

# Prisutnost mikroplastike i histološka analiza probavne žlijezde dagnji *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 s područja sjevernog Jadrana

---

Štefanko, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:321022>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Karla Štefanko

Prisutnost mikroplastike i histološka analiza probavne žlijezde dagnji *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 s područja sjevernog Jadrana

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je u Centru za istraživanje materijala Istarske županije METRIS i Centru za istraživanje mora u Rovinju pod vodstvom doc. dr. sc. Ines Kovačić i suvoditeljstvom izv.prof. dr. sc. Petra Kružića. Predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre Ekologije i zaštite prirode.

*Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ines Kovačić na datim savjetima i smjernicama koje su mi pomogle prilikom izrade ovog diplomskog rada, te njezinom strpljenju, uloženom trudu i vremenu koje mi je posvetila.*

*Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Petru Kružiću na datim smjernicama za polaganje i pisanje ovog diplomskog rada.*

*Također, bi se zahvalila doc.dr. sc. Vedrani Špada i stručnoj savjetnici Josipi Bilić naukazanoj pomoći prilikom korištenja laboratorijske opreme u Centru za istraživanje materijala METRIS, te prof.dr.sc.Bihari na ustupljanju opreme za histološku obradu tkiva u Centru za istraživanje more u Rovinju.*

*Zahvaljujem se i svojoj obitelji koja nikada nije odustala u davanju podrška tijekom mog cjelokupnog školovanja u lijepim i teškim trenucima.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Prisutnost mikroplastike i histološka analiza probavne žlijezde dagnji *Mytilus galloprovincialis* Lamarck,  
1819 s područja sjevernog Jadrana

Karla Štefanko

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Zbog nepravilnog odlaganja otpada, nedovoljnog gospodarenja otpadom i otpadnim vodama dolazi do značajnog nakupljanja čestica mikroplastike u kopnenim, slatkovodnim i morskim ekosustavima. Ulaskom u ekosustave mikroplastika može imati znatni utjecaj na morske organizme, a posebice školjkaše. Cilj ovog rada je utvrditi broj, oblik i veličinu čestica mikroplastike u probavnoj žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovane na 6 postaja u sjevernom Jadranu (područja uz gradove Pula, Rovinj i Kopar). Provedena je histomorfometrijska analiza i semikvantitativna procjena atrofije mikrotubula probavne žlijezde dagnji. Najveći broj identificiranih čestica mikroplastike pronađen je u probavnim žlijezdama dagnji uzorkovanih na postaji Rovinj ( $30.2 \pm 29.9$ ), a najmanje na postaji Katarina ( $8 \pm 2.4$ ) i Strunjan ( $10 \pm 0.5$ ). Najzastupljenije čestice mikroplastike prema boji bile su bijele boje (91%), a najmanje zastupljene žute boje (1%). Prema veličini, najzastupljenije su bile čestice 5 – 10  $\mu\text{m}$ , a prema obliku film. Histološka analiza probavne žlijezde dagnji pokazala je da najveći utjecaj mikroplastika može imati na atrofiju probavnih tubula i smanjenje debljine epitela probavnih kanalića (Rovinj, Kopar). Atrofija probavnih tubula i smanjenje debljine probavnih kanalića pokazali su se kao koristan alat za praćenje utjecaja mikroplastike na promjene u histologiji probavnih žlijezdi dagnji.

Rad sadrži: 59 stranica, 23 slika, 14 tablice, 92 literaturna navoda. Jezik izvornika: hrvatski.

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: mikroplastika, mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis*, histološke analize

Voditelj: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Petar Kružić

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen: 26.11.2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

Microplastics and histological analysis of the digestive gland of the mussels *Mytilus galloprovincialis*  
Lamarck, 1819 from the northern Adriatic

Karla Štefanko

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Due to improper waste disposal, insufficient waste and wastewater management, microplastic particles significantly accumulate in terrestrial, freshwater and marine ecosystems. By entering ecosystems, microplastics can have a significant impact on marine organisms, especially shellfish. The aim of this study was to determine the number, shape and particle size of microplastics in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* collected at 6 stations in the northern Adriatic (areas near the cities of Pula, Rovinj and Koper). Histomorphometric analysis and semiquantitative atrophy of the digestive gland microtubules were performed. The largest number of identified microplastic particles was found in the digestive glands of mussels sampled at the Rovinj station ( $30.2 \pm 29.9$ ), and the least at the Katarina ( $8 \pm 2.4$ ) and Strunjan ( $10 \pm 0.5$ ) stations. The most common microplastic particles by color were white (91%), and the least common were yellow (1%). According to the size, the smallest particles from 5 to 10  $\mu\text{m}$  the most represented, and according to the shape, the film was the most abundant. Histological analysis of the digestive gland of mussels showed that microplastics can have the greatest impact on the atrophy of the digestive tubules and a decrease in the thickness of the digestive gland epithelium (Rovinj, Koper). The atrophy of the digestive tubules and decrease in the thickness of the digestive gland epithelium have been shown to be a useful tool for monitoring the influence of microplastics on changes in the histology of the digestive gland.

Thesis contains: 59 pages, 23 figures, 14 tables, 92 references. Original in: Croatian.

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: microplastic particles, Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, histological analysis

Supervisor: Assist. prof. dr. sc. Ines Kovačić

Cosupervisor: Assoc. prof. dr. sc. Petar Kružić

Reviewers:

Thesis accepted: 26.11.2020.

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Mikroplastika .....	1
1.1.1. Primarna i sekundarna mikroplastika .....	2
1.1.2. Mikroplastika u morskom okolišu .....	4
1.1.3. Mikroplastika u morskim organizmima .....	4
1.2. Utjecaj mikroplastike na morske organizme .....	5
1.2.1. Utjecaj mikroplastike na školjkaše .....	6
1.3. Histološke promjene u školjkašima pod utjecajem zagađivala .....	9
1.3.1. Histološke promjene u probavnim žlijezdama školjkaša .....	9
2. Cilj istraživanja .....	11
3. Materijali i metode .....	12
3.1. Područje uzorkovanja .....	12
3.2. Izolacija i bojanje tkiva .....	13
3.3. Analiza mikroplastike .....	14
3.4. Histološke analize probavne žlijezde .....	14
3.4.1. Semikvantitativna analiza probavnih kanalića dagnje .....	14
3.4.2. Morfometrijske analize probavnih kanalića dagnje .....	14
3.5. Statistička analiza .....	15
4. Rezultati .....	16
4.1. Analiza mikroplastike .....	16
4.1.1. Broj čestica mikroplastika .....	18
4.1.2. Podjela mikroplastike prema boji .....	19
4.1.3. Podjela mikroplastike prema obliku .....	20
4.1.4. Podjela mikroplastike prema veličini .....	22
4.2. Atrofija kanalića probavne žlijezde dagnje .....	23
4.3. Promijene u morfometriji probavnih kanalića dagnje .....	28
5. Rasprava .....	38
6. Zaključak .....	41
7. Literatura .....	42
8. Prilog .....	52
9. Životopis .....	53

## 1. Uvod

### 1.1. Mikroplastika

Industrijaplastike u svijetu, počevši od 50-ih godina 20. stoljeća bilježi kontinuirani rast proizvodnje što je dovelo i do njezinog značajnog nakupljanja u kopnenom, slatkovodnom i morskom ekosustavu kao posljedica nepravilnog odlaganja otpada, nedovoljnog gospodarenja otpadom i otpadnim vodama (Thompson i sur., 2004; Barnes i sur., 2009; Jambeck i sur., 2015; Löder i sur., 2015; Espinosa i sur., 2016). Plastika je sintetički organski materijal koji se sastoji od dugolančanih polimera koji su netopivi u vodi i nerazgradivi u prirodi. Jeftina je, lagana, izdržljiva što ju čini najviše korištenim materijalom na Zemlji, a posljedica toga je i njezino povećano nakupljanje u kopnenim, slatkovodnim i morskim ekosustavima (Sharma, 2019). Ulaskom plastike u ekosustave, raspada se na sve manje čestice koje se nazivaju mikroplastika. Mikroplastika se kategorizira prema veličini, broju, boji, morfologiji (obliku) i polimernom identitetu čestica (Renner, 2018) (Tablica 1.). Mikroplastika se najčešće definira prema veličini, a dijeli se na „veliku mikroplastiku“ (1–5 mm) i „malu mikroplastiku“ (20 µm – 1 mm) (Andrady, 2011; Hanke i sur., 2013; Wang i sur., 2017).

Postoje razni načini na koje mikroplastika ulazi u okoliš, a najčešći način je razgradnja većih čestica plastike. Do formiranja manjih čestica plastike može doći na razne načine kao što su kemijska razgradnja, abrazija guma, sunčevo zračenje, mehaničke sile i mikrobno djelovanje što posljedično dovodi do fragmentacije primarnog plastičnog otpada u mikroplastiku (Boucher i Friot, 2017; Wilkinson i sur., 2017; Silva i sur., 2018).



Tablica 1. Podjela mikroplastike u kategorije prema tipu, boji, veličini i polimernom identitetu čestica u istraživanjima diljem svijeta pronađenim u školjkašima i ribama.

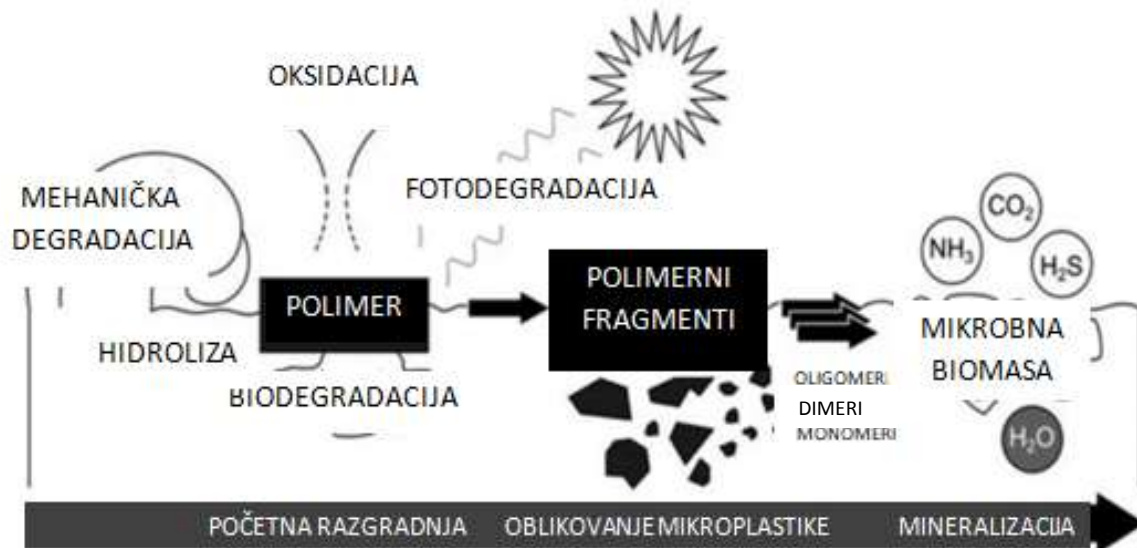
ORGANIZAM	MJESTO UZORKOVANJA	TIP MIKROPLASTIKE	BOJA MIKROPLASTIKE	KOLIČINA (po cijelom organizmu, po gramu, po organu)	VELIČINA (µm)	POLIMERNI IDENTITET ČESTICA MIKROPLASTIKE	LITERATURA
<i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Mytilus edulis</i> , <i>Mytilus trossulus</i>	Belgija	fiber (vlakna), film, sfere, fragment	crna, crvena, plava, ljubičasta, prozima, prozima, narančasta, zelena i žuta	po gramu	200 – 1500 µm	/	De Witte i sur., 2014.
<i>Mytilus edulis</i>	Kina, obalne vode	fiber (vlakna), sfere, flake, fragment	/	po organizmu, po gramu	0.005- 0.25, 0.25- 0.5, 0.5- 1, 1- 5 mm	celofan, polietilen tereftalat i poliester	Li i sur., 2016
<i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Mytilus edulis</i>	Italija, uzgajalište	/	/	po gramu	1000 -100 µm	polietilen, polistiren	Avio i sur., 2015.
<i>Panopeus herbstii</i> , <i>Crassostrea virginica</i>	USA, Florida	fiber (vlakna), beads (perle), fragmenti	plava, crvena, zelena, crna	po gramu	/	/	Waite i sur., 2018.
<i>Mytilus edulis</i> , <i>Perna vindex</i>	Kina	beads (perle), fragmenti, fibers (vlakna)	/	po gramu, po organizmu	/	polietilen tereftalat, rejon, polietilen, polivinil klorid, polipropilen	Qu i sur., 2018.
<i>Mytilus galloprovincialis</i> , <i>Sardina pilchardus</i> , <i>Pagellus erythrinus</i> , <i>Mullus barbatus</i>	Grčka	fragmenti, fiber (vlakna)	plava, roza, crna, zelena, žuta	po organu	< 0.1 mm, 0.1 - 0.5 mm, 0.5 - 1.0 mm, 1.0 - 5.0 mm	polietilen, polipropilen, polivinil klorid, polistiren, polietilen tereftalat	Digka i sur., 2018.

### 1.1.1. Primarna i sekundarna mikroplastika

Glavna podjela mikroplastike se temelji na tome jesu li čestice izvorno proizvedene u toj veličini ili se raspadaju u manje fragmente pod utjecajem različitih čimbenika, primjerice utjecajem valova, ultraljubičastog zračenja, sunca i slično. Prema tome, mikroplastika se dijeli na primarnu i sekundarnu mikroplastiku.

Primarni izvori uključuju čestice koje se proizvode u industriji za proizvodnju proizvoda za široku potrošnju (kozmetički proizvodi, sredstva za osobnu njegu, pilinzi u gelovima za tuširanje, sredstva za čišćenje kupaonskih prostora), također mogu biti generirana drugim raznim sredstvima: erozijom guma tijekom vožnje, abrazijom sintetičkih tekstila tijekom pranja rublja, premazi na brodovima i gradska prašina. Čestice mikroplastike nastale iz primarnih izvora mogu biti različitih veličina, a

najčešće su promjera manjeg od 5 mm. Sekundarna mikroplastika nastaje usitnjavanjem veće plastike pod utjecajem fizikalnih, kemijskih i bioloških procesa ili njihovih kombinacija koji smanjuju strukturni integritet čestica (Piha Henna i sur., 2011; De Witte i sur., 2014; Su i sur., 2016; Andrady, 2017; Auta i sur., 2017; Boucher i Friot, 2017) (Slika 1.).



Slika 1. Stvaranje sekundarne mikroplastike u morskom ekosustavu (preuzeto i prilagođeno Wagner i Lambert, 2018).

Sekundarna mikroplastika široko je povezana s područjima visoke naseljenosti ljudskom populacijom zbog česte uporabe i neprimjerenog odlaganja proizvoda od plastike (Eerkes-Medrano i sur., 2015). U vodenom okolišu samo čestice koje pokazuju manju gustoću od vode, one koje plutaju, pod snažnim su utjecajem ultraljubičastog zračenja i abrazije valova te su osjetljivije na fragmentaciju (Andrady, 2017). U morskom okolišu izvor ulaska mikroplastike potječe i od ribolovnih alata koji su često namjerno bačeni, izgubljeni ili napušteni u moru te pod utjecajem različitih čimbenika mogu biti fragmentirani i postati sekundarna mikroplastika (Lusher i sur., 2017). Osim ribarstva, znatni unos mikroplastike u morski ekosustav mogu imati i brodovi kojima se prevoze robe i usluge gdje može doći do slučajnog izlivanja plastičnih peleta u okoliš (Auta i sur., 2017).

