

# Optimizacija metode za ekstrakciju i kvantifikaciju mikroplastike u sedimentu i biogenim tvorbama slatkovodnih ekosustava

---

Puđak, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:671365>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Matea Puđak

**Optimizacija metode za ekstrakciju i  
kvantifikaciju mikroplastike u sedimentu i  
biogenim tvorbama slatkovodnih  
ekosustava**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Matea Puđak

**Optimisation of methods for extraction and  
quantification of microplastics in sediment  
and biogenic formations of freshwater  
ecosystems**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ane Previšić i na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom dr. sc. Marka Rožmana. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije (mag. educ. biol. et chem.).

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Optimizacija metode za ekstrakciju i kvantifikaciju mikroplastike u sedimentu i biogenim tvorbama slatkovodnih ekosustava

Matea Puđak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Mikroplastika predstavlja prijetnju ekosustavima jer dolazi u interakciju s organizmima, a dugoročne posljedice njenog utjecaja nisu poznate. Slatkovodni ekosustavi smatraju se značajnim u transportu mikroplastike, ali su nedovoljno istraženi. Tulari (Trichoptera, Insecta) su potencijalni bioindikatori za mikroplastiku u slatkovodnim ekosustavima jer grade kućice od svile kojom lijepe čestice sedimenta, ostatke biljaka, pa i mikroplastiku. Cilj ovog diplomskog rada je optimizacija metode za ekstrakciju i kvantifikaciju čestica mikroplastike u sedimentu i biogenim tvorbama slatkovodnih ekosustava. Testirano je više metoda i utvrđen je optimalni protokoli za: razgradnju organske sastavnice korištenjem otopine  $H_2O_2$ , izdvajanje mikroplastike iz smjese mikroplastika-mineralni ostatak otopinom NaBr, detekciju čestica mikroplastike uz bojanje i UV svjetlo. Korištenjem navedenog protokola testirane su kućice tulara i sediment iz pokusa u kojem su isti izlagani utjecaju mikroplastike te smjesi mikroplastike i farmaceutika. Unutar istih tretmana, nema razlike u broju i veličini čestica mikroplastike u sedimentu ni ugradnji u kućice različitih stadija tulara tijekom vremena. Nasuprot tome, nađena je razlika u veličini i broju ugrađenih čestica između različitih tretmana na kraju pokusa, koja je najvjerojatnije povezana s razlikama u adsorpciji, formiranju obraštaja, te sedimentacijom čestica mikroplastike. Navedeni rezultati ukazuju na nužnost provođenja dodatnih pokusa koji će utvrditi ponašanje čestica mikroplastike u uvjetima višestrukih stresora.

**(45 stranica, 14 slika, 10 tablica, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)**

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: plastični polimeri, Trichoptera, Nile Red, UV detekcija

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Ana Previšić

Suvoditelj: Dr. sc. Marko Rožman

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Ana Previšić

Doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

Izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

Rad prihvaćen: 7.7.2021.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

Optimisation of methods for extraction and quantification of microplastics  
in sediment and biogenic formations of freshwater ecosystems

Matea Puđak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Microplastic poses a threat for ecosystems because it interacts with organisms, however the long-term consequences are unknown. Freshwater ecosystems are considered as important in microplastics transport but are insufficiently researched. Caddisflies (Trichoptera, Insecta) are potential bioindicators for microplastics in freshwater ecosystems because they build protective cases using larval silk to glue sediment particles, plant parts, and even microplastics. The goal of this thesis is to optimise the method for extraction and quantification of microplastic particles in sediment and biogenic formations of freshwater ecosystems. I tested different methods and determined the optimal protocol for: digestion of the organic component ( $H_2O_2$  treatment), separation of microplastics from the microplastic-mineral residue mixture (NaBr solution); detection of microplastic particles (staining and UV light). The protocol was then used to test incorporation of microplastics into the caddisfly protective cases and sediment from a previously conducted microcosm experiment with two treatments: microplastics and microplastics+pharmaceuticals. There were no differences in number and size of microplastics found in the sediment of different treatments. Moreover, there were no differences in microplastics incorporated into the caddisfly cases over the course of the experiment within each treatment. However, differences were found in both number and size of microplastics incorporated into the pupal cases at the end of experiment between treatments. These are most likely related to differences in adsorption, biofilm growth and sedimentation of microplastic particles. Thus, further research is needed to determine whether microplastics behave differently in the environment if found in combination with multiple stressors.

**(45 pages, 14 figures, 10 tables, 57 references, original in: Croatian)**

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: plastic polymers, Trichoptera, Nile Red, UV detection

Supervisor: Assoc. Prof. Ana Previšić

Co-supervisor: PhD Marko Rožman

Reviewers:

Assoc. Prof. Ana Previšić

Asst. Prof. Mirela Sertić Perić

Assoc. Prof. Draginja Mrvoš-Sermek

Thesis accepted: 7.7.2021.

## ZAHVALE

*Zahvaljujem se svojim mentorima, izv. prof. dr. sc. Ani Previšić i dr. sc. Marku Rožmanu, na svoj suradnji, pomoći, vodstvu i savjetima bez kojih ne bih mogla realizirati izradu ovog diplomskog rada.*

*Posebno bih htjela zahvaliti asistentici Instituta Ruđer Bošković, mag. oecol. Ivani Grgić, koja je bila uz mene u provedbi diplomskog rada i koja mi je pomagala svaki put kada bi naišla na neku prepreku. Uz njenu pomoć sam uspjela zadržati motivaciju čak i u najtežim trenucima, kada se činilo da sve ide po zlu.*

*Veliko hvala Javnoj ustanovi Maksimir, Znanstvenim čarolijama te Sekciji za edukaciju BIUS-a, s kojima sam imala priliku stjecati znanja i iskustva u radu s učenicima puno prije no što sam se s njima po prvi put susrela u učionici. Uz njih sam naučila puno o suvremenim oblicima nastave, popularizaciji znanosti, ali najvažnije od svega, našla sam u sebi poziv i ljubav za nastavničkom profesijom.*

*Puno hvala mojim prijateljicama, koje su učinile i najnapornije studentske dane lijepima i uvijek su bile rame za plakanje ili najbolje društvo za smijanje. Veliko hvala mojem dragom Matiji na svom strpljenju, podršci, pomoći i ljubavi.*

*Posebno hvala i mojoj mami koja je vjerovala u mene i uvijek se trudila osigurati mi sve što je potrebno, ponekad zanemarujući i sebe, kako bih ja uspješno mogla ostvariti svoje potencijale.*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1 Era plastike.....	1
1.2 Klasifikacija plastike .....	3
1.3 Izvori zagađenja mikroplastikom .....	4
1.4 Mikroplastika kao onečišćujuća tvar .....	7
1.5 Mikroplastika u ekosustavima.....	8
1.5.1 Mikroplastika u slatkovodnim ekosustavima .....	9
1.6 Tulari kao modelni organizmi u istraživanjima mikroplastike .....	11
1.7 Metode koje se najčešće koriste za detekciju i kvantifikaciju mikroplastike.....	13
1.7.1 Razgradnja organske sastavnice .....	13
1.7.2 Izdvajanje mikroplastike iz smjese .....	14
1.7.3 Detekcija čestica mikroplastike .....	14
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1 MATERIJALI.....	16
3.1.1 Kemikalije.....	16
3.1.2 Mikroplastika .....	16
3.1.3 Uzorci kućica tulara i sedimenta.....	17
3.2 METODE .....	17
3.2.1 Testiranje promjene masa čestica mikroplastike prilikom razgradnje organske sastavnice .....	17
3.2.2 Odabir metode za izdvajanje čestica mikroplastike iz smjese mikroplastika-mineralni ostatak.....	17
3.2.3 Testiranje protokola za razgradnju organske sastavnice sedimenta i kućica tulara .....	19
3.2.4 Testiranje pristupa za identifikaciju i kvantifikaciju izdvojenih čestica .....	19
3.2.5. Laboratorijski pokus .....	20
3.2.6 Korištenje optimalnog protokola za razgradnju i detekciju za obradu uzoraka kućica tulara i sedimenta iz laboratorijskog pokusa.....	21
3.2.7 Statistička analiza podataka.....	22
4. REZULTATI .....	23
4.1 Testiranje promjene masa čestica mikroplastike prilikom razgradnje organske sastavnice .....	23



4.2 Odabir metode za izdvajanje čestica mikroplastike iz smjese mikroplastika-mineralni ostatak .....	24
4.3 Testiranje protokola za razgradnju organske sastavnice sedimenta i kućica tulara .....	26
4.4 Testiranje pristupa za identifikaciju i kvantifikaciju izdvojenih čestica.....	27
4.5 Korištenje optimalnog protokola za razgradnju i detekciju za obradu uzoraka kućica tulara i sedimenta iz laboratorijskog pokusa.....	29
5. RASPRAVA .....	33
5.1 Optimizacija metode.....	33
5.2 Validacija metode .....	36
6. ZAKLJUČAK.....	38
7. LITERATURA .....	39
8. ŽIVOTOPIS .....	45

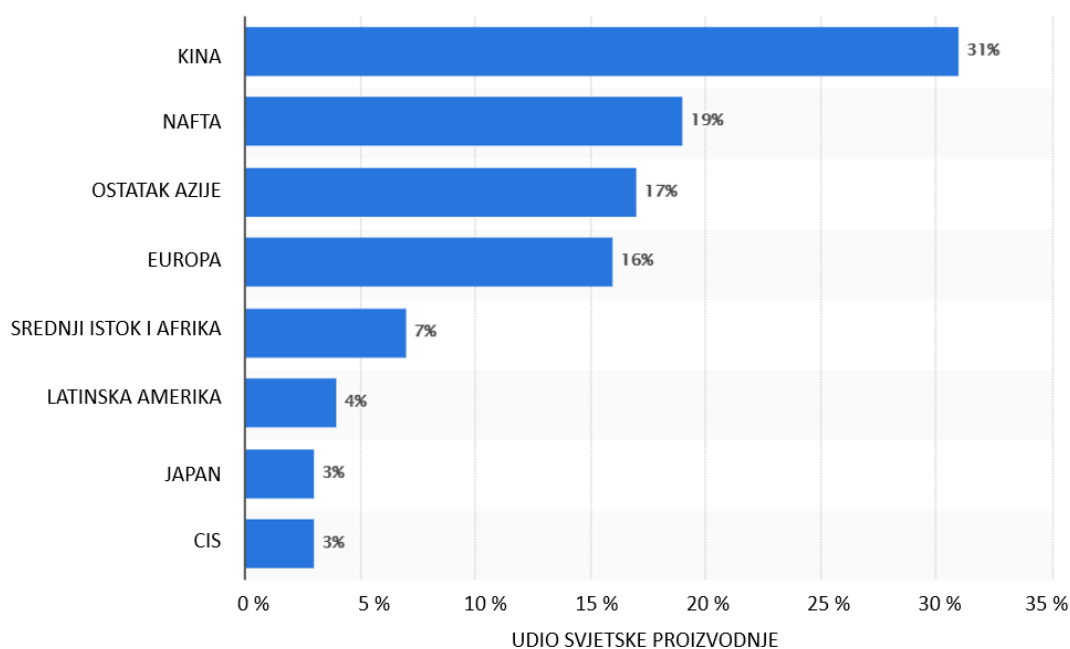
## KRATICE

- $\text{CaCl}_2$ =kalcijev klorid
- $\text{CHCl}_3$ =kloroform
- CIS=Zajednica neovisnih država (The Commonwealth of Independent States)
- $\text{HNO}_3$ =dušična kiselina
- $\text{H}_2\text{O}_2$ =vodikov peroksid
- HPLC/MS=tekućinska kromatografija visokog učinka – spektrometrija mase (High pressure liquid chromatography–mass spectrometry)
- LDPE=polietilen niske gustoće
- M=tretman s česticama PS, LDPE, PE i PP, u jednakim udjelima, u ukupnoj koncentraciji 2000 čestica  $\text{L}^{-1}$
- MS= tretman s česticama PS, LDPE, PE i PP, u jednakim udjelima, u ukupnoj koncentraciji 2000 čestica  $\text{L}^{-1}$ , uz smjesu spojeva metilparabena, BPA, kafeina, gemifibrofila, estrogena i 1H benzotriazola, koncentracija 500  $\text{ngL}^{-1}$
- MW U=Mann-Whitney U test
- NaBr=natrijev bromid
- NaCl=natrijev klorid
- NAFTA=države Sjevernoameričkog sporazuma o slobodnoj trgovini (North American Free Trade Agreement)
- NaI=natrijev jodid
- NOAA=Nacionalna oceanska i atmosferska organizacija
- PA=poliamid
- PC=polikarbonat
- PE=polietilen
- PES=poliester
- PET=polietilen tereftalat
- PP=polipropilen
- PS=polistiren
- PU=poliuretan
- PVC=polivinil klorid
- SW=Shapiro-Wilk test
- UV=ultraljubičasto zračenje
- WSR=Wilcoxonov test sume rangova
- $\text{ZnCl}_2$ =cinkov klorid

# 1. UVOD

## 1.1 Era plastike

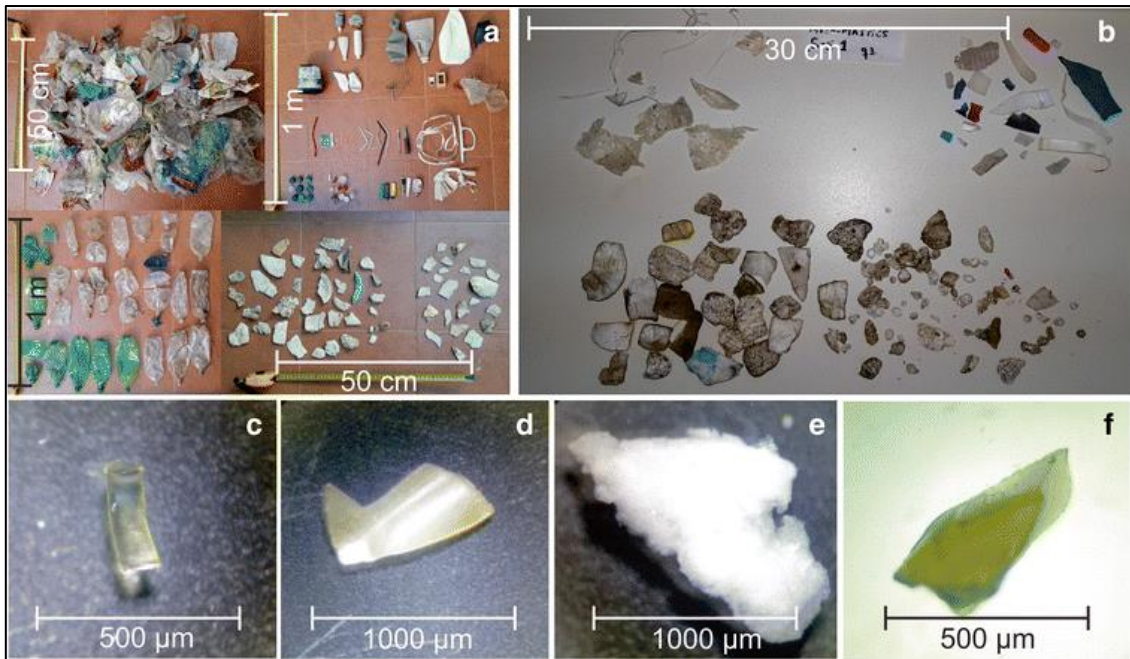
Plastika je zbog svojih fizikalnih i kemijskih svojstava te niske cijene proizvodnje postala jedan od najvažnijih tehničkih materijala današnjice te je omogućila napredak u mnogim područjima ljudske djelatnosti (Wang i sur. 2016). Iako se već u drugoj polovici 19. stoljeća počelo sintetizirati umjetne polimere, pravi potencijal plastike je prepoznat tek 1907. godine, kada Leo Baekeland izumljuje sintetsku smolu, bakelit ([www.acs.org](http://www.acs.org)). Proboj u masovnoj proizvodnji plastika je doživjela polovicom prošloga stoljeća. Procjenjuje se da se 1950-ih godišnje proizvodilo 1,5 milijuna tona plastike, dok se u 2019. godini proizvelo oko 368 milijuna tona plastike. Slika 1. prikazuje udio svjetske proizvodnje plastike prema državama i regijama u 2019. godini ([www.statista.com](http://www.statista.com)). Ljudi su i ranije otkrivali nove materijale i tehnike, zbog kojih im se kvaliteta života znatno mijenjala, ali plastika je prvi čovjekov izum koji je (i koji će) značajno utjecati na život svih organizama na Zemlji (Geyer i sur. 2017).



