 96% etanooli, mille järel mikroplaati loksutatakse 2 tunni vältel. Vetikaid saab fluoromeetriselt tuvastada ergastuslainepikkusel 440 nm ja kiirguslainepikkusel 670 nm juures. Fluorestsentsi mõõdetakse kaks korda ning tulemuste analüüsimisel arvestatakse kahe mõõtmise keskmist tulemust.

Voolutsütomeeter võimaldab mõõta vedelikus leiduvate osakeste või rakkude füüsikalisi omadusi. Osakeste või rakkude laserkiirguse hajutamise ning fluorestsentsi kiirgamise parameetreid salvestatakse optilise-elektronilise sidestussüsteemiga. Analüüsimiseks sobivad osakesed või rakud peavad jääma 0,2–150 µm vahemikku. Mõõtmisel suunatakse proovi vedelikus leiduvaid osakesi või rakke laserkiirde, mille järel suunatakse optiliste filtrite abil osakestelt hajunud valgus sobivatesse detektoritesse. Andmeid saadakse iga osakese või sündmuse kohta valguse hajumisel osakeselt või tänu osakese fluorestseeruvatele omadustele. Elektronika abil muudetakse ja saadetakse saadud valgussignaali analüüsimiseks arvutisse. (BD Biosciences, 2002) Voolutsütomeetri tarkvara abil on võimalik nn värvatega eristada erinevaid proovis leiduvaid sarnaste osakeste kogumeid. Nii saab arvutada vastava kogumi osakeste või rakkude arvu kõigist proovist loendatud osakestest või rakkudest.

Mikroskoobiga võrreldi katse viimasel päeval visuaalselt mikroplasti kõrgeima kontsentratsiooniga proove toksikandivaba kontrolliga. Tulemused, mis saadi katsete mikroskoobiga vaatlemisel, on esitatud lisades 2 ja 3. Lisaks kasutati teises katses 40 nm osakeste paremaks nägemiseks lipofiilset fluorestseeruvat värvi *Nile Red*.

3.1.4. Statistiline analüüs

Doos-vastus kõverad (joonised 3–7) koostati katse lõpp-punktis (71. või 72. tunnil) mõõdetud fluoromeetri või voolutsütomeetri näitude alusel, arvutades keskmise väärtuse kolme

iseseisva replikaadi puhul mõõdetud väärtustest. Hajuvusstatistikuna kasutati kolme replikaadi keskmist standardhälvet, mis arvutati Microsoft Excel valemiga „STDEV.S“. Mõõdetud parameetrite (fluorestsents, rakutihedus, SSC-H, FSC-H) statistilist erinevust kontsentratsioonide ning katse korduste vahel arvutati kasutades statistikaprogrammi R ANOVA funktsiooni „aov“ ning Tukey *post-hoc* testi funktsiooni „TukeyHSD“. Rühmade vahel esinevaid erinevusi loeti statistiliselt oluliseks, kui p-väärtus oli väiksem kui 0,05.

3.2. Katse tulemused ja analüüs

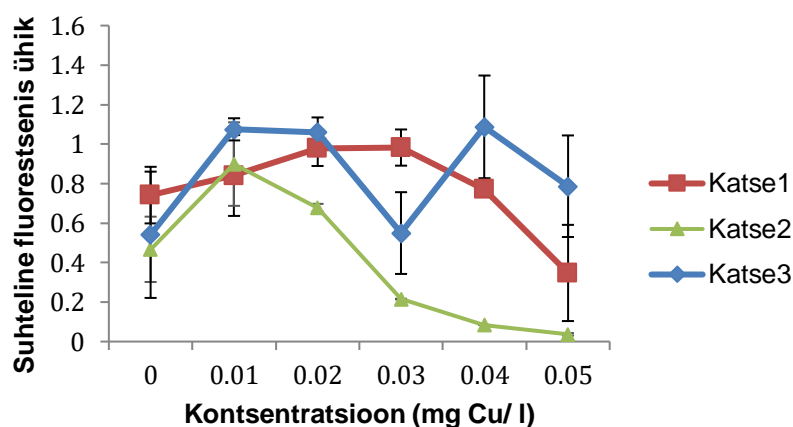
Siinses peatükis on analüüsitud vetika kasvu inhibitsiooni katse tulemusi. Tulemuste analüüsimisel võrreldakse tehtud katse tulemusi ka kahe teise sarnase uurimuse tulemustega, mis käsitlesid samuti polüstüreenist mikroplasti mõju vetikale.

Uurimistöö raames tehtud katses kasutati polüstüreeni mikroosakeste kontsentratsioone vahemikus 1 µg/l kuni 100 µg/l. Need kontsentratsioonid on alampiiril sarnased Euroopas ning USA-s magevee keskkonnas raporteeritud 0,04–34 ng/l ning ülapiiril võrreldavad kõrgeimate merekeskkonnas vaadeldud hulkadega (Besseling *et al.*, 2014, lk 12341). Järgnevalt kirjeldatud kahe teadusartikli katses on siinse uurimistöö katsetega erinevusi selle pikkuses, kasutatud söötmes ja vetikaliigis, kuid sellegipoolest on võimalik neid võrrelda, kuna katsetati sarnaste organismidega (üherakulised vetikad) ning kasutati sama suurusega PS MP-te.