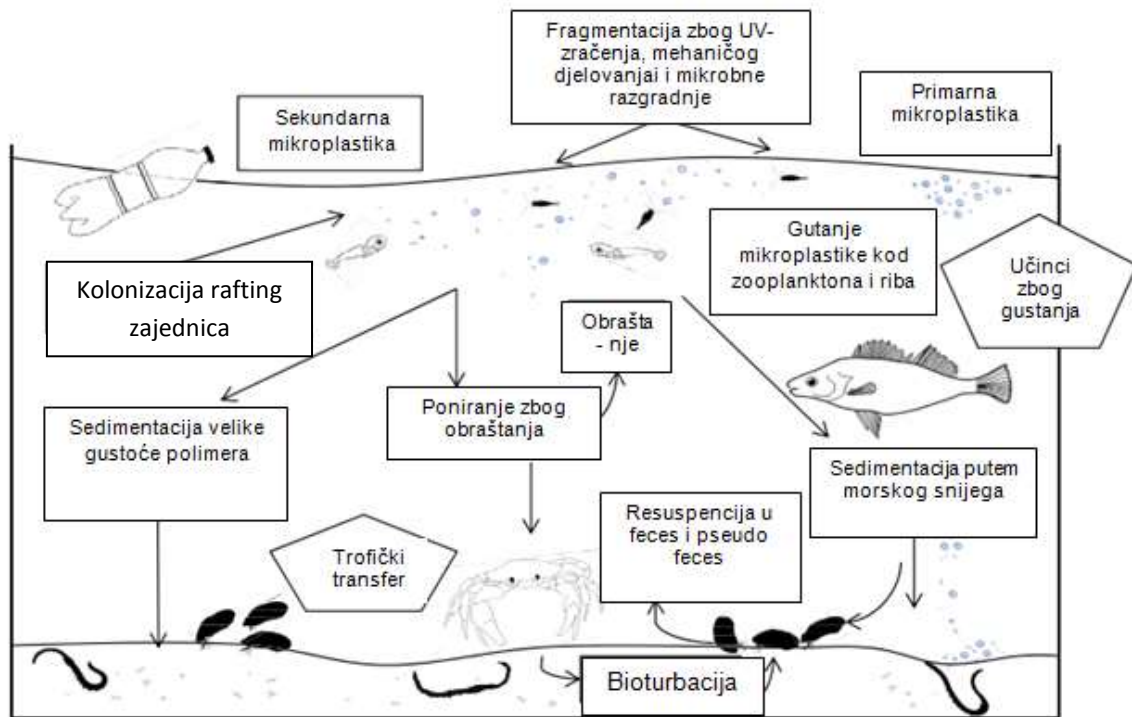
### 1.1.2. Mikroplastika u morskom okolišu

Pojava mikoplastike u morskom i obalnom području prvi puta je primijećena 1970-ih godina, ali se tada još nije koristio izraz mikroplastika (Sharma, 2019). Mikroplastika je jedna od najbrojnijih plastičnih ostataka u morskim ekosustavima te bi s vremenom moglo doći do njezinog povećanja zbog razgradnje većeg plastičnog otpada, koji se na kraju pod utjecajem različitih fizikalnih i kemijskih čimbenika razgrađuju na sve manje čestice mikoplastike (Cozar i sur., 2014; Law i Thompson, 2014). Zbog široke primjene plastike i njezine postojanosti učinila je mikoplastiku sveprisutnom u morskoj vodi, sedimentima, organizmima, pa čak i morskoj soli (Yang i sur., 2015). Raspodjela čestica mikoplastike u morskim ekosustavima djelomično je određena gustoćom polimera mikoplastike koji mogu plutati ili tonuti (Andrady, 2011). U dosadašnjim istraživanjima je također uočeno da čestice mikoplastike mogu dospjeti i na veće nadmorske dubine, gdje se zadržavaju i tako mogu postati dostupne za bentoske organizme (Nor i Obbard, 2014; Auta i sur., 2017). Kowalski i sur. (2016) zabilježili su proces obraštaja mikroorganizama i algi na česticama mikoplastike što dovodi do ubrzanog tonjenja čestica na morsko dno, a time mogu imati znatni utjecaj i na organizme duž cijelog vodenog stupca.

### 1.1.3. Mikroplastika u morskim organizmima

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je mikroplastika raširena od obalnog područja do najudaljenijih podmorskih područja (Hidalgo-Ruz i sur., 2012). Zbog svojih malih dimenzija mikroplastika postaje dostupna širokom spektru morskih organizama, a najčešći razlog tome je zamjena mikoplastike s hranom, što dovodi do smanjenog unosa živih organizama i snižene razine energije koji može utjecati na sam fitness jedinki (Courtene-Jones i sur., 2017; Sharma, 2019). Veličina čestica također može imati utjecaja na proces hranjenja i gutanja kod različitih organizama. Veće čestice mikoplastike (1-5 mm) unijetće organizmi poput morskih kornjača, morskih ptica i riba, dok će manje čestice unositi manji beskralješnjaci i zooplankton (Cole i sur., 2013; Lusher i sur., 2013; Lusher, 2015). Mnoga istraživanja su dokazala unos mikoplastike u organizme gutanjem od dna prehrambenog lanca gdje se nalazi zooplankton, Euphausiacea (kril) i ličinački stadiji mekušaca, pa sve do beskralješnjaka poput mnogočetinaša i školjkaša, te kralješnjaci poput riba, morskih

ptica i kitova (Hart, 1991; Graham i Thompson, 2009; Cole i sur., 2013; Codina-García i sur., 2013; Lee i sur., 2013; Van Cauwenberghe i Janssen, 2014; Romeo i sur., 2015; Fossi i sur., 2016) (Slika 2.).



Slika 2. Potencijalni putevi transporta mikroplastike i njene biološke interakcije (preuzeto i prilagođeno prema Wright i sur., 2013).

## 1.2. Utjecaj mikroplastike na morske organizme

Prilikom gutanja i ulaska mikroplastike u morske organizme može doći do fizičkog oštećenja ili kemijskog utjecaja na probavni sustav organizma. Također, novija istraživanja pokazuju potencijalni negativni učinak mikroplastike kod riba prilikom gutanja, gdje je u konačnici odlazi u jetru i može doći do začepjenja crijeva što posljedično dovodi do fizičkih oštećenja, ali i histopatoloških promjena u crijevima i modifikacije metabolizma lipida (Jovanović, 2017). Unešene čestice mikroplastike mogu također utjecati na smanjenje sposobnosti hranjenja (Wright i sur., 2013), stopu rasta (Besseling i sur., 2014), plodnost (Lee i sur., 2013; Sussarellu i sur., 2016) i remećenja imunološkog sustava (Von Moos i sur., 2012; Avio i sur., 2015) kod mnogih vrsta. Mikroplastika može ispuštati plastične aditive, ali i apsorbirati organske onečišćujuće tvari i teške metale koji se mogu pronaći na površini čestica u

većim koncentracijama od onih pronađenih u okolnom morskom ekosustavu te time može predstavljati potencijalni rizik za okoliš (Wright i sur., 2013; Bakir i sur., 2014; Rochman i sur., 2014; Napper i sur., 2015; Brennecke i sur., 2016). Mnogi toksični učinci mikroplastike uočeni su kod morskih organizama kao što su morski ježevi, školjkaši, rakovi i ribe (Farrell i Nelson, 2013; Kaposi i sur., 2014; Rochman i sur., 2014). Osim toga mikroplastika se može prenositi i akumulirati u tkivima organizama koji se koriste u ljudskoj prehrani, te na taj način imati i potencijalni rizik za ljudsko zdravlje putem procesa biomagnifikacije duž prehrambenog lanca (Rochman i sur., 2013; Brennecke i sur., 2015; Rocha – Santos i Duarte, 2015). Također, treba uzeti u obzir da se proizvodnja morskih organizama (riba i školjkaša) iz akvakulture uglavnom izvodi u otvorenim sustavima, tj. u prirodnoj morskoj vodi (Van Cauwenberghe i Janssen, 2014). Iz tog razloga vrlo je važno razumjeti sudbinu i ponašanje mikroplastike u okolišu (Su i sur., 2016).

### 1.2.1. Utjecaj mikroplastike na školjkaše

Primarni rizik za okoliš povezan s mikroplastikom je upravo njezina sumnjiva bioraspoloživost za morske organizme (Li i sur., 2016). Organizmi koji se intenzivno koriste u programima praćenja mora su školjkaši, posebice dagnje. Također su zbog svog specifičnog načina hranjenja filtracijom izravno izloženi mikroplastikom zbog velike količine vode koju mogu filtrirati (brzinom od 50 ml morske vode u minuti) i time povećavaju svoju izloženost bilo kakvim štetnim materijalima (mikroplastika i kemijske onečišćujuće tvari) koji su prisutni u okolnoj vodi (Famme i sur., 1986; Van Cauwenberghe i Janssen, 2014).

#### 1.2.1.1. Mediteranska dagnja (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) kao modelni organizam u istraživanjima

Dagnje (Bivalvia: Mytiloidea) su jedan od najčešćih modelnih organizama (Slika 3.). Imaju široku geografsku rasprostranjenost, bentoski i filtratorski su organizmi, imaju dobro istraženu fiziologiju i anatomiju i osjetljive su na niz onečišćivala (Cajaraville i sur., 2000; Brenner i sur., 2012; Cuevas i sur., 2015). S obzirom da dagnje mogu tolerirati i akumulirati onečišćujuće tvari u svojim tkivima u većim koncentracijama u odnosu na one koje su prisutne u vodenom okolišu, smatraju se važnim i dobro prepoznatljivim vrstama u ekotoksikološkim istraživanjima

procjenama zdravstvenog stanja morskog okoliša (Livinstone, 1991; Faggio i sur., 2018). Mediteranska dagnja (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) je najčešća bentonska vrsta koja se koristi za proučavanje sudbine i toksičnih učinaka mikroplastike u istraživanjima (Browne i sur., 2008; von Moos i sur., 2012; Van Cauwenberghe i Janssen, 2014; Avio i sur., 2015; Li i sur., 2015; Li i sur., 2016).



Slika 3. Mediteranska dagnja (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819). (<http://www.omare.pt/>)

*M. galloprovincialis* može akumulirati čestice mikroplastike u svom tkivu i važan je vektor prenošenja mikroplastike u ljudski prehrambeni lanac (Li i sur., 2016). Filtriranjem dagnja *M. galloprovincialis* unosi i nakuplja mikroplastiku u škrgama, nakon čega može doći do nakupljanja u probavnom sustavu i hemolimfi (De Witte i sur., 2014). U istraživanju von Moos i sur. (2012) uočeno je da nakon izlaganja mikroplastikom čestice zaostaju i na škrgama. Lokalizacija takvih čestica u određenim tkivima i organima dagnje *M. galloprovincialis* ukazuju na sposobnost mikroplastike da se akumulira na višim trofičkim razinama (De Witte i sur., 2014). Dagnje imaju sposobnost preživjeti u zagađenom okolišu usprkos činjenici da onečišćujuće tvari često preopterećuju normalne fiziološke mehanizme biotransformacije ili detoksikacije u stani (Moore, 1985; Ville i sur., 1992). Preživljavanje u takvim uvjetima dovodi do ozbiljnih promjena u strukturi stanica koje

čine probavni sustav mekušaca, a posebno dagnji (Moore, 1985; Cajaraville i sur., 1989). U mnogim istraživanjima primijećeno je niz toksičnih učinaka povezanih s gutanjem mikroplastike u školjkašima (Von Moos i sur., 2012; Avio i sur. 2015). Primijećene su značajne histološke promjene u probavnim stanicama dagnji, snažni upalni odgovori s stvaranjem granulocitoma i lizosomske destabilizacije koja se povećava s vremenom izlaganja (Von Moose i sur., 2012; Lusher i sur., 2019). U istraživanju Avio i sur. (2015) uočene su promjene povezane s izloženošću dagnji mikroplastikom gdje se javio niz promjena u imunološkom odgovoru, promjene u stabilnosti lizosoma, proliferaciju peroksisoma, antioksidativnom sustavu, neurotoksični učinci, pojava genotoksičnosti i promjene u profilu ekspresije gena (Lusher i sur., 2019). Dosadašnja istraživanja pokazuju da mikroplastika itekako može imati štetnih učinaka na školjkaše, a to su: histološke promjene, upalni odgovor, destabilizacija lizosomalnih membrana, smanjenje aktivnosti filtriranja, neurotoksični učinci, promjene antioksidativnog sustava, povećanje smrtnosti hemocita, displazija, genotoksičnost i transkripcijski odgovor (Lusher i sur., 2019).

#### 1.2.1.2. Probavna žlijezda dagnji, onečišćujuće tvari i mikroplastika

Probavna žlijezda dagnji često se koristi u procjeni utjecaja onečišćujućih tvari na zdravlje dagnji (Faggio i sur., 2018). Probavna žlijezda uključuje brojne epitelne tubule koji se uglavnom sastoje od bazofilnih i probavnih stanica. Bazofilne stanice imaju važnu ulogu u proizvodnji lučenju enzima, dok su probavne stanice odgovorne za unutarstaničnu probavu, te se smatraju glavnim organelima za detoksifikaciju toksičnih metala i organskih zagađivala (Domouhtsidou i Dimitriadis, 2001; Faggio i sur., 2018). S obzirom da se određeni ksenobiotici i teški metali nakupljaju u ovom tkivu, probavna žlijezda dagnje obično se koristi za procjenu patoloških promjena u dagnjama (Martins i sur., 2012; Faggio i sur., 2018). Novija istraživanja pokazuju značajnu osjetljivost dagnjina mikroplastiku koja se akumulira u njihovim tkivima i cirkulacijskim sustavima (Farrell i Nelson, 2013; Faggio i sur., 2018). U istraživanju Setälä i sur. (2016) uočeno je značajno veće nakupljanje mikroplastike u probavnom sustavu u usporedbi sa škrgama. Također, u istraživanju Avio i sur. (2015) je dokazano da je koncentracija ksenobiotika bila znatno veća u dagnjama kontaminiranim s mikroplastikom u usporedbi s organizmima tretiranim samo s ksenobioticima. Uspješno uklanjanje čestica mikroplastike uočeno je nakon 3 dana od

depuracije, ali je također primijećeno da mikroplastika značajno utječe na sposobnost dagnji da uklone ksenobiotike (Van Cauwenberghe i Janssen, 2014; Faggio i sur., 2018).

### 1.3. Histološke promjene u školjkašima pod utjecajem zagađivala

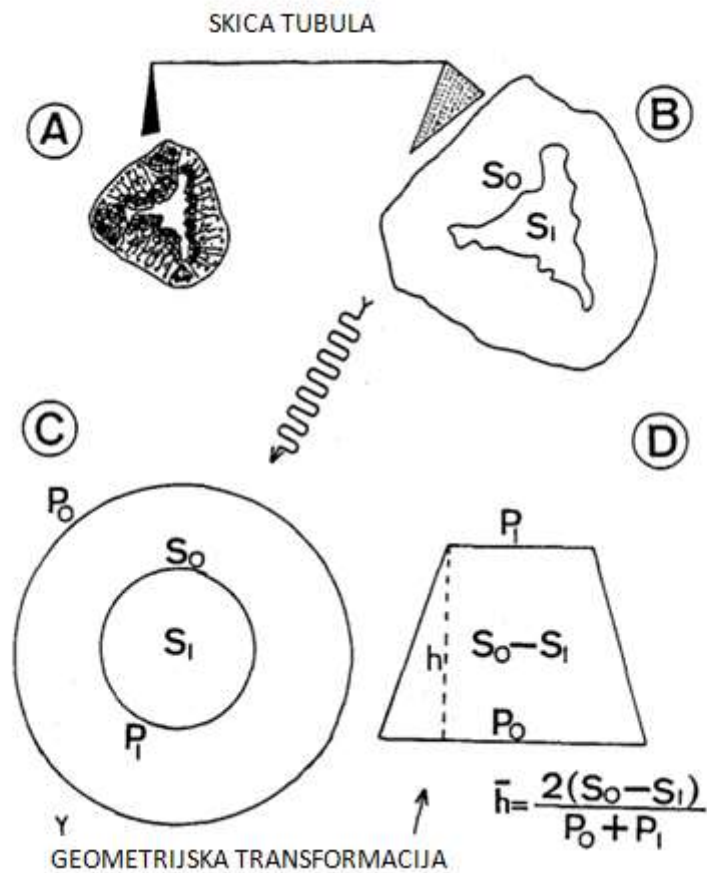
Histološka analiza tkiva u morskim organizmima jedna je od vrijednih alata za procjenu štetnih učinaka na organizme uzrokovanih zagađenjem u procjenama stanja okoliša (Carella i sur., 2015; Cuevas i sur., 2015). Histološki biomarkeri izuzetno su važni jer mogu pružiti izravne informacije o zdravstvenom stanju organizma i populacija (Adams i Sonne, 2013; Cuevas i sur., 2015).

#### 1.3.1. Histološke promjene u probavnim žlijezdama školjkaša

Histološke analize otkrivaju različite degenerativne (vakuolizacija, atrofija), destruktivne (nekroza, smanjenje epitelnog sloja) i upalne patološke promjene koje služe za procjenu morfološkog i funkcionalnog stanja probavnih žlijezdi školjkaša (Usheva i sur., 2006). Atrofija probavnih tubula manifestira se kao promjena u debljini epitela i lumena probavnih tubula u probavnim žlijezdama školjkaša te se smatra jednim od histopatoloških promjena koja može ukazivati na upalni odgovor u probavnim žlijezdama školjkaša (Rocha i sur., 2016). Povećani broj atrofičnih tubula u probavnim žlijezdama dagnji dovodi do zatajenja funkcija probavnih žlijezdi, među kojima su probava, metabolička i homeostatska regulacija (npr. kalcija, pH hemolimfe i regulacija volumena stanica) i imunološka obrana (Rocha i sur., 2016). Također, nekoliko dosadašnjih studija opisalo je stanjivanje probavnog epitela kao odgovor na stresor iz okoliša (Moore i sur., 1978; Lowe i sur., 1981). Srednjadebljina probavnog epitela (h) koristi se kao histološki indeks stresa u okolišu (Marigómez i sur., 1990; Rocha i sur., 2016). Srednja debljina probavnog epitela koristi se kao indeks koji predstavlja udio atrofičnih tubula induciranih stresorima (Marigómez i sur., 1990). Smanjenjem srednje debljine epitela i kružnosti (c) probavnih tubula dovodi do gubitka njihovih funkcija (Rocha i sur., 2016). Metoda za izračunavanje srednje debljine probavnog epitela (h) temelji se na geometrijskoj transformaciji oblika tubularnih presjeka u hipotetski trapez (Marigómez i sur., 1990). Površina trapeza odgovara površini epitela u presjeku, gdje dvije baze trapeza predstavljaju opseg



tubula ( $P_0$ ) i perimetar lumena ( $P_i$ ) (Marigómez i sur., 1990; Rocha i sur., 2016; Slika 4.).



