

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Ena Spremo

Metode ekstrakcije mikroplastike iz školjkaša

DIPLOMSKI RAD

Dubrovnik, 2019.

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Ena Spremo

Metode ekstrakcije mikroplastike iz školjkaša

DIPLOMSKI RAD

Mentor:

doc.dr.sc. Ana Bratoš Cetinić

Komentor:

dr.sc. Marina Brailo Šćepanović

Dubrovnik, 2019.

Ovaj diplomski rad je izrađen pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ane Bratoš Cetinić u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Mikroplastika.....	3
1.1.1. Primarna i sekundarna mikroplastika.....	4
1.1.2. Rasprostranjenost mikroplastike u morskom okolišu	5
1.1.3. Mikroplastika u Sredozemlju i drugim europskim morima	7
1.2. Prijenos postojanih bioakumulacijskih i toksičnih tvari te aditiva iz mikroplastike u morske organizme.....	8
1.3. Metode za ekstrakciju mikroplastike iz organizama	9
1.4. Istraživanja mikroplastike u školjkašima	10
1.4.1. <i>Mytilus galloprovincialis</i> kao model organizam za istraživanje mikroplastike.....	11
1.5. Cilj istraživanja.....	12
2. MATERIJALI I METODE	13
3. REZULTATI.....	16
3.1. Morfometrijske mjere analiziranih jedinki dagnje	16
3.2. Razgradnja tkiva analiziranih dagnji	17
3.3. Materijali pronađeni nakon razgradnje tkiva	21
4. RASPRAVA.....	27
5. ZAKLJUČCI	30
6. LITERATURA.....	31

SAŽETAK

Metode ekstrakcije mikroplastike iz školjkaša

Čestice plastike manje od 5 mm nazivaju se mikroplastikom, a mogu se pronaći u atmosferi, tlu, morskom i slatkovodnom okolišu. Problemu mikroplastike značajnije se pristupilo u posljednjem desetljeću nakon što je količina mikroplastike u okolišu postala zabrinjavajuća. Čestice mikroplastike imaju velik i štetan utjecaj na morske organizme, odnosno na njihove fiziološke funkcije. Razvijene su brojne metode za ekstrakciju mikroplastike iz tkiva različitih organizama pa tako i školjkaša. U sklopu ovog istraživanja uspoređene su tri metode ekstrakcije iz dagnje *Mytilus galloprovincialis*: ekstrakcija iz tkiva pomoću kalijevog hidroksida, dušične kiseline te vodikovog peroksida. Tkivo se najbrže razgradilo u kalijevoj lužini na 60°C, zatim u dušičnoj kiselini na 60°C. Za razgradnju tkiva u vodikovom peroksidu bilo je potrebno više vremena, međutim, svaka od triju metoda pokazala se uspješnom.

KLJUČNE RIJEČI: mikroplastika/ metode ekstrakcije/ morski okoliš/ školjkaši

ABSTRACT

Methods of microplastic extraction from bivalves

Plastic particles smaller than 5 mm are called microplastics, and can be present in atmosphere, ground, freshwater and marine water. The microplastic problem became more important in last decade because quantity rates are quite worrying. Microplastic particles have huge and destructive effects on marine organisms, relatively on their physiology functions. There are more methods for microplastic extraction from tissues of different organisms especially from mussels. In this research are used three methods for extraction microplastics from tissue of mussel *Mytilus galloprovincialis*: extraction from tissue with potassium hydroxide, nitric acid, hydrogen peroxide. Tissue has been faster degraded with potassium hydroxide on temperature 60°C, after that in nitric acid also on 60°C. It takes longer time for tissue degradation in hydrogen peroxide, however, any of these three methods has showed succesfull.

KEY WORDS: microplastics/ extraction methods/ marine environment/ mussels

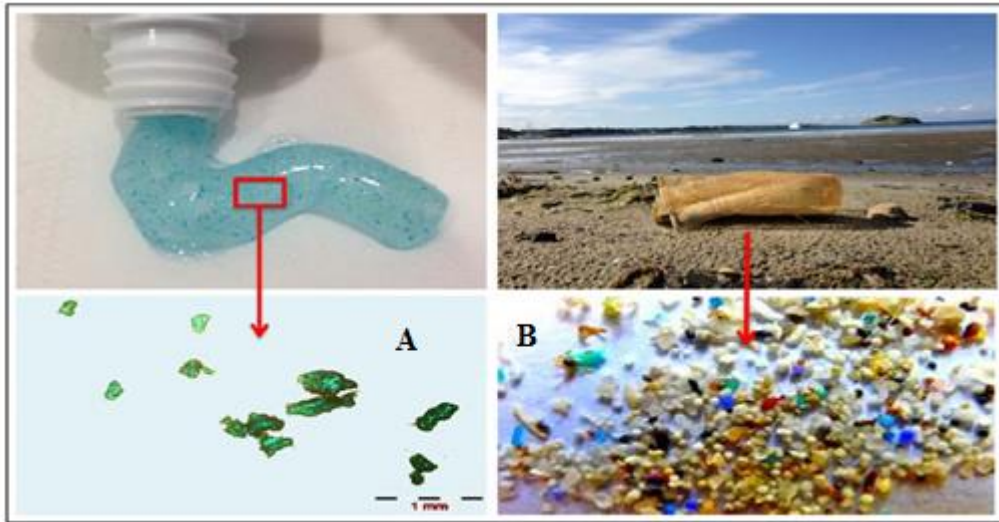
1.UVOD

Plastika je naziv koji se koristi za opisivanje materijala nastalih procesom polimerizacije od jednostavnih spojeva. Obuhvaća široku skupinu sintetičkih i polusintetičkih organskih polimera visoke molekulske mase, dobivenih iz fosilnih izvora kao što su ugljen, prirodni plin, sirova nafta (Dehaut i sur., 2016). Velike plastične čestice formiraju se taljenjem i oblikovanjem smole ili od različitih vlakana te imaju niz primjena, od odjeće do industrijskih struktura (Lusher i sur., 2017). Glavne su značajke plastičnih materijala jednostavnost za rad i oblikovanje, niski troškovi proizvodnje, vodootpornost, dobri su električni izolatori. Međutim, većina ih ne može izdržati vrlo visoke temperature, te nisu otporni na koroziju i kemijske učinke. Neki nisu biorazgradivi ili pogodni za reciklažu, a gorenjem otpuštaju spojeve koji onečišćuju okoliš.

Među više od 20 skupina polimera šest ih čini 80 % proizvedene plastike u Europi: polipropilen (PP) visoke i niske gustoće, polietilen (HDPE i LDPE), polivinil klorid (PVC), poliuretani (PUR), polietilen tereftalat (PET), polistiren (PS) (Dehaut i sur., 2016). Postoje tri velike kategorije plastike koje se razlikuju po obliku, agregatnom stanju te temperaturi pri kojoj su promjenjivi, a to su termoplastika, duromeri i elastomeri (Lusher i sur., 2017). Termoplastika je plastika koja postaje savitljiva iznad određene temperature, a nakon hlađenja se vraća u čvrsto stanje. Većina tipova termoplastike ima veliku molekularnu težinu. Duromeri su petrokemijski materijali, obično u tekućem obliku, općenito su jači od termoplastičnih materijala te su otporniji na visoke temperature. Elastomeri su polimeri visoke elastičnosti i vrlo slabih međumolekularnih sila, i najmanje su otporni od plastičnih materijala (Polymers International Australia, 2014).

Izum plastike 1907. godine smatra se značajnim otkrićem, a plastični proizvodi ubrzo su postali prisutni u svakodnevnom životu. Dugo su se zanemarivali štetni utjecaji plastičnih materijala na ljudsko zdravlje, ekosustave i klimu. Desetljeća lošeg upravljanja otpadom dovela su do međunarodne krize koja prijete svjetskim morima. Znanstvenici predviđaju da će, ako se ništa ne promijeni, do 2050. u morima biti više plastičnih čestica nego ribe. Primjerice, 275 milijuna tona plastičnog otpada nastalo je u 192 obalne zemlje tijekom godine 2010., a 4,8-12,7 milijuna tona ušlo je u more (Merino i sur., 2018).

Jedna od glavnih karakteristika plastike je njezina trajnost. Radi neodgovarajućeg upravljanja otpadom dolazi do kontaminacije plastikom na kopnu i u moru. Naime, veći se komadi plastike fragmentiraju, što je osobito vidljivo u obalnom području u kojem je utjecaj valova i UV svjetlosti najizraženiji. Visoka temperatura, zajedno s intenzivnim UV zračenjem utječe na razgradnju plastike, dok niža temperatura i manje UV zračenje dovode do znatno sporije fragmentacije (Andrady i sur., 2015) (Slika 1).



Slika 1. Primjeri mikroplastike iz proizvoda za osobnu njegu, A) pasta za zube i B) ostatci od velikih plastičnih komada (Nerland i sur., 2014)

Veličina komadića plastike u okolišu je različita pa se plastika razlikuje po veličini: makroplastika (>25 mm), mezoplastika (5-25 mm), mikroplastika (<5 mm), nanoplastika (Van Cauwenberghe i sur., 2015a).

1.1. Mikroplastika

Manje plastične čestice, manje od 5 mm nazivaju se mikroplastikom (Slika 2), a mogu se pronaći u različitim područjima kao što su atmosfera, tlo, slatkovodni i morski okoliš. U vodenom okolišu mikroplastika se pronalazi na plažama, kontinentskoj podini, dubokomorskom sedimentu te u površinskim i podzemnim vodama. Također, zabilježen je unos hranom u mnogobrojne morske organizme među kojima su komercijalno važne ribe i beskralježnjaci (Lusher i sur., 2017). Čestice mikroplastike najčešće se klasificiraju prema morfološkim karakteristikama: veličini, obliku i boji. Sadržavaju monomere i plastične aditive koji mogu imati toksična svojstva koja ugrožavaju morske organizme. Zagađenje mikroplastikom izaziva pozornost znanstvenika i istraživača radi velike količine u okolišu i mogućih bioloških učinaka na morske organizme (Santana, 2015).