Mao *et al.* (2018) artiklis kirjeldatakse polüstüreenist mikroplasti osakeste mõju magevee vetikale *Chlorella pyrenoidosa*’le. Katse tehti 0,1 µm ja 1,0 µm polüstüreenist mikroplasti osakestega, mille kontsentratsioonid (10, 50 ja 100 mg/l) sarnanesid või ületasid keskkonnast leitud polüstüreenist mikroplasti kontsentratsioone. Polüstüreeni osakeste mõju vaadeldi 30 päeva jooksul vetika viibefaasis (*lag phase*), logaritmilises ja statsionaarses faasis. Vetikakasv toimus kahes osas, millest viibe ja varajases logaritmilises faasis vähendas polüstüreen vetika kasvu ning teises, logaritmilise lõpu ja statsionaarses faasis, toimus tekkinud negatiivsete muutuste paranemine. Polüstüreen tekitas lisaks kasvu ja fotosünteesi aktiivsuse vähendamisele muutusi vetikarakkude morfoloogias. Füüsilise kahjustuse ja oksüdatiivse stressiga kaasnesid ebaselged pürenoidid, moonutatud tülakoidid ja muutused rakumembraanides (rakuseina paksenemine). Katses moodustasid omavahel agregate nii vetikad (homoagregaat) kui ka vetikad ja mikroplast (heteroagregaat).

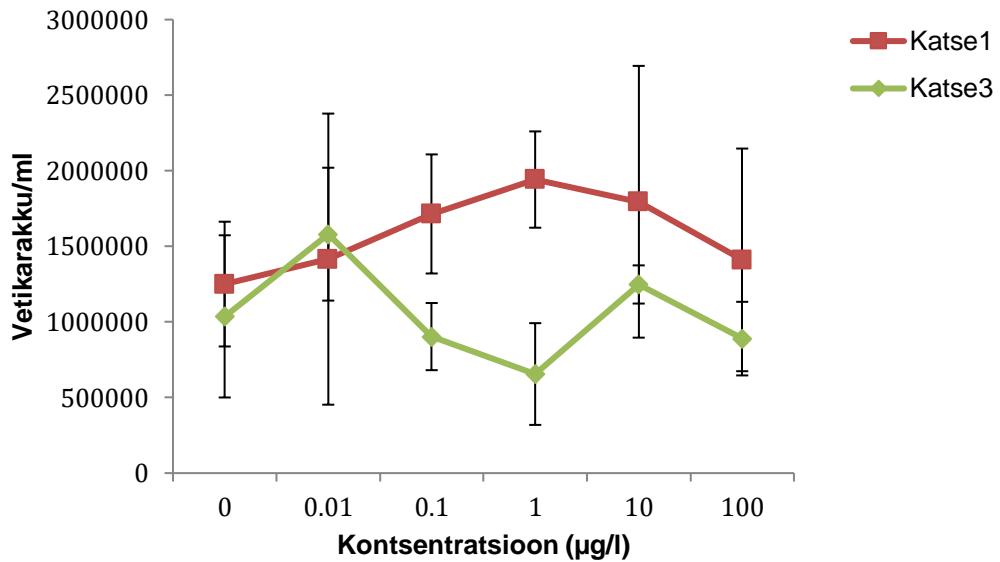
Bergami *et al.* (2017) artiklis kirjeldatud eksperimendis uuriti merevee keskkonnas 40 nm polüstüreenist anioonse karboksüülitud (PS-COOH) ja 50 nm katioonse aminohappega (PS-NH₂) modifitseeritud polüstüreenist plasti mõju rohevetikale *Dunaliella tertiolecta* ja soolvee krevetile *Artemia franciscana*. ISO testi nõudeid järgides korraldati katse kahes osas, millest esimesel uuriti 72 tunni jooksul MP mõju vetikale ning seejärel kasutati esimese katse vetikat

kreveti söötmena 14-päevases katses. 40 nm osakesed ei mõjutanud viidatud artiklis vetika kasvu kuni katses kasutatud maksimaalse kontsentratsioonini 50 mg/l.