**Slika 1.** Udio svjetske proizvodnje plastike prema državama i regijama u 2019. godini; preuzeto i prilagođeno prema: <https://www.statista.com/statistics/281126/global-plastics-production-share-of-various-countries-and-regions/>

NAFTA=države Sjevernoameričkog sporazuma o slobodnoj trgovini (North American Free Trade Agreement), CIS=Zajednica neovisnih država (The Commonwealth of Independent States)

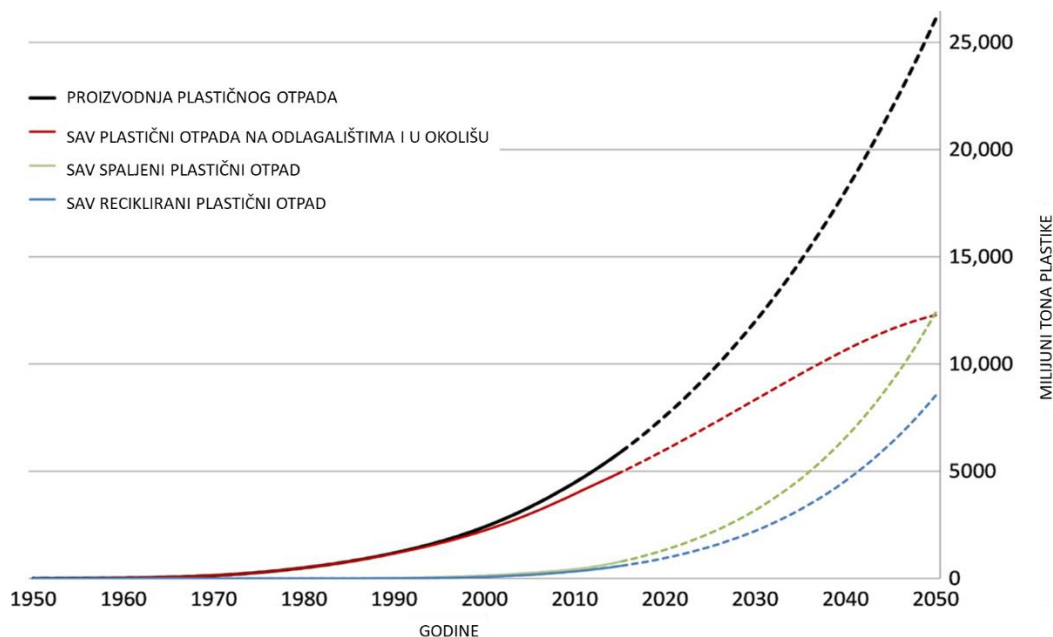
Masovna proizvodnja plastike dovela je do masovnog gomilanja plastike u okolišu. Problem plastičnog otpada u okolišu nije ni zamijećen do 1960-ih, kada znanstvenici prvi put bilježe megaplastiku (čestice > 100 mm) i makroplastiku (čestice > 20 mm) u moru te komade plastike u morskim pticama. Morat će proći još dvadesetak godina da se zapazi mikroplastika (čestice < 5 mm) u moru i da ju se počne smatrati mogućim problemom (Barnes i sur. 2009). Slika 2. prikazuje čestice mikroplastike raznih dimenzija iz okoliša (Blettler i sur. 2017).



**Slika 2.** Primjeri plastike različitih dimenzija; preuzeto iz Blettler i sur. (2017).

Iako su znanstvenici u osamdesetim i devedesetim godinama prošlog stoljeća mogli predvidjeti da će plastike u budućnosti biti sve više, rijetki su bili svjesni koliki će problem predstavljati na svjetskoj razini. Zbrinjavanje i uporaba rabljene plastike trebali bi biti jedan od prioriteta u zaštiti okoliša, međutim velik dio plastike završava u okolišu kao plastični otpad. O problemu plastičnog otpada govori i tvrdnja da danas ne postoji mjesto na Zemlji bez plastike (Wang i sur. 2016). Procjenjuje se da je u razdoblju od 2015. do 2017. godine proizvedeno oko 6,3 milijardi tona plastičnog otpada, od kojeg je 12 % spaljeno, 9 % reciklirano, a čak je 79 % završilo u odlagalištima otpada i u okolišu (Slika 3.). Koristi se samo oko 30 % ikad proizvedene plastike. Ukoliko se ovakav trend u proizvodnji i (ne)zbrinjavanju plastičnog otpada nastavi, do 2050. godine bi se na odlagalištima otpada i u okolišu moglo naći oko 12 milijardi tona

otpadne plastike (Geyer i sur. 2017). Prema nekim procjenama, u morima će do 2050. biti veća masa mikroplastike od mase riba (Auta i sur. 2017).



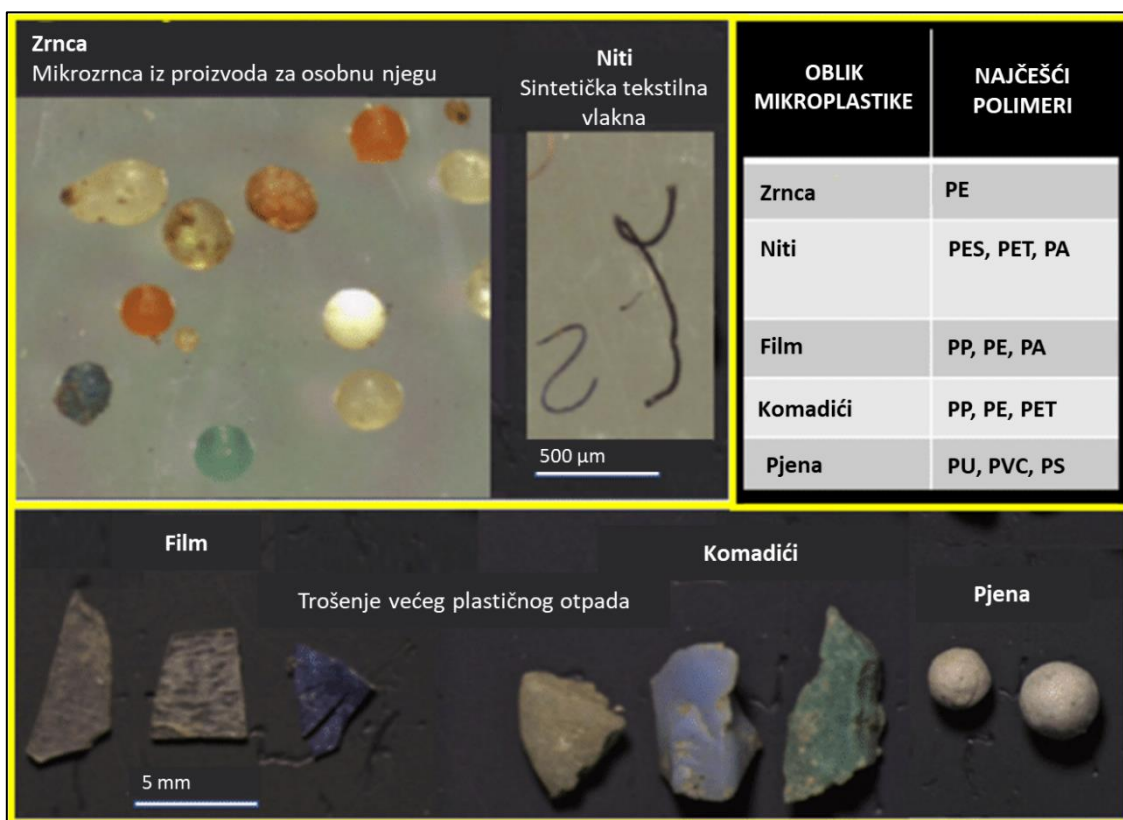
**Slika 3.** Grafički prikaz ukupne proizvodnje plastičnog otpada, izražen u milijunima tona, i njegovo zbrinjavanje, od 1950-ih do 2017. godine, s projekcijom porasta trendova do 2050. godine; preuzeto i prilagođeno prema Geyer i sur. (2017).

## 1.2 Klasifikacija plastike

Prema fizikalnim i kemijskim svojstvima, plastiku možemo podijeliti u tri kategorije: na termoplastiku, dimere i elastomere. Termoplastika se može zagrijavati bez da joj se promijeni kemijski sastav pa je pogodna za oblikovanje. Neke od poznatijih vrsta termoplastike su: polietilen (PE), polipropilen (PP), polivinil klorid (PVC), polistiren (PS), poliamid (PA) i polikarbonat (PC). Dimeri se ne mogu oblikovati zagrijavanjem jer im se porastom temperature mijenja kemijski sastav. Dimeri su: poliuretani (PU), vinil esteri, silikon, epoksi smola, fenol formaldehid smola i akrilna smola. Guma i neopren spadaju u elastomere koji imaju sposobnost rastezanja i vraćanja u prvobitno stanje bez mijenjanja fizikalnih i kemijskih svojstava (Dražić 2020).

Postoje određene nesustavnosti, kao što je točno određivanje vrsta plastike prema dimenziji čestica, koje su posljedica brzog razvoja područja i rastućeg broja istraživanja plastike (Van Cauwenberghe i sur. 2015). Nesuglasice su češće oko dimenzija potrebnih da se čestica klasificira kao mezo-, makro- ili mega- plastika.

Mikroplastikom, prema klasifikaciji Nacionalne oceanske i atmosfere organizacije (NOAA), smatramo čestice sintetičkih polimera, koje se opiru (bio)razgradnji, manje od 5 mm (Poerio i sur. 2019). Mikroplastiku možemo podijeliti prema obliku (Slika 4.) na različite tipove (Poerio i sur. 2019).



**Slika 4.** Najčešći oblici mikroplastike i njihovi izvori; prevedeno i prilagođeno prema Poerio i sur. (2019)

PE=polietilen, PES=poliester, PET=polietilen tereftalat, PA=poliamid, PP=polipropilen, PU=poliuretan, PVC=polivinil klorid, PS=polistiren

### 1.3 Izvori zagađenja mikroplastikom

Čestice mikroplastike koje se nalaze u okolišu su vrlo heterogene. Razlikuju se po obliku, dimenzijama, kemijskom sastavu i gustoći, a razlike proizlaze iz izvora mikroplastike. Ovisno o izvoru zagađenja, mikroplastiku dijelimo na primarnu i sekundarnu mikroplastiku. Primarna mikroplastika je proizvedena i dospjela u prirodu u dimenzijama manjim od 5 mm. Sekundarna mikroplastika je u prirodu dospjela komadanjem većih dijelova plastike (Duis i Coors 2016). Tablica 1. prikazuje najčešće izvore primarne i sekundarne mikroplastike. Slika 5. prikazuje šljokice koje se koriste u kozmetici, primarnu vrstu mikroplastike.

**Tablica 1.** Pregled najčešćih izvora primarne i sekundarne mikroplastike koja dopijeva u okoliš, prema Duis i Coors (2016).

<b>PRIMARNA MIKROPLASTIKA</b>	<b>SEKUNDARNA MIKROPLASTIKA</b>
Proizvodi za osobnu njegu koji sadrže mikroplastiku kao abrazivno sredstvo ili eksfolijant	Plastični otpad odbačen u prirodu
Kozmetički proizvodi sa šljokicama	Gubitci pri sakupljanju plastičnog otpada (iz odlagališta otpada i pogona za reciklažu)
Proizvodi sa specifičnom medicinskom namjenom (npr. sredstvo za poliranje zubi koje koriste zubari)	Gubitci plastičnog materijala u prirodnim katastrofama
Industrijska abrazivna sredstva	Malčiranje plastike
Predproizvodnja plastike	Sintetski polimeri koji se koriste za poboljšanje kvalitete zemlje i kao dodatci kompostu
Ostaci plastike iz proizvodnje	Uništavanje i otpadanje sintetskih vlakana
Plastični regranulati	Otpuštanje vlakana iz higijenskih proizvoda
Otpadci iz tvorničkih postrojenja za preradu plastike	Propadanje automobilskih guma
Slučajni gubitci mikroplastike	Boje i lakovi bazirani na sintetskim polimerima; abrazija usred uklanjanja boja; neispravno zbrinjavanje boja i lakova
Tekućine za bušenje (traženje nafte i plina)	Abrazija plastičnog materijala (npr. materijala iz kućanstva)
	Plastični predmeti u organskom otpadu
	Papir premazan ili laminiran slojem plastike
	Izgubljen ili odbačen materijal za pecanje ili iz postrojenja za akvakulturu
	Izgubljen ili odbačen materijal iz brodova (trgovačkih, ribičkih, putničkih, osobnih)
	Izgubljen ili odbačen materijal iz naftnih i plinskih bušotina





**Slika 5.** Šljokice koje se koriste u kozmetici su primarna mikroplastika i jedan od glavnih izvora mikroplastike u okolišu. Preuzeto s: <https://www.amazon.com/Warmfits-Holographic-Festival-Different-Hexagons/dp/B07R5S16BD>

Nekoliko faktora utječe na raspad većih komada plastike u mikroplastiku. Okolišni faktori koji pridonose fragmentaciji su sunčeva svjetlost (ultraljubičasto zračenje) i povišena temperatura, a na fragmentaciju značajno utječe vrsta polimera od koje je načinjen plastični predmet. Ultraljubičasto (UV) zračenje uzrokuje fotodegradaciju plastike, koja je posljedica oksidacije u polimernom matriksu, zbog koje dolazi do cijepanja veza u polimeru. Zbog toga sekundarna mikroplastika najuspješnije nastaje na plažama, gdje je plastika izložena jakom utjecaju UV zračenja, fizikalnoj abraziji koju uzrokuju valovi, kisiku i turbulencijama. Kada dospije u vodu, proces fragmentacije se usporava (Auta i sur. 2017).

U efluentima se najčešće nalaze čestice mikroplastike PP, PE, PS, PVC, PC, PA, PES (poliester) i PET (polietilen tereftalat). Ove vrste plastike pripadaju reverzibilnim termoplastičnim polimerima i vrlo ih se lako može reciklirati. Od materijala koji se ne mogu reciklirati, među česticama mikroplastike nalaze se razne vrste epoksi smola, vinil estera, fenolnih smola, melaminskih smola, silikona, nezasićenih poliester, PU, formaldehidi, akrilne smole, itd. Iako pogoni za zbrinjavanje otpadnih voda mogu pročistiti 98 % čestica mikroplastike, čestice manje od 20  $\mu\text{m}$  se ne mogu izdvojiti i vraćaju se u prirodu (Poerio i sur. 2019).