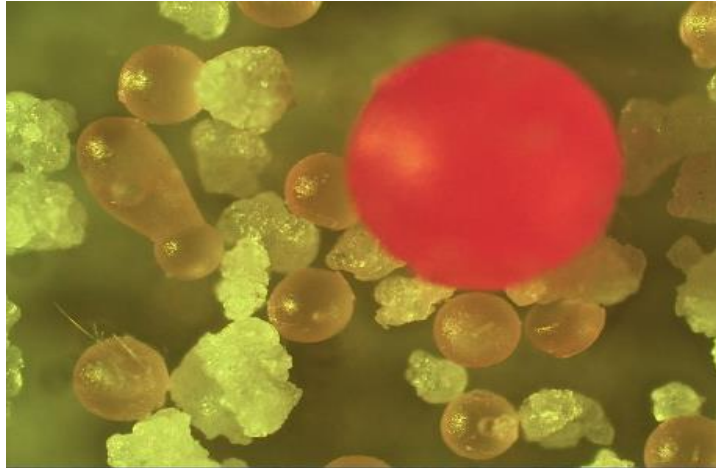
Slika 2. Mikroplastika prikupljena iz morske vode, obala i morskog sedimenta (Izvor: Lavender Law i Thompson, 2014)

Prema obliku, čestice mikroplastike znanstvenici najčešće dijele u pet glavnih kategorija: fragmenti (niti), vlakna, kuglice, pjena, peleti (Lusher i sur., 2017). Još 1960-ih zabilježeni su plastični fragmenti u ptičjim organizmima (Harper i Fowler, 1987), a 1970-ih u planktonskim uzorcima (Carpenter i Smith, 1972). Međutim, pozornost znanstvene zajednice ovaj je problem privukao tek prije desetak godina od kada je zabilježen veći broj publikacija o različitim aspektima onečišćenja mikroplastikom.

Tijekom različitih istraživanja, mikroplastika je pronađena unutar tijela širokog spektra morskih organizama od beskralježnjaka, preko riba i ptica do sisavaca. Plastika sadrži kemikalije dodane tijekom proizvodnje, a može apsorbirati i toksične tvari poput pesticida i drugih kemikalija iz okolne morske vode. Tako se kemikalije iz ingestirane plastike prenose u tkiva. Plastične čestice manje veličine, mikroplastika, prolaze kroz stanične membrane te uzrokuju oštećenja tkiva. Probavljena mikroplastika može utjecati na fiziologiju organizma u kojem se nalazi i ugroziti njegovo funkcioniranje (Andrady i sur., 2015).

1.1.1. Primarna i sekundarna mikroplastika

Primarnu mikroplastiku (Slika 3) predstavljaju plastične čestice koje se proizvode u veličini manjoj od 5 mm kao što su peleti smole promjera 3-5 mm koji se koriste kao sirovina u proizvodnji plastike, mikrogranule ugrađene u kozmetičke proizvode, kuglice za abrazivno pjeskarenje površina. Sekundarna mikroplastika rezultat je fragmentacije i raspada većih plastičnih čestica u okolišu. Ulazni put primarne mikroplastike ovisi o njezinoj primjeni. Tako čestice kozmetičkih proizvoda obično ulaze u okoliš preko otpadnih voda, mikroplastika iz kuglica za abrazivno pjeskarenje ulazi preko atmosfere i otpadnih voda, dok primarna mikroplastika koja se koristi za sirovine može ući u okoliš otjecanjem sirovina iz postrojenja za preradu. Ovakva vrsta mikroplastike može se prenijeti izravno u morski okoliš kad su čestice premale za zadržavanje prilikom pročišćavanja otpadnih voda (Lusher i sur., 2017).



Slika 3. Mikrovlakna (izvor: Microplastic Marine Debris)

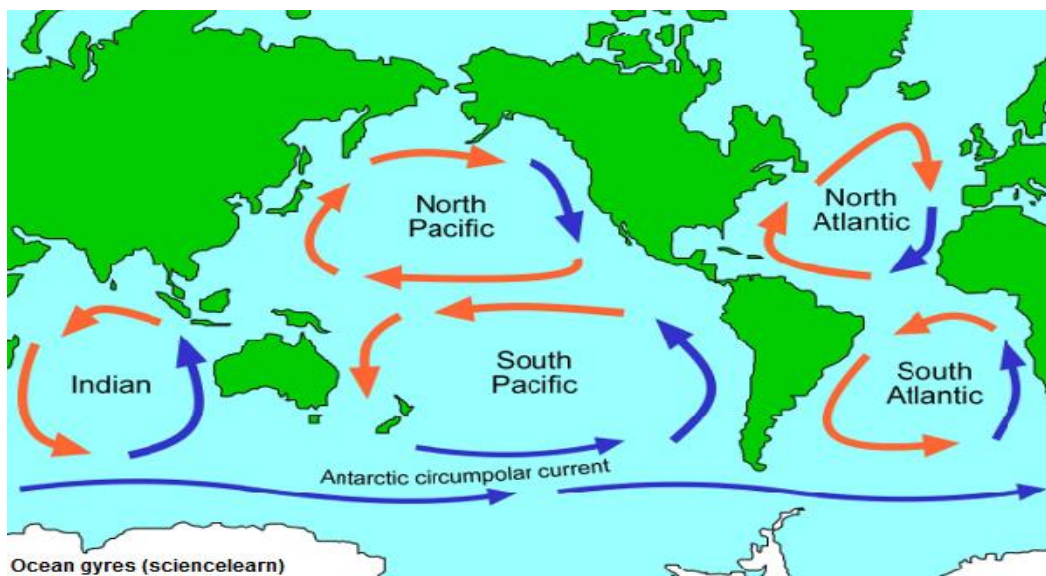
Glavni čimbenici okoliša povezani s proizvodnjom sekundarne mikroplastike su izloženost UV zračenju, temperaturi i abraziji. Postoji više ulaznih puteva sekundarne mikroplastike u okoliš. Tako npr. čestice tekstila mogu proći kroz otpadnu vodu nakon pranja ili kroz zrak prilikom sušenja. Raspadnute plastične čestice koje se koriste u poljoprivredi mogu ući u okoliš otjecanjem iz tla. Fragmentacijom i raspadanjem plastičnih čestica radi UV zračenja mikroplastika se unosi u atmosferu i more, a raspadom plastičnog otpada u obalni pojas. Ovi procesi bit će sporiji u vodenim sredinama i u područjima koja su manje izložena UV zračenju i niskoj temperaturi (Lusher i sur., 2017).

1.1.2. Rasprostranjenost mikroplastike u morskom okolišu

Iako se dio plastike spaljuje i reciklira, velika količina završava u morskom okolišu. Brojna dosadašnja istraživanja mikroplastike bila su ograničena na površinski sloj mora i neuston zbog svojstva plastike da pluta, a zatim su se istraživanja proširila na pojas od nekoliko metara dubine. Međutim, u istraživanjima na području Kine i Koreje 2006. godine, mikroplastika je pronađena i na većim dubinama (Van Cauwenberghe i sur., 2015a). Mikroplastika je prisutna u svim svjetskim morima, pronađena je u Atlantiku i Pacifiku kao i njihovim rubnim morima, u obalnom području i na otvorenom moru.

Široku rasprostranjenost mikroplastike potvrđuju dosad provedene studije. Najveća koncentracija zabilježena je u analiziranim uzorcima otpada (Nerland i sur., 2014)

prikupljenim u sjeverozapadnom Atlantiku (oko 60 %), Portugalu (61 %), oko Korzike (74 %), u Keltskom moru (oko 89 %), te u estuarijima Sjevernog mora (oko 97 %) (Nerland i sur., 2014). Prema podacima iz Programa Ujedinjenih naroda za okoliš (UNEP) 15 % otpada u moru pluta na njegovoj površini, 15% lebdi u vodenom stupcu, a čak 70 % nalazi se na morskome dnu (Van Cauwenberghe i sur., 2015a). Prema podacima Europske agencije za okoliš otpad se zbog djelovanja morskih struja, vjetra i Zemljine rotacije okuplja i formira vrtloge. Postoji pet takvih vrtloga, dva u Atlantskom i Tihom te jedan u Indijskom oceanu (Slika 4). Najveći, sjevernopacifički vrtlog sadrži oko 3,5 milijuna tona otpada (Van Cauwenberghe i sur., 2015a).



Slika 4. Položaj pet vrtloga otpada

(izvor:<http://www.ecogo.org/dispatches/plastic-ocean-gyres/>)

Istraživanje provedeno u Japanu pokazalo je da plastika čini 80– 85 % otpada na morskome dnu (Van Cauwenberghe i sur., 2015a), a prema istraživanju u Portugalu čak je 98 % otpada na plažama plastično (Van Cauwenberghe i sur., 2015a). Mikroplastika različitih dimenzija zabilježena je u sedimentima diljem svijeta, pogotovo u obalnim i sedimentima plitkih mora (Van Cauwenberghe i sur., 2015a). Istraživanja sedimenta pokazala su da je zagađenje plastikom sve veće (Van Cauwenberghe i sur., 2015a). U posljednjih je dvadeset godina na plažama u Belgiji zabilježeno trostruko povećanje taloženja čestica mikroplastike (Van Cauwenberghe i sur., 2015a). Velika je koncentracija zabilježena na području Sjevernog mora, Sredozemnog mora, Azije te na gusto naseljenoj obali Brazila (Van Cauwenberghe i sur., 2015a). Najranija istraživanja obuhvaćaju pelete industrijske smole (2-5 mm) na plažama Novog Zelanda, Kanade, Bermuda, Libanona i Španjolske (Van Cauwenberghe i sur., 2015a).