Slika 4. Shematski prikaz postupka kojime se mjeri debljina epitela iz presjeka tubula promatranim svjetlosnim mikroskopom (A); povećana projekcija presjeka tubula (površinu epitelnog sloja ( $S_0$ ) i područje lumena probavnih tubula ( $S_1$ )) (B); pravilni lik dobiven iz povećane projekcije (gdje vrijednosti  $S_0$  i  $S_1$  odgovaraju onima na prethodnoj slici, a vrijednost  $P_0$  predstavlja opseg tubula i vrijednost  $P_i$  predstavlja perimetar lumena (C); hipotetski trapez okarakteriziran istim mjerama kao na C slici gdje vrijednost  $h$  predstavlja visinu trapeza i debljinu tubula (preuzeto i prilagođeno iz rada Marigómez i sur., 1990).

## 2. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je:

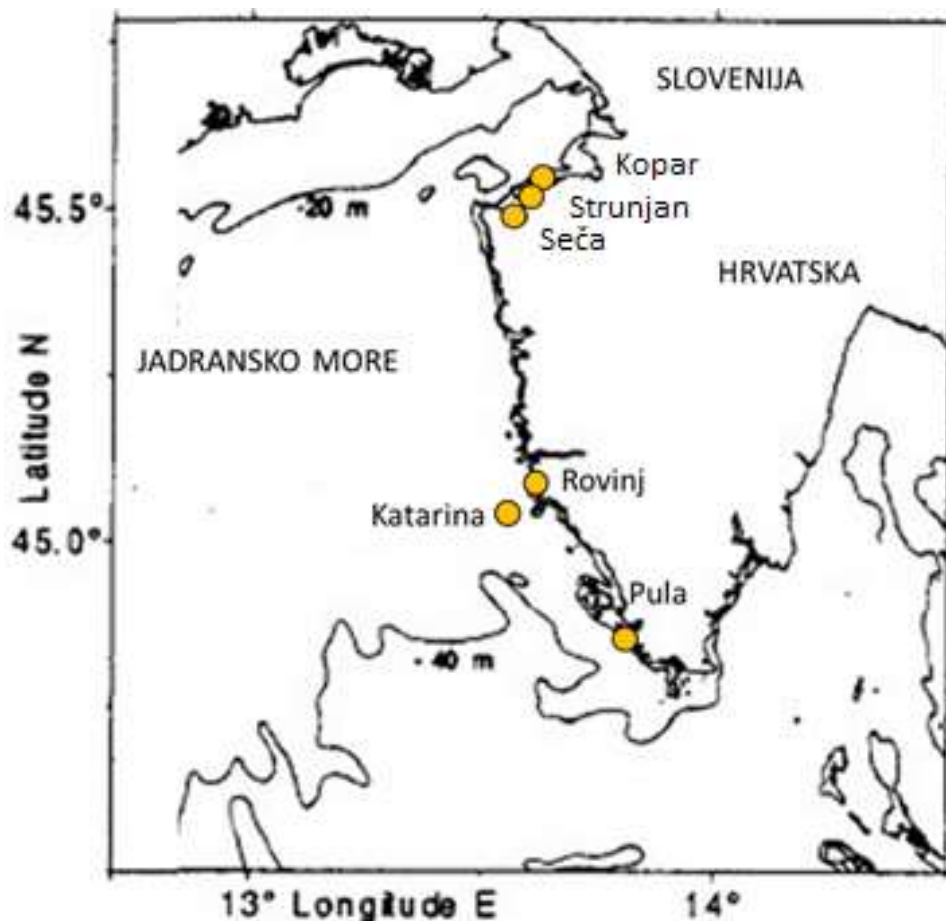
1. utvrditi broj, oblik i veličinu čestica mikroplastike u probavnoj žlijezdi dagnje *M. galloprovincialis* sakupljenih na 6 postaja u sjevernom Jadranu (područja uz gradove Pula, Rovinj i Kopar).
2. klasificirati čestica mikroplastike u pojedine skupine na temelju grupiranja prema dosadašnjim istraživanjima
3. analizirati histomorfometrijske promjene i napraviti semikvantitativnu procjenu atrofije mikrotubula probavne žlijezde dagnji
4. usporediti 6 postaja u sjevernom Jadranu te procijeniti utjecaj mikroplastike na dagnju *M. galloprovincialis*

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Područje uzorkovanja

Uzorci dagnje (N=12), *M. galloprovincialis* Lamarck 1819, sakupljani su u veljači i travnju 2014. godine na šest postaja u sjevernom Jadranu: ACI Marina Pula, otok Katarina, ACI Marina Rovinj, Strunjan, Seča i Kopar (Slika 5.). Postaja Katarina nalazi se na zapadnoj obali istarskog poluotoka, te je udaljena 2 km zračne linije od Rovinja. U blizini postaje Sv. Katarina nema izvora onečišćenja, stoga se smatra kontrolnom postajom u istraživanju. Unutar urbaniziranog područja Rovinja nalazi se postaja Rovinj, mjesto koje je pod utjecajem vode porijeklom iz tvornice prerade ribe Mirna, otpadnih voda iz kanalizacija i pristaništa brodova. Postaja ACI marina Pula nalazi se u neposrednoj blizini visoko urbaniziranog područja te je pod utjecajem luke i brodogradilišta u Puli koji ispuštaju velike količine urbanih i industrijskih otpadnih voda (Bihari i sur. 2004; Jakšić i sur., 2005).

Postaja Strunjan je kontrolna postaja u Sloveniji koja se nalazi na uzgajalištu dagnji (Ramšak i sur., 2012). Postaja Seča nalazi se u Piranskom zaljevu, također na području uzgajališta. Postaja Kopar nalazi se okružena turističkim naseljima, te koja je pod utjecajem industrijskih otpadnih voda i luke.



Slika 5. Lokaliteti uzorkovanja dagnje *Mytilus galloprovincialis* u sjevernom Jadranu (•).

### 3.2. Izolacija i bojanje tkiva

Tkivo probavne žlijezde isječeno je škaricama. Polovice probavne žlijezde naglo su smrznute u N-heksanu, prethodno ohlađenom u tekućem dušiku. Tako obrađeni uzorci pohranjeni su na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , do pripreme histoloških preparata.

Prije kriosekcije, uzorci su pričvršćeni za nosač mikrotoma i uklopljeni u medij O.C.T. TM (Microm Inc. GmbH, Germany) (Kovačić, 2015). Uzorci žlijezdi smješteni su na nosač kriotoma (Zeiss Hyrax C 50, Microm GmbH, Germany) prethodno ohlađenim na  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Za pojedini uzorak od pet žlijezda pripremljeni su preparati prereza debljine  $10\mu\text{m}$ . Smrznuti poprečni prerezi probavnih žlijezda nanešeni su na predmetno stakalce zagrijano na sobnu temperaturu. Preparati su bojani otopinom hematoksilina i eozina (Sigma-Aldrich, USA) pri sobnoj temperaturi. Nakon bojanja, preparati su uklopljeni u glicerol želatinu (Sigma – Aldrich, USA).

### 3.3. Analiza mikroplastike

Dobiveni presjeci probavnih žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* analizirali su se pretražnim elektronskim mikroskopom SEM FEI FEG250QUANTA / OXFORD EDS PENTAFET, te svjetlosnim mikroskopom uz pomoć polarizatora (Zeiss AXIO m2M).

Snimljene su fotografije kanalića u probavnoj žlijezdi dagnji svjetlosnim mikroskopom (Zeiss AXIO m2M) pod povećanjem 200X. Podaci o broju i obliku čestica procijenili su se obradom fotografija u programu Image J. Na temelju dobivenih podataka čestice mikroplastike klasificirane su prema boji, obliku i veličini u skupine na temelju istraživanja Ding i sur. (2019) i Van Cauwenberghe i Janssen (2014).

### 3.4. Histološke analize probavne žlijezde

Histološka analiza probavnih žlijezdi dagnje *Mytilus galloprovincialis* provedena je na temelju dobivenih fotografija snimljenih pomoću svjetlosnog mikroskopa (Zeiss AXIO m2M) uvećanja 200X. Izvršena su mjerenja histomorfometrije probavnih kanalića i semikvantitativna analiza probavnih kanalića (Rocha i sur., 2016). Histološka analiza probavne žlijezde provedena je na fotografijama snimljenim na uvećanju 200X (30 tubulića po organizmu, na 5 probavnih žlijezdi po svakoj postaji) te su slike analizirane pomoću programa za obradu slika ImageJ.

#### 3.4.1. Semikvantitativna analiza probavnih kanalića dagnje

Izvršena je semikvantitativna procjena atrofije kanalića probavne žlijezde dagnje prema radu (Rocha i sur., 2016). Udio svake vrste probavnih tubulića po životinji analiziran je vizualno iz snimljenih fotografija, gdje su svrstani u tri različita tipa (tip 1- faza zadržavanja, tip 2- apsorpcijska faza, tip 3- raspadajuća ili atrofička faza) (Rocha i sur., 2016).

#### 3.4.2. Morfometrijske analize probavnih kanalića dagnje

Provedena je histomorfometrijska analiza modifikacije probavnih tubulića u probavnim žlijezdama dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Status probavnih tubulića analiziran je s obzirom na površinu epitelnog sloja (S0), područje lumena probavnih

tubula ( $S_i$ ), opseg tubula ( $P_0$ ), perimetar lumena ( $P_i$ ), srednje vrijednosti debljine epitela ( $h$ ) [ $h = 2(S_0 - S_i)/P_0 + P_i$ ] i kružnosti ( $c$ ) [ $c = 4\pi (S_0 / P_0^2)$ ] (Rocha i sur., 2016).

### 3.5. Statistička analiza

Ukupan broj čestica mikroplastike i promijene na tkivima izračunate su kao srednja vrijednost i standardna devijacija u Microsoft Excel 2016. Statistička obrada rezultata izvršena je u program Statistica 9.0. Statistička razlika u lokalitetima i vremenu uzorkovanja izračunata je pomoću dvosmjerne analize varijance (Two - wayANOVA), a statistička razlika između pojedinog dva uzorka izračunata je post hoc Tuckey HSD testom.

## 4. Rezultati

### 4.1. Analiza mikroplastike

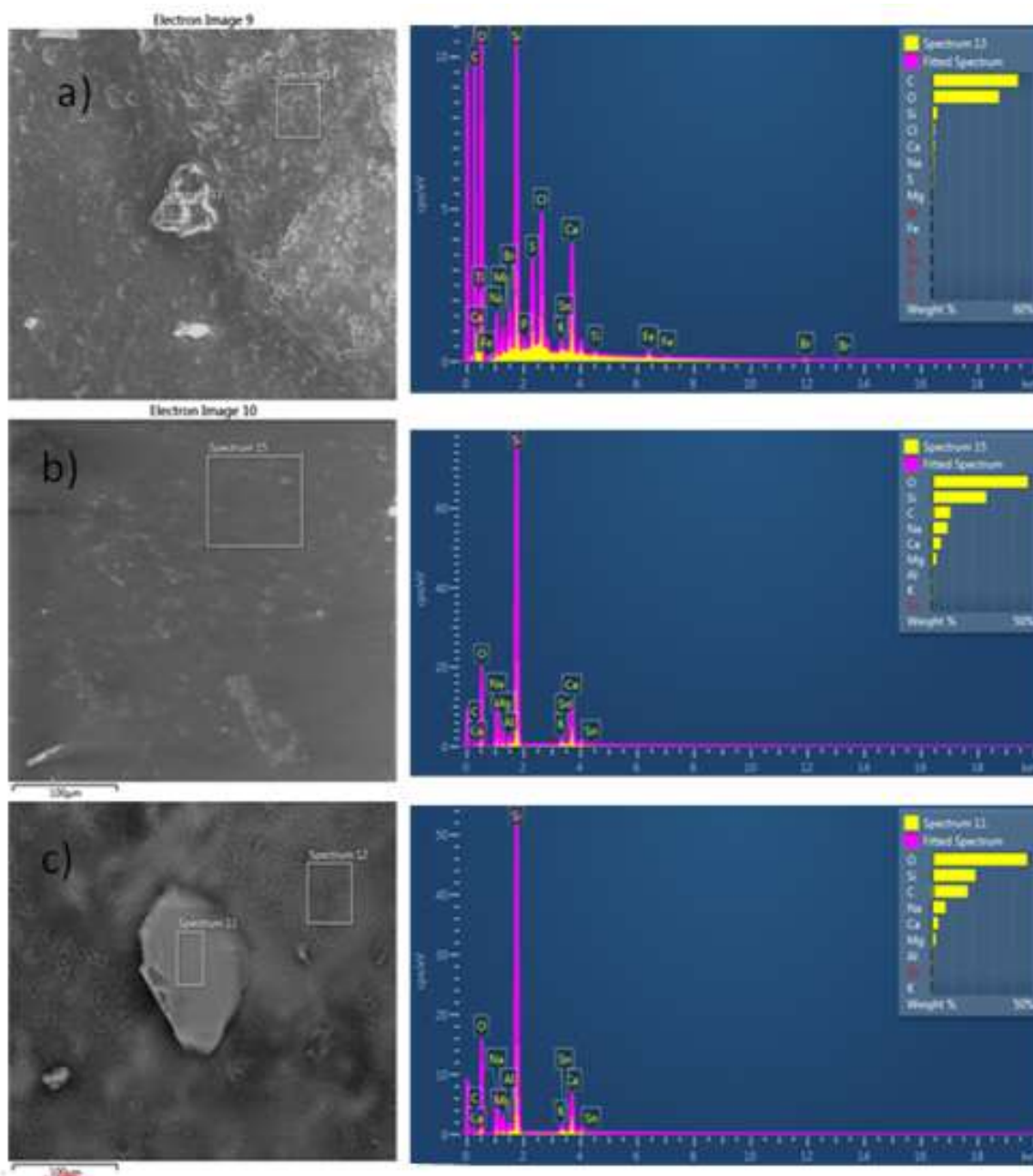
Čestice mikroplastike analizirane svjetlosnim mikroskopom pomoću polarizatora (Slika 6.) pretražnim elektronskim mikroskopom (Slika 7.) prikazane su na fotografijama. Na temelju prethodnih istraživanja Ding i sur. (2019) i Van Cauwenberghe i Janssen (2014) čestice mikroplastike svrstane su u kategorije na temelju veličine, boje i oblika pronađenih u dagnjama *Mytilus galloprovincialis* na šest istraživanih postaja u veljači i travnju 2014. godine. Prilikom svrstavanja čestica mikroplastike u kategorije zanemarene su čestice manje od 4  $\mu\text{m}$ . Veće čestice koje nisu bile uklopljene u sam prerez tkiva također su bile isključene iz brojanja tesu definirane kao kontaminacija (Slika 6. I).



Slika 6. Reprezentativni primjeri mikroplastike pronađeni u uzorcima dagnji *Mytilus galloprovincialis* na postajama u sjevernom Jadranu snimljenim svjetlosnim mikroskopom pomoću polarizatora. A), B) i C) film; D) i E) pelet; F) filament (Avio i

sur. 2015); H) i G) sfere; I) vlakna (kontaminacija) povećanje 200X, veličina *scale bar* 10  $\mu\text{m}$ .

Odabrane čestice mikroplastike dodatno su snimljene elektronskim mikroskopom (Slika 7.). Iz sastava čestica utvrđeno je da se radi o česticama mikroplastike zbog velikog udjela ugljikovih i kisikovih atoma (Slika 7. a i b). Čestica sastava većeg udjela kisikovih i silicijevih atoma identificirana je kao mineralna čestica (Slika 7. c).