## 1.4 Mikroplastika kao onečišćujuća tvar

Svojstva koja čine plastiku pogodnom za razne namjene, posebice trajnost i otpornost na čimbenike koji dovode do raspada, su razlog zašto se plastični otpad vrlo teško ili nikako ne može asimilirati u prirodi (Geyer i sur. 2017). Vrijeme razgradnje plastike je dugo, prosječna veličina čestica plastike u okolišu se smanjuje, a rasprostranjenost mikroplastike na svjetskoj razini se povećala u posljednjih nekoliko desetljeća (Barnes i sur. 2009). Što je čestica mikroplastike manja, to je veći broj živih bića koja ju mogu unijeti u svoj organizam. Manje čestice povećavaju osjetljivost na mikroplastiku, pojačano se ispiru, te povećavaju desorpcijski i adsorpcijski potencijal mikroplastike (Auta i sur. 2017). Zbog visoke gustoće čestica mikroplastike u vodama i sedimentu (do 100 000 čestica/m<sup>3</sup>) često dolazi do interakcije s organizmima u okolišu (Eerkes-Medrano i sur. 2015).

Iako još nije poznat potpun opseg utjecaja mikroplastike na zdravlje životinja, već sada znamo da ona predstavlja prijetnju, jer može uzrokovati niz problema. Neki od njih su: patološki stres, lažan osjećaj sitosti, problemi pri razmnožavanju i rastu, oksidativni stres, može blokirati sintezu enzima, a služi i kao potencijalni vektor za prijenos patogena (Wang i sur. 2016; Auta i sur. 2017; Walker 2021). Čestice mikroplastike pronađene su čak i u ljudskoj posteljici, s majčine i fetalne strane, a porijeklom su iz plastičnih proizvoda, kozmetike, tekstila, boja i lakova za nokte. Pretpostavlja se da su do posteljice dospjele iz dišnog ili probavnog sustava majke. Mikroplastika bi u trudnoći mogla potencijalno smanjiti obrambene mehanizme od patogena te utjecati na korištenje zaliha energije. Dugoročan učinak mikroplastike bi mogao biti narušavanje nekoliko staničnih regulacijskih puteva u posteljici, kao što je komunikacija između embrija i maternice, što može dovesti do ozbiljnih posljedica, poput preeklampsije i ograničenog fetalnog rasta (Ragusa i sur. 2021). Na površinu mikroplastike adsorbiraju se onečišćivači iz okoline, koji u slučaju konzumacije mikroplastike mogu dospjeti u hranidbeni lanac, u kojem se gomilaju biomagnifikacijom i bioakumulacijom (Wang i sur. 2016).

## 1.5 Mikroplastika u ekosustavima

U ekosustavu mikroplastika pokazuje određena fizikalna, kemijska i biološka ponašanja (Wang i sur. 2016), koja su sažeta u Tablici 2.

**Tablica 2.** Sažeti pregled fizikalnih, kemijskih i bioloških ponašanja mikroplastike u morskom ekosustavu, prema Wang i sur. (2016).

<b>FIZIKALNA PONAŠANJA MIKROPLASTIKE</b>	<b>KEMIJSKA PONAŠANJA MIKROPLASTIKE</b>	<b>BIOLOŠKA PONAŠANJA MIKROPLASTIKE</b>
MIGRACIJA	DEGRADACIJA	UNOS U ORGANIZAM (GUTANJE)
SEDIMENTACIJA	ADSORPCIJA (ORGANSKIH ONEČIŠĆUJUĆIH TVARI, METALA)	TRANSLOKACIJA
AKUMULACIJA (VREMENSKA, PROSTORNA)		BIODEGRADACIJA

Zbog pronalaska vrlo velikog broja čestica, najviše se istraživanja provodi na mikroplastici iz morskih ekosustava. Čestice mikroplastike pronađene su čak na Antarktici i u dubokom moru. Visoka koncentracija čestica nalazi se u industrijskim centrima i metropolskim regijama te u zatvorenim i poluzatvorenim morima, kao što je Sredozemno more (Duis i Coors 2016). Mikroplastiku nalazimo u stupcu mora (mikroplastika manje gustoće od morske vode), ali u morskom sedimentu se nalazi mnogo veća koncentracija mikroplastike (Hidalgo-Ruz i Thiel 2013). Obale i zone plime i oseke sadrže najviše mikroplastike. Mikroplastika u sedimentu nađena je u gornjim slojevima (gornja 2 cm sedimenta), ali i dublje. Na veoma onečišćenim plažama, mikroplastika može biti do 3,3 % ukupne mase sedimenta. Kopneni ekosustavi nisu dobro istraženi, ali znamo da su jedan od izvora zagađenja mikroplastikom (Duis i Coors 2016). Dokazano je da se u tlu mikroplastika zadržava u visokim koncentracijama i 15 godina nakon što je mjesto zagađenja zbrinuto (Zubris i Richards 2005). U vodenim ekosustavima najčešći oblici pronađene mikroplastike su niti, komadići, granule i film, a najčešći pronađeni polimeri plastike su PP, PE i PS (Duis i Coors 2016).

### 1.5.1 Mikroplastika u slatkovodnim ekosustavima

Slatkovodni ekosustavi nisu ni približno tako dobro istraženi kao morski. Većina istraživanja slatkovodnih ekosustava fokusirala se na veće rijeke i jezera, dok su manja jezera i potoci vrlo slabo istraženi (Duis i Coors 2016). Najveće koncentracije čestica mikroplastike nađene su u slatkim vodama u blizini metropola, a većinom su to bili polimeri niske gustoće: PE, PP i PS (Wagner i sur. 2014).

Istraživanje je pokazalo da je u Dunavu, drugoj najvećoj europskoj rijeci, prosječna biomasa ličinki riba niža od mase plastike. Također, Dunav u Crno more izbaci oko 4,2 tone plastike na dan, odnosno oko 1,5 milijardi tona plastike godišnje (Lechner i sur. 2014). U kopnenim vodama mikroplastiku prenose kanalizacijske vode, efluenti iz tvornica plastike, urbani izljevi i rijeke. Možemo zaključiti da su slatkovodni ekosustavi itekako značajni za prijenos čestica plastike u more (Eerkes-Medrano i sur. 2015). U Njemačkoj su provedena istraživanja sedimenta na rijekama Elbi, Moselle, Neckar i Rajni. Nađeno je 34-64 čestica po kili suhog sedimenta, a najveću koncentraciju mikroplastike u sedimentu imala je rijeka Rajna (Wagner i sur. 2014).

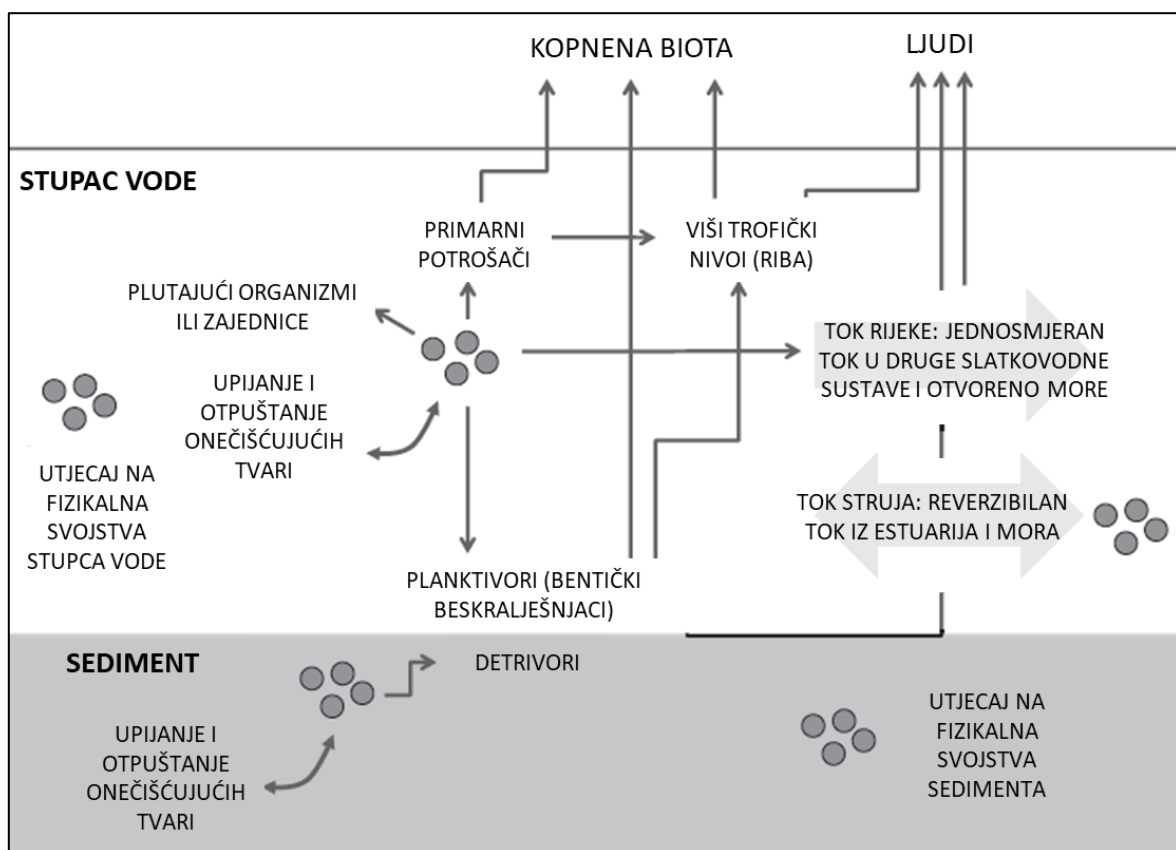
Niz čimbenika utječe na kvantitetu čestica mikroplastike u slatkovodnim ekosustavima. Neki od njih su gustoća ljudske populacije u blizini vode, blizina urbanim sredinama, vrijeme zadržavanja vode, vrsta zbrinjavanja otpada koja se koristi u blizini i količina otpadnih kanalizacijskih voda koja dopijeva u slatkovodni ekosustav (Eerkes-Medrano i sur. 2015). Sekundarna mikroplastika, nastala raspadom biorazgradive polihidroksibutirat (PHB) plastike, pokazala se štetnom za organizme ključne u slatkovodnom ekosustavu (González-Pleiter i sur. 2019).

Osim što može ulaziti u interakciju s bićima iz slatkovodnih ekosustava, porast koncentracije mikroplastike može ukazati na degradaciju abiotičkih uvjeta u vodenom okolišu. U estuarijima rijeka, gdje je prisutno više onečišćujućih tvari, je vjerojatnije da će ih mikroplastika adsorbirati na svoju površinu. Takve čestice se talože u sediment, a onečišćenje ostaje dulje prisutno u okolišu (Eerkes-Medrano i sur. 2015). Taloženje mikroplastike u pelagijalu i bentosu može promijeniti prodor svjetlosti kroz stupac vode ili svojstva sedimenta, što može dovesti do promjena u biogeokemijskim ciklusima (Arthur i Baker, 2011). Fizikalna i kemijska svojstva sedimenta, koja su važna za

ekosustav, su dimenzije zrnaca, dimenzije pora i kapacitet vezanja kemikalija za sediment (Simpson i sur. 2005).

Da bi se produbilo razumijevanje utjecaja mikroplastike na slatkovodne ekosustave, potrebno je redovno pratiti prisutnost čestica mikroplastike u slatkim vodama, ne samo u većim jezerima i rijekama, već i u manjim kopnenim vodama. Trebalo bi bolje istražiti izvore i sudbinu slatkovodne mikroplastike, jer još ne poznajemo obrasce ponašanja mikroplastike dovoljno dobro, kao što ih poznajemo za morske ekosustave (Tablica 2.). Također, bilo bi potrebno istražiti utjecaj mikroplastike na slatkovodne mikroorganizme. Razumijevanje odnosa mikroplastike i drugih onečišćujućih tvari u slatkim vodama potrebno je za bolje poimanje mikroplastike u slatkovodnom ekosustavu. Da bi zaštitili slatkovodne ekosustave, moramo razviti mreže za procjenu rizika od mikroplastike (Wagner i sur. 2014).

Eerkes-Medrano i sur. (2015) opisali su kako mikroplastika može djelovati na slatkovodni ekosustav i hranidbeni lanac, što je prikazano Slikom 6.



**Slika 6.** Dijagram potencijalnog prijenosa čestica mikroplastike u slatkovodnom ekosustavu; preuzeto i prevedeno prema Eerkes-Medrano i sur. (2015).

## 1.6 Tulari kao modelni organizmi u istraživanjima mikroplastike

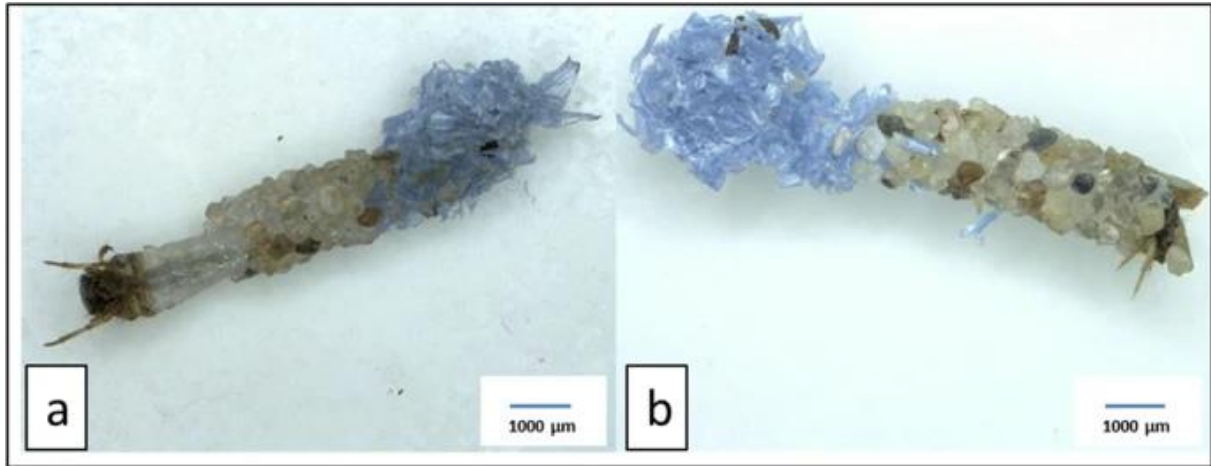
Kao modelni organizmi za istraživanja mikroplastike korištene su komercijalno važne vrste riba i rakova (Abbasi i sur. 2018). Često se koriste školjkaši, poput dagnji, budući da su filtratori vode pa u sebi, uz ostale onečišćujuće tvari, talože i mikroplastiku (Avio i sur. 2015; Kolandhasamy i sur. 2018). Još neki od značajnih modelnih organizama korištenih u istraživanjima mikroplastike su zooplanktonski račići (Cole i sur. 2014), morski mnogočetinaši (Green i sur. 2016), ličinke kukaca i ribe zebrice (Khosrovyan i sur. 2020.).

Većina istraživanja koja se bavila slatkovodnim ekosustavima je kao modelne organizme koristila epibentičke vrste životinja, koje su mikroplastiku unosile gutanjem (Ehlers i sur. 2020). Nel i Froneman (2018) su pokazali da mnogočetinaši mogu uklopiti čestice mikroplastike u svoje tvorbe. Ličinke tulara mogu progutati čestice mikroplastike, ali ih također mogu i ugraditi u svoje kućice, što ih čini pogodnim modelnim organizmom za istraživanje mikroplastike (Ehlers i sur. 2020). Ehlers i suradnici (2019) su pokazali da je u kućice tulara, vrste *Lepidostoma basale* Kolenati 1848, bila uklopljena raznobojna mikroplastika, uključujući polimere PVC i PES.