1.1.3. Mikroplastika u Sredozemlju i drugim europskim morima

Otpad u moru, u kojem je udio plastike čak 70– 80 %, ozbiljan je problem u Sredozemlju. Količina mikroplastike u površinskim vodama Sredozemnog mora slična je količini u sjevernopacifičkom krugu ($0,27$ čestica m^{-3}). Na rasprostranjenost mikroplastike znatno utječe vjetar koji može preraspodijeliti čestice u gornjim slojevima vodenog stupca. Mikroplastika, u obliku granula i peleta, široko je rasprostranjena na morskome dnu i na plažama u Sredozemlju i drugim europskim morima. Na manje hidrodinamičnim područjima, kao što je npr. Venecijanska laguna, količina je velika. U Belgiji je zabilježena veća koncentracija u sedimentu iz luka nego u uzorcima s plaža na kojima je hidrodinamizam izraženiji. Mikroplastika je zabilježena i u sedimentima na većim dubinama u Sredozemnom i drugim morima, što ukazuje na tonjenje čestica mikroplastike. Duboko morsko dno može se smatrati glavnim odlagalištem plastičnog otpada čime se može objasniti trenutna neusklađenost između procijenjenog unosa plastičnog otpada u mora i terenskih podataka koji se uglavnom odnose na plutajući otpad (Lusher, 2015).

Do 2016. godine trajao je regionalni projekt procjene stanja morskog otpada u Jadranskom moru pod nazivom „Sustav upravljanja morskim otpadom u jadranskoj regiji (“Derelict Fishing Gear Management System in the Adriatic Region“, skraćeno: DeFishGear). Proveo se u sedam država regije: Albaniji, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, Grčkoj, Italiji, Sloveniji i Hrvatskoj. Ciljevi projekta bili su uspostavljanje regionalne mreže stručnjaka za morski otpad, razmjena iskustava u svrhu usklađenog praćenja morskog otpada u cijelom Jadranu, podizanje javne svijesti te sveobuhvatna procjena stanja na regionalnoj razini. U srednjoj i južnoj Dalmaciji zabilježena je povećana količina otpada, čemu u velikoj mjeri pridonosi i otpad iz Crne Gore, Albanije i Grčke koji u ovo područje donose morske struje. Problematika morskog otpada na području Jadrana uglavnom se svodi na povremene analize otpada naplavljenog na plažama, ali nedostaju sustavne studije i programi monitoringa, kao i baze podataka o morskom otpadu (Guić, 2016).

1.2. Prijenos postojećih bioakumulacijskih i toksičnih tvari te aditiva iz mikroplastike u morske organizme

Mikroplastika može u morski okoliš prenositi kemikalije koje se smatraju zagađivačima od ekotoksikološkog značaja, i to iz dvaju glavnih izvora. Prvi izvor uključuje aditive, monomere i nusproizvode nastale od plastičnih čestica (Teuten i sur., 2009). Druga su vrsta zagađivača hidrofobne komponente metala iz okolne morske vode. Najčešće obuhvaćaju postojeće bioakumulacijske i toksične tvari (PBT), otporne organske zagađivače (POP-s) i policiklične aromatske ugljikovodike (PAH-s) (Ogata i sur., 2009).

Svojstvo mikroplastike da akumulira postojeće bioakumulacijske toksične tvari omogućuje njihovo prenošenje na morske organizme. Takve tvari izazivaju imunološke, reproduktivne i neurološke smetnje kod organizama. Prisutnost i akumulacija plastičnih otpadaka u morskom okolišu postali su prioritetna pitanja politike zaštite okoliša. Čestice mikroplastike između 1 μm i 5 mm najzastupljeniji su oblici plastike u morskom okolišu, a te se čestice nakupljaju u površinskim vodama, obalama i sedimentu. Također su prisutne i u organizmima te su toksikološki značajne (Lusher i sur., 2017). Na temelju procjene prijenosa postojećih bioakumulacijskih toksičnih tvari iz mikroplastike na morske organizme, koja obuhvaća i modelne izračune na temelju eksperimentalnih studija, zaključeno je da ingestija mikroplastike neće povećati izloženost organizama ovim tvarima. Slično tome, prijenos aditiva iz ingestirane mikroplastike ima zanemariv utjecaj na ukupnu izloženost organizma

aditivima. Negativni metabolički i fiziološki učinci zabilježeni su samo u laboratorijskim uvjetima, gdje su u većini pokusa organizmi izloženi vrlo visokim koncentracijama mikroplastike koje nisu karakteristične za prirodni okoliš (Lusher i sur., 2017).

1.3. Metode za ekstrakciju mikroplastike iz organizama

Da bi se utvrdila količina u organizmima, mikroplastiku je potrebno ekstrahirati, a za utvrđivanje razine izloženosti organizama, olakšavanje usporedbe među studijama i mogućnost procjene rizika od akumulacije čestica mikroplastike, nužno je standardizirati metode ekstrakcije i odabrati pokusne organizme. Dagnje su dobri kandidati za procjenu izloženosti mikroplastici, isto kao što su dobre indikatorske vrste za druge onečišćivače okoliša (Vandermeersch i sur., 2015). Zahvaljujući filtrirajućem načinu života, dagnje su dobri indikatori koji akumuliraju tvari iz okoliša (VolpiGhirardini i sur., 2015, Jović i sur., 2011). Zbog filtriranja morske vode dagnja u sebi nakuplja razne onečišćivače i toksine održavajući prisutnost onečišćivača u vodenom stupcu (Mubiana i sur., 2006).

Ako se koriste standardizirane metode za ekstrakciju i kvantifikaciju mikroplastike u tkivima, dagnje mogu biti model vrstaza indikaciju onečišćenja mikroplastikom u različitim područjima jer je rod *Mytilus* široko rasprostranjen, jedinke filtriraju velike količine vode, relativno su nepokretne i lako dostupne tijekom cijele godine (Browne i sur., 2008). Laboratorijske studije pokazale su ingestiju mikroplastike kod *Mytilus spp.* i zadržavanje u crijevima oko 72 sata. Mikroplastika je pronađena i kod dagnji iz prirodnih populacija i kod uzgojenih dagnji (Ward i Kach, 2009).

Ekstrakcija mikroplastike iz dagnji obično se odrađuje kemijskom razgradnjom pojedinim ili pomiješanim jakim kiselinama kao što su klorovodična, dušična, perklorna i bazama kao što su natrijeva i kalijeva lužina. Međutim, neke od tih metoda mogu oštetiti ili uništiti pH osjetljive polimere. Za razgradnju tkiva prije ekstrakcije također se koristi i vodikov peroksid (H_2O_2), ali su ograničenja poput nepotpune razgradnje tkiva i proizvodnja pjene pokazala da smanjuje mogućnost detekcije (De Witte i sur., 2014).

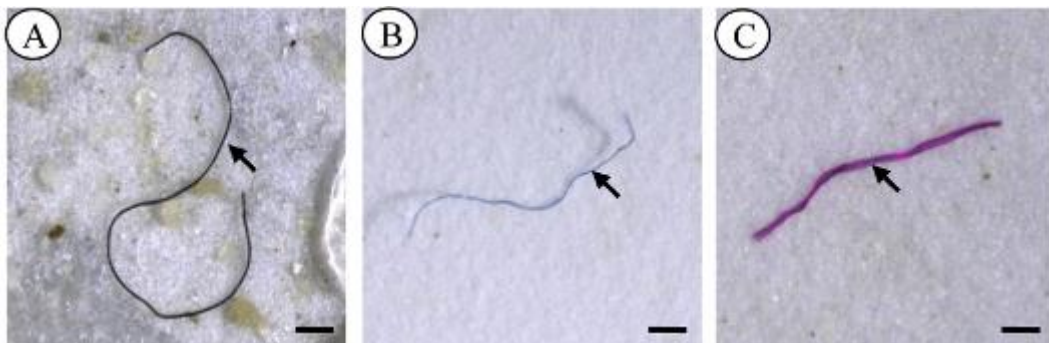
Pristup istraživača razgradnji tkiva može se grupirati na temelju značajki pri tom korištenih kemikalija-jakih kiselina, jakih baza ili enzima. Za enzimsku razgradnju koriste se industrijski enzimi, jeftiniji od enzima koji se koriste za razgradnju tkiva u drugim laboratorijskim istraživanjima, što se naziva novim enzimatskim postupkom (Catarino i sur., 2017).

Učinkovitost razgradnje tkiva može se uspoređivati, a rezultati svake metode razgradnje polimera mogu se procijenjivati analizom ekstrahiranih čestica mikroplastike iz zrnatih uzoraka Fourierovom transformacijskom infracrvenom (FTIR) spektroskopijom (Catarino i sur., 2017).

1.4. Istraživanja mikroplastike u školjkašima

Školjkaši su organizmi koji se hrane filtriranjem, a neki od njih kao što su dagnje mogu filtrirati oko dvije litre morske vode na sat, stoga nije iznenađujuće da je upravo kod njih pronađena velika količina mikroplastike (Durve, 1963). Također je dokazano da uzgojene dagnje sadrže više mikroplastike nego one iz prirodnih populacija sakupljene s istog područja. Veća količina kod uzgojenih dagnji objašnjava se kontaktom s plastičnim užetom na kojem se uzgajaju (Mathalon i Hill, 2014).

Tijekom istraživanja prisutnosti mikroplastike u devet vrsta školjkaša iz prirodnih i uzgajanih populacija u Kini i nakon tretmana vodikovim peroksidom te flotacije i filtracije natrijevim kloridom, utvrđeno je da su vlakna najzastupljeniji oblik mikroplastike u tkivu školjkaša (Slika 5)(Li i sur., 2015).



Slika 5. Vlakna zabilježena u tkivu školjkaša (Li i sur., 2015)

Tijekom istraživanja prisutnosti mikroplastike u školjkašu *Scapharca cornea* na tri postaje, tkivo se razgrađivalo natrijevom lužinom. Čestice mikroplastike kategorizirane su prema veličini, obliku, boji. Najveći postotak prisutne mikroplastike bio je u obliku niti (Ibrahim Y.S. i sur., 2016).

Prilikom ispitivanja triju vrsta dagnji, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Perna perna*, u laboratorijskim uvjetima, dokazano je da sve tri ingestiraju čestice mikroplastike.