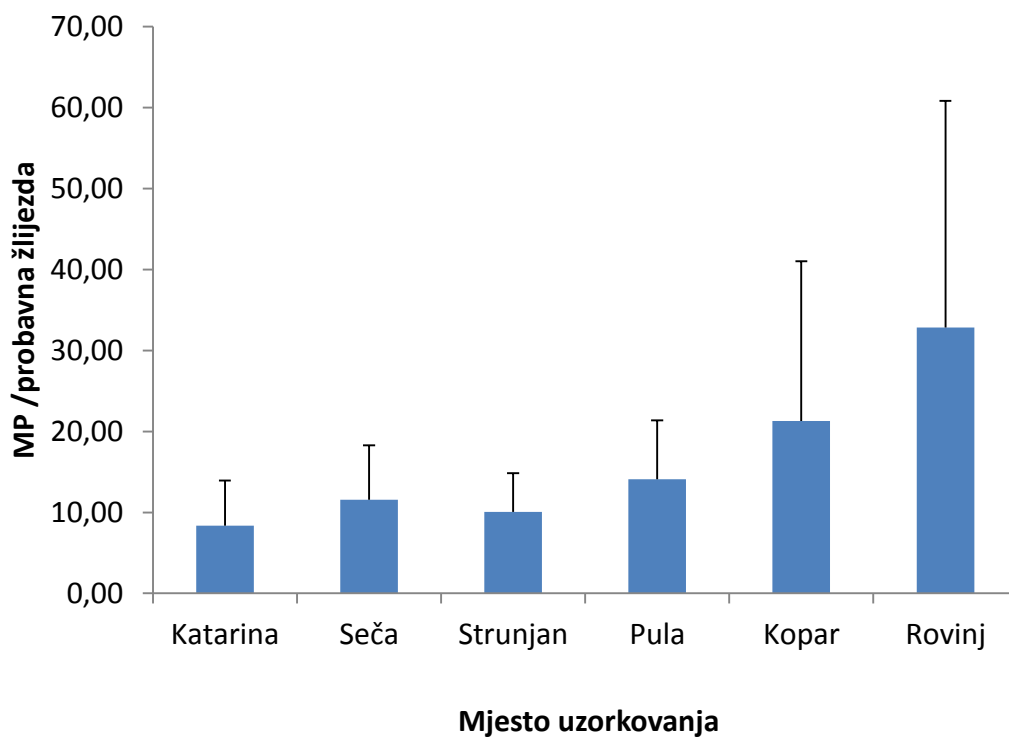
Slika 7. a) i b) Reprezentativni primjeri mikroplastike pronađeni u uzorcima dagnji *Mytilus galloprovincialis* na postajama u sjevernom Jadranu snimljenim elektronskim



mikroskopom i c) primjer čestice koja prema sastavu ne odgovara čestici mikroplastike. Fotografije i sastav tvari analiziran je na SEM EDS mikroskopom.

#### 4.1.1. Broj čestica mikroplastika

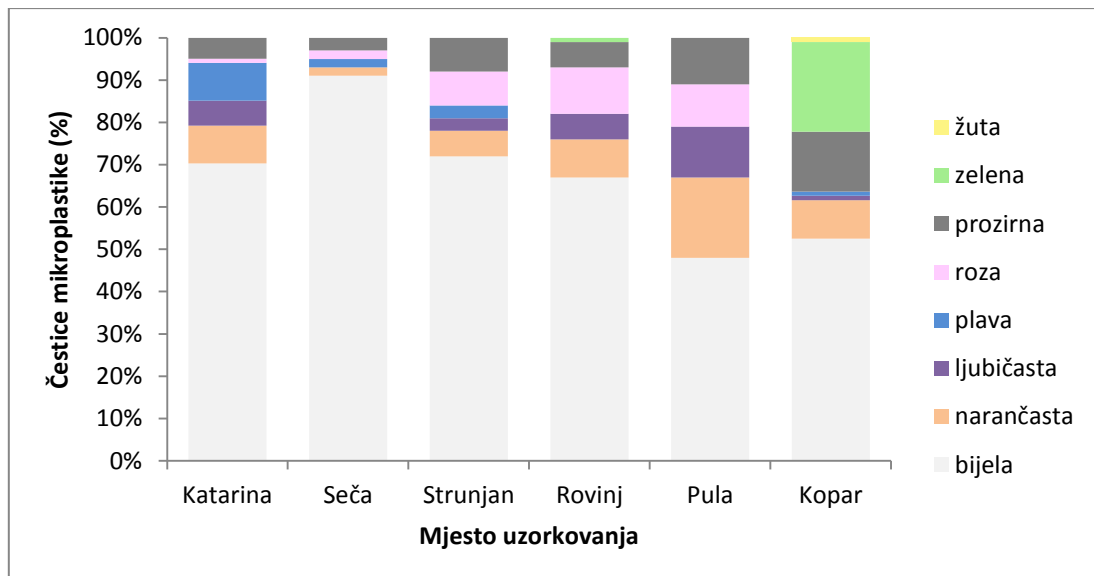
Ukupan broj identificiranih čestica mikroplastike u dagnjama *M. gallopovincialis* prikazan je na slici (Slika 8.). Najveći broj čestica mikroplastike u probavnim žlijezdama dagnji pronađen je u dagnjama uzorkovanim na postaji Rovinj, a najmanji broj čestica mikroplastike pronađen je u probavnim žlijezdama dagnji uzorkovanih na postaji Katarina (Slika 8.).



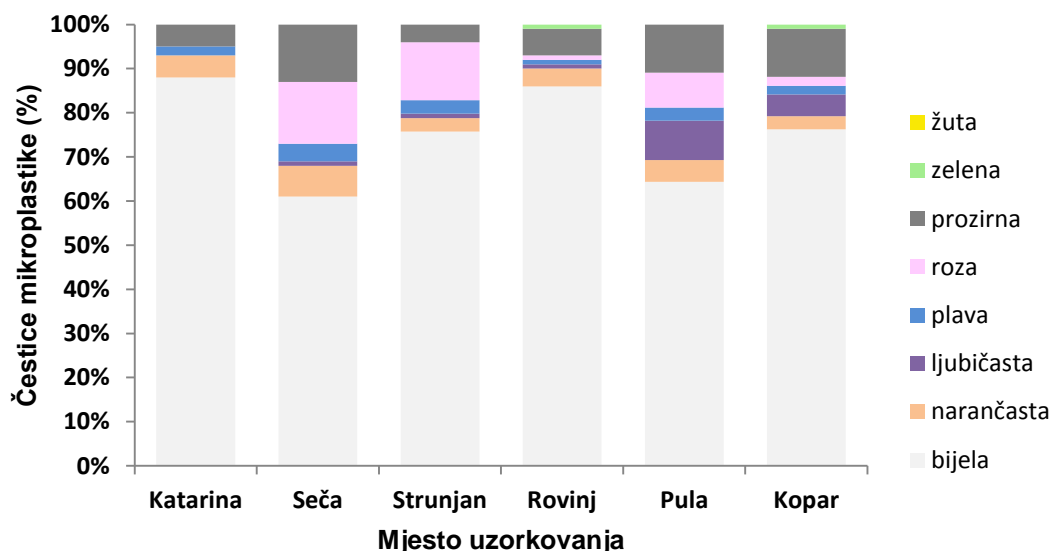
Slika 8. Prikaz broja čestica mikroplastike (srednja vrijednost ± standardna devijacija) u probavnoj žlijezdi dagnje (N=24 po mjestu uzorkovanja) uzorkovanih na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014. godine.

#### 4.1.2. Podjela mikroplastike prema boji

Pronađene čestice mikroplastike u dagnjama *M. galloprovincialis*na šest različitih postaja u veljači i travnju 2014.godine klasificirane su u osam kategorija prema boji, a to su žuta, zelena, prozirna, roza, plava, ljubičasta, narančasta i bijela. Najzastupljenije čestice pronađene u dagnjama su bijele boje, a najmanje zastupljene su bile čestice žute boje u veljači i travnju 2014.godine (Slika 9. i Slika 10.). U veljači 2014.godine najviše (91%) čestica bijele boje mikroplastike pronađeno je na postaji Seča, a najmanje (48%) na postaji Pula (Slika 9.). Druge po zastupljenosti čestice mikroplastike u veljači 2014.godine su narančaste i prozirne. Najviše čestica bijele boje pronađeno je u probavnim žlijezdama dagnji na postaji Katarina (88%), a najmanje na postaji Seča (61%) u travnju 2014. godine (Slika 10.).



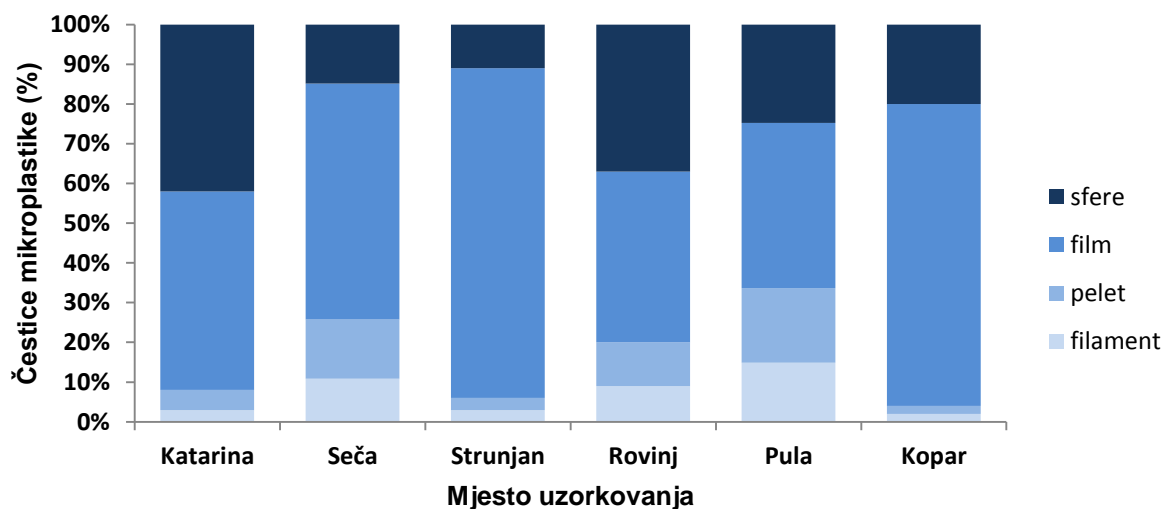
Slika 9. Podjela čestica mikroplastike prema boji pronađenih u uzorcima probavnih žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih u veljači 2014.godine na postajama u sjevernom Jadranu.



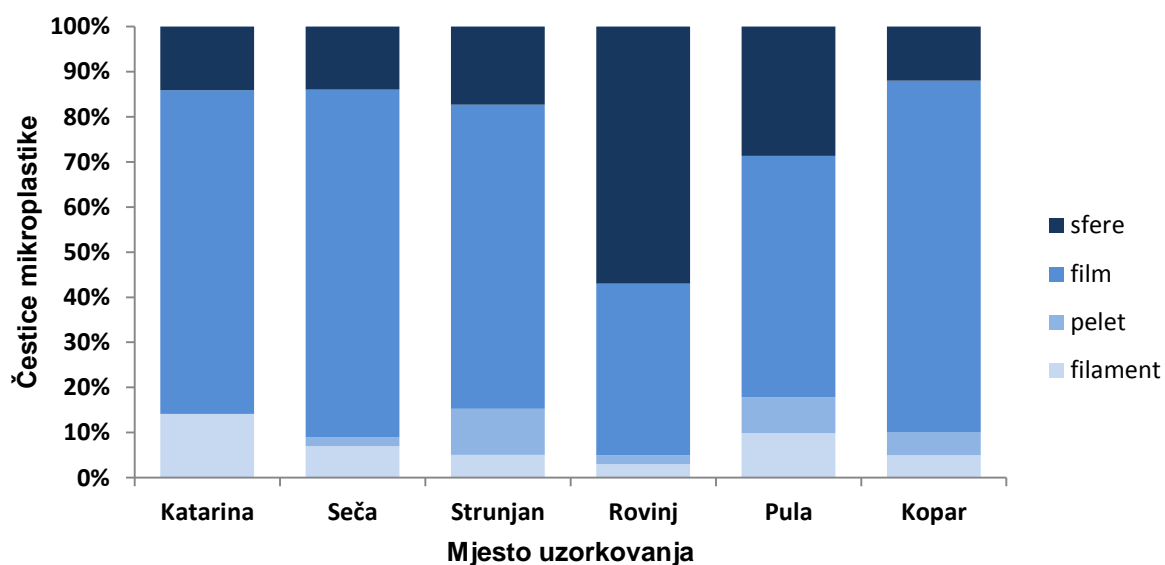
Slika 10. Podjela čestica mikroplastike prema boji pronađenih u uzorcima probavnih žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih u travnju 2014. godine na postajama u sjevernom Jadranu.

#### 4.1.3. Podjela mikroplastike prema obliku

Na temelju prethodnih istraživanja (Van Cauwenberghe i Janssen, 2014; Avio i sur. 2015; Ding i sur. 2019; Ehlers i sur. 2019) čestice mikroplastike klasificirane su u četiri kategorije sfere, film, pelet i filament s obzirom na tip čestica (Van Cauwenberghe i Janssen, 2014; Avio i sur. 2015; Ding i sur. 2019; Ehlers i sur. 2019). U veljači i travnju 2014. godine najčešća čestica mikroplastike prema obliku je film, a zatim sfere (Slika 11. i Slika 12.). Najviše zastupljenih čestica mikroplastike prema obliku film u veljači 2014. godine je na postajama Strunjan (83%) i Kopar (76%), a najmanja zastupljenost na postaji Pula (42%) i Rovinj (43%) (Slika 11.). U travnju 2014. godine najzastupljenije čestice mikroplastike po obliku bile su film i sfere, a najmanje zastupljene pelet (Slika 12.). Najviše čestica mikroplastike prema obliku film pronađeno je u probavnim žlijezdama dagnje *M. galloprovincialis* na postajama Kopar (78%), Seča (77%) i Katarina (71%) u dagnjama uzorkovanih u travnju 2018. godine (Slika 12.). Druge po obliku čestice mikroplastike bile su sfere, te su najbrojnije pronađene u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* na postaji Rovinj (57%) (Slika 12.). Najmanja zastupljenost filmaje na postaji Rovinj (38%), a sferana postaji Kopar (12%) (Slika 12.).



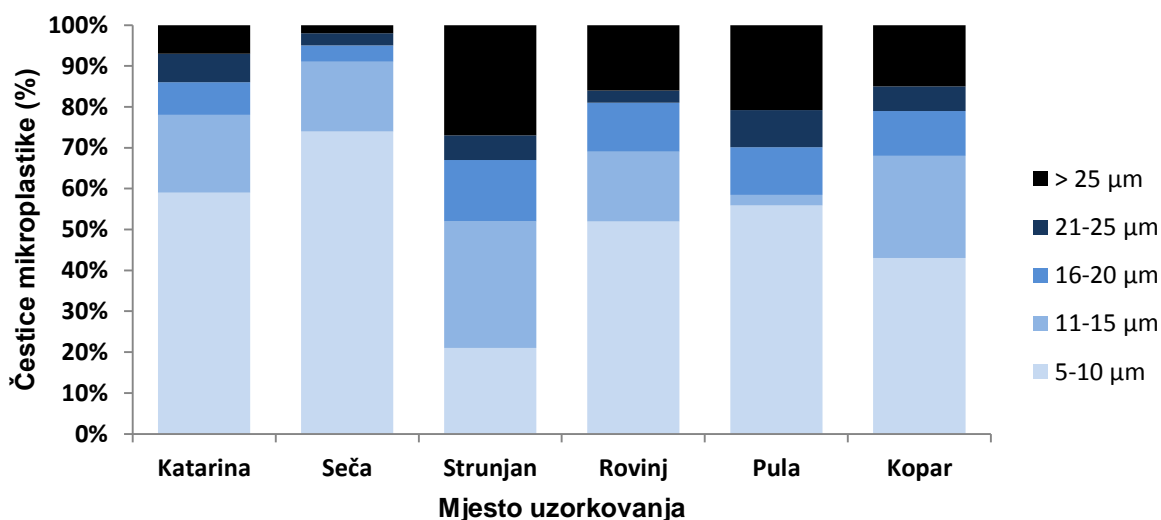
Slika 11. Podjela čestica mikroplastike prema obliku pronađenih u uzorcima probavnih žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih u veljači 2014. godine na postajama u sjevernom Jadranu.