Ličinke tulara grade kućice koje im olakšavaju disanje, služe za kamuflažu i zaštitu. Pri izgradnji se koriste raznim materijalom kojeg mogu pronaći u svojoj okolini. Za ugradnju koriste ličinačku svilu pomoću koje lijepe čestice u svoju kućicu. Neke vrste koriste sve dostupne čestice iz okoline, dok neke preferiraju zrnca sedimenta ili dijelove biljaka. U slučaju opasnosti mogu na brzinu izgraditi privremenu kućicu koja nije toliko čvrsta i koja obično nema specifičan oblik cijevi, karakterističan za tularu. Kućice koje ličinke grade od više različitih materijala pokazuju u pravilu veću stabilnost (Ehlers i sur. 2019, Ehlers i sur. 2020.).

U laboratorijskim uvjetima, ličinke tulara uzete iz prirode i stavljene u akvarije s mikroplastikom i ostalim materijalom za izgradnju kućica (poput pijeska) odmah su započele izgradnju kućica. Kućice izgrađene u laboratorijskim uvjetima razlikovale su se od kućica izgrađenih u potoku iz kojih su jedinke uzete. Čak je 79 % jedinki isprva odabralo mikroplastiku kao materijal za izgradnju kućica, a tek su kasnije prešle na uporabu mineralnih zrnaca. Rezultat opisane izgradnje vidljiv je na Slici 7. Utvrđeno je

da su kućice s većim postotkom mikroplastike bile manje stabilne i lakše su pucale. Kućice od PVC plastike bile su stabilnije od kućica od PET plastike (Ehlers i sur. 2020).



**Slika 7.** Pogled na ličinku tulara koja je za izgradnju kućice koristila zrnca sedimenta i PET plastike, odozgo (a) i s boka (b); preuzeto iz Ehlers i sur. (2020)

PET=polietilen tereftalat

U ranijem istraživanju na ličinkama tulara, sakupljenima iz prirode i ne tretiranim mikroplastikom u laboratorijskim uvjetima, pronađene su čestice mikroplastike koju su tulari ugradili u svoje kućice iz prirode. Od primarne mikroplastike nađena su zrnca, niti, filmovi i komadići. Zrnca su činila najveći postotak pronađene mikroplastike. Općenito, kućice su sadržavale različite oblike plastike, tipove polimera, čestice različitih dimenzija i boja. Budući da su ličinke tulara za izgradnju svojih kućica koristile čestice koje su im bile dostupne u okolišu, pokazale su se kao potencijalan bioindikator za zagađenje mikroplastikom (Ehlers i sur. 2019).

## 1.7 Metode koje se najčešće koriste za detekciju i kvantifikaciju mikroplastike

U detekciji i kvantifikaciji čestica mikroplastike manjka sustavnosti zbog brzog razvoja područja i rastućeg broja istraživanja (Van Cauwenberghe i sur. 2015). Glavni koraci u izolaciji čestica mikroplastike prikazani su na Slici 8.



**Slika 8.** Shematski prikaz glavnih koraka u izolaciji čestica mikroplastike. Shema: M. Puđak

### 1.7.1 Razgradnja organske sastavnice

Uzorci iz prirode kompleksni su, jer obično sadrže organsku sastavnicu koju je nužno ukloniti kako bi se olakšala izolacija te detekcija čestica mikroplastike. U literaturi se navodi više metoda uklanjanja organske sastavnice (Hu i sur. 2019; Tagg i sur. 2017; Claessens i sur. 2013; Naidoo i sur. 2017; Li i sur. 2018). Jedna od metoda je razgradnja organske sastavnice 30 % vodikovim peroksidom ( $H_2O_2$ ). Nedostatak metode je relativno velik utrošak vodikovog peroksida pa nije prikladna za tretiranje velikog broja uzoraka ili uzoraka velike mase (Hu i sur. 2019). Fentonov reagens (smjesa 30 %  $H_2O_2$  i željezovih(II) iona, koncentracije 0,05 M) može se koristiti kao učinkovita alternativa za razgradnju organske sastavnice u uzorcima mikroplastike. Ne mijenja znatno svojstva mikroplastike, a prednosti su mu što je vremenski isplativ i može se koristiti za obradu većeg broja uzoraka jer ga treba manje od čistog vodikovog peroksida (Tagg i sur. 2017). Za razgradnju organske sastavnice može se koristiti i dušična kiselina. Pomoću nje iz smjese se uspješno uklanja organska sastavnica, a postotak oporavka čestica mikroplastike je visok. Međutim, neka istraživanja su pokazala da ona može imati negativne posljedice na mikroplastiku. Neke od tih posljedica su uništavanje čestica mikroplastike na temperaturi većoj od 60 °C, oštećivanje polimerne strukture najlona, diskoloracija PE plastike i reakcija s površinom PVC plastike koja dovodi do promjene površinske morfologije (Claessens i sur. 2013; Naidoo i sur. 2017; Li i sur. 2018).

### **1.7.2 Izdvajanje mikroplastike iz smjese**

Mikroplastiku je od drugih materijala iz otopina najlakše ukloniti temeljem gustoće. Čestice manje gustoće od otopine isplivaju na površinu, dok čestice veće gustoće zaostanu na dnu (Hu i sur. 2019; Van Cauwenberghe i sur. 2015). Za izdvajanje temeljem gustoće najkorištenije su vodene otopine natrijevog klorida (NaCl), kalcijevog klorida (CaCl<sub>2</sub>), cinkovog klorida (ZnCl<sub>2</sub>) i natrijevog jodida (NaI). NaCl i CaCl<sub>2</sub> su jeftini i ne štete okolišu, ali mana im je što ne mogu razdvojiti mikroplastiku visoke gustoće, a kalcijevi ioni mogu reagirati s organskom tvari koja nije uklonjena iz smjese. ZnCl<sub>2</sub> i NaI mogu razdvajati plastiku visoke gustoće, ali su skupe soli. Velika mana je što su štetne za okoliš i embrio-toksične za vodene organizme. NaBr je netoksičan, nekoroziivan i jeftin reagens za razdvajanje tvari na temelju gustoće i koristi se za izolaciju mikroplastike iz sedimenta (Liu i sur. 2019).

### **1.7.3 Detekcija čestica mikroplastike**

Vizualna detekcija mikroplastike se koristi često, lako je primjenjiva i jeftina, ali mana joj je što rezultati jako ovise o osobi koja ju provodi (Hidalgo-Ruz i sur. 2012). Vizualna detekcija se može provoditi uz pomoć mikroskopa, lupe ili bez pomagala (Hengstmann i Fischer 2019). Spektroskopija i kromatografija su pouzdane, ali troše puno vremena i zahtijevaju specifičnu, skupu opremu (Hengstmann i Fischer 2019). Bojenje Nile Red bojom i detekcija mikroplastike pomoću UV svjetla su brže od detekcije pomoću fluorescencijskog mikroskopa ili spektroskopije. Troškovi su mnogo manji, a rezultati su pouzdani kod većih čestica, dok se pouzdanost za sitnije još treba utvrditi. Korištenjem ove metode za detekciju može se smanjiti krivo identificiranje čestica mikroplastike, ali pregledavanje uzoraka i dalje troši mnogo vremena. Čestice obojane na ovaj način su ružičaste kada ih se promatra pod UV svjetlom. Mana ove metode je što kloroform može utjecati na neke tipove plastike pa svakako treba provjeriti kako se ponašaju u otopini (Shim i sur. 2016, Hengstmann i Fischer 2019).



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Glavni cilj ovog diplomskog rada je optimizacija metode za ekstrakciju i kvantifikaciju čestica mikroplastike u sedimentu i biogenim tvorbama slatkovodnih ekosustava, kao što su kućice ličinke tulara (Trichoptera, Insecta).

Specifični ciljevi rada su:

- Utvrditi protokol za razgradnju organske sastavnice prisutne u sedimentu i kućicama tulara;
- Utvrditi protokol za izdvajanje mikroplastike iz dobivene smjese mikroplastika-mineralni ostatak;
- Analizirati učinkovitost detekcije i kvantifikacije čestica mikroplastike uz upotrebu Nile Red boje i UV svjetlosti;
- Utvrditi potencijal sedimenta i kućica tulara za zadržavanje čestica mikroplastike u ekosustavu slatkih voda.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 MATERIJALI

##### 3.1.1 Kemikalije

U ovom radu koristila sam sljedeće kemikalije:

- dušična kiselina ( $\text{HNO}_3$ ), 65 % suprapur, stupanj čistoće HPLC/MS, proizvođača Sigma-Aldrich (Missouri, SAD)
- vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 30 %, stupanj čistoće HPLC/MS, proizvođača Sigma-Aldrich (Missouri, SAD)
- otopina natrijevog bromida ( $\text{NaBr}$ ),  $\rho=1,266$  g/mL; pripremljena u laboratoriju iz krutog  $\text{NaBr}$ , proizvođača Sigma-Aldrich (Missouri, SAD) i deionizirane vode, Milli-Q
- kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), stupanj čistoće HPLC/MS, proizvođača Sigma-Aldrich (Missouri, SAD)
- Nile Red boja (u prahu), proizvođača Sigma-Aldrich (Missouri, SAD)

##### 3.1.2 Mikroplastika

U ovom radu koristila sam sljedeće vrste plastike, prikazane u Tablici 3. ([www.amesweb.info](http://www.amesweb.info), [www.plastics.ulprospector.com](http://www.plastics.ulprospector.com)):

**Tablica 3.** Gustoća tipova plastike, korištenih pri izradi ovog diplomskog, pri sobnoj temperaturi, izražena u  $\text{g/cm}^3$ .

TIP PLASTIKE	$\rho$ [ $\text{g/cm}^3$ ]
LDPE	0,925
PE	0,925 – 0,959
PP	0,905
PS	1,050

LDPE=polietilen niske gustoće, PE=polietilen, PP=polipropilen, PS=polistiren

Uzorci mikroplastike dobiveni su krio-mljevenjem industrijskih granula plastike te naknadnim prosijavanjem dobivene smjese kako bi se izdvojile čestice  $< 0,5$  mm.

### **3.1.3 Uzorci kućica tulara i sedimenta**

Za razvoj i testiranje metode izolacije mikroplastike iz kućica tulara i sedimenta koristila sam uzorke dobivene iz prethodno provedenog pokusa, s čiste lokacije, detaljno opisanog u podpoglavlju 3.2.5.

## **3.2 METODE**

### **3.2.1 Testiranje promjene masa čestica mikroplastike prilikom razgradnje organske sastavnice**

Prvo sam testirala kako tretman smjesom HNO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u volumnom omjeru 1:3 (protokol 1) te tretman samo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (protokol 2) utječu na promjenu mase čestica određenih vrsta mikroplastike. Za protokol 1 izvagala sam triplikate makroskopskih čestica PE, PS, PP, LDPE i zabilježila im mase. U svaki uzorak triplikata dodala sam 1 mL smjese tretmana. Za protokol 2 izvagala sam triplikate za čestice PE, PS, PP, LDPE i zabilježila im mase. U svaki uzorak triplikata dodala sam 1 mL vodikova peroksida (30 %). Uzorke sam ostavila da odstoje tjedan dana (Claessens i sur. 2013; Lusher i sur. 2017.; Al-Azzawi i sur. 2020). Nakon tjedan dana uzorke sam filtrirala, filtrat neutralizirala, a mikroplastiku sam prebacila u suhe i čiste Eppendorf epruvete. Stavila sam ih da se suše u sušionik na 60 °C pola sata. Nakon toga sam sve uzorke triplikata, iz oba tretmana, ponovno izvagala i zabilježila njihove mase.

### **3.2.2 Odabir metode za izdvajanje čestica mikroplastike iz smjese mikroplastika-mineralni ostatak**

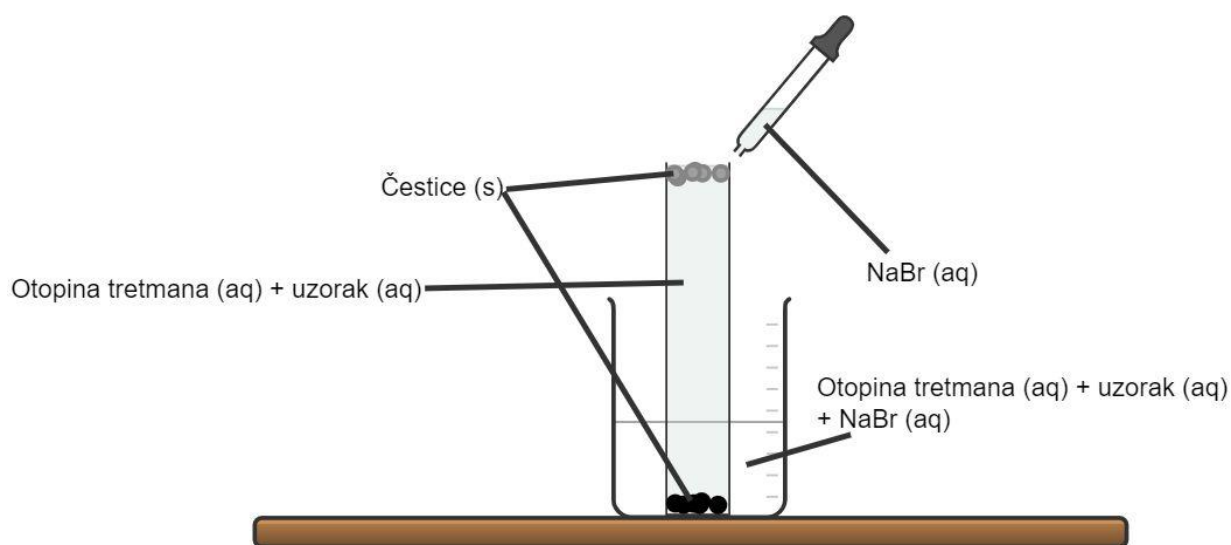
Prilikom odabira metode izdvajanja čestica mikroplastike iz dobivene smjese mikroplastika-mineralni ostatak, testirala sam dvije metode:

- I. korištenje lijevka za odjeljivanje te
- II. odvajanje prema gustoći korištenjem vodene otopine NaBr.

Obje metode testirane su na uzorku sedimenta i uzorku kućica tulara. Iz oba uzorka organska sastavnica bila je uklonjena korištenjem protokola 2.

I. Za testiranje izdvajanja pomoću lijevka za odjeljivanje, u lijevak sam stavila otopinu natrijevog bromida ( $\rho=1,266 \text{ g/mL}$ ) i probni uzorak. Pokušala sam razdvojiti talog od gornjeg sloja natrijevog bromida, koji je sadržavao, između ostalog, i čestice mikroplastike.

II. Za testiranje odvajanja prema gustoći pomoću vodene otopine natrijevog bromida ( $\rho=1,266 \text{ g/mL}$ ), svaki od triplikata sam prebacila u posebnu vijalu. Vijale s uzorcima sam stavila u širu čašu. Polako sam, uz rub u vijalu dokapavala otopinu natrijeva bromida. Dokapavala sam dok se površinska napetost otopine u vijali nije razbila i površina otopine, skupa s česticama koje su na nju isplivale, se razlila preko ruba vijale. Dokapavanje sam nastavila još neko vrijeme, sve dok se na površini otopine u vijali više nisu mogle zamijetiti čestice. Gornji sloj otopine sam usisala kapaljkom, pažljivo, da ne pomutim čestice koje su se nataložile na dno vijale. Sadržaj kapaljke sam ispustila u čašu. Rubove i vanjske stijenke vijale sam isprala otopinom natrijevog bromida. Aparaturu sam prikazala na Slici 9.