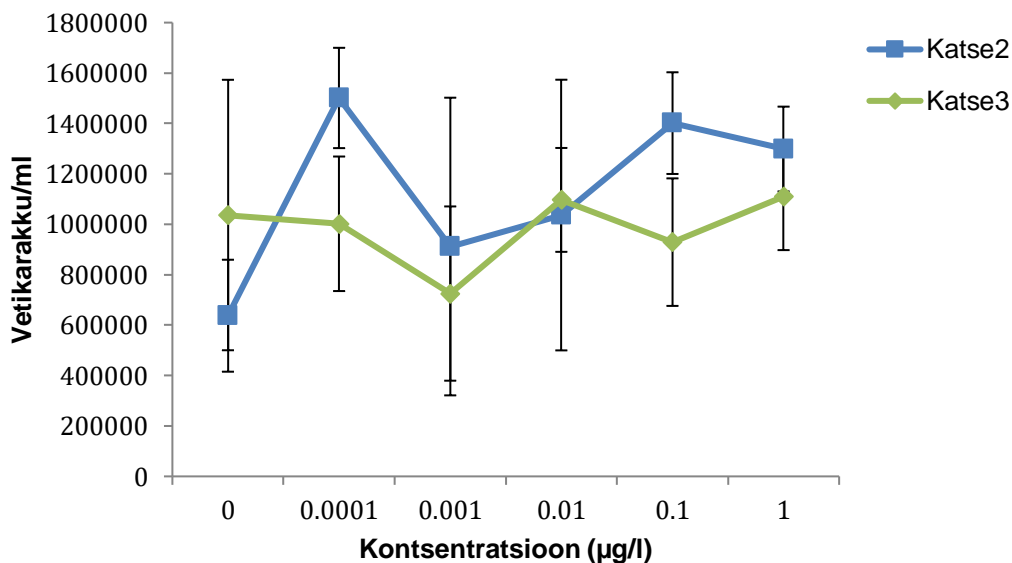


Joonis 3. Positiivse kontrolli vasksulfaadi (CuSO_4) efekt vetika *Raphidocelis subcapitata* klorofüll a fluorestsentsile (ergastuslainepikkus 440 nm, kiirguslainepikkus 670 nm) kolmes katses. Tulemused kajastavad mõõtmisi katse lõpus. Veapiirid näitavad standardhälvet.

Positiivse kontrolli katsesse kaasamisega sooviti saada kinnitust vetikarakkude tundlikkuse järjepidevusele, kasutades teadaoleva efektiga toksikanti vasksulfaati. Klorofüll a fluorestsentsi kaudu hinnati vetikate hulka proovis erinevatel vasksulfaadi kontsentratsioonidel. Joonisel 3 on esitatud kolme eraldiseisva katse positiivsete kontrollide tulemused. Esimeses ja teises katses oli doos-vastus efekt oodatud tulemusega ehk kui vase kontsentratsioon oli kõrgem, vähenes vetikate hulk proovis. Väikestel kontsentratsioonidel soodustas vask vetikakasvu. Kolmandas katses oli vetikarakkude tundlikkus vasele võrreldes varasematega madalam.



Joonis 4. 1µm polüstüreenist mikroplasti efekt vetika *Raphidocelis subcapitata* rakutihedusele katsete lõpus, mõõdetuna voolutsütomeetriga. Veapiirid näitavad standardhälvet.

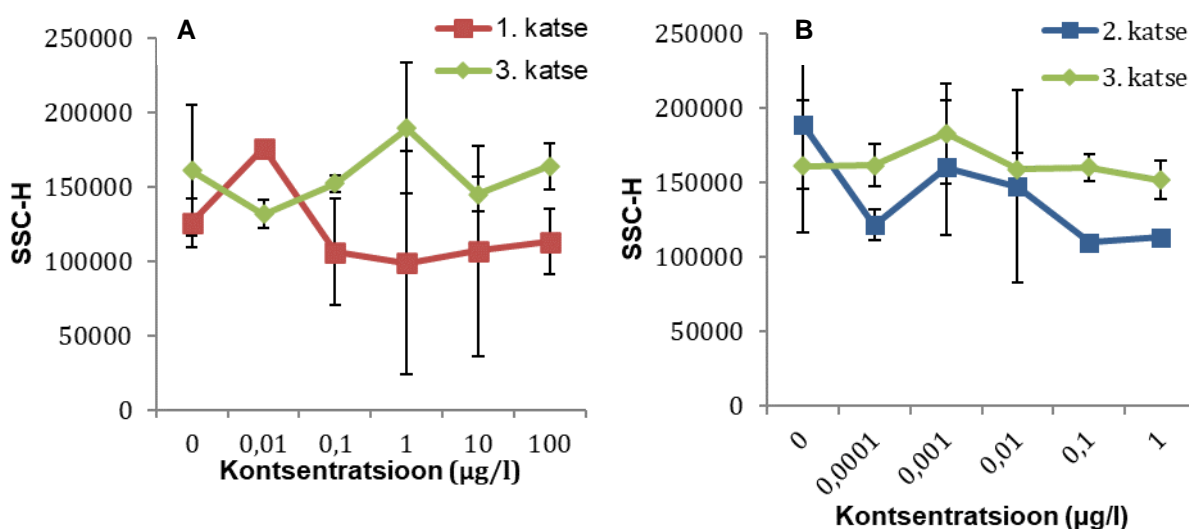


Joonis 5. 40 nm polüstüreenist mikroplasti efekt vetika *Raphidocelis subcapitata* rakutihedusele katsete lõpus, mõõdetuna voolutsütomeetriga. Veapiirid näitavad standardhälvet.

1µm (LISA 2) ja 40 nm (LISA 3) polüstüreenist mikroplasti (PS MP) osakeste mõju vetika *Raphidocelis subcapitata* rakutihedusele katse lõpus uuriti voolutsütomeetri abil. Kummagi suurusega mikroplasti osakesed (joonised 4 ja 5) ei suurendanud ega vähendanud vetikate rakutihedust võrreldes negatiivse kontrolliga statistiliselt olulisel määral (ANOVA, $p > 0,05$).