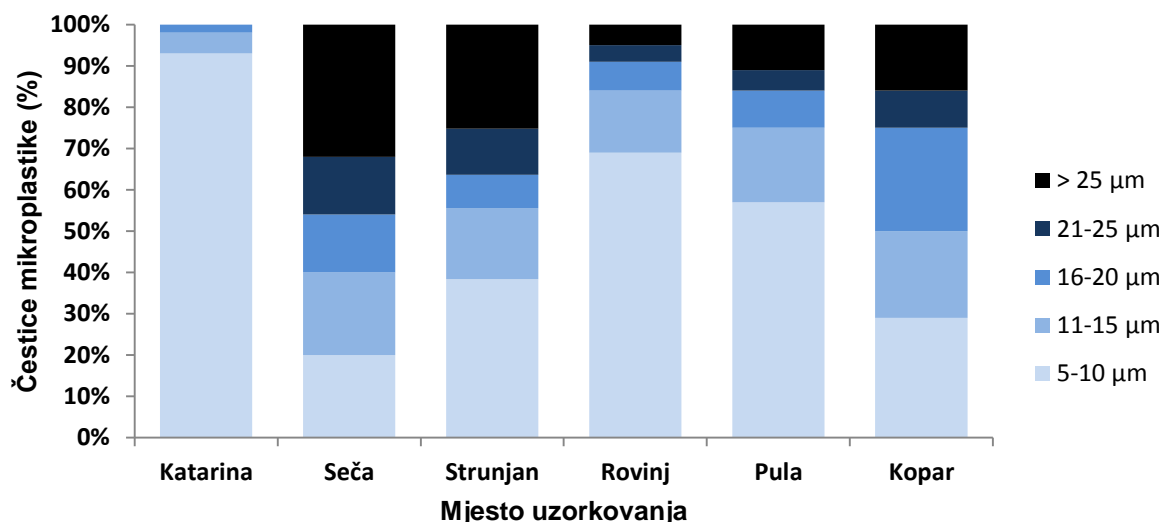
Slika 12. Podjela čestica mikroplastike prema obliku pronađenih u uzorcima probavnih žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih u travnju 2014. godine na postajama u sjevernom Jadranu.

#### 4.1.4. Podjela mikroplastike prema veličini

Na temelju istraživanja Van Cauwenberghe i Janssen (2014) pronađene čestice mikroplastike u probavnim žlijezdama dagnji *Mytilus galloprovincialis* svrstane su u pet klasifikacijskih kategorija: 5-10  $\mu\text{m}$ , 11-15  $\mu\text{m}$ , 16-20  $\mu\text{m}$ , 21-25  $\mu\text{m}$  i veće od 25  $\mu\text{m}$ . Najviše čestica pronađenih u probavnim žlijezdama dagnje *M. galloprovincialis* u veljači 2014.godine pripada kategoriji 5-10  $\mu\text{m}$ , dok najmanje pronađenih čestica mikroplastike pripada kategoriji 21-25  $\mu\text{m}$  (Slika 13.). Najveće čestice svrstane u kategoriju veće od 25  $\mu\text{m}$  pronađene u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* najzastupljenije su na postaji Strunjan u veljači (27%) i u travnju (25 %) 2014. godine (Slika 13. i Slika 14.). Najmanje čestice mikroplastike svrstane u prvu kategoriju 5-10  $\mu\text{m}$  najbrojnije su na postajama Seča (74%), Katarina (59 %) i Rovinj (52%) u veljači 2014. godine (Slika 13.). Najzastupljenije čestice mikroplastike pronađene u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u travnju 2014.godine uvrštene su u kategoriju 5-10  $\mu\text{m}$ , a najmanje zastupljene su čestice mikroplastike svrstavane u kategoriju 21-25  $\mu\text{m}$  (Slika 14.). Najviše čestica u kategoriji 5-10  $\mu\text{m}$  pronađeno je u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* na postaji Katarina (93%), a najmanje na postaji Seča (20%) (Slika 14.).



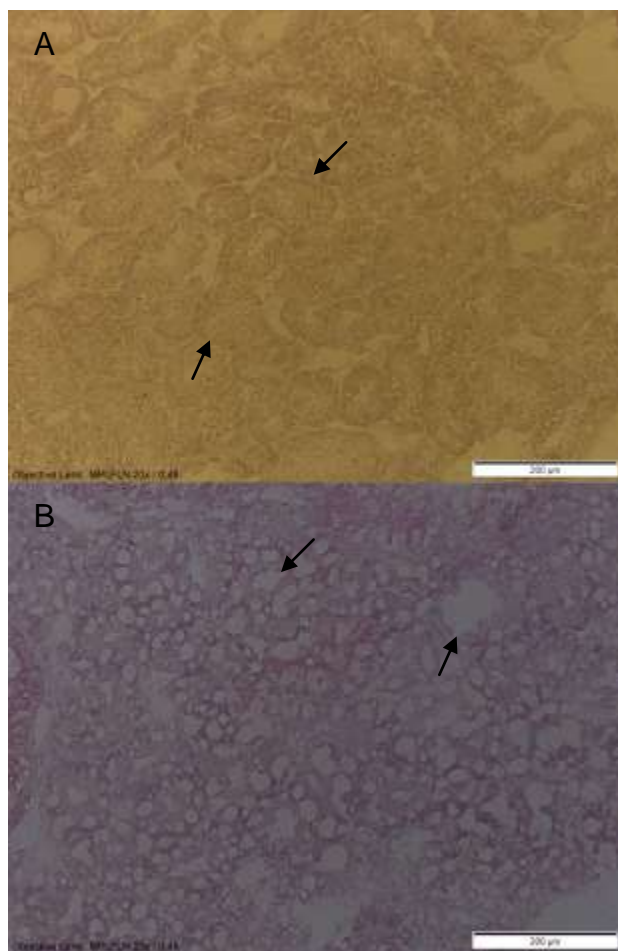
Slika 13. Podjela čestica mikroplastike prema veličini u uzorcima probavnih žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih u veljači 2014.godine na postajama u sjevernom Jadranu.



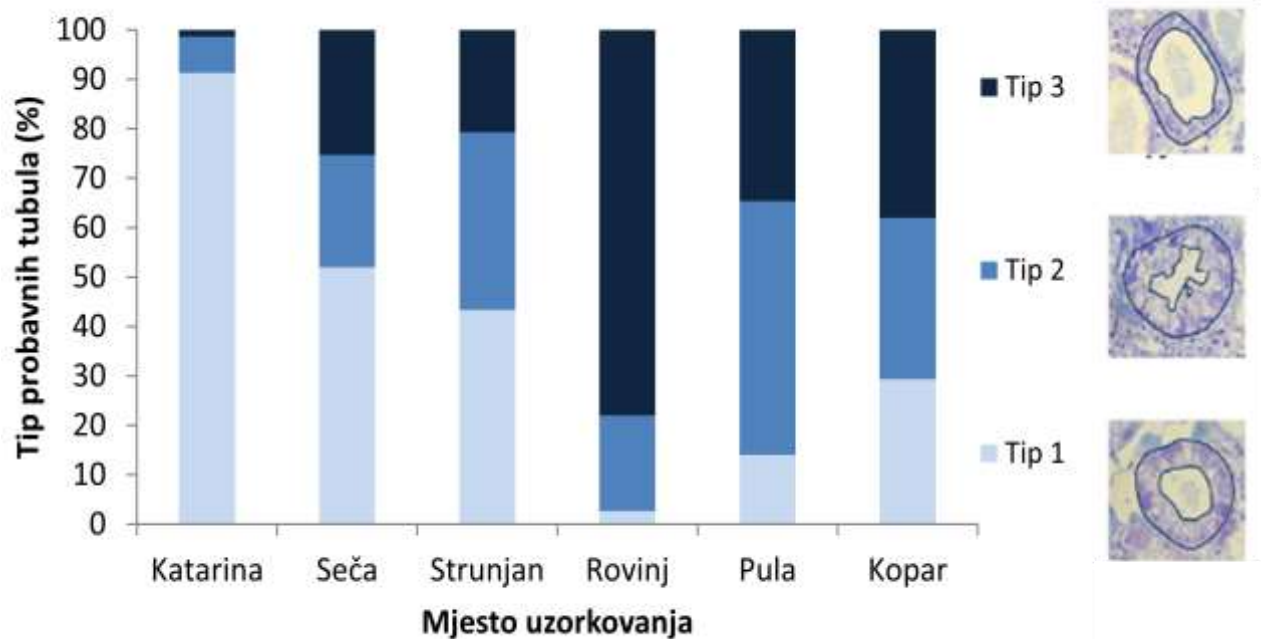
Slika 14. Podjela čestica mikroplastike prema veličini pronađenih u uzorcima probavnih žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih u travnju 2014. godine na postajama u sjevernom Jadranu.

#### 4.2. Atrofija kanalića probavne žlijezde dagnje

Prema radu Rocha i sur. (2016) izvršena je procjena atrofije kanalića probavne žlijezde dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Normalna fazna aktivnost probavne žlijezde zabilježena je kod dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u veljači 2014. godine na postaji Katarina koja se smatra kontrolnom postajom u ovom istraživanju (Slika 15.A i Slika 16.). Lokalitet i vrijeme uzorkovanja najviše utječu na dobivene vrijednosti atrofije tubula (Tablica 2.) u dagnji, te se postaje prema navedenom parametru statistički razlikuju. Kontrolna postaja Sv. Katarina statistički se značajno razlikuje prema svim tipovima stanja atrofije mikrotubula u odnosu na ostale postaje ( $p < 0.05$ , Tablica 3.). Udio probavnih tubula u fazi zadržavanja (Tip 1) u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* na postaji Katarina iznosi više od 90% (Slika 16.). Najveći udio probavnih tubula u atrofičnoj fazi (tubuli s velikim lumenom i stanjenim epitelom, Tip 3) pokazuju dagnje uzorkovane u veljači 2014. godine na postaji Rovinj koji iznosi manje od 5% (Slika 16. B, Tablica 3.).



Slika 15. Probavni kanalići probavnih žlijezdi uzorkovanih u veljači 2014. godinedagnji *Mytilus galloprovincialis* na postaji Katarina (A) i Rovinj (B). Fotografije su snimljene povećanjem 200x saskvjetlosnim mikroskopom (Zeiss AXIO m2M).



Slika 16. Semikvantitativna analiza probavnih žlijezdi dagnji uzorkovanih u veljači 2014. na postajama u sjevernom Jadranu.

Tablica 2. Statistička analiza perimetra tubula (Po) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači 2014., ( $p^* < 0,05$ ;  $p^{**} < 0,001$ ).

	SS	df	MS	F	p
Vrijeme uzorkovanja	150,86	2	75,43	4,13	*
Lokalitet*Vrijeme	4226,33	10	422,63	23,17	**

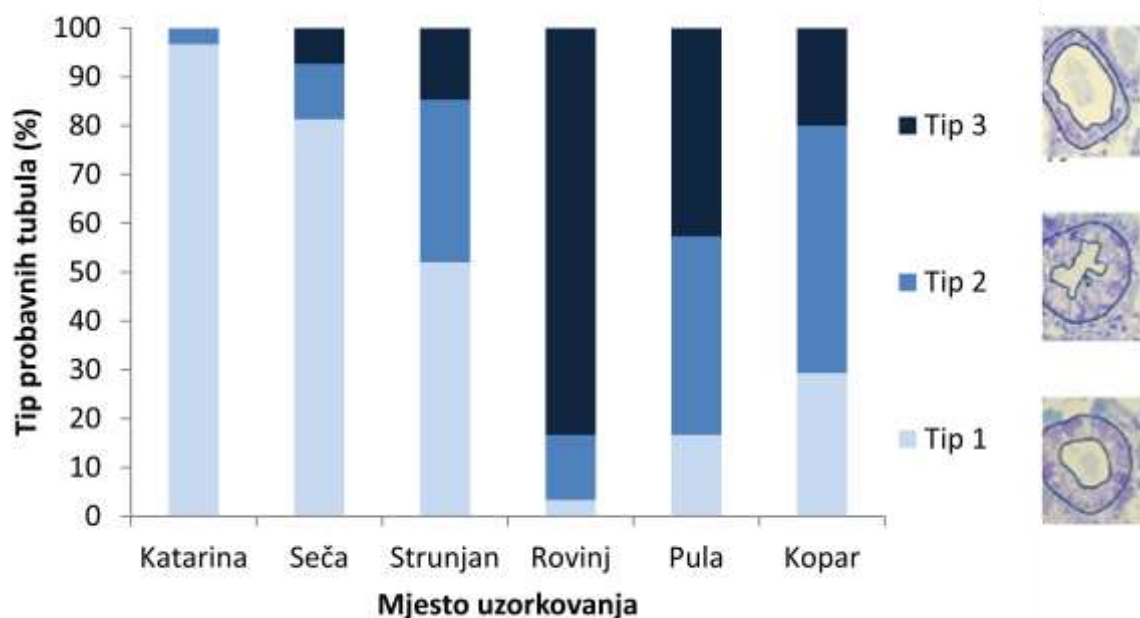


Tablica 3. p rijednosti Tukey HSD testa za semikvantitativnu analizu probavnih tubula kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim u veljači 2014. na postajama u sjevernom Jadranu ( $p^* < 0,05$ ;  $p^{**} < 0,001$ ).

Postaja /Tip	Katarina			Seča			Strunjan			Rovinj			Pula			Kopar			
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
Katarina	I	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	II			*			*					*		*					
	III			*			*	*				*		*	**			*	
Seča	I									*	*	*	*						
	II											*							
	III											*							
Strunjan	I									*		*							
	II									*		*							
	III											*							
Rovinj	I											*		*					*
	II											*							
	III												*		*	*	*	*	*
Pula	I													*					
	II																		
	III																		
Kopar	I																		
	II																		

Normalna fazna aktivnost probavne žlijezde zabilježena je kod dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u travnju 2014.godine na postaji (Slika 17.). Udio probavnih tubula u fazi zadržavanja (Tip 1) u probavnim žlijezdama dagnje *M. galloprovincialis* na postaji Katarina iznosi više od 90% (Slika 17.). Najveći udio probavnih tubula u atrofičnoj fazi (Tip 3) pronađen je u dagnjama uzorkovanih u travnju 2014.godine na postaji Rovinj koji iznosi manje od 5% (Slika 17.). Uzorkovane dagnje na postaji Seča u veljači 2014. godine imaju udio probavnih tubula u fazi zadržavanja (Tip 1) manji od 55%, dok je u travnju 2014. godine udio probavnih tubula u fazi zadržavanja više od 80% (Slika 16. i 17.). Postaje Katarina i Seča

statistički se značajno razlikuju prema svim tipovima tubula semikvantitativne analize u odnosu na ostale postaje ( $p < 0.05$ , Tablica 5.). Lokalitet i vrijeme uzorkovanja utječu na dobivene vrijednosti atrofije tubula (Tablica 4.) u dagnjama, te se postaje prema navedenom parametru statistički razlikuju.



Slika 17. Semikvantitativna analiza probavne žlijezde dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih u travnju 2014. na postajama u sjevernom Jadranu.

Tablica 4. Statistička analiza perimetra tubula (Po) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u travnju 2014 ( $p^* < 0,001$ ).

	SS	df	MS	F	p
Vrijeme uzorkovanja	716,87	2,00	358,43	24,42	*
Lokalitet*Vrijeme	5986,33	10,00	598,63	40,79	*

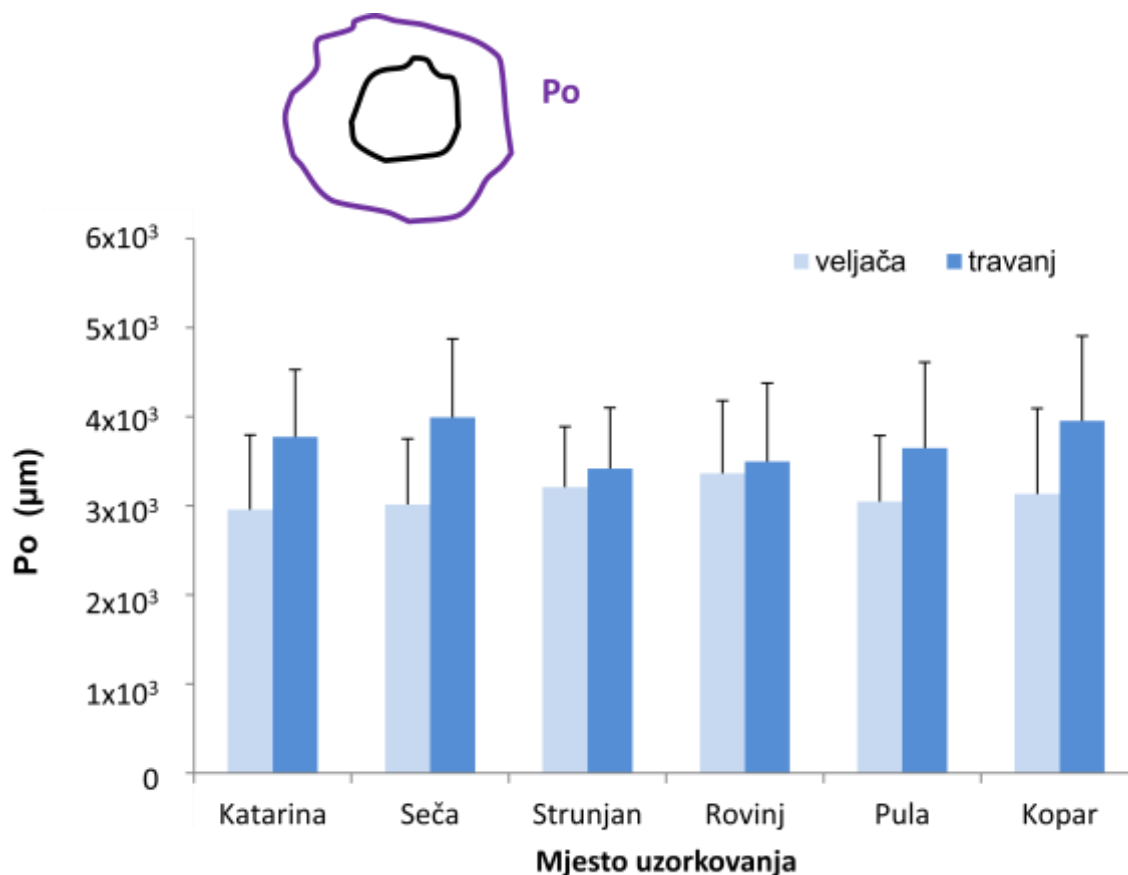
Tablica 5. p vrijednosti Tukey HSD testa za semikvantitativnu analizu probavnih tubula kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim u travnju 2014. na postajama u sjevernom Jadranu (p\* <0,05; p\*\*<0,001).