Promjene u tkivu, lizosomalna nestabilnost, upalni procesi i oksidativni stres zabilježeni su u *M. edulis* i *M. galloprovincialis* koje su ingestirale i asimilirale čestice polietilena i polistirena (Santana, 2015). Mikroplastika u obliku fragmenata, vlakana i peleta identificirana kod školjkaša veličine je od 5 µm do 5 mm. U osam od devet vrsta školjkaša uzorkovanih s azijskog tržišta, vlakna su činila 52% čestica mikroplastike (Santana, 2015). U europskoj studiji kod *M. edulis* također su sintetička vlakna dominirala, a njihova veličina kretala se od 200 do 1500 µm. I uzgojene i dagnje iz prirodnih populacija ingestiraju mikroplastiku, ali je prosječna koncentracija mikrovlakana u uzgojenim dagnjama bila znatno veća nego u prirodnim populacijama. Zabilježeno je prosječno 178 vlaknastih čestica po uzgojenoj jedinki, 126 vlaknastih čestica po jedinki iz prirodnih populacija (Von Moos i sur., 2012). U Belgiji je zabilježena mikroplastika u dagnjama spremnim za konzumaciju prikupljenim u robnim kućama, otvorenom moru i zaštićenim područjima (Claessens i sur., 2011). Nekoliko je istraživanja pokazalo da su obale Kine među mikroplastikom najzagađenijim područjima (Zhao i sur., 2014; Fok i Cheung, 2015, Qiu i sur., 2015).

Mediteranska dagnja *M. galloprovincialis* u jednom je laboratorijskom istraživanju bila izložena zrcima polietilena i polistirena manjim od 100 µm tjedan dana. Utvrđeno je da je koncentracija polistirena bila tri puta veća u probavnim žlijezdama nego u plastičnim kuglicama (Avio i sur., 2015).

Mikroplastika također ima negativan utjecaj na koncentraciju ugljikovog dioksida u moru. Raspadanje antropogenog CO₂ u oceanu dramatično mijenja kemizam ugljika u morskoj vodi, smanjuje se zasićenost karbonatima i povećava kiselost mora. Smanjena koncentracija karbonata, promjene koncentracije CO₂ i promjene kiselosti mora imaju štetan utjecaj na morske organizme in njihovu fiziologiju, preživljavanje, kalcifikaciju, rast i reprodukciju (Fernandez-Reiriz i sur., 2012; Kroeker i sur., 2010).

1.4.1. *Mytilus galloprovincialis* kao model organizam za istraživanje mikroplastike

Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) školjkaš je trokutastog oblika, čvrste građe te bilateralno simetričnih ljuštura (Slika 6). Sistematski se svrstava u koljeno Mollusca (mekušci), razred Bivalvia (školjkaši), red Filibranchia (končastoškrgeši), porodicu Mytilidae (dagnje), rod *Mytilus* (Župan, 2006). Ljuštura su crno-plave ili crno-smeđe boje, a periostrakum je obično crn. Na vanjskoj strani ljuštura ima jasno

vidljive linije rasta. Dagnje su razdvojena spola, spolne žlijezde smještene su u plaštu, a spol se može makroskopski odrediti na osnovi boje gonada. Muške gonade su mliječno-bijele ili krem boje, dok su ženske narančasto-crvenkaste. Ovisno o temperaturi, dagnje se mogu mrijestiti jednom ili više puta godišnje. Dva dana nakon oplodnje embriji se razvijaju u planktonsku veliger ličinku. Pelagička ličinka može biti nošena strujama i više tjedana. Mediteranska dagnja nastanjuje zonu plime i oseke, a ograničena dubinska rasprostranjenost nije uvjetovana čimbenicima u dubljim slojevima infralitorala, već biološkim čimbenicima predacije i kompeticije (Beaumont i sur., 2007).



Slika 6. Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

(izvor: www.aquacase.org)

1.5. Cilj istraživanja

Cilj je ovog istraživanja odrediti učinkovitost razgradnje tkiva dagnje *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) vodikovim peroksidom, dušičnom kiselinom i kalijevim hidroksidom na sobnoj i povišenoj temperaturi radi ekstrakcije mikroplastike i utvrđivanja količine i oblika čestica mikroplastike koji se pri tom pronađu.

2. MATERIJALI I METODE

Pokusi za utvrđivanje učinkovitosti vodikovog peroksida (H_2O_2), dušične kiseline (HNO_3) i kalijevog hidroksida (KOH) obavili su se na temperaturama od $24^\circ C$ i $60^\circ C$, pri čemu je svaki pokus izveden u triplikatu. U pokusima je korišteno 18 jedinki dagnje. Prije početka pokusa, pomoćnim mjerilom preciznosti 0,1 mm su izmjerene morfometrijske mjere svake dagnje: duljina– udaljenost od anteriornog do posteriornog ruba, visina – udaljenost od dorzalnog do ventralnog ruba i širina - najveća udaljenost lijeve od desne ljuštore (Slika 7). Nakon toga svakoj je dagnji odvojeno meko tkivo od ljuštore radi vaganja analitičkom vagom preciznosti 0,001 g (Mettler Toledo)(Slika 8).



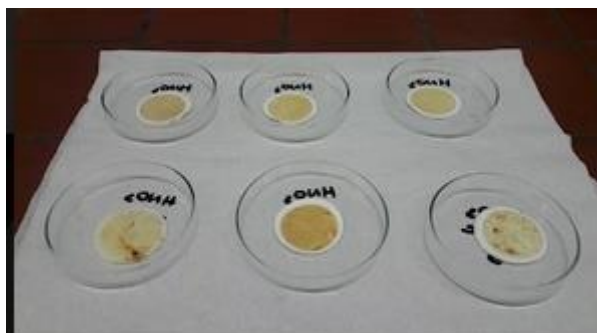
Slika 7. Morfometrijske mjere



Slika 8. Analitička vaga

Prije početka pokusa uključila se vodena kupelj kako bi se zagrijala na temperaturu od 60°C. Izolirano tkivo svake dagnje stavljeno je u 50 ml odgovarajuće kemikalije pripremljene u staklenoj čaši i potom je stavljeno na sobnu temperaturu (24°C) ili u vodenu kupelj (60°C). Promjene pri razgradnji tkiva praćene su svakih 15 minuta i unošene u tablicu.

Nakon završetka razgradnje sadržaj svake čaše profiltriran je kroz filter (celulozni naborani filter papir veličine pora od 4 µm) (Slika 9) uz pomoć vakuumske pumpe (Slika 10). Nakon filtracije površina filtera pažljivo je proučena pod lupom Olympus SZ x 9. Identificirani ostatci grupirani su u četiri grupe prema obliku: nitasta mikroplastika, alge, ostatci dijelova mikroorganizama (ostatci dagnji), bisusne niti, te prebrojeni. Podatci su uneseni u tablice i grafički prikazani.



Slika 9. Sadržaj filtera nakon filtracije kemikalije s razgrađenim tkivom



Slika 10. Vakuumska pumpa

3. REZULTATI

3.1. Morfometrijske mjere analiziranih jedinki dagnje

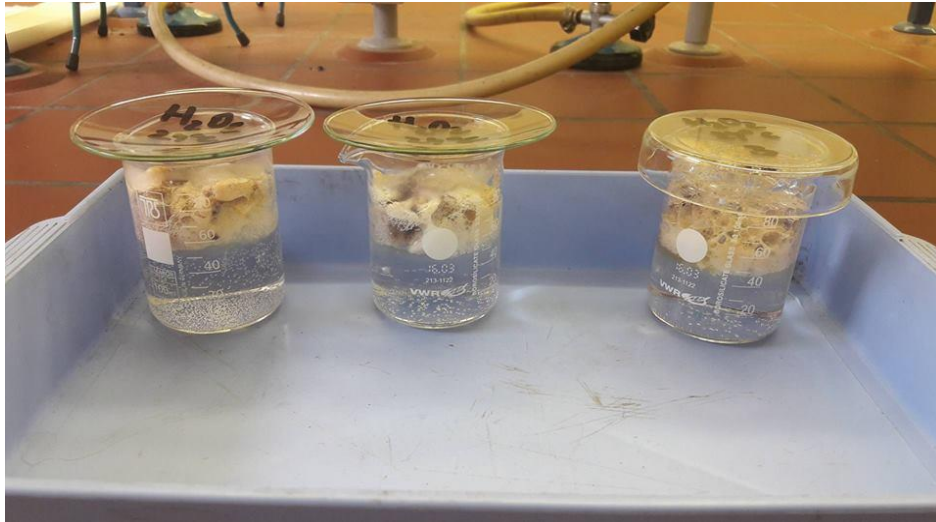
Ukupno je analizirano 18 dagnji čija je duljina bila u rasponu od 50 do 80 mm, u prosjeku $67,37 \pm 9,722$ mm. Širina dagnji iznosila je od 30 do 55 mm, u prosjeku $40 \pm 7,63$ mm. Visina dagnji iznosila je od 15 do 40 mm, u prosjeku $25,4 \pm 6,589$ mm. Raspon mase mekog tkiva bio je od 2 do 8 g, prosječno $4,6 \pm 1,554$ (Tablica 1).

Tablica 1. Morfometrijske mjere i masa mekog tkiva dagnji

	DULJINA (mm)	VISINA (mm)	ŠIRINA(mm)	MASA(g)
1	77,49	38,03	46,02	4,16
2	82,90	33,40	53,13	4,49
3	76,62	36,93	51,67	3,63
4	76,50	35,61	54,38	3,28
5	55,41	21,36	33,71	3,71
6	60,09	20,17	34,51	3,49
7	55,27	17,28	31,68	2,60
8	62,19	21,70	38,71	5,39
9	53,06	19,51	31,52	3,30
10	55,41	18,70	34,23	3,40
11	60,61	22,73	32,48	2,57
12	59,63	20,36	32,95	3,68
13	73,32	23,67	40,16	5,89
14	73,99	21,92	41,24	6,57
15	68,03	27,70	36,29	5,71
16	69,74	22,79	39,18	6,37
17	72,14	26,35	39,49	6,91
18	80,17	29,12	48,36	7,46
Prosječne vrijednosti	67,37	25,4	40	4,6

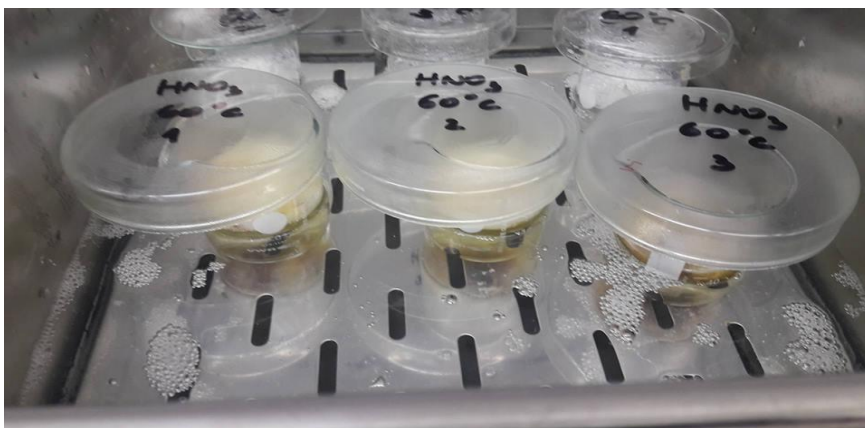
3.2. Razgradnja tkiva analiziranih dagnji

Trideset minuta nakon stavljanja tkiva u staklenu čašu s vodikovim peroksidom sobne temperature, došlo je do stvaranja guste pjene (Slika 11). Zamućenje se pojavilo nakon četrdeset i pet minuta, a tkivo se potpuno razgradilo nakon nepunih pet dana.