1 µm PS MP osakestega negatiivset efekti ei tuvastatud ka katse lõpuks (30. päevaks) Mao *et al.* (2018, lk 64) artiklis. Sellegipoolest leiti, et logaritmilises kasvufaasis toksikante sisaldavad proovid on kontrollproovidega võrreldes maha jäänud. Sellele vaatamata ei erinenud tolles töös mikroplasti sisaldavate proovide kasv katse lõpuks oluliselt kontrollist ($p > 0,05$), va 100 mg/l proovide puhul, kus kasv oli koguni kontrollidest kõrgem. 40 nm PS MP osakestega tehtud Bergami *et al.* (2017) katses leiti, et mikroplasti proovides ei muutunud vetikate kasv oluliselt kuni 50 µg/ml (ehk 50 mg/l), mis on palju kõrgem sisaldus siinses uurimistöös kasutatud kontsentratsioonidest.

Kahe 40 nm PS MP (joonis 5) katse vahel ei esinenud statistiliselt olulist erinevust ($p > 0,05$) vetikate rakutiheduses. 1 µm PS MP (joonis 4) korral erines kahes katses vetika rakutihedus oluliselt kontsentratsioonidel 0,10 ning 1 µg/l ($p < 0,05$).



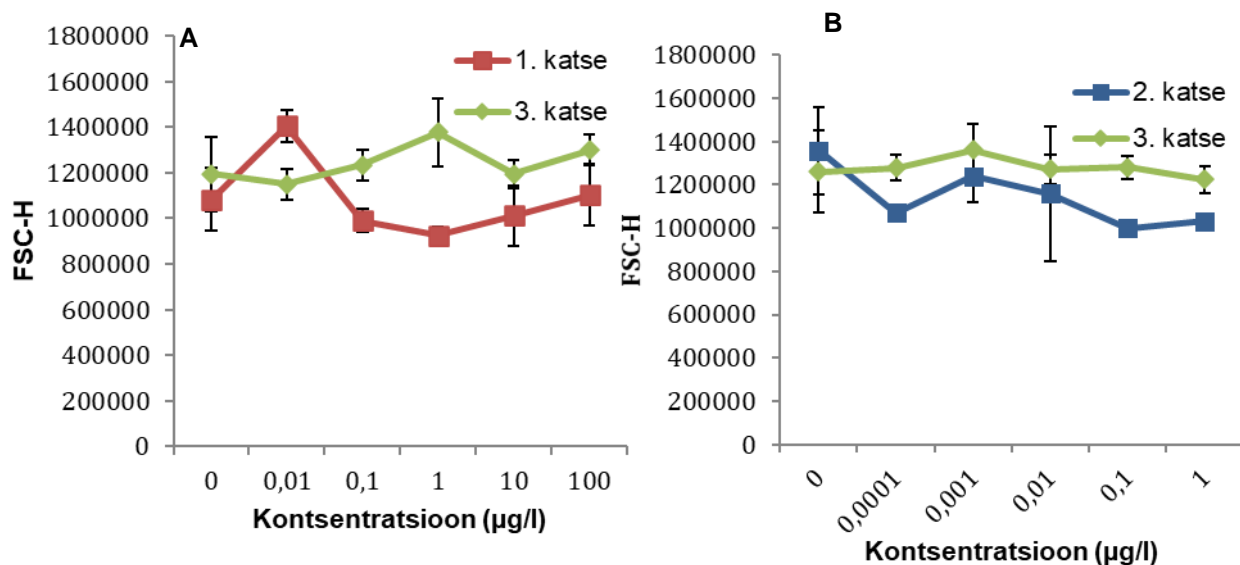
Joonis 6. Polüstüreenist mikroplasti osakeste efekt vetika rakkude keskmisele granulaarsusele (SSC-H) katse lõpuks, mõõdetuna voolutsütomeetriga. A-proovid 1 µm mikroplastiga. B-proovid 40 nm mikroplastiga. Veapiirid näitavad standardhälvet.

Voolutsütomeetria parameetri SSC-H ehk granulaarsust tuvastava külghajuvusega on võimalik hinnata muutusi vetika rakkude struktuuris. Olulised kõrvalekalded SSC-H parameetris võivad viidata MP kinnitumisele rakkude külge või MP esile kutsutud morfoloogilistele muutustele.

1 µm PS MP-d (joonis 6A) muutsid vetikarakkude granulaarsust võrreldes kontrolliga statistiliselt oluliselt ($p < 0,05$) vaid 1. katses kontsentratsiooni 0,01 µg/l juures. SSC-H näidud antud kontsentratsiooni juures erinesid oluliselt ($p < 0,05$) ka kõigist teistest 1. katse kontsentratsioonide tulemustest. Sama efekt ei esinenud nende osakeste puhul 3. katses,

mistõttu võis nähtud seos olla juhuslik. Kahe katse vahel erines 1 µm PS MP-de puhul granulaarsus ehk SSC-H parameeter statistiliselt oluliselt kõigil kontsentratsioonidel peale kontrollide ($p < 0,05$).