**Slika 9.** Aparatura za odvajanje čestica mikroplastike prema gustoći, pomoću NaBr (aq),  $\rho(\text{NaBr}) = 1,266 \text{ g/mL}$ . Krute čestice manje gustoće od otopine NaBr plutaju na površini, dok su čestice veće gustoće na dnu. Pažljivim dokapavanjem otopine čestice manje gustoće izdvajaju se u čašu, dok čestice veće gustoće ostaju na dnu. Crtež: M. Puđak

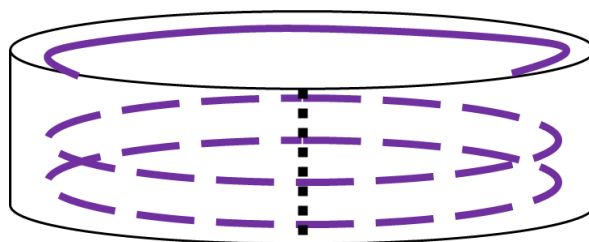
Uzorke kojima sam testirala odvajanja prema gustoći pomoću vodene otopine natrijevog bromida ( $\rho=1,266 \text{ g/mL}$ ) sam vakuumski profiltrirala kroz polikarbonatni filter.

### **3.2.3 Testiranje protokola za razgradnju organske sastavnice sedimenta i kućica tulara**

Na čistim uzorcima sedimenta i kućica tulara testirala sam učinkovitost i iskorištenje protokola 1 i 2 za razgradnju organske sastavnice. Napravila sam tripikat sedimenta i kućica za svaki protokol. Za probni uzorak kućica koristila sam jednu kućicu po uzorku, a za probni uzorak sedimenta oko 0,5 g po uzorku. U svaki uzorak sam stavila točno 30 čestica mikroplastike (10 LDPE + 10 PS + 10 PP). Nakon provedene razgradnje smjesu sam razdvojila temeljem gustoće pomoću vodene otopine natrijevog bromida ( $\rho=1,266$  g/mL), kako sam opisala u podpoglavlju 3.2.2. Ovako odijeljen sadržaj sam vakuumski profiltrirala kroz polikarbonatni filtar. Svaki filtar sam prebacila na posebnu Petrijevu zdjelicu. Pod lupom sam pregledala uzorke i prebrojala čestice mikroplastike. Na temelju broja čestica mikroplastike koje sam pronašla nakon filtracije, izračunala sam iskorištenje za svaki od korištenih tretmana.

### **3.2.4 Testiranje pristupa za identifikaciju i kvantifikaciju izdvojenih čestica**

Testirala sam dva pristupa za identifikaciju izdvojenih čestica mikroplastike. U prvom pristupu koristila sam vizualnu identifikaciju bez dodatnog bojenja i označivanja čestica mikroplastike. U drugom pristupu odlučila sam se za bojenje čestica mikroplastike Nile Red bojom i osvjetljivanja UV svjetlom;  $\lambda = 365$  nm (Shim i sur. 2016; Tamminga i sur. 2017., Hengstmann i Fischer 2019). Čestice mikroplastike prekrivene Nile Red bojom pod utjecajem UV svijetla fluorescenciraju u ružičastoj boji. Jedan  $\mu$ L Nile Red boje otopila sam u jednom mL kloroforma. Svakom uzorku sam dodala 1 mL otopine Nile Red boje. Uz dodavanje je bilo potrebno lagano okretati Petrijevu zdjelicu da se otopina boje što ravnomjernije rasporedi. Obojane uzorke sam ostavila 24 sata u digestoru. Nakon što su odstajale, čestice sam pregledala van digestora, pod lupom. Prilikom detekcije čestica mikroplastike koristila sam plastični cilindar na koji sam s unutarnje strane nalijepila trake UV žaruljica ( $\lambda = 365$  nm). Cilindar sam prerezala na sredini, tako da sam ga lako mogla namjestiti i pomicati oko uzorka i objektiva lupe (Slika 10.). Također, budući da je otapalo za Nile Red boju kloroform, testirala sam djelovanje kloroforma na promjenu mase čestica mjerenjem mase čestica prije i nakon izlaganja kloroformu.



**Slika 10.** Shematski prikaz plastičnog cilindra s nalijepljenim trakama UV žaruljica ( $\lambda = 365$  nm). Ljubičaste crte pokazuju položaj trake u cilindru. Isprekidana crna crta označava prerez na cilindru. Crtež: M. Puđak

### 3.2.5. Laboratorijski pokus

Proveden je pokus u kojem je simuliran model vodenog ekosustava onečišćenog česticama mikroplastike koristeći pojednostavljeni hranidbeni lanac koji se sastojao od mahovina i ličinki tulara vrste *Micropterna nycterobia* McLachlan, 1875. Čista voda, sediment, mahovine (mješavina dvaju vrsta *Cinclidotus aquaticus* [Hedw.] Bruch & Schimp i *Rhynchostegium riparioides* [Hedw.] Cardot) i ličinke tulara prikupljene su na izvoru rijeke Krčić u svibnju 2019. godine, te je po 40 jedinki tulara stavljeno u akvarije volumena vode od 3 L (Slika 11.). U pokusu su se razlikovale dvije vrste tretmana i kontrola, nakon aklimatizacije u trajanju od sedam dana. U prvom tretmanu (tretman M) su u akvarije dodane čestice mikroplastike PS, LDPE, PE i PP u jednakim udjelima, u ukupnoj koncentraciji od 2000 čestica  $L^{-1}$ . U drugom tretmanu su također dodane iste čestice mikroplastike u istim udjelima i jednakoj koncentraciji, a uz njih je dodana smjesa spojeva metilparabena, BPA, kafeina, gemifibrofila, estrogena i 1H benzotriazola (tretman MS), čija je koncentracija održavana na  $500 \text{ ngL}^{-1}$ . Određeni su triplikati (akvariji) za svaki tretman; kontrolu i dodanu mikroplastiku. Pokus je ukupno trajao 60 dana.



**Slika 11.** Dio akvarija korištenih u provedbi laboratorijskog pokusa. Foto: A. Previšić

Uzorkovanje ličinki i kukuljica tulara uz odvajanje njihovih kućica provedeno je nakon 30 dana (ličinke i kukuljice) i nakon 60 dana (kukuljice) provođenja pokusa. Uzorak sedimenta prikupljen je na kraju pokusa, odnosno nakon 60 dana provođenja pokusa.

Korištenjem optimalnog protokola razgradila sam uzorke kućica ličinki tulara, kukuljica tulara i sedimenta te sam provela identifikaciju i kvantifikaciju čestica mikroplastike. Dobivene rezultate statistički sam obradila.

### **3.2.6 Korištenje optimalnog protokola za razgradnju i detekciju za obradu uzoraka kućica tulara i sedimenta iz laboratorijskog pokusa**

Kao optimalni protokol za razgradnju i detekciju za obradu uzoraka kućica ličinki tulara, kukuljica tulara i sedimenta iz laboratorijskog pokusa odabrala sam postupak koji se sastoji od: razgradnje uzoraka u otopini vodikovog peroksida (30%; podpoglavlje 3.2.1), kojem slijedi odvajanje prema gustoći pomoću vodene otopine natrijevog bromida ( $\rho=1,266$  g/mL; podpoglavlje 3.2.2), nakon kojeg dobivene uzorke vakuumski profiltriram preko polikarbonatnog filtera i obojam otopinom Nile Red boje u kloroformu (1 ppm) te ih detektiram i kvantificiram pod lupom, uz UV svjetlo ( $\lambda = 365$  nm;

podpoglavlje 3.2.3). Prilikom kvantificiranja uzoraka bilježila sam broj i dužinu čestica mikroplastike.

Pripremila sam po jedan set triplikata kontrola za uzorke sedimenta i uzorke kućica tulara (za ličinke i za kukuljice). Za kućice ličinki tulara pripremila sam po jedan set triplikata za ličinke koje su bile tretirane tretmanom M i one koje su bile tretirane tretmanom MS. Za kućice kukuljica tulara uzorkovanih 30. dan tretmana pripremila sam po jedan set triplikata za kukuljice koje su bile tretirane tretmanom M i one koje su bile tretirane tretmanom MS. Za kućice kukuljica tulara uzorkovanih 60. dan tretmana, kojih je bilo mnogo više, priredila sam po 12 setova triplikata za kukuljice koje su bile tretirane tretmanom M i one koje su bile tretirane tretmanom MS. Sediment je sakupljen samo na kraju pokusa (60. dan tretmana). Za njega sam pripremila 12 setova triplikata za tretman M i 15 setova triplikata za tretman MS. Uzorci kućica ličinki i kukuljica sadrže jednu kućicu po uzorku, a uzorci sedimenta oko 0,5 g sedimenta po uzorku.

### **3.2.7 Statistička analiza podataka**

Za testiranje distribucije podataka koristila sam Shapiro-Wilkov test (SW). Za nezavisne uzorke od parametrijskih testova koristila sam T-test, a od neparametrijskih Mann-Whitney U test (MW U). Za vremenski ovisne uzorke koristila sam Wilcoxonov test sume rangova (WSR). U statističkoj analizi podataka koristila sam program Excel iz paketa Microsoft Office 16 i IBM-ov program SPSS Statistics 27.



## 4. REZULTATI

### 4.1 Testiranje promjene masa čestica mikroplastike prilikom razgradnje organske sastavnice

U prvom koraku testirala sam dolazi li do promjene masa čestica mikroplastike prilikom razgradnje organske sastavnice korištenjem protokola 1 i 2. Rezultati dobiveni korištenjem oba protokola (Tablica 4., Tablica 5.) testirani su Shapiro-Wilkov (SW) testom normalnosti. Odbacuje se hipoteza normalne distribucije podataka za oba protokola jer je razina značajnosti ( $p$ ) manja od 0,05 (SW  $p=0,000$ ,  $p<0,05$ ) te za daljnju analizu koristim neparametrijski Mann-Whitney U test (MW U). Rezultati analize pokazali su da prilikom korištenjem oba protokola za razgradnju organske sastavnice nema statistički značajne razlike u promjeni mase čestica mikroplastike nakon tretmana ( $U(\text{protokol 1})=1,500$ ,  $p(\text{protokol 1})=0,683$   $p>0,05$ ;  $U(\text{protokol 2})=3,000$ ;  $p(\text{protokol 2})=0,500$   $p>0,05$ ).

**Tablica 4.** Srednje vrijednosti, standardne pogreške i standardna odstupanja za razlike masa probnih čestica mikroplastike tretiranih dušičnom kiselinom i vodikovim peroksidom u omjeru 1:3, izražene u gramima.

VRSTA PLASTIKE	PE	LDPE	PS	PP
$\bar{x}$ [g] $\pm$ $\sigma_{\bar{x}}$ [g]	0,00010 $\pm$ 0,00010	0,00005 $\pm$ 0,00005	0,00005 $\pm$ 0,00005	0,00010 $\pm$ 0,00000
$\sigma$ [g]	0,00014	0,00007	0,00007	0,00000

PE=polietilen, LDPE=polietilen niske gustoće, PS=polistiren, PP=polipropilen

$\bar{x}$ =srednja vrijednost,  $\sigma_{\bar{x}}$ =standardna pogreška,  $\sigma$ =standardno odstupanje

**Tablica 5.** Srednje vrijednosti, standardne pogreške i standardna odstupanja za razlike masa probnih čestica mikroplastike tretiranih vodikovim peroksidom, izražene u gramima.

VRSTA PLASTIKE	LDPE	PE	PP	PS
$\bar{x}$ [g] $\pm$ $\sigma_{\bar{x}}$ [g]	0,00010 $\pm$ 0,00010	0,00033 $\pm$ 0,00018	0,00013 $\pm$ 0,00007	0,00033 $\pm$ 0,00033
$\sigma$ [g]	0,00017	0,00031	0,00012	0,00006

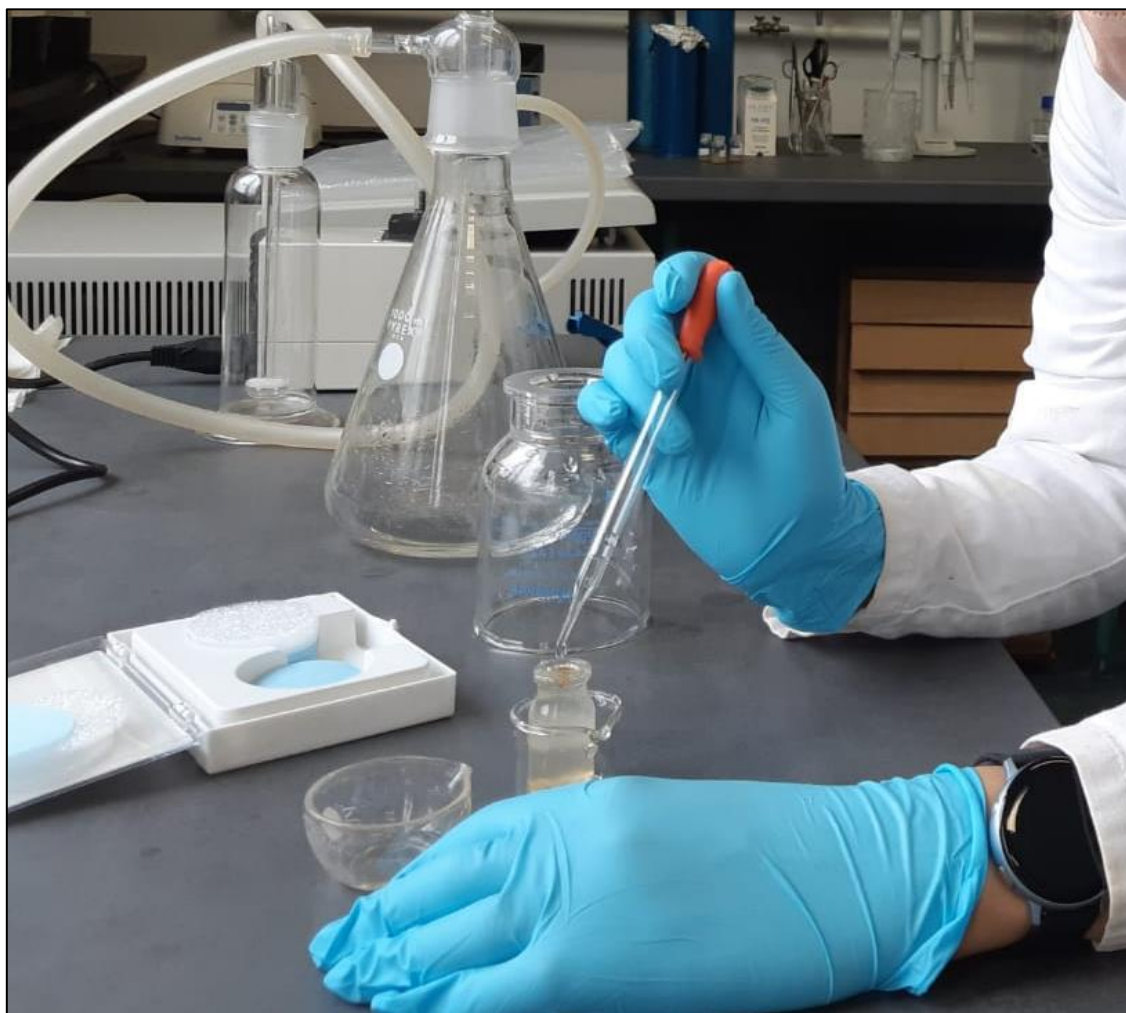
PE=polietilen, LDPE=polietilen niske gustoće, PS=polistiren, PP=polipropilen

$\bar{x}$ =srednja vrijednost,  $\sigma_{\bar{x}}$ =standardna pogreška,  $\sigma$ =standardno odstupanje

## 4.2 Odabir metode za izdvajanje čestica mikroplastike iz smjese mikroplastika-mineralni ostatak

Metoda izdvajanja čestica mikroplastike korištenjem lijevka za odjeljivanje (metoda I.) pokazala se neefikasnom jer je bilo nemoguće odvojiti krutu fazu od tekuće. Otvaranjem pipca lijevka za odjeljivanje u čašu je istovremeno ulazio miješani sadržaj taloga i gornjeg sloja otopine.