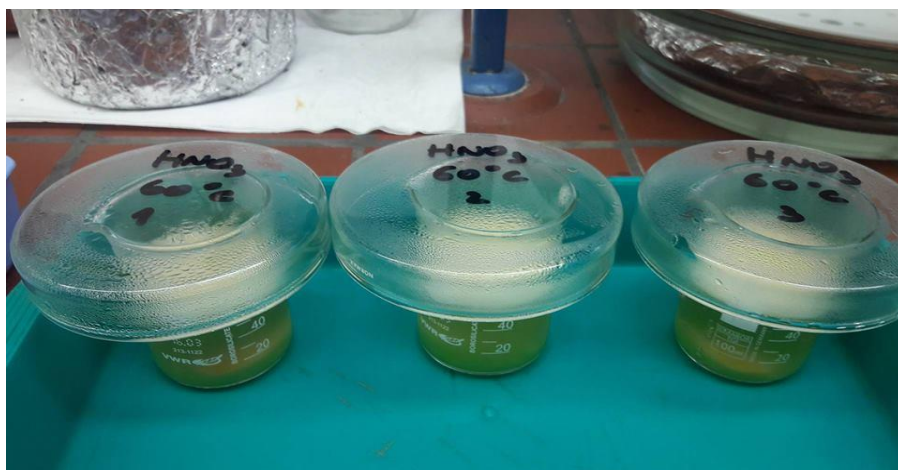


Slika 11. Uzorak tijekom razgradnje u vodikovom peroksidu na sobnoj temperaturi 30 minuta nakon početka pokusa

U vodikovom peroksidu na 60°C nakon sat vremena od početka pokusa došlo je do pojave pjene, dok je 75 minuta prošlo do izbjeljivanja uzorka. Potpuna razgradnja je uslijedila nakon dvadeset sati. Uzorak u dušičnoj kiselini na sobnoj temperaturi promijenio je boju u žutu nakon 30 minuta, a potpuna razgradnja je uslijedila nakon dva sata. U dušičnoj kiselini na 60°C uzorak je promijenio boju u žutu i došlo je do stvaranja pjene nakon 15 minuta (Slika 12), a potpuno se razgradio nakon 30 minuta (Slika 13).



Slika 12. Uzorak tijekom razgradnje u dušičnoj kiselini na 60°C nakon 15 minuta. Promjena boje u žutu i zapjenjenje.



Slika 13. Potpuno razgrađeni uzorak u dušičnoj kiselini na 60°C nakon 30 minuta

U kalijevoj lužini na sobnoj temperaturi uzorak je promijenio boju u smeđu te je došlo do замуćenja nakon 30 minuta. Nakon 19 sati tkivo se potpuno razgradilo. Već nakon 15 minuta uzorak u kalijevoj lužini na 60°C promijenio je boju u smeđu (Slika 14), a nakon 30 minuta se potpuno razgradio.

Tkivo se najbrže razgradilo u kalijevom hidroksidu, a nekoliko minuta nakon u dušičnoj kiselini pri temperaturi od 60°C. Razgradnja u vodikovom peroksidu trajala je najdulje.



Slika 14. Uzorak u kalijevoj lužini na 60°C nakon 15 minuta. Promjena boje u smeđu.

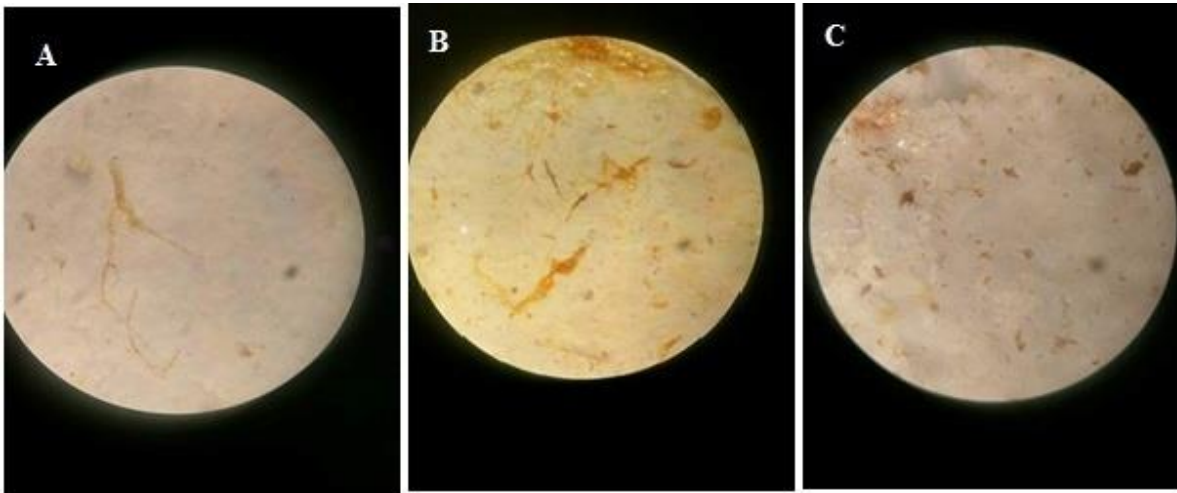
Cijeli tijek razgradnje tkiva u kemikalijama pri zadanim temperaturama prikazan je tablično, uz promjene koje su se događale u različitim vremenskim periodima (Tablica 2).

Tablica 2. Tijek razgradnje tkiva

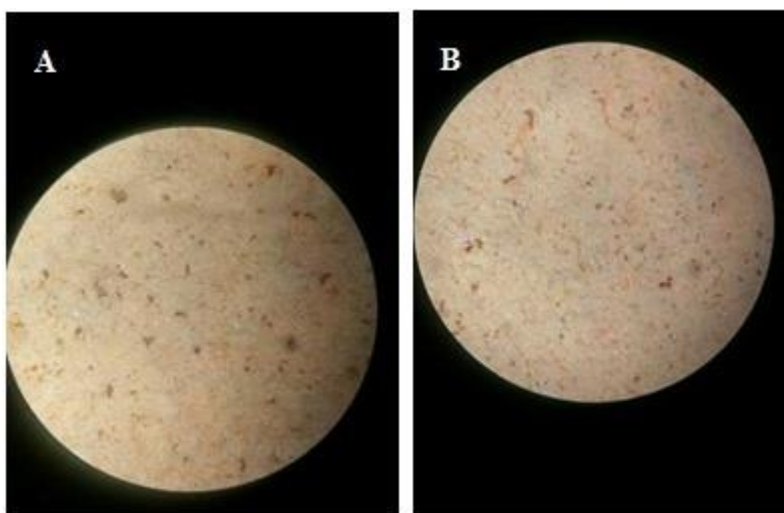
Minuta	H ₂ O ₂ 24°C	H ₂ O ₂ 60°C	HNO ₃ 24°C	HNO ₃ 60°C	KOH 24°C	KOH 60°C
15	-	-	-	Promjena boje u žutu,pjena	-	Promjena boje u smeđu
30	Pojava guste pjene	-	Promjena boje u žutu	Završetak razgradnje	Zamućenje i promjena boje u smeđu	Završetak razgradnje
45	Zamućenje	-	-	-	-	-
60	-	Pojava pjene	-	-	-	-
75	-	Izbjeljivanje uzorka	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-
105	-	-	-	-	-	-
120	-	-	Završetak razgradnje	-	-	-
1 150	-	-	-	-	Završetak razgradnje	-
1 200	-	Završetak razgradnje	-	-	-	-
6 300	Završetak razgradnje	-	-	-	-	-

3.3. Materijali pronađeni nakon razgradnje tkiva

Svaki je pokus obavljen u triplicatu, a nakon razgradnje i filtracije razgrađenog tkiva ostatci na filter-papiru proučeni su pod lupom Olympus SZx9 te je zabilježen sadržaj uzoraka. Na filter-papiru nakon filtriranja uzorka razgrađenog u dušičnoj kiselini na sobnoj temperaturi (Slika 15) pronađena je nitasta mikroplastika (Slika 15A), ostatci dagnji (narančaste i žute sluzave tvorevine) (Slika 15B), alge (Slika 15C). Sadržaj filter-papira nakon filtriranja uzorka razgrađenog u dušičnoj kiselini na 60°C (Slika 16) u vodenoj kupelji činila je nitasta mikroplastika (crvene i crne niti) (Slika 16A), ostatci dagnji (žute i narančaste sluzave tvorevine) (Slika 16B).