40 nm osakesed (joonis 6B) ei mõjutanud võrreldes kontrolliga vetikarakkude granulaarsust SSC-H kummaski katses statistiliselt olulisel määral ($p > 0,05$). Sellegipoolest ei olnud tulemused kahes iseseisvas katses igal kontsentratsioonil sarnased: SSC-H näidud erinesid statistiliselt oluliselt kontsentratsioonidel 0,0001, 0,1 ning 1 µg/l.



Joonis 7. Polüstüreenist mikroplasti osakeste efekt vetika rakkude keskmisele suurusele (FSC-H) katse lõpuks, mõõdetuna voolutsütomeetriga. A-proovid 1 µm mikroplastiga. B-proovid 40 nm mikroplastiga. Veapiirid näitavad standardhälvet.

Voolutsütomeetria parameetri FSC-H ehk otsehajuvusega, mis esindab osakeste või rakkude suurust, on võimalik hinnata muutusi vetika rakkude suuruses. Olulised kõrvalekalded FSC-H parameetris võivad viidata MP esile kutsutud muutustele raku suuruses või rakkude aglomeratsioonile.

1 µm PS MP-de (joonis 7A) mõjutasid vetikarakkude suurust parameetri FSC-H alusel statistiliselt oluliselt ($p < 0,05$) vaid 1. katses kontsentratsiooni 0,01 µg/l juures, kus võis täheldada kontrollist suuremaid rakke. FSC-H näidud antud kontsentratsiooni juures erinesid oluliselt ($p < 0,05$) ka kõigist teistest 1. katse PS MP-de kontsentratsioonidest. See efekt ei kordunud aga 3. katses, mistõttu võib pidada 1. katses leitud seost juhuslikuks. 1 µm PS MP-de puhul erines FSC-H parameeter kahe katse vahel oluliselt ($p < 0,05$) kontsentratsioonidel 0,01 kuni 1 µg/l.

40 nm osakesed (joonis 7B) ei muutnud parameetri FSC-H alusel hinnates vetikarakkude suurust või agregeeritust ($p > 0,05$). Sellegipoolest ei olnud tulemused kahes iseseisvas katses igal kontsentratsioonile sarnased: FSC-H näidud erinesid statistiliselt olulisel määral kontsentratsioonidel 0,0001; 0,1 ning 1 $\mu\text{g/l}$.

3.2.1. Naatriumasiidi mõju

Uurimistöö katses kasutatud polüstüreenist mikroplasti algse tootjalt saadetud lahuses oli naatriumasiidi (NaN_3) 0,09% ehk 0,9 g/l. Euroopa Kemikaaliagentuuri andmetel on antud kemikaali EC50 (ehk poole võrra vetika kasvu takistav) *Raphidocelis subcapitata* puhul 0,35 mg/l (ECHA 2019b). Tehtud katses oli kõige kõrgema kontsentratsiooni (100 $\mu\text{g/l}$) plasti sisalduse juures naatriumasiidi kontsentratsioon 0,009 mg/l, mistõttu on selle aine iseseisev toksiline mõju ebatõenäoline.

KOKKUVÕTE

Uurimistöö eesmärk oli välja selgitada polüstüreenist mikroplasti (PS MP) osakeste mõju mikrovetikale *Raphidocelis subcapitata* ning leida vastused küsimustele: mis on mikroplast ja miks on oluline uurida mikroplasti mõju elusloodusele ning kuidas mõjutab mikroplast vetika *Raphidocelis subcapitata* kasvukiirust ja raku morfoloogiat. Eesmärgi saavutamiseks kasutati kvantitatiivset uurimismeetodit, milleks tehti katse järgides OECD juhendi 201 katsetingimusi, milles käsitletakse vetikate kasvukiiruse inhibeerimistesti nõudeid.

Katse mõju uuriti rohevetikale *Raphidocelis subcapitata* kolmes katses, millest esimene tehti 1 µm PS MP osakestega, teine 40 nm PS MP osakestega ning viimane katse tehti paralleelselt mõlemate osakestega. 40 nm ja 1 µm PS MP osakeste kontsentratsioonid olid vahemikus 0,0001 kuni 100 µg/l. Lisaks MP proovidele lisati katsesse negatiivsed kontrollid ehk toksikandita proovid ning positiivsed kontrollid vasksulfaadiga (CuSO₄) ehk proovid, mille toksikandi mõju on varasemate uuringutega teada. Vasksulfaadi proovid olid kontsentratsioonidega 0,01 kuni 0,05 mg/l. Eksperiment kestis 72 tundi, mille iga 24 tunni möödudes, kaasaarvatud ka 0 tunnil, tehti mõõtmisi fluoromeetriga ja voolutsütomeetriga. Viimasel päeval vaadeldi ka vetikarakke mikroskoobi all. Fluoromeetriga mõõdeti vetikate autofluorestsentsi, voolutsütomeetriga vetikarakkude ja plasti suurust (SSC), granulaarsust (FSC) ning mikroskoobiga vaadeldi rakkude morfoloogiat. Tulemuste analüüsimiseks koostati katse lõpp-punktis (71. või 72. tunnil) doos-vastus kõverad fluoromeetri või voolutsütomeetri tulemustega, võttes koostamisel aluseks kolme replikaadi keskmise väärtuse. Toksikantide mõju hindamisel kasutati seega nelja parameetrit: fluorestsents, rakutihedus, SSC-H ja FSC-H.