Postaja/Tip	Katarina			Seča			Strunjan			Rovinj			Pula			Kopar		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
Katarina	I	*	*		*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*
	II			*			*	**		*			*	*		*		
	III			*			*	**		*			*	*	*	*	*	
Seča	I				*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*
	II						*			*			*	*		*		
	III						*			*			*	*		*		
Strunjan	I						*	*	*	*	*	*						*
	II									*	*	**					*	
	III									*							*	
Rovinj	I									*			*	*		*		
	II									*				*		*		
	III												*	*	*	*	*	*
Pula	I																*	
	II																*	
	III																*	
Kopar	I												*	*	*	*		
	II																	*

#### 4.3. Promijene u morfometriji probavnih kanalića dagnje

Izmjereni histomorfometrijski parametri u probavnoj žlijezdi dagnje *M. galloprovincialis* sakupljenih na šest različitih postaja prikazani su na slikama (Slika 18. – 23.). Dagnje *M. galloprovincialis* na postaji Katarina pokazivale su slične histomorfometrijske promjene kao i ostale postaje, jedino su se značajno mijenjale vrijednosti za epitelno područje (So), lumen tubula (Si) i srednju brzinu širenja tubula (h) (Slika 20.- 22., Tablica 9., 11. i 13.). Lokalitet i vrijeme uzorkovanja značajno utječu na dobivene vrijednosti za epitelno područje (So), lumen tubula (Si) i srednju brzinu širenja tubula

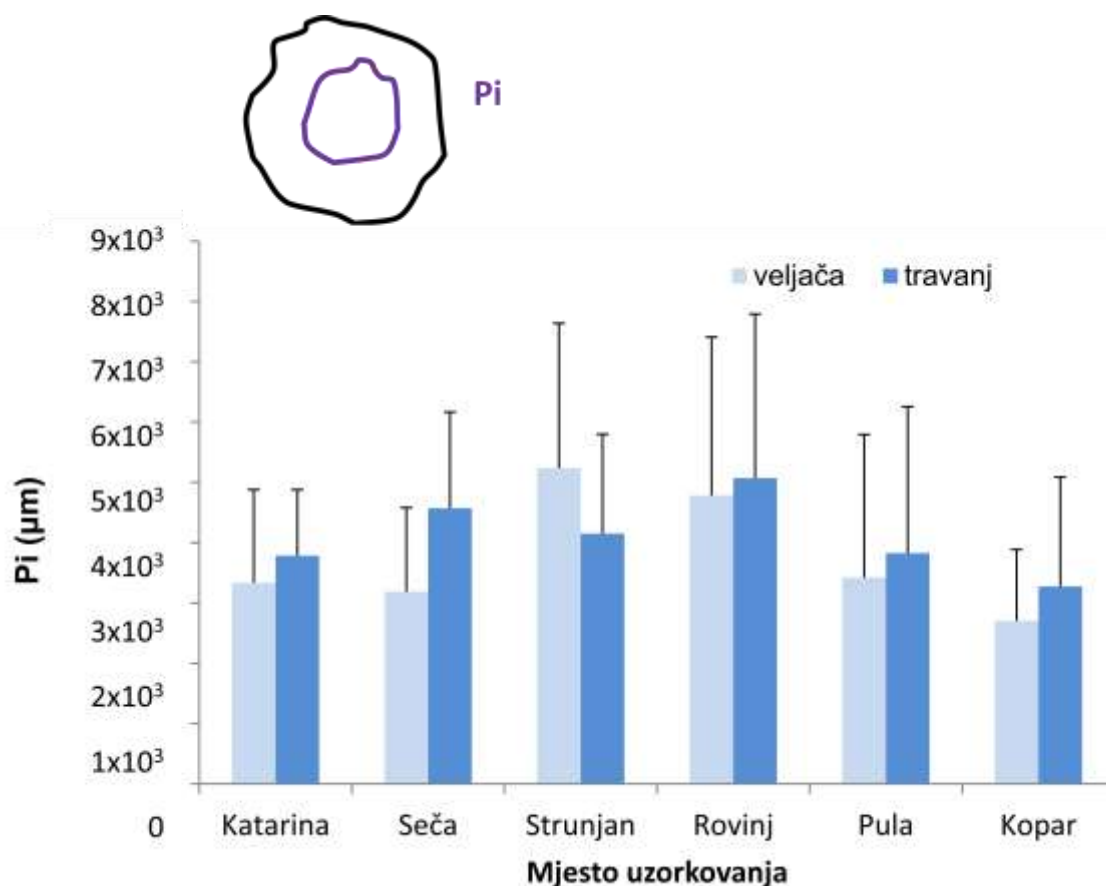
(h) (Tablica 8., 10. i 12.), dok za vrijednosti perimetar tubula ( $P_o$ ) i perimetar lumena ( $P_i$ ) nema statistički značajne razlike (Tablica 6 i 7.).



Slika 18. Perimetar tubula ( $P_o$ ) (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014.

Tablica 6. Statistička analiza perimetra tubula ( $P_o$ ) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014.

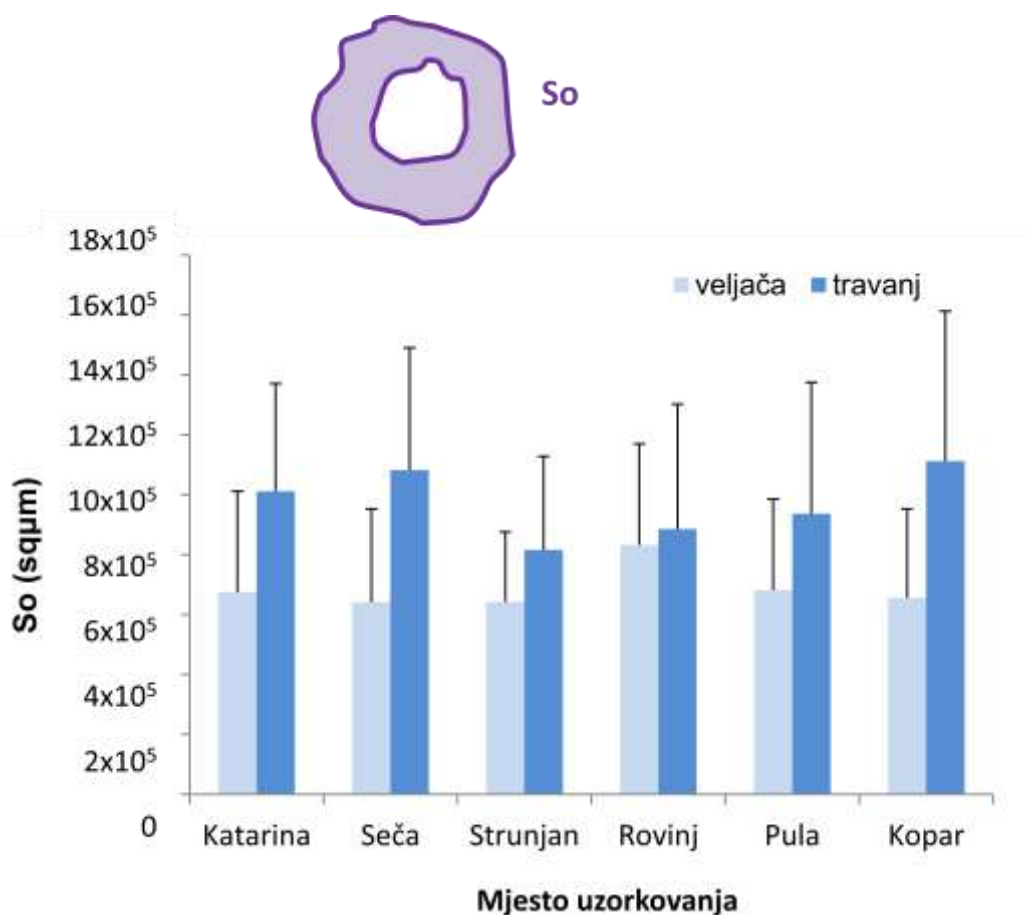
	SS	df	MS	F	p
Lokalitet	1,27	5	2,55	1,35	0,23
Vrijeme uzorkovanja	1,97	1	1,97	0,10	0,74
Lokalitet*Vrijeme	4,45	5	8,91	0,47	0,79



Slika 19. Perimetar lumena (Pi) (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014.

Tablica 7. Statistička analiza perimetra tubula (Po) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014.

	SS	df	MS	F	P
Lokalitet	1,15	5	2317159	1,55	0,16
Vrijeme uzorkovanja	1,07	1	1075428	0,72	0,39
Lokalitet*Vrijeme	2,34	5	469079	0,31	0,90



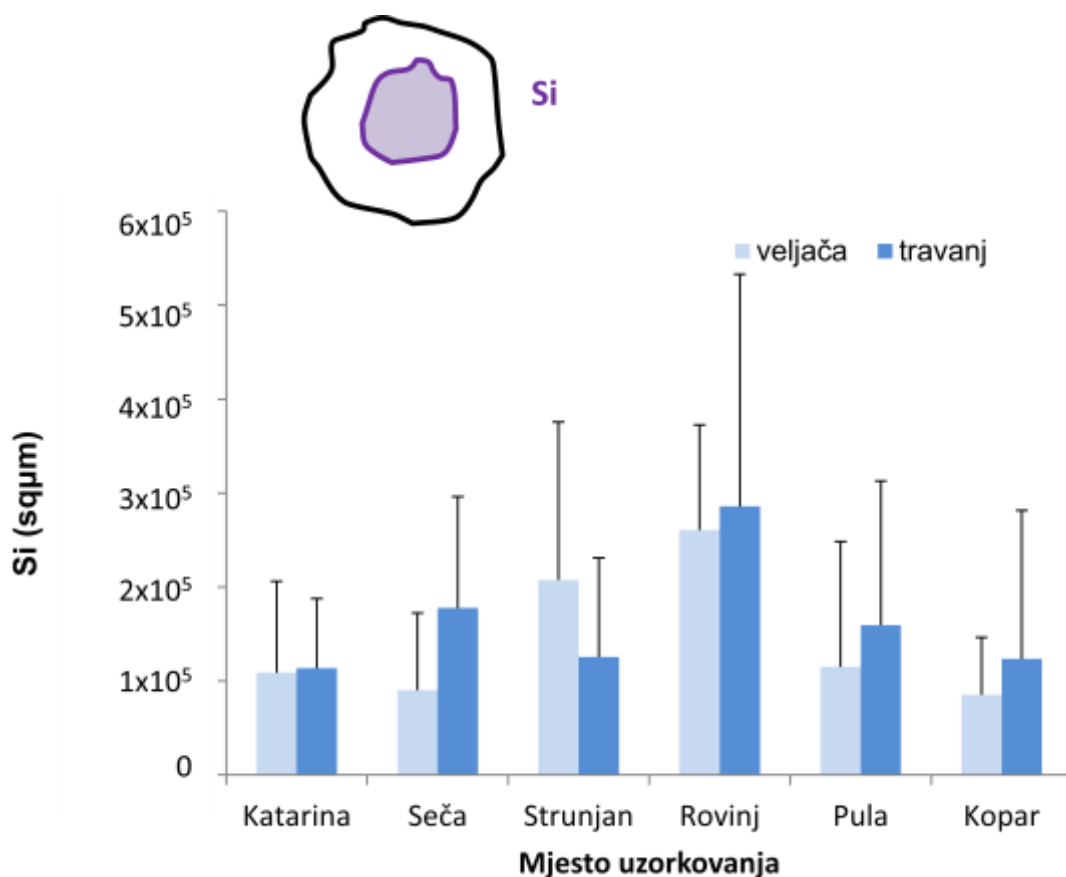
Slika 20. Epitelno područje (So) probavnog tubula (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014.

Tablica 8. Statistička analiza perimetra tubula (Po) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014 ( $p^* < 0,001$ ).

	SS	df	MS	F	p
Lokalitet	2,78	5	5,56	3,20	*
Vrijeme uzorkovanja	3,71	1	3,71	213,72	*
Lokalitet*Vrijeme	7,28	5	1,45	8,37	*

Tablica 9. Tukey HSD test za epitelno područje (So) probavnog tubula kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu: Strunjan (St), Seča (Se), Kopar (Ko), Katarina (Ka), Pula (Pu) i Rovinj (Ro) u veljači (2.) i travnju (4.) 2014 godine ( $p^* < 0,001$ ;  $p^{**} < 0,05$ ).

	St 4	Se 2	Se 4	Ko 2	Ko 4	Ka 2	Ka 4	Ro 2	Ro 4	Pu 2	Pu 4
St 2	**		*		*		*		*		*
St 4		*	*	**	*	*				**	
Se 2			*		*		*	**	*		*
Se 4				*		*		*	**	*	
Ko 2					*		*		*		*
Ko 4						*		*	*	*	**
Ka 2							*		*		*
Ka 4								**		*	
Ro 2											
Ro 4										*	
Pu 2											*



Slika 21. Lumen (Si) tubula (srednja vrijednost ± standardna devijacija) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014

Tablica 10. Statistička analiza lumena (Si) tubula kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014 (p \* < 0,001; p\*\* < 0,05).

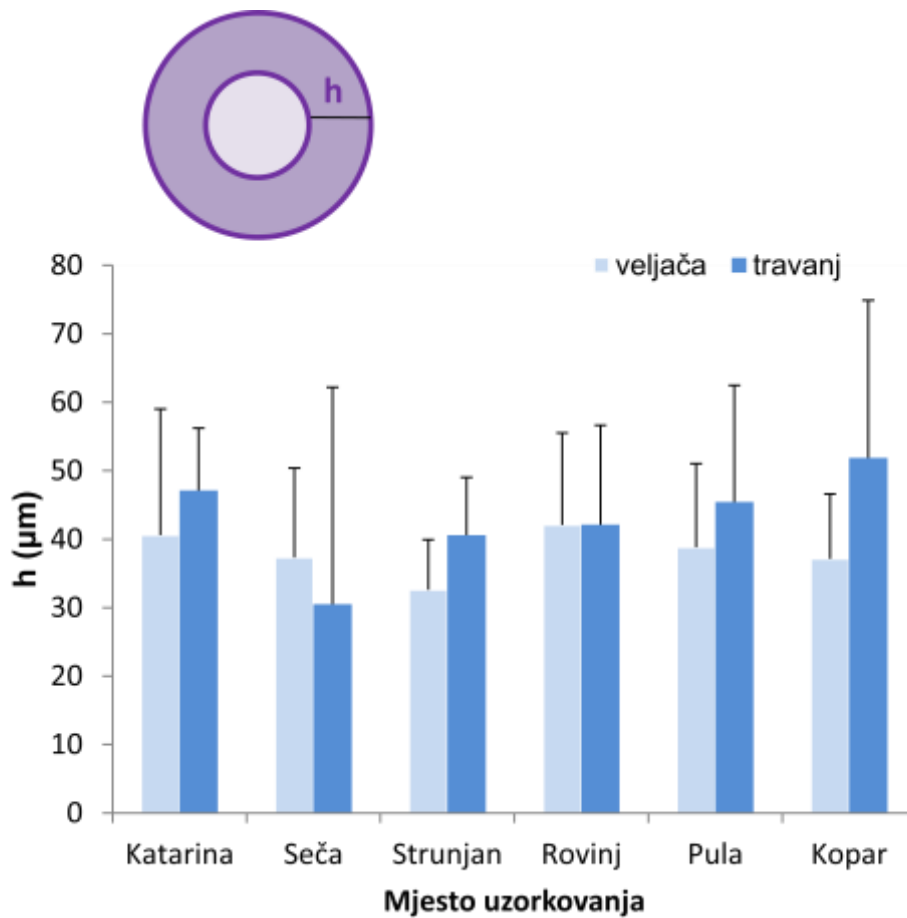
	SS	df	MS	F	p
Lokalitet	6057672	5	1211534	13,81	*
Vrijeme uzorkovanja	304405	1	304405	3,47	**
Lokalitet*Vrijeme	815708	5	163142	1,85	0,09



Tablica 11.p vrijednost Tukey HSD testa za lumen tubula (Si) probavnog tubula kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu: Strunjan (St), Seča (Se), Kopar (Ko), Katarina (Ka), Pula (Pu) i Rovinj (Ro) u veljači (2.) i travnju (4.) 2014 godine (p \* < 0,001; p \*\* < 0,05).