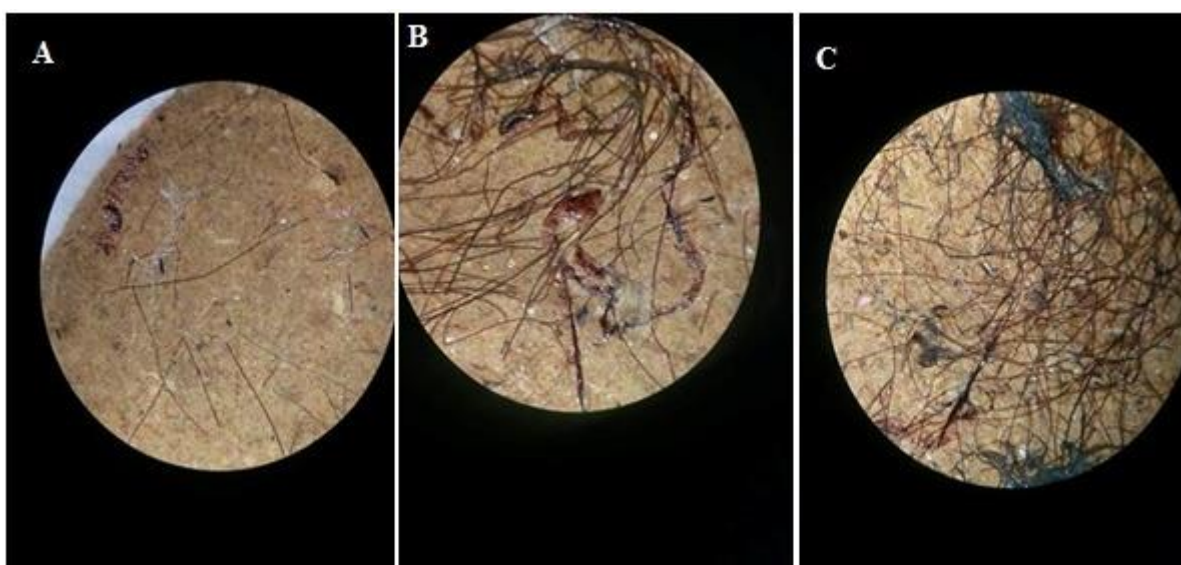


Slika 15. Uzorci tkiva razgrađenog u dušičnoj kiselini pri 24°C: nitasta mikroplastika (A), ostatci dagnji (B) i alge (C)

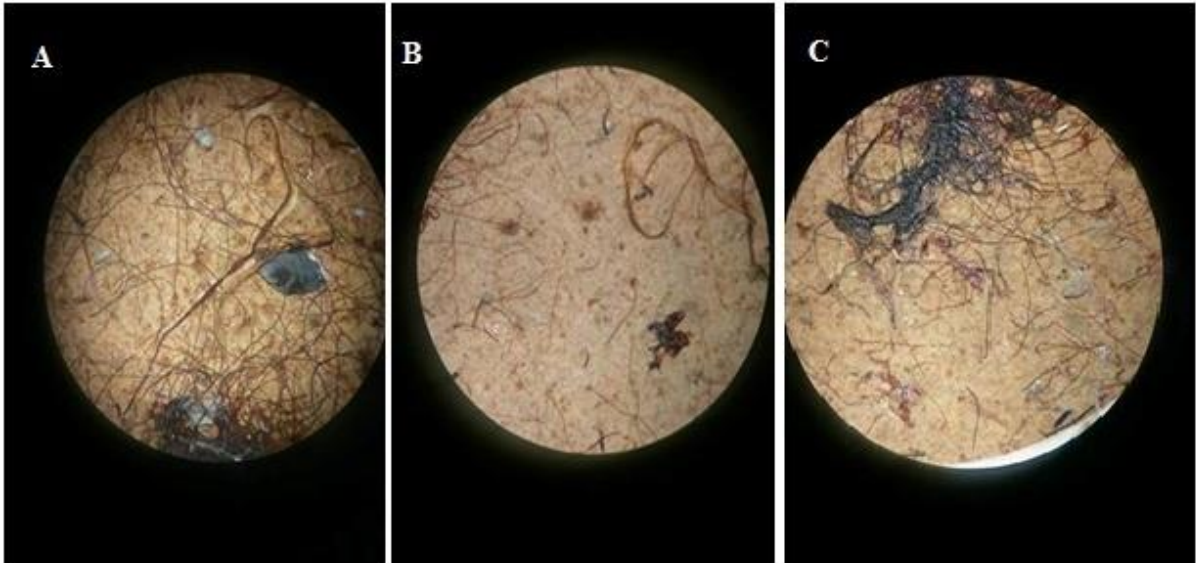


Slika 16. Uzorci tkiva razgrađenog u dušičnoj kiselini na 60°C: nitasta mikroplastika (A) i ostatci dagnji (B)

Na filter-papiru nakon filtriranja uzorka razgrađenog u kalijevoj lužini na sobnoj temperaturi (Slika 17) najviše je bilo ostataka algi (Slika 17A), nitaste mikroplastike (crne i crvene dlačice) (Slika 17B) te bisusnih niti (Slika 17C) koje kalijeva lužina ne razgrađuje. Sadržaj filter-papira nako filtriranja uzorka u kalijevoj lužini na 60°C (Slika 18) činila je nitasta mikroplastika (Slika 18A), alge te ostatci dagnji (Slika 18B) i bisusne niti (Slika 18C).

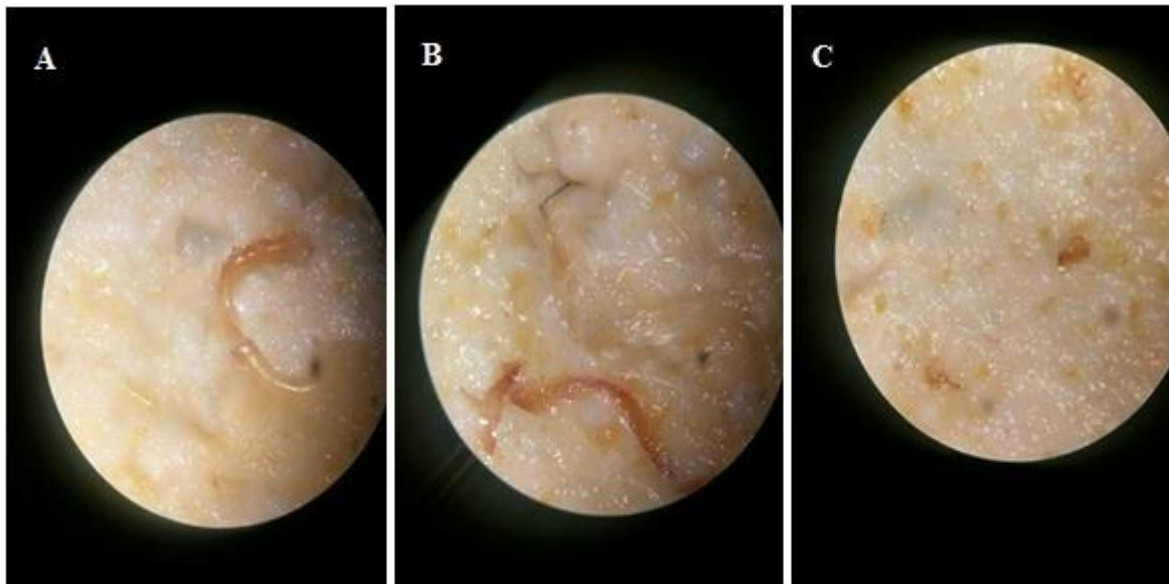


Slika 17. Uzorci tkiva razgrađenog u kalijevoj lužini na 24°C; alge (A), nitasta mikroplastika isprepletana s bisusnim nitima (B), bisusne niti (C)



Slika 18. Uzorci tkiva razgrađenog u kalijevoj lužini na 60°C: nitasta mikroplastika (A), alge i ostatci dagnji (B), bisusne niti (C)

Na filter-papiru nakon filtriranja uzorka razgrađenog u vodikovom peroksidu pri sobnoj temperaturi (Slika 19) najbrojnije su alge (Slika 19A), ostatci dagnji (Slika 19B) i nitasta mikroplastika (Slika 19C). U sadržaju filter-papira nakon filtriranja uzorka razgrađenog u vodikovom peroksidu na 60°C pronađena je nitasta mikroplastika te neznatna količina ostataka dagnji (Slika 20).



Slika 19. Uzorci tkiva razgrađenog u vodikovom peroksidu na 24°C: alge (A), ostatci dagnji (B), nitasta mikroplastika (C)



Slika 20. Uzorci tkiva razgrađenog u vodikovom peroksidu na 60°C

Nitasta mikroplastika zauzimala je najveći postotak u svim uzorcima. Također su pronađene i različite vrste algi, ostatci dagnji te bisusne niti (Tablica 3).

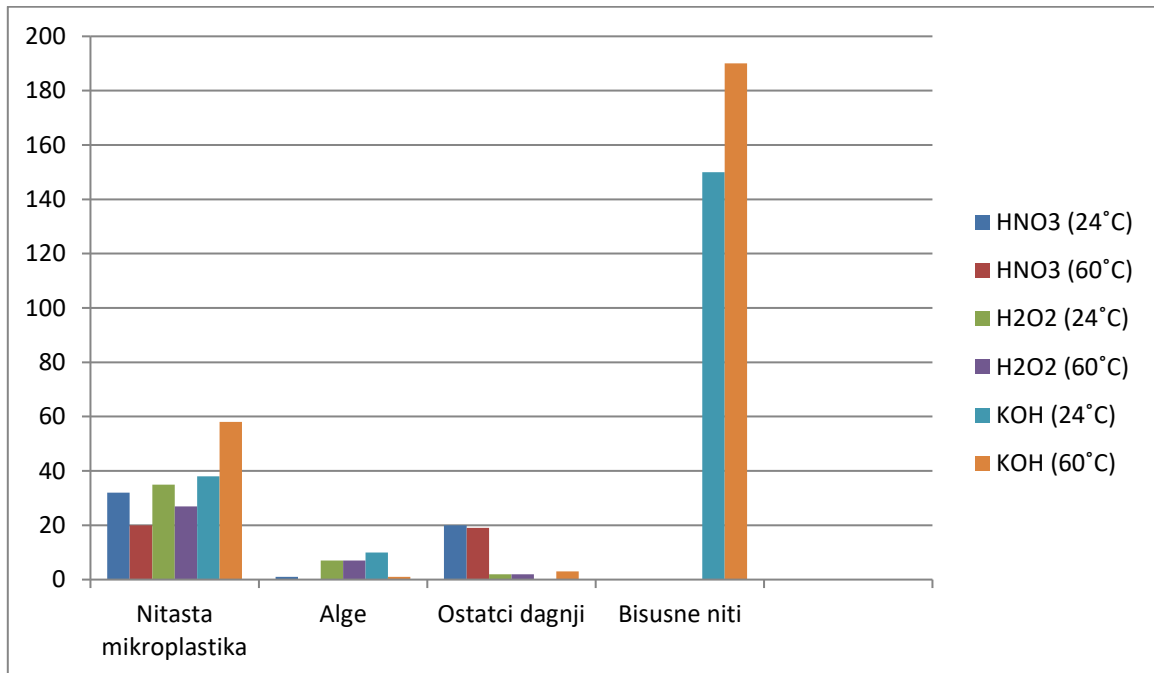
Bisusne niti nisu pronađene u uzorcima koji su se razgrađivali u dušičnoj kiselini i vodikovom peroksidu. S druge strane, pronađene su u velikoj mjeri u uzorcima koji su se razgrađivali u kalijevoj lužini.