Positiivses kontrollis vetika hulga hindamisel kasutatud klorofüll a sisaldusest fluorestsentsis selgus, et esimeses ja teises katses oli doos-vastus efekt oodatud tulemusena ehk kui vasekontsentratsioon oli suurem, vähenes vetikate hulk proovis. Vask soodustas vetikakasvu väiksematel kontsentratsioonidel. Kolmandas katses oli vetika rakkude tundlikkus vasele võrreldes eelnevatega väiksem. 1 µm ja 40 nm PS MP osakestega ei tuvastatud negatiivset mõju vetikakasvule ega raku morfoloogiale võrreldes toksikandivabade proovidega. 1 µm PS MP-de puhul erines kontrolli SSC-H lõplikest väärtustest vaid 1. katse kontsentratsiooni 0,01 µg/l tulemus ning 40 nm osakeste puhul puudus plasti mõju SSC-H-le ehk granulaarsusele. Ka parameetri FSC-H puhul, mida saab pidada suuruse mõõduks, erines 1 µm PS MP-de kontrolli FSC-H lõplikest väärtustest vaid 1. katse kontsentratsiooni 0,01 µg/l tulemus.

Uurimistöö raames tehtud eksperimendis ei leitud polüstüreenist mikroplasti olulist negatiivset mõju vetika rakutihedusele, suurusele, kujule ega struktuurile. Edaspidi tuleks mikroplasti osakeste mõju uurida toiduahela perspektiivist, kuna vetikatele, kes on toiduahela

esmased biomassi tootjad, võib kinnitunud plast või sellest leostuv kemikaal häirida nende elutegevust ja toiduahelas edasi kandudes ka teisi organisme kahjustada. Näiteks võiks saastunud vetika edasi kandumist toiduahelas uurida vesikirbuga. Kindlasti peab tulevikus uurima ka teiste plastitüüpide mõju vetikatele ja keskkonnale.

POLYSTYRENE MICROPLASTIC IMPACT TO MICROALGAE *RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA*

Johanna Juhkami

Summary

The purpose of this research paper was to find out the impact of polystyrene microplastic to microalgae *Raphidocelis subcapitata* and find the answers to the following questions: What is microplastic and why is it important to study its impact on nature? How does microplastic impact algae growth inhibition and its morphology?

The chosen method for this research was quantitative, so to collect data and information, a number of experiments were done. In the experiment the microalgae *Raphidocelis subcapitata* and polystyrene microplastic (PS MP) particles sizes 1 μm and 40 nm were used. All three experiments followed the requirements of OECD 201, which is the algal growth inhibition test. The concentrations of 40 nm and 1 μm PS MP ranged between 0.0001 and 100 $\mu\text{g/l}$. In addition to the microplastic samples, the positive control copper sulfate (CuSO_4) and negative control were also added. Positive control means a sample with a toxicant, the impact of which has been proved by previous studies. Negative control is a sample without the toxicant. The copper sulfate concentrations were 0.01 to 0.05 mg/l. The experiment lasted for 72 hours and after every 24 hours, including the hour 0, measurements with a fluorometer and a flow cytometer were done. The microscopy was only done at the end of the experiment. For impact assessment, 4 parameters were evaluated: fluorescence, cell density, SSC-H (granularity) and FSC-H (size). With these parameters the dose-response curves with data from the endpoint of the experiment were made. The results were calculated based on three replicates of each concentration.

In the first and the second experiment chlorophyll a content in copper sulfate samples were as expected. It means that on the higher concentrations the number of algal cells decreased. At lower concentrations copper sulfate favored algal growth. In the third experiment, the sensitivity of algal cells to copper was lower than expected. There were no negative effects to algal cell density and morphology with the toxicant PS. Only one of the concentrations with 1 μm PS MP particles (0,01 $\mu\text{g/l}$) in the first experiment had differences with negative controls in the parameter SSC-H (granularity). Samples with 40 nm PS particles had no effect on algal SSC-H. The results were similar on the parameter FSC-H (size), where the differences had been in same concentration (0,01 $\mu\text{g/l}$) in 1 μm PS sample. In addition, the morphology of the algal cells was difficult to study with microscopy and also the possible aggregation of algal and MP.

In conclusion, in the example of the experiments concluded for this research paper there were no negative polystyrene microplastic effects on algae *Raphidocelis subcapitata*. In the future, experiments on food chain effects could be done with algae who have been affected with MP by adding a higher trophic level organism into the experiment, for example a planktonic crustacean. It is important to study the MP's impact to other marine species, because they could spread to other species through the food chain.

KASUTATUD ALLIKAD

Kasutatud kirjandus:

BD Biosciences 2002. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. Ameerika Ühendriigid: BD Biosciences.

Bergami, E.; Pugnali S.; Vannuccini M. L.; Manfra L.; Faleri C.; Savorelli F.; Dawson K. A.; Corsi I. 2017. Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana*. *Aquatic Toxicology*, 189, lk 159–169.