Metodom II. uspješno su izdvojene čestice mikroplastike (Slika 9., Slika 12.). Čestice mikroplastike su isplivale na površinu, zajedno s nekim česticama manje gustoće (npr. sjemene lupine). Uspješno su odvojene u čašicu i izdvojene vakuumskom filtracijom (Slika 13.). Odabrala sam metodu II. za daljnju obradu uzoraka.



**Slika 12.** Dodavanje otopine NaBr ( $\rho=1,266$  g/mL) u uzorak. Foto: I. Grgić



**Slika 13.** Vakuumska filtracija uzoraka mikroplastike i otopine NaBr ( $\rho=1,266$  g/mL). Foto: I. Grgić

### 4.3 Testiranje protokola za razgradnju organske sastavnice sedimenta i kućica tulara

Oba korištena protokola pokazala su zadovoljavajuću učinkovitost razgradnje organske sastavnice sedimenta i kućica tulara. Kod kućica tulara organska sastavnica je uspješno uklonjena te su se kućice uspješno razgradile ostavljajući samo mineralnu komponentu.

Ukupno iskorištenje čestica mikroplastike tretiranih dušičnom kiselinom i vodikovim peroksidom u omjeru 1:3 iznosi 66,11 % (Tablica 6.), a za tretman samo vodikovim peroksidom iznosi 82,78 %, bez bojanja (Tablica 7.). Za obradu eksperimentalnih uzoraka odabran je tretman samo vodikovim peroksidom.

**Tablica 6.** Ukupno iskorištenje čestica mikroplastike, srednje vrijednosti, standardne pogreške i standardna odstupanja za probne uzorke kućica tulara vrste *Micropterna nycterobia* McLachlan, 1875. i probne uzorke sedimenta tretirane dušičnom kiselinom i vodikovim peroksidom u omjeru 1:3.

<b>KUĆICE</b>	
ISKORIŠTENJE UKUPNO [%]	62,22
$\bar{x}$ [N ČESTICA] $\pm \sigma_{\bar{x}}$ [N ČESTICA]	18,67 $\pm$ 4,70
$\sigma$ [N ČESTICA]	8,14
<b>SEDIMENT</b>	
ISKORIŠTENJE UKUPNO [%]	70,00
$\bar{x}$ [N ČESTICA] $\pm \sigma_{\bar{x}}$ [N ČESTICA]	21,00 $\pm$ 1,53
$\sigma$ [N ČESTICA]	2,65
<b>UKUPNO ISKORIŠTENJE METODOM [%]</b>	<b>66,11</b>

$\bar{x}$ =srednja vrijednost,  $\sigma_{\bar{x}}$ =standardna pogreška,  $\sigma$ =standardno odstupanje

#### 4.4 Testiranje pristupa za identifikaciju i kvantifikaciju izdvojenih čestica

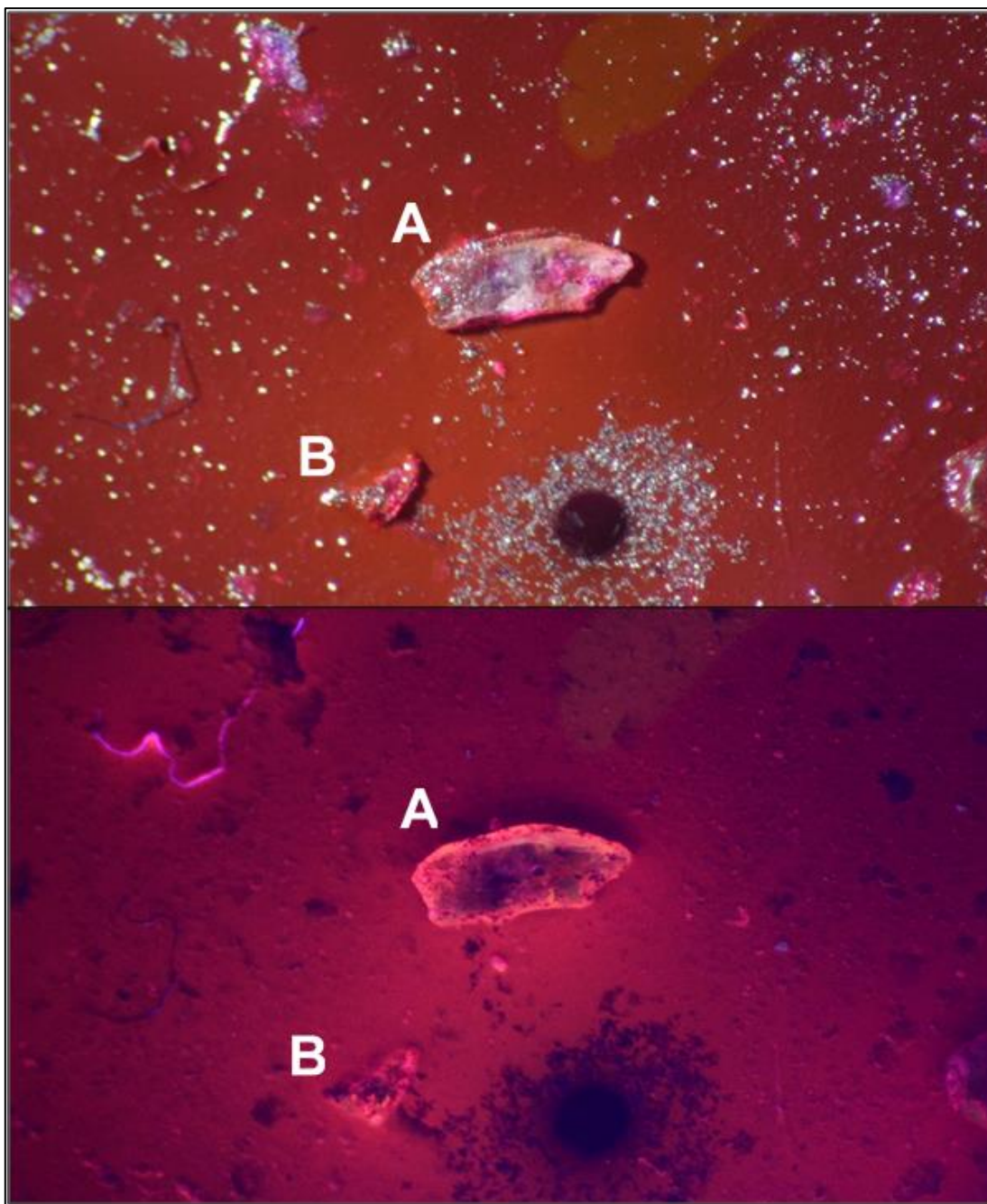
Brojanjem nebojanih čestica mikroplastike iz probnih uzoraka, razgrađenih tretmanom vodikovim peroksidom, pod lupom, pronađeno je 93,33 % čestica koje su bile dodane uzorcima kućica tulara. U sedimentu je pronađeno 82,78 % dodanih čestica mikroplastike. Iz probnih uzoraka razgrađenih istim tretmanom, obojanih Nile Red bojom pripremljenom u kloroformu pronađeno je 94,44 % čestica mikroplastike u kućicama te 87,78 % u sedimentu. Ukupno je pronađeno 5 % više čestica u probnim uzorcima koji su bili bojani Nile Red bojom (Tablica 7.). Prilikom brojanja, detekcija obojanih čestica pomoću UV svjetlosti ( $\lambda=365$  nm) bila je znatno brža i lakša od detekcije nebojanih čestica.

**Tablica 7.** Usporedba ukupnog iskorištenje čestica mikroplastike, srednje vrijednosti, standardne pogreške i standardna odstupanja za probne uzorke kućica tulara vrste *Micropterna nycterobia* McLachlan, 1875. i probne uzorke sedimenta tretiranih vodikovim peroksidom, brojanih pod lupom bez bojenja i uz bojenje Nile Red bojom.

	BEZ BOJENJA	UZ BOJENJE
<b>KUĆICE</b>		
ISKORIŠTENJE UKUPNO [%]	93,33	94,44
$\bar{x}$ [N ČESTICA] $\pm \sigma_{\bar{x}}$ [N ČESTICA]	28 $\pm$ 2	28,33 $\pm$ 1,20
$\sigma$ [N ČESTICA]	3,46	2,08
<b>SEDIMENT</b>		
ISKORIŠTENJE UKUPNO [%]	72,22	81,11
$\bar{x}$ [N ČESTICA] $\pm \sigma_{\bar{x}}$ [N ČESTICA]	21,67 $\pm$ 4,41	24,33 $\pm$ 4,7
$\sigma$ [N ČESTICA]	7,64	8,14
<b>UKUPNO ISKORIŠTENJE METODOM [%]</b>	<b>82,78</b>	<b>87,78</b>

$\bar{x}$ =srednja vrijednost,  $\sigma_{\bar{x}}$ =standardna pogreška,  $\sigma$ =standardno odstupanje





**Slika 14.** Čestice mikroplastike A i B, obojane Nile Red bojom pod svjetlom lupe (gore) i pod UV svjetlom (dolje). Foto: M. Puđak

Nakon tretmana kloroformom, koji se koristi kao otapalo za Nile Red boju, utvrđeno je da ne utječe na promjenu mase za čestice PE i LDPE. Za čestice PS zabilježen je porast mase od 13,58 %, a za čestice PP porast mase od 4,75 %.

Promjene masa plastike nakon tretmana kloroformom testirane su SW testom normalnosti. Odbacuje se hipoteza normalne distribucije podataka za tipove PE, LDPE

i PP (SW  $p=0,000$ ,  $p<0,05$ ), a za PS se prihvaća hipoteza normalne distribucije podataka (SW  $p=0,298$ ,  $p>0,05$ ).

MW U test ukazuje da za PE, LDPE i PP nema statistički značajne razlike u promjeni mase čestica mikroplastike nakon tretmana kloroformom ( $U=4,500$ ;  $p=1,000$   $p>0,05$ ). Za tip plastike PS napravljen je parametrijski T-test koji je pokazao da dolazi do statistički značajne promjene mase ( $t(2)=19,218$ ;  $p=0,003$ ,  $p<0,05$ ) kada se PS tretira kloroformom.

Polikarbonatni filtar se dodatkom kloroforma otopio. Sve čestice mikroplastike zadržale su svoj početni oblik i nakon bojanja ih se moglo jasno razlikovati. Najviše boje su upili rubovi čestica mikroplastike. Pod UV svjetlom, rubovi su najjače fluorescirali (Slika 14.). Nile Red boja obojala je neke druge strukture, poput niti ili lupine sjemena. One su također fluorescirale pod UV svjetlom, ali njih je bilo lako vizualno eliminirati kao ostale čestice. Kamenčići iz sedimenta koji su se površinski obojali Nile Red bojom nisu fluorescirali pod UV svjetlom.

#### **4.5 Korištenje optimalnog protokola za razgradnju i detekciju za obradu uzoraka kućica tulara i sedimenta iz laboratorijskog pokusa**

Kao optimalni protokol za razgradnju i detekciju za obradu uzoraka iz laboratorijskog pokusa odabran je tretman vodikovim peroksidom, nakon kojeg su otopinom natrijeva bromida čestice razdvojene na temelju gustoće, vakuumski profiltrirane, obojane Nile Red bojom i pregledane pod lupom uz detekciju UV svjetlom.

Broj čestica i dužina čestica mikroplastike pronađene u sedimentu ne pokazuje normalnu distribuciju (SW (broj)  $p=0,030$ ; SW (dužina)  $p=0,000$ ,  $p<0,05$ ). MW U broja čestica za sediment pokazao je da razlika u broju čestica nije statistički značajna ( $U=70,000$ ;  $p=0,318$ ,  $p>0,05$ ). Također, razlika u dužini čestica mikroplastike pronađene u sedimentu statistički nije značajna ( $U=330,500$ ;  $p=0,733$ ,  $p>0,05$ ; Tablica 8.).

**Tablica 8.** Srednje vrijednosti, standardne pogreške i standardna odstupanja broja i dužine čestica (u mikrometrima) za uzorke sedimenta iz laboratorijskog pokusa, tretirane vodikovim peroksidom i bojane Nile Red bojom.

	K	M	MS
$\bar{x}$ [N ČESTICA] $\pm \sigma_{\bar{x}}$ [N ČESTICA]	0,00	1,67 $\pm$ 0,45	2,33 $\pm$ 0,51
$\sigma$ [N ČESTICA]	0,00	1,56	1,99
$\bar{x}$ [ $\mu\text{m}$ ] $\pm \sigma_{\bar{x}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	0,00	274,20 $\pm$ 30,43	291,89 $\pm$ 27,82
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]	0,00	136,08	164,60

$\bar{x}$ =srednja vrijednost,  $\sigma_{\bar{x}}$ =standardna pogreška,  $\sigma$ =standardno odstupanje

K = kontrola, M = tretman M, MS = tretman MS

Broj čestica mikroplastike u kućicama ličinki i kukuljica tulara ne pokazuje normalnu distribuciju (SW  $p=0,000$ ,  $p<0,05$ ). MW U test je pokazao da nema statistički značajne razlike u broju čestica mikroplastike prisutnom između kućica ličinki koje su uzorkovane iz tretmana M i MS ( $U=9$ ;  $p=0,072$ ,  $p>0,05$ ). Nadalje, MW U test nije utvrdio statistički značajnu razliku u broju čestica mikroplastike pronađenih u kućicama kukuljica, obzirom na to jesu li uzorkovane iz tretmana M ili tretmana MS, za uzorke uzorkovane 30. dan tretmana ( $U=18,500$ ;  $p=0,361$ ,  $p>0,05$ ). Za kućice ličinki sakupljene 30. dan tretmana podatci dužine čestica nisu normalno distribuirani (SW  $p=0,000$ ;  $p<0,05$ ), dok su za kukuljice podatci dužine čestica normalno distribuirani (SW  $p=0,057$ ;  $p>0,05$ ). MW U test utvrdio je da nema statistički značajne razlike u dužini čestica mikroplastike iz kućica ličinki tulara ( $U=20,000$ ;  $p=0,899$ ,  $p>0,05$ ) i kukuljica tulara ( $t(8)=0,316$ ;  $p=0,760$ ,  $p>0,05$ ) uzorkovanih 30. dan tretmana.

Za uzorke kućica kukuljica (SW  $p=0,027$ ,  $p<0,05$ ) uzorkovanih na kraju pokusa (60. dan tretmana), statistički značajno veći broj čestica mikroplastike je pronađen u uzorcima kukuljica koje su iz tretmana M ( $U=18,500$ ;  $p=0,01$ ;  $p<0,05$ ). SW test normalnosti distribucije podataka dužine čestica mikroplastike pronađenih u kućicama uzorkovanim 60. dan tretmana i sedimentu odbacuje hipotezu normalne distribucije podataka (SW=0,000,  $p<0,05$ ). U kućicama kukuljica tulara uzorkovanih 60. dan tretmana, značajno duže čestice ( $U=25,000$ ;  $p=0,042$ ,  $p<0,05$ ) su pronađene u uzorcima iz tretmana MS (Tablica 9., Tablica 10.).



**Tablica 9.** Usporedba srednjih vrijednosti, standardnih pogrešaka i standardnih odstupanja broja i dužine čestica (u mikrometrima) za uzorke kućica ličinki i kukuljica tulara iz laboratorijskog pokusa, tretiranih vodikovim peroksidom i bojanih Nile Red bojom.