Ostatci dagnji u obliku narančastih i žutih sluzavih tvorevina pronađeni na filter-papiru uzoraka razgrađivanih u dušičnoj kiselini, vodikovom peroksidu te u kalijevoj lužini na 60°C zabilježeni su u manjoj mjeri. Moguće je da je to nepotpuno razgrađeno crijevo kojemu je potrebno više vremena za razgradnju.

Tablica 3. Ukupni materijal na filter-papiru nakon filtriranja razgrađenog tkiva u svim kemikalijama na različitim temperaturama

Sadržaj filter papira	HNO ₃ (24°C)	HNO ₃ (60°C)	H ₂ O ₂ (24°C)	H ₂ O ₂ (60°C)	KOH (24°C)	KOH (60°C)
Nitasta mikroplastika	32	20	35	27	38	58
Alge	1	-	7	7	10	1
Ostatci dagnji	20	19	2	2	-	3
Bisusne niti	-	-	-	-	150	190

Nitasta mikroplastika pronađena je u svakom uzorku, alge i ostatci dagnji pronađeni su u manjem broju uzoraka, te bisusne niti koje su pronađene u uzorku razgrađivanom u kalijevoj lužini (Slika 21).

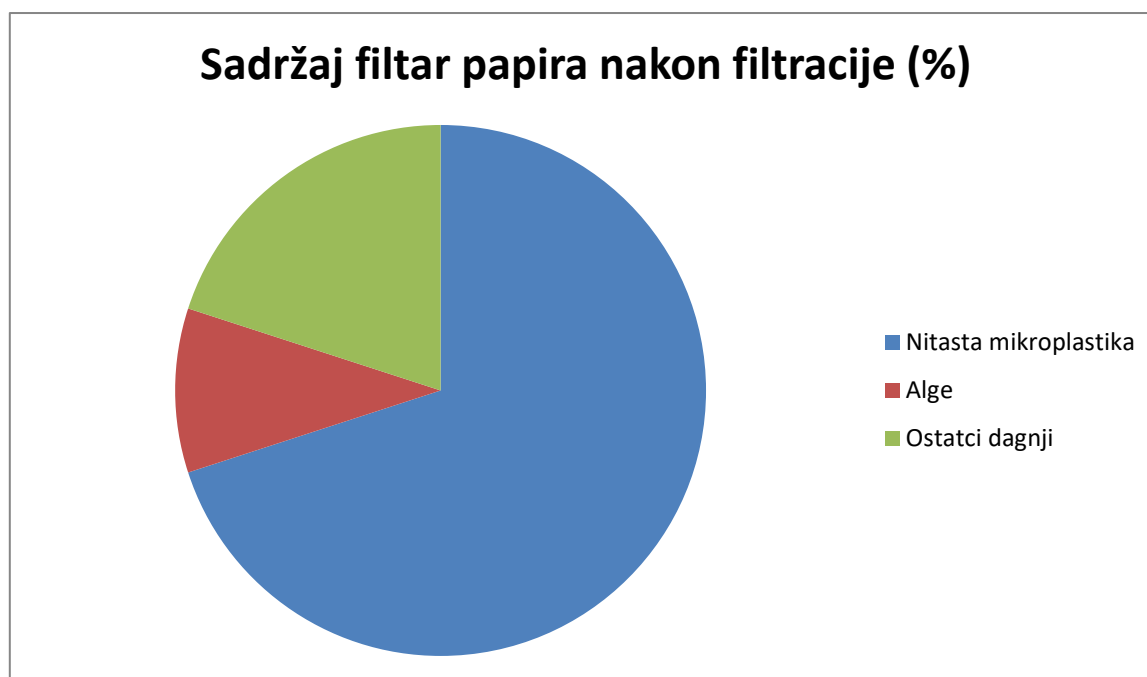


Slika 21. Ukupni materijal na filter-papiru nakon razgradnje u svakoj od kemikalija pri različitim temperaturama

Tablica 4. prikazuje brojnost i vrstu ostataka nakon razgradnje tkiva. Od svih ostataka 70 % materijala činila je nitasta mikroplastika, zatim 20 % ostatci dagnji te alge s 10 % (Slika 22).

Tablica 4. Ukupni broj i postotak materijala na filter-papiru isključujući bisusne niti

SADRŽAJ	BROJ	POSTOTAK
nitasta mikroplastika	210	70
Alge	26	10
ostatci dagnji	46	20



Slika 22. Ukupan postotak materijala na filter papiru isključujući bisusne niti

4. RASPRAVA

Mikroplastika može adsorbirati i otpuštati toksične tvari. Morski organizmi unose u sebe mikroplastiku na različite načine: dagnje i kamenice filtriranjem, a ribe i rakovi kroz škrge ili usta. U životinja koje se hrane filtriranjem unos plastike neselektivan je proces.

Kontaminacija mikroplastikom ne predstavlja samo fizički rizik već i kemijski i biološki, jer ima negativan utjecaj na kemizam ugljika u moru te na fiziološke funkcije morskih organizama.

Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinkovitost triju kemikalija na različitim temperaturama za razgradnju tkiva radi ekstrakcije mikroplastike iz dagnje *Mytilus galloprovincialis*, tj. koja će kemikalija i na kojoj temperaturi u najkraćem vremenu razgraditi tkivo. U istraživanju su analizirane dagnje *M. galloprovincialis* (Lamarck, 1819) u 50 ml različitih kemikalija: vodikovu peroksidu, dušičnoj kiselini i kalijevoj lužini. Cijeli eksperiment trajao je pet dana jer kemikalije imaju različito djelovanje, odnosno brzinu djelovanja na razgradnju tkiva. Analizom podataka pokazano je da je svaka od triju korištenih metoda bila uspješna u razgradnji tkiva u određenom vremenu budući da je u svakom od uzoraka zabilježen određeni oblik mikroplastike. U dosadašnjim istraživanjima većinom je model organizam bila plava dagnja *Mytilus edulis* (Claessens i sur., 2013; Van Cauwenberghe i sur., 2014; Van Cauwenberghe i sur., 2015), a *M. galloprovincialis* joj je blizak srodnik.

U ovom istraživanju jedinke dagnje *M. galloprovincialis* bile su prosječne veličine 6,7 cm, pri čemu se nastojalo koristiti jedinke približnih veličina. Dok su, primjerice, u istraživanju koje se odrađivalo duž belgijske obale jedinke plave dagnje *M. edulis* bile nešto manje, od 4 do 4,5 cm (Claessens i sur., 2013). Oba istraživanja započela su morfometrijskim mjerenjem jedinki te izolacijom mekog tkiva radi vaganja. Korištene su iste kemikalije, samo je u istraživanju Claessens-a i suradnika kalijeva lužina zamijenjena natrijevom. Sobnu temperaturu zamijenila je temperatura od 100°C dok se razgradnja na 60°C odvijala u oba pokusa. U istraživanju s dagnjom *M. galloprovincialis* kao najbolja metoda pokazala se ona s razgradnjom u dušičnoj kiselini, iako je, uspoređujući je s istraživanjem Claessens-a i suradnika, zahtijevala nešto više vremena. S druge strane, bez obzira na kemikaliju ili pomiješane kemikalije, postupak koji uključuje zagrijavanje od jedan sat na 60°C iza kojeg slijedi kuhanje u trajanju od jedan sat pokazao se kao najbolji učinak. Frakcije tkiva, u oba istraživanja, koje su ostale na filter-papirima razlikovale su se u različitim kombinacijama

temperature razgradnje, temperature filtracije i kemikalija. Budući da se čekala razgradnja u svim kemikalijama na zabilježenim temperaturama, u pokusu s *M. galloprovincialis* filtracija se odrađivala isključivo na hladno, dok je u pokusu s *M. edulis* odrađivana i na toplo i na hladno. Kao najučinkovitija razgradnja u istraživanju s *M. edulis* bila je ona u dušičnoj kiselini zagrijavana na 60°C jedan sat i nakon toga jedan sat na 100°C. Iako je u odnosu na pokus s *M. galloprovincialis* trajala duže, razgradnja je u navedenom istraživanju svakako doprinijela lakšoj analizi uzoraka tkiva (Claessens i sur., 2013).

Primjerice, jedinke plave dagnje *M. edulis* sakupljene u Njemačkoj duž obale Sjevernog mora (Van Cauwenberghe i sur., 2014) bile su manjih veličina te se razgradnja izvodila uz pomoć tople, filtrirane, deionizirane vode, što je, moguće, doprinijelo većoj brzini razgradnje. Također, u tom se istraživanju sušio filter-papir na 40°C tijekom 24 sata, što je vjerojatno olakšalo analizu dobijenih uzoraka na filterima. U istraživanju s *M. galloprovincialis* zabilježeni su postotci određenih materijala pa je najzastupljenija bila nitasta mikroplastika s oko 70 % dok je u istraživanju Van Cauwenberghe-a i suradnika opterećenje mikroplastikom bilo 36–45 % čestica po gramu tkiva plave dagnje (Van Cauwenberghe i sur., 2014).