Besseling, Ellen; Wang, Bo; Lürling, Miquel; Koelmans, Albert A. 2014. Nanoplastic Affects Growth of *S. obliquus* and Reproduction of *D. Magna*. *Environmental Science & Technology*, 48, lk 12336–12343.

Boucher, Julien; Friot, Damien 2017. Primary Microplastics in the Oceans: A Global Evaluation of Sources. Šveits, Gland: IUCN.

Cole, Matthew; Lindeque, Pennie; Halsband, Claudia; Galloway, Tamara S. 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 62, lk 2588–2597.

European Commission (DG Environment) 2017. Intentionally added microplastics in products: Final report. Inglismaa Ühendkuningriik: European Commission (DG Environment).

Field, Christopher B.; Behrenfeld, Michael J.; Randerson, James T.; Falkowski, Paul. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281, lk 237–240.

Jiang, Jia-Qian. 2018. Occurrence of microplastics and its pollution in the environment: A review. *Sustainable Production and Consumption*, 13, lk 16–23.

Karami, Ali. 2017. Gaps in aquatic toxicological studies of microplastics. *Chemosphere*, 184, lk 841–848.

Mao, Yufeng; Ai, Hainan; Chen, Yi; Zhang, Zhenyu; Zeng, Peng; Kang, Li; Li, Wei; Gu, Weikang; He, Qiang; Li, Hong. 2018. Phytoplankton response to polystyrene microplastics: Perspective from an entire growth period. *Chemosphere*, 208, lk 59–68.

Olli, Kalle 2010. Algoloogia. Tartu: Tartu ülikool.

Rezania, Shahabaldin; Park, Junboun; Din, Mohd Fadhil Md; Taib, Shazwin Mat; Talaiekhosravi, Amirreza; Yadav, Krishna Kumar; Kamyab, Hesam. 2018. Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. *Marine Pollution Bulletin*, 133, lk 191–208.

Zhang, Cai; Chen, Xiaohua; Wang, Jiangtao; Tan, Liju. 2017. Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastic and algae. *Environmental Pollution*, 220, lk 1282–1288.

Wagner, Martin; Lambert, Scott 2018. Freshwater Microplastics. Emerging Environmental Contaminants? Barceló, Damià; Kostianoy, Andrey G. (toim). The Handbook of Environmental Chemistry 58. Switzerland, Cham: Springer International Publishing AG.

Wright, Stephanie L.; Thompson, Richard C.; Galloway, Tamara S. 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, 178, lk 483–492.

Elektroonilised allikad:

ECHA 2019a. Information requirements. Kättesaadav:

<https://echa.europa.eu/regulations/reach/registration/information-requirements> (14.03.2019).

ECHA 2019b. Toxicity to aquatic algae and cyanobacteria. Kättesaadav:

<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14174/6/2/6> (17.03.2019).

Geyer, Roland; Jambeck, Jenna R.; Law, Kara Lavender. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3:e1700782, lk 1-5. Kättesaadav:

<http://advances.sciencemag.org/content/3/7/e1700782> (17.03.2019).

IEEP. Polystyrene. Kättesaadav: [https://ieep.eu/uploads/articles/attachments/376c45d7-e02b-430c-8507-](https://ieep.eu/uploads/articles/attachments/376c45d7-e02b-430c-8507-86adb0be97c8/IEEP_ACES_Polystyrene_Product_Fiche_Final_April_2017.pdf?v=63664509972)

[86adb0be97c8/IEEP_ACES_Polystyrene_Product_Fiche_Final_April_2017.pdf?v=63664509972](https://ieep.eu/uploads/articles/attachments/376c45d7-e02b-430c-8507-86adb0be97c8/IEEP_ACES_Polystyrene_Product_Fiche_Final_April_2017.pdf?v=63664509972) (17.03.2019).

OECD 2011. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Kättesaadav: [https://www.oecd-](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en)

[ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-201-alga-growth-inhibition-test_9789264069923-en) (14.03.2019).

SAG 2019. 61.81 Raphidocelis subcapitata. Kättesaadav: https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=61.81 (10.03.2019).

LISAD

LISA 1. OECD juhend 201, vetika sööde

Tabel 1. AAP-söötme (US. EPA) ja OECD TG 201 söötme koostis (OECD 2011, 18).

| Component | AAP | | OECD | |
|---|----------|------------|---------|------------|
| | mg/L | mM | mg/L | mM |
| NaHCO ₃ | 15.0 | 0.179 | 50.0 | 0.595 |
| NaNO ₃ | 25.5 | 0.300 | | |
| NH ₄ Cl | | | 15.0 | 0.280 |
| MgCl ₂ ·6(H ₂ O) | 12.16 | 0.0598 | 12.0 | 0.0590 |
| CaCl ₂ ·2(H ₂ O) | 4.41 | 0.0300 | 18.0 | 0.122 |
| MgSO ₄ ·7(H ₂ O) | 14.6 | 0.0592 | 15.0 | 0.0609 |
| K ₂ HPO ₄ | 1.044 | 0.00599 | | |
| KH ₂ PO ₄ | | | 1.60 | 0.00919 |
| FeCl ₃ ·6(H ₂ O) | 0.160 | 0.000591 | 0.0640 | 0.000237 |
| Na ₂ EDTA·2(H ₂ O) | 0.300 | 0.000806 | 0.100 | 0.000269* |
| H ₃ BO ₃ | 0.186 | 0.00300 | 0.185 | 0.00299 |
| MnCl ₂ ·4(H ₂ O) | 0.415 | 0.00201 | 0.415 | 0.00210 |
| ZnCl ₂ | 0.00327 | 0.000024 | 0.00300 | 0.0000220 |
| CoCl ₂ ·6(H ₂ O) | 0.00143 | 0.000006 | 0.00150 | 0.00000630 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O) | 0.00726 | 0.000030 | 0.00700 | 0.0000289 |
| CuCl ₂ ·2(H ₂ O) | 0.000012 | 0.00000007 | 0.00001 | 0.00000006 |
| pH | 7.5 | | 8.1 | |