	St 4	Se 2	Se 4	Ko 2	Ko 4	Ka 2	Ka 4	Ro 2	Ro 4	Pu 2	Pu 4
St 2		**		*							
St 4									*		
Se 2								*	*		
Se 4									**		
Ko 2								*	*		
Ko 4								*	*		
Ka 2								*	*		
Ka 4								*	*		
Ro 2										*	
Ro 4										*	*
Pu 2											

Lokalitet i vrijeme uzorkovanja utjecali su na dobivene vrijednosti srednje širine epitela tubula (Slika 22., Tablica 12.) u dagnjama, dok na vrijednosti cirkularnosti nemaju utjecaja (Slika 23., Tablica 13.). Srednja širina epitela tubula ( $h$ ) izračunatog pomoću ostalih histomorfometrijskih vrijednosti statistički se značajno razlikuje između postaja Strunjan (St2) i Rovinj (Ro4), Seča (Se4) s Koprom (Ko4) i Pula (Pu2), Kopar (Ko2) i Katarina (Ka4), Kopar (Ko4) i Pula (Pu4), Katarina u veljači i travnju i Pula u veljači i travnju ( $p < 0.05$ , Tablica 13.).



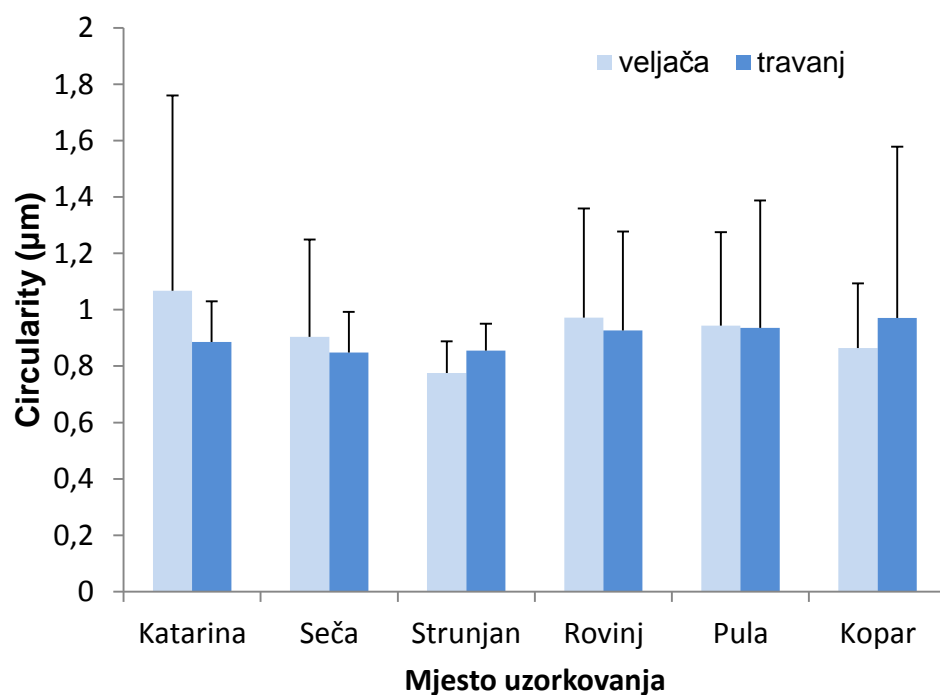
Slika 22. Srednja širina epitela tubula ( $h$ ) (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014.

Tablica 12. Statistička analiza lumena (Si) tubula kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014 (p \* < 0,001).

	SS	df	MS	F	p
Lokalitet	7980	5	1596	5,59	*
Vrijeme uzorkovanja	22427	1	22427	78,53	*
Lokalitet*Vrijeme	5745	5	1149	4,02	*

Tablica 13.p vrijednost Tukey HSD testa za epitel tubula (h) probavnog tubula kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu: Strunjan (St), Seča (Se), Kopar (Ko), Katarina (Ka), Pula (Pu) i Rovinj (Ro) u veljači (2.) i travnju (4.) 2014 godine (p \* < 0,001; p \*\* < 0,05).

	St 4	Se 2	Se 4	Ko 2	Ko 4	Ka 2	Ka 4	Ro 2	Ro 4	Pu 2	Pu 4
St 2			*		*		*		**		*
St 4					*						
Se 2			*		*		*				*
Se 4					**					**	
Ko 2					*		**				
Ko 4						*		*	*	*	**
Ka 2							**				
Ka 4										*	
Ro 2											
Ro 4											
Pu 2											**



Slika 23. Cirkularnost epitela tubula (c) (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014.

Tablica 14. Statistička analiza cirkularnosti epitela tubula (c) kod dagnje *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanim na postajama u sjevernom Jadranu u veljači i travnju 2014.

	SS	df	MS	F	p
Lokalitet	11,64	5	2,32	1,19	0,30
Vrijeme uzorkovanja	7,32	1	7,32	3,75	0,06
Lokalitet*Vrijeme	5,25	5	1,05	0,53	0,74

## 5. Rasprava

U ovom radu istraživao se broj, oblik i veličina čestica mikroplastike pronađenih u probavnim žlijezdama dagnji *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih na postajama Katarina, Strunjan, Seča, Pula, Kopar i Rovinj, te njihov utjecaj na probavnu žlijezdu uzorkovanih dagnji.

Najveći broj identificiranih čestica mikroplastike pronađen je u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* na postaji Rovinj, a najmanje na kontrolnim postajama Katarina i Strunjan. U prethodnim istraživanjima broj čestica mikroplastike izražen je po težini cijelog tkiva dagnji (Li i sur., 2016; Digka i sur., 2018), a u ovom diplomskom radu po probavnoj žlijezdi što ukazuje na razlike u rezultatima. Ovim istraživanjem smo utvrdili da su čestice mikroplastike pronađene u uzorcima dagnjina svim postajama, kao i na području uzgajališta. Neka od dosadašnjih istraživanja pokazala su da školjkaši na uzgajalištima sadrže više mikroplastike nego divlje dagnje iz toga razloga što se uzgajaju na plastičnim linijama (De Witte i sur., 2014), dok je rezultat ovog istraživanja bio suprotan gdje je veći broj čestica mikroplastike pronađen u dagnjama u područjima luka s povećanom ljudskom aktivnosti.

Sama kontaminacija u ovom istraživanju je bila smanjena na minimum iz tog razloga što su se koristili presjeci probavnih žlijezdi koji su kasnije bili uklopljeni u glicerol želatinu te je kontaminacija bila vidljiva pod svjetlosnim mikroskopom jer nije bila uklopljena u samo tkivo već je bila vidljiva na stakalcu (Slika 6.). Najzastupljenije čestice mikroplastike u pronađene u probavnim žlijezdama uzorkovanih dagnji bile su bijele boje, a najmanje zastupljene su bile čestice žute boje. Bogatstvo bijelih čestica mikroplastike u morski okoliš dopijeva iz plastike koja se koristi za pakiranje, u ribolovnim linijama, odjeći, proizvodima za osobnu njegu (Cole i sur., 2014). Također, istraživanje Cole (2014) potvrđuje da enzimatska aktivnost nema utjecaja na izbjeljivanje plastike što ima minimalni utjecaj na identifikaciju čestica mikroplastike prema boji. Najviše bijelih čestica mikroplastike u veljači 2014. godine pronađeno je u uzorcima dagnji na postaji Seča, dok je u travnju 2014. godine na toj postaji pronađeno najmanje bijelih čestica u uzorcima (Slika 9. i Slika 10.). U ovom istraživanju dominantne čestice mikroplastike prema obliku bile su film, a najmanje zastupljene čestice mikroplastike bile su peletne čestice. Međutim, rezultati

istraživanja De Witte (2014), Li (2016) i Reguera (2019) na školjkašima pokazuju veći postotak vlakana u odnosu na film, vjerojatno iz razloga što nisu istraživali čestice mikroplastike u presjecima tkiva, pa su stoga čestice bile i većih veličina. Takvi rezultati mogu ukazivati na povezanost s različitim izvorima i strategijama gospodarenja otpadom (Rochman i sur., 2015; Digka i sur., 2018). Povećani broj film čestica mikroplastike može biti povezan s obalnim područjima s izuzetno velikom turističkom i rekreacijskom aktivnošću gdje dolazi do velikog unosa plastike u morski okoliš (npr. plastične vrećice, plastične boce, plastične čaše) koji se kasnije lome na manje čestice film i fragment (Digka i sur., 2018). Također, u dosadašnjim istraživanjima se predlaže da je razlog unosa čestica mikroplastike zbog sličnosti s plijenom (Wright i sur., 2013), a neka istraživanja ukazuju na to da nema povezanosti oblika čestica mikroplastike s plijenom (Li i sur., 2016). Uz film čestice, najbrojnija skupina prema obliku bile su sfere koje mogu ukazivati na plastično zagađenje povezano s kozmetičkim proizvodima, pastama za zube i proizvodima za čišćenje (Gallagher i sur., 2015). Sferne čestice su dovoljno male da prolaze kroz uređaje za pročišćavanje otpadnih voda što može objasniti i njihova povećana koncentracija u probavnim žlijezdama uzorkovanih dagnji (Andrady, 2011). Najzastupljenije čestice mikroplastike bile su ubrojane u kategoriju 5-10  $\mu\text{m}$ , a najmanje zastupljene u kategoriji 21-25  $\mu\text{m}$ . Ovakav rezultat ukazuje na to da školjkaši prvenstveno unose manje čestice mikroplastike zbog svog načina hranjenja – filtracijom (Li i sur., 2016; Digka i sur., 2018). Rezultati dosadašnjih istraživanja su dokazali da se velika koncentracija mikroplastike može nakupljati u probavnoj žlijezdi školjkaša, te da može uzrokovati degenerativne i destruktivne promjene u probavni žlijezdama školjkaša (Paul-Pont i sur., 2016; Setala i sur., 2016; Faggi i sur., 2018). Rezultati su pokazali da mikroplastika može utjecati na atrofiju probavnih tubula i promjene u morfometriji probavnih kanalića (stanjivanje probavnog epitela) u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* (Slika 16.). Najveći udio atrofiranih tubulića uočeno je u probavnim žlijezdama dagnji *M. galloprovincialis* uzorkovanih na postaji Rovinj, što može potvrditi i najveći broj identificiranih čestica na toj postaji (Slika 8. i Slika 16.). Veliki udio atrofičnih tubula pokazali su i rezultati istraživanja Rocha (2016) gdje se pratio utjecaj kadmija, te su rezultati pokazali povećani udio atrofiranih tubulića kao i na istraživanoj postaji Rovinj u ovom radu. Ovi rezultati mogu ukazivati na to da mikroplastika također može imati znatni utjecaj na histologiju probavne žlijezde dagnje što može biti povezano i s prisutnošću štetnih plastičnih aditiva, ali i

organskih onečišćujućih tvari i teških metala koji se apsorbiraju na površini čestica mikroplastike (Bakar i sur., 2014; Rochman i sur., 2014; Napper i sur., 2015; Slika 16. i Prilog 1.). Rezultati također pokazuju da mikroplastika ima najveći utjecaj na srednju brzinu širenja tubula, ali ne i na kružnost (Slika 21. i Slika 22.). Prethodna istraživanja pokazuju utjecaj teških metala (npr. kadmij) na smanjenje brzine širenja tubula (Marigómez i sur., 1990; Rocha i sur., 2016), te se temeljem ovog istraživanja takav učinak može potvrditi da uzrokuje i mikroplastika (Slika 22.).

Praćenje mikroplastike u okolišu zahtjeva veliku pozornost u budućim praćenjima stanja ekosustava Jadranskog mora, pa i šire. Osobito je važno ispitivati čestice mikroplastike u organizmima koji se koriste za prehranu ljudi.

## 6. Zaključak

1. Čestice mikroplastike pronađene su u probavnim žlijezdama dagnji *Mytilus galloprovincialis* svih šest ispitivanih postaja u sjevernom Jadranu.
2. Broj identificiranih čestica mikroplastike povezana je s ljudskom aktivnošću što potvrđuje povećani broj čestica mikroplastike na postaji Rovinj.
3. Boja i oblik čestica mikroplastike također je povezana s neadekvatnim gospodarenjem otpadom i vrstom ljudske aktivnosti uz obalna područja.
4. Čestice mikroplastike utječu na promjene u histologiji probavne žlijezde dagnje *M. galloprovincialis*.
5. Atrofija probavnih tubula i smanjenje debljine probavnih kanalića može se koristiti kao koristan alat za praćenje utjecaja mikroplastike na promjene u histologiji probavnih žlijezdi dagnji.
6. Prisutstvo čestica mikroplastike u dagnjama *M. galloprovincialis* potvrđuje da se dagnje mogu koristiti kao pokazatelj utjecaja mikroplastike.



## 7. Literatura

Adams, D. H. i Sonne, C. 2013. Mercury and histopathology of the vulnerable goliath grouper, *Epinephelus itajara*, in US waters: A multi-tissue approach. *Environmental research*, 126, 254-263.

Andrady, A. L. 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 62(8), 1596-1605.

Andrady, A. L. 2017. The plastic in microplastics: A review. *Marine pollution bulletin*, 119(1), 12-22.

Auta, H. S., Emenike, C. U. i Fauziah, S. H. 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment international*, 102, 165-176.

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

Avio, C. G., Gorbi, S. i Regoli, F. 2015. Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: first observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine environmental research*, 111, 18 – 26.

Bakir, A., Rowland, S. J. i Thompson, R. C. 2014. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environmental Pollution*, 185, 16-23.

Besseling, E., Wang, B., Lüring, M. i Koelmans, A. A. 2014. Nanoplastic Affects Growth of *S. obliquus* and Reproduction of *D. magna*. *Environmental Science & Technology*, 48, 12336-12343.

Bihari, N., Mičić, M., Fafandjel, M., Jakšić, Ž., i Batel, R. 2004. Testing quality of sea water from the Adriatic coast of Croatia with toxicity, genotoxicity and DNA integrity tests.

- Brennecke, D., Ferreira, E. C., Costa, T. M., Appel, D., da Gama, B. A. i Lenz, M. 2015. Ingested microplastics (> 100 µm) are translocated to organs of the tropical fiddler crab *Uca rapax*. *Marine Pollution Bulletin*, 96(1-2), 491-495.
- Brennecke, D., Duarte, B., Paiva, F., Caçador, I. i Canning-Clode, J. 2016. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 189-195.
- Brenner, M., Buchholz, C., Heemken, O., Buck, B. H. i Köhler, A. 2012. Health and growth performance of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from two hanging cultivation sites in the German Bight: a nearshore - offshore comparison. *Aquaculture International*, 20(4), 751-778.
- Boucher, J. i Friot, D. 2017. *Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of sources* (pp. 2017-002). Gland, Switzerland: IUCN.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M. i Thompson, R. C. 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental science & technology*, 42(13), 5026-5031.
- Cajaraville, M. P., Marigómez, J. A. i Angulo, E. 1989. A stereological survey of lysosomal structure alterations in *Littorina littorea* exposed to 1-naphthol. *Comparative biochemistry and physiology. C. Comparative pharmacology*, 93(2), 231-237.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. i Viarengo, A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment*, 247(2-3), 295-311.
- Carella, F., Sardo, A., Mangoni, O., Di Cioccio, D., Urciuolo, G., De Vico, G. i Zingone, A. 2015. Quantitative histopathology of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) exposed to the harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Journal of invertebrate pathology*, 127, 130-140.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J. i Galloway, T. S. 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental science & technology*, 47(12), 6646-6655.

Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. K., Fileman, E. S., Halsband, C. i Galloway, T. S. 2014. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Scientific reports*, 4, 4528.

Codina-García, M., Militão, T., Moreno, J. i González-Solís, J. 2013. Plastic debris in Mediterranean seabirds. *Marine pollution bulletin*, 77(1-2), 220-226.

Courtene-Jones, W., Quinn, B., Gary, S. F., Mogg, A. O., & Narayanaswamy, B. E. 2017. Microplastic pollution identified in deep-sea water and ingested by benthic invertebrates in the Rockall Trough, North Atlantic Ocean. *Environmental Pollution*, 231, 271-280.

Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., Palma, A. T., Navarro, S., Garcia-de-Lomas, J., Ruiz, A., Fernández-de-Puelles, M. L. i Duarte, C.M. 2014. Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10239-10244.

Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Franco, J. i Larreta, J. 2015. Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquatic toxicology*, 162, 152-164.

De Witte, B., Devriese, L., Bekaert, K., Hoffman, S., Vandermeersch, G., Cooreman, K. i Robbens, J. 2014. Quality assessment of the blue mussel (*Mytilus edulis*): Comparison between commercial and wild types. *Marine pollution bulletin*, 85(1), 146-155.