Jedinke u ovom istraživanju bile su nešto veće od jedinki plave dagnje sakupljene duž francuske, belgijske i nizozemske obale Sjevernog mora (Van Cauwenberghe i sur., 2015b). Za razliku od istraživanja s *M. galloprovincialis* gdje su se sakupljene jedinke odmah morfometrijski određivale te im se izoliralo tkivo radi vaganja, u istraživanju Van Cauwenberghe-a i suradnika jedinke su stajale 24 sata u 250 ml staklenkama nakon čega je uslijedilo mjerenje i izolacija tkiva. Tkivo je ostavljeno preko noći u 69 %-tnoj dušičnoj kiselini, nakon čega je slijedilo zagrijavanje i razrjeđivanje u trajanju od dva sata, što je možda doprinijelo bržoj razgradnji. Uzorci u istraživanju s *M. galloprovincialis* filtrirani su preko celuloznog filter-papira veličine pora 4 µm te je zabilježeno 70 % prisustvo nitaste mikroplastike dok su u istraživanju Van Cauwenberghe-a i suradnika filtrirani preko filtera veličine pora 5 µm s opterećenjem mikroplastike od 20 do 30 % čestica po gramu tkiva.

U svakom od ovih istraživanja kemikalija za ekstrakciju mikroplastike iz tkiva je dušična kiselina, što ukazuje da je dobar izbor za izvođenje ovakvih eksperimenata. Za svako od istraživanja birane su jedinke približnih veličina kako bi rezultati bili što vjerodostojniji. Izolacija mikroplastike iz jedinki u istraživanjima ukazala je na njihovu uspješnost. Razlikovali su se vremenski periodi razgradnje te temperature, u određenim su se istraživanjima podudarale. Postupci ekstrakcije uglavnom su se zasnivali na istom slijedu, od sakupljanja jedinki preko morfometrijskih mjerenja, izolacije tkiva, do razgradnje i filtracije te konačne analize materijala na filter-papirima.

5. ZAKLJUČCI

Školjkaši, odnosno dagnje, najpogodniji su organizmi modeli za ispitivanje izloženosti mikroplastici, budući da se hrane filtriranjem te su sesilni organizmi dostupni tijekom cijele godine.

Najučinkovitija metoda razgradnje mekog tkiva radi ekstrakcije mikroplastike iz dagnje ona je u dušičnoj kiselini. I na sobnoj temperaturi i u vodenoj kupelji razgradnja je bila brza, odnosno, dva sata bila su potrebna za razgradnju na sobnoj temperaturi, a 27 minuta na temperaturi od 60°C.

Pomoću svake od kemikalija uspjela se izolirati mikroplastika iz uzoraka. Za razgradnju tkiva u kalijevoj lužini na sobnoj temperaturi bilo je potrebno 19 sati, a u vodenoj kupelji 30 minuta. Do razgradnje tkiva u vodikovom peroksidu pri sobnoj temperaturi došlo je nakon nepunih pet dana, na 60°C nakon 20 sati.

Zabilježeni tip mikroplastike u svakom od dobijenih frakcija bila je nitasta mikroplastika.

6. LITERATURA

Andrady, T., Arthur, C., Baker, J., Bouwman, H., Gall, S., Hidalgo- Ruz, V., Kershaw, P., Koehler, A., Law, K., Leslie, H., Pahl, S., Potemra, J., Ryan, P., Shim, W.J., Takada, H., Thompson, R., Turra, A., Vethaak, D., Wyles, K. 2015. Microplastics in the ocean. *Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP)*

Avio, C. G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Regoli, F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution* 198: 211–222.

Beaumont, A., Gjedrem, T., Moran, P. 2007. Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations
Blue Mussel—*M. edulis* and Mediterranean mussel—*M. galloprovincialis*. 62-69.

Browne, M., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C. 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L). *Environmental Science and Technology* 42:5026–31.

Carpenter, E. J. i Smith, K. 1972. 'Plastics on the Sargasso Sea surface'. *Science* 175 (4027): 1240-1241.

Catarino, A., Thompson, R., Sanderson, W., Henry, T.B., 2017. Standard method for microplastics extraction from mussels: Development and optimisation of a standard method for extraction of microplastics in mussels by enzyme digestion of soft tissues. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36 (4): 947-951.

Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., Janssen, C. R. 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Marine Pollution Bulletin* 62:2199–2204.

- Claessens, M., Van Cauwenberghe, L., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R. 2013. New techniques for the detection of microplastics in sediments and field collected organisms. *Marine Pollution Bulletin* 70: 227-233.
- Dehaut, A., Cassone, A. L., Frere, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Riviere, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., Paul- Pont, I. 2016. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution* 215: 223-233.
- De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K., Robbens, J. 2014. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): comparison between commercial and wild types. *Marine Pollution Bulletin* 85:146–55.
- Durve, V. S., 1963. A study on the rate of filtration of the clam *Meretrix Casta* (CHEMNITZ). *Journal of the Marine Biological Association of India* 5 (2): 221-231.
- Fernandez- Reiriz, J., Range, P., Alvarez- Salgado, X.A., Espinosa, J., Labarta, U. 2012. Tolerance of juvenile *Mytilus galloprovincialis* to experimental seawater acidification. *Marine Ecology Progress Series* 454: 65-74.
- Fok, L., Cheung, P.K. 2015. Hong Kong at the Pearl River estuary: a hotspot of microplastic pollution. *Marine Pollution Bulletin* 99: 112-118.
- Guić, R. 2016. Mikroplastika u morskom okolišu. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno matematički fakultet.
- Harper, P.C. i Fowler, J.A. 1987. 'Plastic pellets in New Zealand storm-killed prions (*Pachyptila spp*). 1958-1977'. *Notornis* 34: 65-70.
- Ibrahim, Y.S., Azmi, A.A., Shukor, S.A., Anuar, S.T., Abdullah, S.A. 2016. Microplastics Ingestion by *Scapharca cornea* at Setiu Wetland, Terengganu, Malaysia, Middle-East. *Journal of Scientific Research* 24 (6): 2129-2136.

- Jović, M., Stanković, A., Slavković-Beskoski, L., Tomić, I., Degetto, S., Stanković, A. 2011. Mussels as bio-indicator of the environmental quality of the coastal water of the Boka Kotorska Bay (Montenegro). *Journal of Serbian Chemical Society* 76 (6): 933-946.
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R.N., Singh, G.G. 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecology Letters* 13: 1419-1434.
- Lavender Law, K., Thompson, R.C. 2014. Microplastics in the seas. *Oceans. Science* 345 (6193): 144-5.
- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., Shi, H. 2015. Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental Pollution* 207: 190-195.
- Lusher, A., 2015. Microplastics in the Marine Environment; Distribution, Interactions and Effects. *Marine Anthropogenic Litter* 245-307.
- Lusher, A., Hollman, P., Mendoza- Hill, J. 2017. Microplastics in fisheries and aquaculture. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* 615: 2070-7010.
- Mathalon, A., Hill, P. 2014. Microplastic fibres in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. *Marine Pollution Bulletin* 81:69–79.
- Merino, V., Ayer, D., LeChevet, C., Larrivee, R., Ergastolo, M., Robledo, L. 2018. Plastic Pollution Primer and Action Toolkit, Earth Day Network
- Mubiana, V.K., Vercauteren, K., Blust, R. 2006. The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* 144: 272-279.
- Nerland, I.L., Halsband, C., Allan, I., Thomas, K.V., 2014. Microplastics in marine environments: Occurrence, distribution and effects. *Norwegian Institute for Water Research* 71.

- Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Mato, Y., Saha, M., Okuda, K., Nakashima, A., Murakami, M., Zurcher, N., Booyatumanondo, R., Zakaria, M. P., Dung, L. Q., Gordon, M., Miguez, C., Suzuki, S., Moore, C., Karapanagioti, H. K., Weerts, S., McClurg, T., Burrell, E., Smith, W., Velkenburg, M. V., Lang, J. S., Lang, R. C., Laursen, D., Danner, B., Stewardson, N. i Thompson, R. C. 2009. 'International Pellet Watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs'. *Marine Pollution Bulletin* 58 (10): 1437-1446.
- Qiu, Q.X., Peng, J.P., Yu, X.B., Chen, F., Wang, J., Dong, F. 2015. Occurrence of microplastics in the coastal marine environment: first observation on sediment of China. *Marine Pollution Bulletin* 98: 274- 280.
- Santana, M. F. M., 2015. Effects of microplastics contamination on marine biota. Dissertation, University of Sao Paulo.
- Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S. J., Thompson, R. C., Galloway, T. S. i Yamashita, R. 2009. 'Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife'. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1526): 2027-2045.
- Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R. 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental Pollution* 193: 65-70.
- Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., Janssen, C.R. 2015a). Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research* 111: 5-17.
- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C. R. 2015b). Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental Pollution* 199: 10-17.
- Vandermeersch, G., Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., Marques, A., Granby, K., Fait, G., Kotterman, M.J., Diogène, J., Bekaert, K., Robbens, J., Devriese, L. 2015. A critical

view on microplastic quantification in aquatic organisms. *Environmental Research* 143:46–55.

Volpi Ghirardini, A., Losso, C., Arizzi Novelli, A., Baugrave, A., Edouard, H., Ghetti, P. F. 2015. *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the lagoon of Venice (Italy). *Chemistry and Ecology* 21(6):455-463.

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A. 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* after an experimental exposure. *Environmental Science and Technology* 46:11327–35.

Ward, J.E., Kach, D.J. 2009. Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research* 68:137–142.

Zhao, S.Y., Zhu, L.X., Wang, T., Li, D.J. 2014. Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze estuary system, China: first observations on occurrence, distribution. *Marine Pollution Bulletin* 86: 562-568.

Župan, I. 2006. Utjecaj blizine kaveznog uzgoja riba na prirast i indeks kondicije dagnji (*Mytilus galloprovincialis*). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.

Izvori s interneta:

<https://aquacase.org> (03. 05. 2019)

https://marinedebris.noaa.gov/sites/default/files/MicroplasticsOnePager_0.pdf (03. 05. 2019)

<http://www.ecogo.org/dispatches/plastic-ocean-gyres/> (03. 05. 2019)

<https://polymers.com.au/> (03. 05. 2019)

IZJAVA

S punom odgovornošću izjavljujem da sam završni rad izradila samostalno, služeći se navedenim izvorima podataka i uz stručno vodstvo doc. dr. sc. Ane Bratoš Cetinić.

Ena Spremo