	LIČINKE			KUKULJICE		
	K	M	MS	K	M	MS
$\bar{x}$ [N ČESTICA] $\pm \sigma_{\bar{x}}$ [N ČESTICA]	0	4,67 $\pm$ 2,67	0,67 $\pm$ 0,33	0	1,67 $\pm$ 0,69	1,21 $\pm$ 0,91
$\sigma$ [N ČESTICA]	0	4,62	0,58	0	1,20	1,58
$\bar{x}$ [ $\mu\text{m}$ ] $\pm \sigma_{\bar{x}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	0	326,93 $\pm$ 100,47	310,00 $\pm$ 221,89	0	689,69 $\pm$ 382,42	775,33 $\pm$ 321,25
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]	0	375,93	384,32	0	662,38	556,41

$\bar{x}$ =srednja vrijednost,  $\sigma_{\bar{x}}$ =standardna pogreška,  $\sigma$ =standardno odstupanje

K = kontrola, M = tretman M, MS = tretman MS

**Tablica 10.** Usporedba srednjih vrijednosti, standardnih pogrešaka i standardnih odstupanja broja i dužine čestica (u mikrometrima) za uzorke kućica kukuljica tulara, iz laboratorijskog pokusa, uzorkovanih u različitim terminima, tretiranih vodikovim peroksidom i bojanih Nile Red bojom

	KUKULJICE 30. dan			KUKULJICE 60. dan		
	K	M	MS	K	M	MS
$\bar{x}$ [N ČESTICA] $\pm \sigma_{\bar{x}}$ [N ČESTICA]	0	1,33 $\pm$ 0,67	2,00 $\pm$ 1,00	0	2,00 $\pm$ 0,44	0,42 $\pm$ 0,15
$\sigma$ [N ČESTICA]	0	1,16	1,73	0	1,54	0,52
$\bar{x}$ [ $\mu\text{m}$ ] $\pm \sigma_{\bar{x}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	0	1041,00 $\pm$ 447,17	891,00 $\pm$ 252,76	0	353,88 $\pm$ 78,98	700,40 $\pm$ 228,44
$\sigma$ [ $\mu\text{m}$ ]	0	894,33	619,13	0	386,91	510,82

$\bar{x}$ =srednja vrijednost,  $\sigma_{\bar{x}}$ =standardna pogreška,  $\sigma$ =standardno odstupanje

K = kontrola, M = tretman M, MS = tretman MS

Distribucija vrijednosti vremenski zavisnih uzoraka, tj. kućica ličinki i kukuljica iz različitih tretmana nije se pokazala normalnom prema SW testu (SW  $p=0,000$ ,  $p<0,05$ ) za broj i za dužinu čestica pronađene mikroplastike. Zbog toga su vrijednosti obrađene neparametrijski, uz pomoć Wilcoxonov testa sume rangova (WSR). Za oba tretmana, analiza broja čestica između kućica ličinki i kukuljica pokazala je da nema značajnih razlika (tretman M:  $Z=0,593$ ,  $p>0,05$ ; tretman MS:  $Z=0,593$ ,  $p>0,05$ ). Isto tako, analiza dužine čestica između kućica ličinki i kukuljica pokazala je da nema značajnih razlika (tretman M:  $Z=0,109$ ,  $p>0,05$ ; tretman MS:  $Z=0,285$ ,  $p>0,05$ ). Jednako tako, nema značajnih razlika za kućice kukuljica uzorkovane 30. i 60. dan pokusa unutar istog tretmana, niti za broj čestica (tretman M:  $Z=0,00$ ,  $p>0,05$ ; tretman SM:  $Z=-1,069$ ,  $p>0,05$ ), kao ni za dužinu čestica (tretman M:  $Z=-1,604$ ,  $p>0,05$ ; tretman SM:  $Z=-1,069$ ,  $p>0,05$ ).

## 5. RASPRAVA

### 5.1 Optimizacija metode

Budući da nema statistički značajnih promjena masa čestica mikroplastike tretiranih smjesom  $\text{HNO}_3$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  u volumnom omjeru 1:3, te samo s  $\text{H}_2\text{O}_2$ , može se zaključiti da su oba otapala prikladna za razgradnju organske sastavnice jer ne reagiraju s česticama mikroplastike. Ipak, veće iskorištenje pokazala je metoda razgradnje organske sastavnice samo s  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Prilikom otapanja u smjesi  $\text{HNO}_3$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  dolazilo je do izraženog pjenjenja uzoraka. Moguće je da je dio čestica mikroplastike manje gustoće dospio na površinu i sa pjenom se prelio preko ruba vijale ili se zalijepio za stijenke vijale, tako uzrokujući konačni gubitak čestica. Izraženije pjenjenje uzoraka, povezano s manjim iskorištenjem, uočeno je i u ranijim istraživanjima gdje se kao otapalo (ili jedno od sastojaka otapala) koristila  $\text{HNO}_3$  (Claessens i sur. 2013).

Također, ranija istraživanja su pokazala da povišene koncentracije dušikovih spojeva mogu imati negativan utjecaj na ekosustav. Mogu utjecati na sastav biljnih vrsta u okolišu, zakiseljavanje tla, povišenu koncentraciju nitrata u tlu, podzemnim i nadzemnim vodama i povećanu osjetljivost šuma na suše i požare. Osim toga, mogu imati negativan utjecaj na zdravlje ljudi i životinja (Fenn i sur. 2010; Cisneros i sur. 2010). Budući da je pokazao veće iskorištenje i da bi se smanjile količine dušikovih spojeva koje će dospjeti u okoliš, kao optimalno otapalo odabran je samo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , koji se spontano raspada na neškodljivu vodu i kisik. Za vrijeme izvođenja pokusa se nije javio problem korištenja velikih količina vodikova peroksida, koji se navodi u literaturi (Hu i sur. 2019), jer su u pokusu korištene male mase uzoraka za čije su otapanje bili potrebni mali volumeni  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Prilikom izdvajanja mikroplastike iz dobivene smjese mikroplastika-mineralni ostatak metoda I. (pomoću lijevka za odjeljivanje) nije funkcionirala. Problem se javljao, jer su se kruta i tekuća faza neprestano miješale. Da bi se lijevak za odjeljivanje mogao uspješno koristiti za izdvajanje mikroplastike od mineralnog ostatka, uz njega je nužno koristiti separator čestica (Liu i sur. 2019). Ovakav pristup je prikladniji ako je riječ o uzorcima većeg volumena i mase no što su bili uzorci korišteni u ovom diplomskom radu. Kao alternativa ovoj metodi, u budućim istraživanjima bi se za manje uzorke mogao koristiti JAMSTEC-ov separator čestica mikroplastike. Riječ je o aparaturi koja

se sastoji od dva dijela. Donji dio sastoji se od staklene pločice u koju je uklopljena otvorena staklena cijev, a gornji dio od staklene pločice u koju je uklopljen stakleni cilindrični spremnik. Veličina ove aparature varira od zapremnine 30, 60 do 100 mL. Za vrijeme izdvajanja čestica, smjesa se nalazi u donjem dijelu aparature. Do izdvajanja dolazi kada se pločicama klizne jednom preko druge. Mikroplastika se nađe u supernatantu u gornjem cilindričnom spremniku. Ovo je idealna aparatura za terenski rad jer je veoma mala i lako ju se može prenositi (Nakajima i sur. 2019).

Metoda II. (izdvajanje mikroplastike iz dobivene smjese mikroplastika-mineralni ostatak temeljem razlike u gustoći između otopine NaBr i čestica mikroplastike) se pokazala veoma učinkovitom i lakom za primjenu. Čestice veće gustoće od otopine su ostajale na dnu vijale, dok su čestice manje gustoće isplivale na površinu. U česticama manje gustoće su osim čestica mikroplastike primijećene i sjemene lupine, komadići mahovine, kućice manjih puževa i niti tkanine. Osim što je ova metoda vrlo jednostavna, također je jeftina i neškodljiva za okoliš (Liu i sur. 2019). Da bi se uspješno odvojio supernatant, bilo je potrebno improvizirati aparaturu. Iako se ona pokazala vrlo učinkovitom, osobi koja se po prvi put njome služi bi možda mogla djelovati zbunjujuće pa bi u budućim istraživanjima trebalo promisliti o primjeni neke već usustavljene aparature ili o jednostavnijem dizajnu. Jedan od primjera aparature koja bi se mogla primijeniti je niz lijevaka, koji se nadovezuju jedan na drugoga, a svaki idući sadrži pore sve manjih dimenzija. Ipak, mana ove metode je što se mikroplastika javlja u različitim dimenzijama pa bi čestice većih dimenzija mogle ostati na nekom od filtara koji je bio namijenjen zadržavanju mineralnog ostatka, što bi moglo dovesti do gubitka (Zobkov i sur. 2020).

Analiza učinkovitost detekcije i kvantifikacije čestica mikroplastike bez bojanja i uz upotrebu Nile Red boje i UV svjetlosti pokazala je slične rezultate iskorištenja. Međutim, vrlo je važno spomenuti da je znatno brže i lakše bilo identificirati čestice koje su obojane i fluorescirale su pod UV svjetlom. Dodatan izazov u pregledavanju ovih uzoraka je što su u pokusu s tularima korišteni bezbojni polimeri plastike. Zbog toga je kod nebojanih uzoraka često postojala dilema je li zbilja riječ o čestici mikroplastike ili o mineralnom ostatku. Ovo je veoma česti problem općenito kod vizualne detekcije (Hidalgo-Ruz i sur. 2012). Zato bi u budućim pokusima bilo dobro koristiti obojane polimere plastike.

Mana UV detekcije je izlaganje zračenju ako aparatura za detekciju nije potpuno izolirana. Dugotrajno izlaganje UV zračenju može dovesti do opekotina na koži, oštećenja rožnice i razvoja niza neželjenih mutacija („Ultraviolet Radiation in the Workplace“ 2009, izvor: [www.labour.gov.on.ca](http://www.labour.gov.on.ca)). Zato uvijek treba biti oprezan. Važno je naglasiti da vizualna detekcija, bojanje i UV detekcija i dalje nisu kvalitativne metode. Metode koje mogu potvrditi je li uzorak zbilja mikroplastika i o kojem je polimeru riječ su primjerice spektroskopija i kromatografija (Hengstmann i Fischer 2019). Kod određenih kvalitativnih metoda, poput Ramanove spektroskopije, fluorescencija uzorka može smetati pri određivanju vrste polimera pa bi to trebalo imati na umu pri dizajniranju budućih istraživanja, koji bi uzorak kvantificirali pomoću bojanja i UV detekcije čestica (Cebeci-Maltaş i sur., „Photobleaching profile of Raman peaks and fluorescence background“ 2017, izvor: [www.europeanpharmaceuticalreview.com](http://www.europeanpharmaceuticalreview.com)).

U pokusu je zamijećen značajan porast mase PS nakon tretmana kloroformom. U prijašnjim istraživanjima se pokazalo da kloroform može donekle otopiti PS (García i sur. 2009). Budući da su u pokusu korišteni vrlo mali volumeni kloroforma, koji su gotovo odmah isparili, nije došlo do potpunog otapanja i čestice su ostale čitave. Međutim, porast u masi sugerira da je došlo do promjene. Moguće je da se počela mijenjati polimerna struktura PS, koja je u sebi zarobila dio otapala, no tu pretpostavku treba potvrditi daljnjim istraživanjem. Osim PS, kloroform je utjecao i na polikarbonatni filter. To je na neki način pomoglo detekciji jer su se čestice mikroplastike fiksirale u polikarbonatni filter pa se nisu rasipale po Petrijevoj posudici, ali u budućim pokusima koji sadrže kloroform kao otapalo bi bilo dobro odabrati filter na koji ne utječe. Kloroform je prisutan u nizu vodenih ekosustava, ali ne pokazuje bioakumulaciju i nije se pokazao štetnim za članove hranidbenog lanca. Koncentracije u kojima se nalazi u okolišu ne predstavljaju ekotoksikološki rizik, čak ni za najosjetljivije, ličinačke oblike života. Također, male količine koje dospijevaju u atmosferu ne oštećuju ozonski omotač ni ne postaju fotokemijski aktivne. Ne smatra ga se stakleničkim plinom (McCulloch 2003). Ipak, kloroform je otrovan za ljude i treba oprezno njime rukovati.

Postoje i druga otapala za Nile Red boju koja bi se mogla koristiti u budućim istraživanjima. Neka od njih su n-heksan, etil-acetat i metanol. Ovisno o otapalu, Nile Red boja će fluorescencirati u različitom spektru i različitoj boji (Liu i sur. 2014). Kao otapalo u ovom pokusu razmatran je metanol, međutim nije uspješno postignuta

fluorescencija pod UV svjetlom. Ako bi se u budućim istraživanjima koristila drugačija aparatura za detekciju, npr. fluorescencijski mikroskop, mogla bi se koristiti i druga otapala koja ne bi djelovala na mikroplastiku (Shim i sur. 2016; Hengstmann i Fischer 2019).

Iako su se sve čestice površinski prekrile bojom, nisu sve fluorescirale. Mineralni ostaci su pod UV svjetlom uočeni kao crne točkice. Sjemenje lupine su fluorescirale, ali njih je bilo lako vizualno eliminirati kao čestice koje nisu mikroplastika. Kod mikroplastike su najviše fluorescirali rubovi jer su oni raslojeni pa su upili najviše boje. O strukturi tvari ovisi hoće li ona fluorescirati ili ne. Nile Red dobro fluorescira kada se veže za hidrofobne molekule koje sadrže duge lance, kakve su molekule polimera plastike (Shim i sur. 2016; Tamminga i sur. 2017.; Hengstmann i Fischer 2019).

## 5.2 Validacija metode

Čestice mikroplastike koje su se našle u akvarijskoj vodi mogle su završiti ugrađene u kućicama tulara, zaostati na mahovini, ostati plutati u stupcu vode ili se nataložiti u sedimentu i na stjenkama akvarija (Eerkes-Medrano i sur. 2015; Ehlers i sur. 2019).

Budući da su količina mahovine i gustoća jedinki bile ujednačene između tretmana, ne iznenađuje da u sedimentu nije utvrđena značajna razlika u broju čestica ni u veličini između tretmana M i MS. Vjerojatno je razlog tomu što je gustoća jedinki tulara korištenih u pokusu premala da bi utjecala na brzinu uklanjanja mikroplastike iz sedimenta, npr. ugradnjom u kućice ili slučajnim gutanjem (Ehlers i sur. 2019).

Vrste tulara roda *Micropterna* pokazuju određene vrste preferencije prema česticama koje ugrađuju u kućice, ovisno o razvojnem stadiju. Za kukuljenje se mijenjaju ili nadograđuju kućice ličinki (Ehlers i sur. 2020). Tako su u prirodi u kukuljice vrsta roda *Micropterna* ugrađene krupnije čestice nego kod ličinki, isključivo od kamenja, dok ličinke često kombiniraju kamenčiće s organskim supstratom, kao što su komadići grančica i lišća (Giller i Malmqvist 1998). Za očekivati bi bilo da će postojati statistički značajna razlika u broju s obzirom na vrijeme, posebno u veličini čestica između kućica ličinki i kukuljica, ali ona nije pronađena u ovom radu. Bilo bi dobro ponoviti pokus s većim brojem jedinki, pogotovo ličinki, da se utvrdi je li ovakav rezultat slučajan ili ne.