Digka, N., Tsangaris, C., Torre, M., Anastasopoulou, A. i Zeri, C. 2018. Microplastics in mussels and fish from the Northern Ionian Sea. *Marine pollution bulletin*, 135, 30-40.

Ding, L., Mao, R. fan, Guo, X., Yang, X., Zhang, Q. i Yang, C. 2019. *Microplastics in surface waters and sediments of the Wei River, in the northwest of China. Science of The Total Environment.*

Domouhtsidou, G. P. i Dimitriadis, V. K. 2001. Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress. *Environmental Pollution*, 115(1), 123-137.

Eerkes-Medrano, D., Thompson, R. C. i Aldridge, D. C. 2015. Microplastics in freshwater systems: a review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water research*, 75, 63-82.

Ehlers, S. M., Manz, W. i Koop, J. H. 2019. Microplastics of different characteristics are incorporated into the larval cases of the freshwater caddisfly *Lepidostoma basale*. *Aquatic Biology*, 28, 67-77.

Eriksen, M., Mason, S., Wilson, S., Box, C., Zellers, A., Edwards, W., Farley, H. i Amato, S. 2013. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine pollution bulletin*, 77(1-2), 177-182.

Faggio, C., Tsarpali, V. i Dailianis, S. 2018. Mussel digestive gland as a model tissue for assessing xenobiotics: an overview. *Science of the Total Environment*, 636, 220-229.

Famme, P., Riisgård, H. U. i Jørgensen, C. B. 1986. On direct measurement of pumping rates in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 92(3), 323-327.

Farrell, P. i Nelson, K. 2013. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental pollution*, 177, 1-3.

Gallagher, A., Rees, A., Rowe, R., Stevens, J. i Wright, P. 2016. Microplastics in the Solent estuarine complex, UK: an initial assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 102(2), 243-249.

Graham, E. R. i Thompson, J. T. 2009. Deposit-and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 368(1), 22-29.

Hart, M. W. 1991. Particle captures and the method of suspension feeding by echinoderm larvae. *The Biological Bulletin*, 180(1), 12-27.

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C. i Thiel, M. 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental science & technology*, 46(6), 3060-3075.

- Jakšić, Ž., Batel, R., Bihari, N., Mičić, M. i Zahn, R.K. 2005. Adriatic coast as a microcosm for global genotoxic marine contamination—A long-term field study. *Marine Pollution Bulletin* 50, 1314- 1327.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R. i Law, K. L. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768-771.
- Jovanović, B. 2017. Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), 510-515.
- Kaposi, K. L., Mos, B., Kelaher, B. P. i Dworjanyan, S. A. 2014. Ingestion of microplastic has limited impact on a marine larva. *Environmental science & technology*, 48(3), 1638-1645.
- Kovačić I. 2015. Aktivnost kisele deoksiribonukleaze i histokemijske promjene u lizosomima kao odgovor dagnje *Mytilus galloprovincialis* na čimbenike u okolišu. Doktorska disertacija, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
- Kowalski, N., Reichardt, A. M. i Waniek, J. J. 2016. Sinking rates of microplastics and potential implications of their alteration by physical, biological, and chemical factors. *Marine pollution bulletin*, 109(1), 310-319.
- Law, K. L. i Thompson, R. C. 2014. Microplastics in the seas. *Science*, 345(6193), 144-145.
- Lee, K. W., Shim, W. J., Kwon, O. Y. i Kang, J. H. 2013. Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental science & technology*, 47(19), 11278-11283.
- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K. i Shi, H. 2015. Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental pollution*, 207, 190-195.
- Li, J., Qu, X., Su, L., Zhang, W., Yang, D., Kollandhasamy, P., Li, D. i Shi, H. 2016. Microplastics in mussels along the coastal waters of China. *Environmental Pollution*, 214, 177-184.

- Li, J., Green, C., Reynolds, A., Shi, H. i Rotchell, J. M. 2018. Microplastics in mussels sampled from coastal waters and supermarkets in the United Kingdom. *Environmental pollution*, 241, 35-44.
- Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Bråte, I. L. N., Sun, C., Hossain, M.S., Li., Q., Kolandhasamy, P. i Shi, H. 2019. Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environmental pollution*, 244, 522-533.
- Livingstone, D. R. 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In *Advances in comparative and environmental physiology* (pp. 45-185). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lowe, D. M., Moore, M. N. i Clarke, K. R. 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicology*, 1(3-4), 213-226.
- Lusher, A. L., Mchugh, M. i Thompson, R. C. 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine pollution bulletin*, 67(1-2), 94-99.
- Lusher, A. 2015. Microplastics in the marine environment: distribution, interactions and effects. In *Marine anthropogenic litter* (pp. 245-307). Springer, Cham.
- Lusher, A., Hollman, P. i Mendoza, J. 2017. Microplastics in fisheries and aquaculture: Status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety.
- Marigómez, J. A., Sáez, V., Cajaraville, M. P. i Angulo, E. 1990. A planimetric study of the mean epithelial thickness (MET) of the molluscan digestive gland over the tidal cycle and under environmental stress conditions. *Helgoländer meeresuntersuchungen*, 44(1), 81-94.
- Martins, M., Costa, P. M., Raimundo, J., Vale, C., Ferreira, A. M. i Costa, M. H. 2012. Impact of remobilized contaminants in *Mytilus edulis* during dredging operations in a harbour area: Bioaccumulation and biomarker responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 85, 96-103.

Mohsen, M., Wang, Q., Zhang, L., Sun, L., Lin, C. i Yang, H. 2019. Microplastic ingestion by the farmed sea cucumber *Apostichopus japonicus* in China. *Environmental Pollution*, 245, 1071-1078.

Moore, M. N., Lowe, D. M. i Fieth, P. E. M. 1978. Lysosomal responses to experimentally injected anthracene in the digestive cells of *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 48(4), 297-302.

Moore, M. N. 1985. Cellular responses to pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, (4).

Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J. i Thompson, R. C. 2015. Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine Pollution Bulletin*, 99(1-2), 178-185.

Nor, N. H. M. i Obbard, J. P. 2014. Microplastics in Singapore's coastal mangrove ecosystems. *Marine pollution bulletin*, 79(1-2), 278-283.

Qiu, Q., Tan, Z., Wang, J., Peng, J., Li, M., i Zhan, Z. 2016. Extraction, enumeration and identification methods for monitoring microplastics in the environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 176, 102-109.

Qu, X., Su, L., Li, H., Liang, M. i Shi, H. 2018. Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels. *Science of the total environment*, 621, 679-686.

Piha Henna, E., Hanke, G., Galgani, F., Werner, S., Alcaro, L., Mattidi, M., Fleet D., Kamizoulis G., Maes, T., Osterbaan, L., Thompson, R., Van franeker, J.A., Mouat, J., Meacle, M., Carroll, C., Detloff, K. C., Kinsey, S., Nilsson, P., Sheavly S., Svärd, B., Veiga J.M., Morison S., Katsanevakis, S.M., Lopez-lopez, L., Palatinus, A. i Scoullou, M. 2011. Marine Litter: Technical Recommendations for the Implementation of MSFD Requirements. JRC Scientific and Technical Reports, 97p.

Paul-Pont, I., Lacroix, C., Fernández, C. G., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Frere, L., Cassone, A., Sussarellu, R., Fabioux, Guyomarch, J., C., Albentosa, M., Huvet, A. i Soudant, P. 2016. Exposure of marine mussels *Mytilus* spp. to polystyrene microplastics: toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environmental pollution*, 216, 724-737.

- Ramšak, A., Ščančar, J., i Horvat, M. 2012. Evaluation of metallothioneins in blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as a biomarker of mercury and cadmium exposure in the Slovenian waters (Gulf of Trieste): a long-term field study. *Acta Adriatica: international journal of Marine Sciences*, 53(1), 71-84.
- Reguera, P., Viñas, L. i Gago, J. 2019. Microplastics in wild mussels (*Mytilus* spp.) from the north coast of Spain. *Scientia Marina*, 83(4), 337-347.
- Renner, K. O. 2018. *Particle size analysis, quantification and identification of microplastics in selected consumer products: A critical comparison of methods and analytical techniques* (Doctoral dissertation, Brunel University London).
- Rocha-Santos, T. i Duarte, A. C. 2015. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 65, 47-53.
- Rocha, T. L., Sabóia-Morais, S. M. T. i Bebianno, M. J. 2016. Histopathological assessment and inflammatory response in the digestive gland of marine mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium-based quantum dots. *Aquatic toxicology*, 177, 306-315.
- Rochman, C. M., Hoh, E., Kurobe, T. i Teh, S. J. 2013. Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Scientific reports*, 3, 3263.
- Rochman, C. M., Kurobe, T., Flores, I. i Teh, S. J. 2014. Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of the Total Environment*, 493, 656-661.
- Rochman, C. M., Tahir, A., Williams, S. L., Baxa, D. V., Lam, R., Miller, J. T., Teh, F., Werorilangi, S. i Teh, S. J. 2015. Anthropogenic debris in seafood: Plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Scientific reports*, 5, 14340.
- Romeo, T., Pietro, B., Pedà, C., Consoli, P., Andaloro, F. i Fossi, M. C. 2015. First evidence of presence of plastic debris in stomach of large pelagic fish in the Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 95(1), 358-361.



- Setälä, O., Norkko, J. i Lehtiniemi, M. 2016. Feeding type affects microplastic ingestion in a coastal invertebrate community. *Marine pollution bulletin*, 102(1), 95-101.
- Silva, A. B., Bastos, A. S., Justino, C. I., da Costa, J. P., Duarte, A. C. i Rocha-Santos, T. A. 2018. Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry-A review. *Analytica chimica acta*, 1017, 1-19.
- Su, L., Xue, Y., Li, L., Yang, D., Kolandhasamy, P., Li, D. i Shi, H. 2016. Microplastics in taihu lake, China. *Environmental Pollution*, 216, 711-719.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E., Goïc, N.I., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbins, J., Paul-Pont, I., Soudant, P. i Huvet, A. 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 2430.
- Tanabe, S., Prudente, M. S., Kan-Atireklap, S. i Subramanian, A. 2000. Mussel watch: marine pollution monitoring of butyltins and organochlorines in coastal waters of Thailand, Philippines and India. *Ocean & Coastal Management*, 43(8-9), 819-839.
- Usheva, L. N., Vaschenko, M. A. i Durkina, V. B. 2006. Histopathology of the digestive gland of the bivalve mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 32(3), 166-172.
- Van Cauwenberghe, L. i Janssen, C. R. 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental pollution*, 193, 65-70.
- Ville, M. P. C., Marigómez, J. A., Díez, G. i Angulo, E. 1992. *Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels—2. Quantitative alterations in the structure of the digestive tubules. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 102(1), 113–123.
- Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P. i Köhler, A. 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental science & technology*, 46(20), 11327-11335.

Wagner, M. i Lambert, S. 2018. *Freshwater microplastics: emerging environmental contaminants?* Springer Nature.

Waite, H. R., Donnelly, M. J. i Walters, L. J. 2018. Quantity and types of microplastics in the organic tissues of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and Atlantic mud crab *Panopeus herbstii* from a Florida estuary. *Marine pollution bulletin*, 129(1), 179-185.

Wang, Z. M., Wagner, J., Ghosal, S., Bedi, G. i Wall, S. 2017. SEM/EDS and optical microscopy analyses of microplastics in ocean trawl and fish guts. *Science of The Total Environment*, 603, 616-626.

Watts, A. J., Urbina, M. A., Goodhead, R., Moger, J., Lewis, C. i Galloway, T. S. 2016. Effect of microplastic on the gills of the shore crab *Carcinus maenas*. *Environmental science & technology*, 50(10), 5364-5369.

Wilkinson, J., Hooda, P. S., Barker, J., Barton, S., i Swinden, J. 2017. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental Pollution*, 231, 954-970.

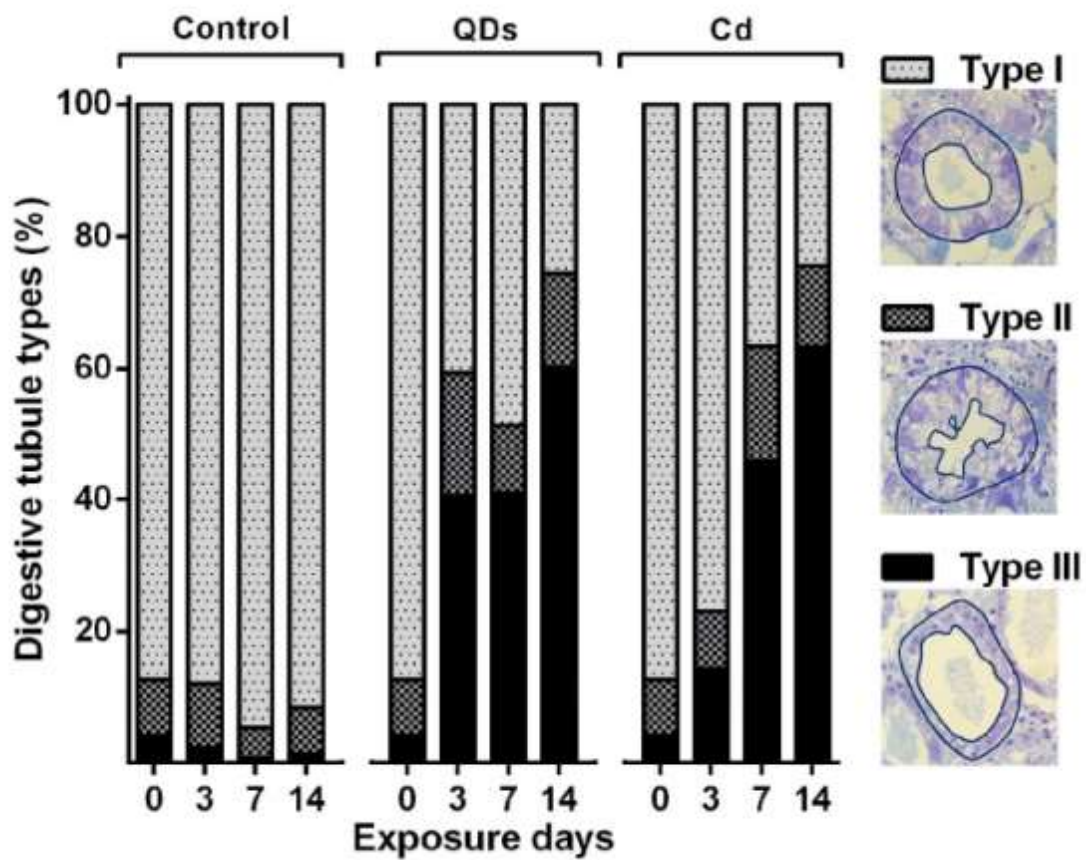
Wright, S. L., Rowe, D., Thompson, R. C. i Galloway, T. S. 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Curr.Biol.*, 23, R1031-R1033.

Wright, S. L., Thompson, R. C. i Galloway, T. S. 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental pollution*, 178, 483-492.

Yang, D., Shi, H., Li, L., Li, J., Jabeen, K. i Kolandhasamy, P. 2015. Microplastic pollution in table salts from China. *Environmental science & technology*, 49(22), 13622-13627.

Zhang, C., Chen, X., Wang, J. i Tan, L. 2017. Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastic and algae. *Environmental pollution*, 220, 1282-1288.

## 8. Prilog



Prilog 1. Tipovi probavnih tubula (%) u dagnjama *M. gallopovincialis* iz kontrole C, izloženi CdTe QD (QD) i otopljenom Cd (Cd) tijekom 14 dana. Probavni tubuli klasificirani su u tip I (tip 1- faza zadržavanja, tip 2- apsorpcijska faza, tip 3- raspadajuća ili atrofička faza) (preuzeto iz rada Rocha i sur., 2016).

## 9. Životopis

Rođena sam 19.ožujka 1996. godine u Požegi. Osnovnu školu završila sam u OŠ Poreč u Poreču 2011.godine. Nakon navršene osnovne škole iste te godine upisala sam opću gimnaziju u Gimnaziji i strukovnoj školi „Jurja Dobrile“u Pazinu. Prediplomski studij Znanosti o moru upisala sam na Sveučilištu „Jurja Dobrile“u Puli 2015. godine. Na preddiplomskom studiju sudjelovala sam na raznim manifestacijama poput Festivala znanosti i Europske noći istraživača te sam radila na inventarizaciji zoološke zbirke u Centru za istraivanje mora u Rovinju. Prediplomski studij Znanosti o moru završila sam 2018.godine s temom „Određivanje stabilnosti lizosomalnih membrana u probavnim žlijezdama dagnji *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. uzorkovanih u sjevernom Jadranu“pod mentorstvom doc. dr. sc. Ines Kovačić. Iste te godine 2018. upisala sam diplomski studij na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Ekologija i zaštita prirode.