LISA 2. Vetikarakud 1 μm mikroplasti osakekestega

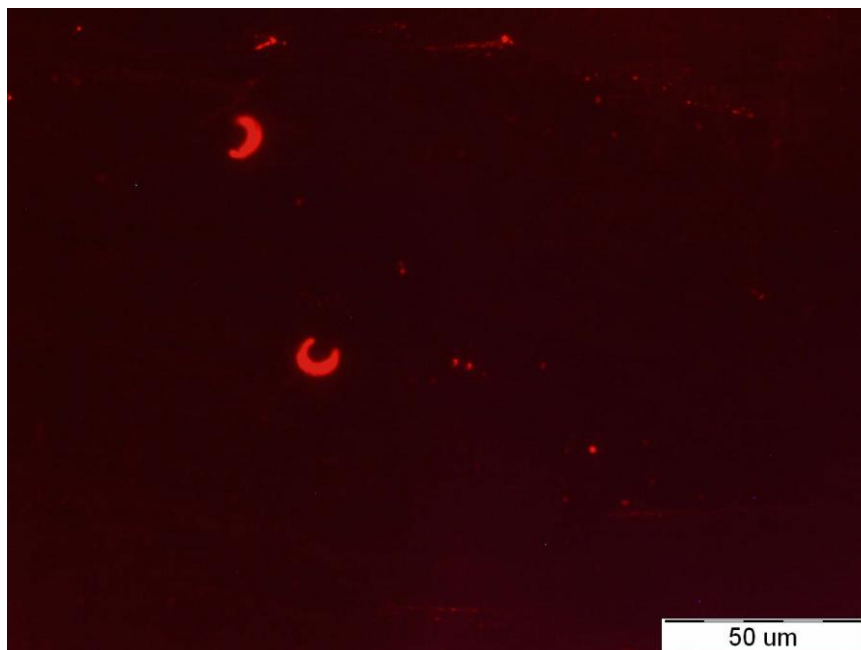


Joonis 1. Esimese katse I kontrolli vetikarakud, 400 x suurendusega.

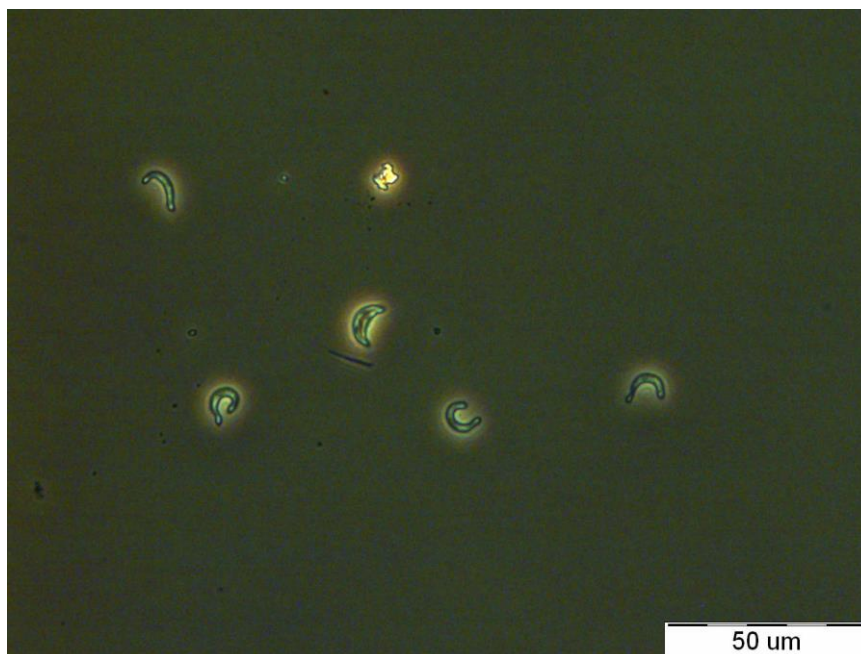


Joonis 2. Kolmanda katse 1 μm PS MP osakekestega proovi vetikarakk, 1000 x suurendusega.

LISA 3. Vetikarakud 40 nm mikroplasti osakekestega



Joonis 3. Teise katse vetikarakud 40 nm PS MP (100 μg/l) proovis, värvituna *Nile Red*ga. 40 x suurendus.



Joonis 4. Kolmanda katse kontrolli vetikarakud, 400 x suurendusega.