Međutim, postoji značajna razlika u broju i dužini čestica mikroplastike u kućicama kukuljica između različitih tretmana na kraju pokusa (60. dan). Odnosno, nađen je

značajno veći broj čestica u tretmanu M u odnosu na MS, te značajno duže čestice u tretmanu MS u odnosu na M. U tretmanu MS su bile otopljene dodatne tvari (smjesa farmaceutika i hormona) koje su se mogle adsorbirati na površinu čestica mikroplastike i/ili utjecati na brzinu i intenzitet formiranja bakterijskog obraštaja na istima. Čestice većih dimenzija na sebe su mogle adsorbirati više otopljenih tvari, što je moglo utjecati na njihovu gustoću i uzrokovati da s vremenom potonu na dno (Wang i sur. 2016; Eerkes-Medrano i sur. 2015). Na dnu bi postale dostupne tularima za ugradnju, što bi objasnilo zašto su tulari iz tretmana MS nakon duljeg vremena u svojim kućicama sadržavali čestice mikroplastike znatno većih dimenzija (Ehlers i sur. 2020). S druge strane, samu razliku u broju čestica između dva spomenuta tretmana na kraju pokusa teško je objasniti uz pomoć postojećih podataka i trenutnog znanja o ugradnji mikroplastike u biogene tvorbe kao što su kućice tulara (Ehlers i sur. 2020).

Unutar istih tretmana nema razlike u ugradnji mikroplastike kroz vrijeme, ni u broju ni u veličini čestica, u kućice različitih stadija tulara. Ovo je pokazatelj da je razlika u tretmanima odgovorna za razlike u ugradnji različitog broja i dimenzija čestica mikroplastike. Razlike među tretmanima ukazuju da bi utjecaj i interakcija više stresora mogli utjecati na ponašanje mikroplastike u okolišu. To je u skladu s prijašnjim spoznajama koje su utvrdile da se u kombinaciji s onečišćenjem mikroplastika mijenja svoja svojstva i ponašanje (Wang i sur. 2016, Eerkes-Medrano i sur. 2015). Trebalo bi dizajnirati pokus koji bi točnije utvrdio utjecaj farmaceutika i endokrinih disruptora na mikroplastiku, ali i na tulara (Stevens i sur. 2000). Osim toga, da bi se dodatno provjerio potencijal zadržavanja mikroplastike u ekosustavu, iz ovog pokusa bi bilo dobro napraviti analizu tkiva tulara i mahovina.

## 6. ZAKLJUČAK

Ovim radom utvrđeno je:

- Kao protokol za razgradnju organske sastavnice učinkovito se može koristiti tretman smjesom  $\text{HNO}_3$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , u volumnom omjeru 1:3, kao i tretman samo s  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $\text{H}_2\text{O}_2$  je manje štetan za okoliš i pogodan je za obradu manjeg broja uzoraka pa je odabran kao optimalno otapalo za organsku sastavnicu.
- Lijevak za odjeljivanje nije prikladna aparatura za izdvajanje mikroplastike iz smjese mikroplastika-mineralni ostatak. Nasuprot tome, otopina NaBr veće gustoće od čestica mikroplastike prisutnih u uzorku pokazala se optimalnom za izdvajanje mikroplastike iz smjese, te treba dizajnirati prikladniju aparaturu koja bi olakšala odjeljivanje temeljem gustoće.
- Detekcija obojanih uzoraka pod UV svjetlom je mnogo brža i lakša od detekcije bez bojanja, međutim ni jedna od ovih vrsta detekcije ne daje podatke o tipu mikroplastike u uzorku i u daljnjim istraživanjima bi ih trebalo kombinirati s kvalitativnom metodom. Budući da kloroform može utjecati na svojstva plastike, treba se isprobati učinkovitost bojanja i utjecaj drugih otapala za Nile Red boju.
- U laboratorijskom pokusu s tularima, unutar istih tretmana nema razlike u ugradnji mikroplastike u kućice različitih stadija tulara tijekom vremena, niti u broju, ni u veličini čestica. Nasuprot tome, nađena razlika u veličini i broju ugrađenih čestica između različitih tretmana na kraju pokusa, najvjerojatnije je povezana s razlikama u adsorpciji, formiranju obraštaja, te kruženjem i sedimentacijom čestica mikroplastike. Navedeni rezultat ukazuje na nužnost provođenja dodatnih pokusa koji će utvrditi ponašanje čestica mikroplastike u uvjetima višestrukih stresora.



## 7. LITERATURA

- Abbasi S., Soltani N., Keshavarzi B., Moore F., Turner A., Hassanaghahi M. (2018): Microplastics in different tissues of fish and prawn from the Musa Estuary, Persian Gulf. *Chemosphere* 205: 80-87.
- Al-Azzawi M.S.M., Kefer S., Weißer J., Reichel J., Schwaller C., Glas K., Knoop O., Drewes J.E. (2020): Validation of Sample Preparation Methods for Microplastic Analysis in Wastewater Matrices—Reproducibility and Standardization. *Water* 12 (9): 2445.
- Arthur C., Baker J. (2011): Proceedings of the Second Research Workshop on Microplastic Debris. NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R-39.
- Auta H.S., Emenike C.U., 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., Regoli F. (2015): Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution* 198: 211-222.
- Barnes D. K. A., Galgani F., Thompson R. C., Barlaz M. (2009): Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 1985–1998.
- Blettler M.C.M., Ulla M.A., Rabuffetti A.P., Garelo N. (2017): Plastic pollution in freshwater ecosystems: macro-, meso-, and microplastic debris in a floodplain lake. *Environmental Monitoring and Assessment* 189: 581.
- Cisneros R., Bytnerowicz A., Schweizer D., Zhong S., Traina S., Bennett D.H. (2010): Ozone, nitric acid, and ammonia air pollution is unhealthy for people and ecosystems in southern Sierra Nevada, California. *Environ Pollut.* 158 (10): 3261-71.
- 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. *Mar Pollut Bull* 70:227–233.

- Cole M., Webb H., Lindeque P.K., Fileman E.S., Halsband C., Galloway T.S. (2014): Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Sci Rep* 4: 4528.
- Dražić K. (2020): Evaluacija sadržaja mikroplastike u mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) uz hrvatsku obalu Jadrana. Diplomski rad. Split: Sveučilište u Splitu.
- Duis K., Coors A., (2016): Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environ. Sci. Eur.* 28: 2.
- Eerkes-Medrano D., Thompson R. C., 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., Al Najjar T., Taupp T. Koop J.H.E. (2020): PVC and PET microplastics in caddisfly (*Lepidostoma basale*) cases reduce case stability. *Environ Sci Pollut Res* 27: 22380–22389 (2020).
- Ehlers S. M., Manz W., Koop J. H. E. (2019): Microplastics of different characteristics are incorporated into the larval cases of the freshwater caddisfly *Lepidostoma basale*. *Aquatic Biology* 28: 67-77.
- Fenn M.E., Allen E.B., Weiss S.B., Jovan S., Geiser L.H., Tonnesen G.S., Johnson R.F., Rao L.E., Gimeno B.S., Yuan F., Meixner T., Bytnerowicz A. (2010): Nitrogen critical loads and management alternatives for N-impacted ecosystems in California. *Journal of Environmental Management* 91 (12): 2404-2423.
- García M. T., Gracia I., Duque G., Lucas A., Rodríguez J. F. (2009): Study of the solubility and stability of polystyrene wastes in a dissolution recycling process. *Waste Management* 29 (6): 1814-1818.
- Geyer R., Jambeck J. R., Law K. L. (2017): Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances* 3: e1700782.

- Giller P. S., Malmqvist B. (1998): The biology of streams and rivers. Oxford University Press, Oxford, UK.
- González-Pleiter M., Tamayo-Belda M., Pulido-Reyes G., Amariei G., Leganés F., Rosal R., Fernández-Piñas F. (2019): Secondary nanoplastics released from a biodegradable microplastic severely impact freshwater environments. *Environ. Sci.* 6: 1382
- Green D.S., Boots B., Sigwart J., Jiang S., Rocha C. (2016): Effects of conventional and biodegradable microplastics on a marine ecosystem engineer (*Arenicola marina*) and sediment nutrient cycling. *Environmental Pollution* 208: 426-434.
- Hengstmann E., Fischer E. K. (2019): Nile red staining in microplastic analysis—proposal for a reliable and fast identification approach for large microplastics. *Environ Monit Assess* 191: 612-621.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. (2012): Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science & Technology* 46: 3060–3075.
- Hidalgo-Ruz V., Thiel M. (2013): Distribution and abundance of small plastic debris on beaches in the SE Pacific (Chile): a study supported by a citizen science project. *Mar. Environ. Res.* 87/88:12–18.
- Hu Y., Gong M., Wang J., Bassi A. (2019): Current research trends on microplastic pollution from wastewater systems: a critical review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 18, 207–230.
- Karlsson T. M., Vethaak A. D., Almroth B. C., Ariese F., van Velzen M., Hassellöv M., Leslie H. A. (2017): Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastic accumulation. *Marine Pollution Bulletin* 122: 403-408.
- Khosrovyan A., Gabrielyan B., Kahru A. (2020): Ingestion and effects of virgin polyamide microplastics on *Chironomus riparius* adult larvae and adult zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere* 259: 127456.

- Kolandhasamy P., Su L., Li J., Qu X., Jabeen K., Shi H. (2018): Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: A novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *Science of the Total Environment* 610–611: 635–640.
- Lechner A., Keckeis H., Lumesberger-Loisl F., Zens B., Krusch R., Tritthart M., Glas M., Schludermann E. (2014): The Danube so colourful: a potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environ. Pollut.* 188:177–181.
- Li J, Liu H, Paul Chen J. (2018): Microplastics in freshwater systems: a review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Res* 137:362–374.
- Liu M., Song Y., Lu S., Qiu R., Hu J., Li X., Bigalke M., Shi H., He D. (2019): A method for extracting soil microplastics through circulation of sodium bromide solutions. *Science of the Total Environment* 691: 341–347.
- Liu S., Wu Q., Bai B., Ma Y., Wei M., Yin X., Neeves K. (2014): Optic Imaging Of Oil/water Flow Behavior In Nano-scale Channels. *Proceedings - SPE Symposium on Improved Oil Recovery*. 2.
- Lusher A., Welden N., Sobral P., Cole M. (2017): Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Analytical Methods* 9: 9.
- McCulloch A. (2003): Chloroform in the environment: occurrence, sources, sinks and effects. *Chemosphere* 50 (10): 1291-1308.
- Naidoo T., Goordiyal K., Glassom D. (2017): Are Nitric Acid (HNO<sub>3</sub>) Digestions Efficient in Isolating Microplastics from Juvenile Fish? *Water Air Soil Pollut* 228: 470.
- Nakajima R., Tsuchiya M., Lindsay D. J., Kitahashi T., Fujikura K., Fukushima T. (2019): A new small device made of glass for separating microplastics from marine and freshwater sediments. *PeerJ* 7: e7915.
- Nel H.A., Froneman P.W. (2018): Presence of microplastics in the tube structure of the reef-building polychaete *Gunnarea gaimardi* (Quatrefages 1848). *Afr J Mar Sci* 40: 87–89.

- Poerio T., Piacentini E., Mazzei R. (2019): Membrane Processes for Microplastic Removal. *Molecules* 24: 4148
- Ragusa A., Svelato A., Santacroce C., Catalano P., Notarstefano V., Carnevali O. Papa F., Rongioletti M.C.A., Baiocco F., Draghi S., D'Amore E., Rinaldo D., Matta M., Giorginic E. (2021): Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environ. Int.* 146: 106274.
- Shim W.J., Song Y.K., Hong S.H., Jang M. (2016): Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine Pollution Bulletin* 113: 469-476
- Simpson S.L., Batley G.E., Chariton A.A., Stauber J.L., King C.K., Chapman J.C., Hyne R.V., Gale S.A., Roach A.C., Maher W.A. (2005): *Handbook for Sediment Quality Assessment*. CSIRO: Bangor, NSW.
- Stevens D. J., Hansell M. H., Monaghan P. (2000): Developmental trade-offs and life histories: strategic allocation of resources in caddis flies. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 1511–1515.
- Tagg A.S., Harrison J.P., Ju-nam Y., Sapp M., Bradley E.L., Sinclair C.J., Ojeda J.J. (2017): Fenton's reagent for the rapid and efficient isolation of microplastics from wastewater. *Chem Commun* 53:372–375.
- Tamminga M., Hengstmann E., Fischer E. (2017): Nile Red Staining as a Subsidiary Method for Microplastic Quantification: A Comparison of Three Solvents and Factors Influencing Application Reliability. *Journal of Earth Sciences & Environmental Studies* 2:2.
- Van Cauwenberghe L., Devriese L., Galgani F., Robbins J., Janssen C. R. (2015): Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research* 111: 5-17
- Wagner M., Scherer C., Alvarez-Muñoz D., Brennholt N., Bourrain X., Buchinger S., Fries E., Grosbois C., Klasmeier J., Marti T., Rodriguez-Mozaz S., Urbatzka R., Vethaak A.D., Winther-Nielsen M., Reifferscheid G. (2014): Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe* 26: 12-21.

Walker T. R. (2021): (Micro)plastics and the UN Sustainable Development Goals. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 30: 100497.

Wang J., Tan Z., Peng J., Qiu Q., Li M. (2016): The behaviors of microplastics in the marine environment. *Marine Environmental Research* 113: 7-17.

Wright S.L., Thompson R.C., Galloway T.S. (2013): The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental Pollution*, 3: 1-10.

Zobkov M., Zobkova M., Galakhina N., Efremova T. (2020): Method for microplastics extraction from Lake sediments, *Methods X* (7): 101140

Zubris K.A., Richards B.K. (2005): Synthetic fibers as an indicator of land application of sludge. *Environ Pollut* 138:201–211.

[www.acs.org](http://www.acs.org) (pristupljeno 19.6.2021.)

[www.amesweb.info](http://www.amesweb.info) (pristupljeno 13.6.2021.)

[www.europeanpharmaceuticalreview.com](http://www.europeanpharmaceuticalreview.com) (pristupljeno 1.7.2021.)

[www.labour.gov.on.ca](http://www.labour.gov.on.ca) (pristupljeno 1.7.2021.)

[www.plastics.ulprospector.com/](http://www.plastics.ulprospector.com/) (pristupljeno 13.6.2021.)

[www.statista.com](http://www.statista.com) (pristupljeno 19.6.2021.)

## 8. ŽIVOTOPIS

Matea Puđak rođena je 1995. u Zagrebu. Završila je „Osnovnu školu dr. Ivan Merz“ i „Privatnu klasičnu gimnaziju s pravom javnosti“ u Zagrebu. 2014. godine upisuje se na Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije, smjer: nastavnički; na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Tečno govori engleski, a zna i osnove danskog, švedskog i španjolskog. Za vrijeme studija je provela jedan semestar u Danskoj na programu „Nature in Social Education“, u sklopu kojeg je odradila praksu u danskoj osnovnoj školi „Hestehaveskole“.

Dvije je godine vodila Sekciju za edukaciju u Udruzi studenata biologije BIUS, čiji je član četiri godine, a također je član studentske sekcije Hrvatskog kemijskog društva, Znanstvene čarolije, šest godina. U sklopu ovih udruga se dugo volonterski bavila popularizacijom znanosti za javnost, primarno učenike osnovnih i srednjih škola. Volonterski je također dva puta bila mentor na Ljetnoj tvornici znanosti gdje je provodila interaktivne znanstvene radionice s učenicima.

Sudjelovala je na raznim znanstveno-popularizacijskim događanjima, kao što su Dan za znanost u Koprivnici, Znanstveni piknik, Festival znanosti u Tehničkom muzeju i Noć biologije. Pisala je za časopis In Vivo na temu „Mikroplastika naša svagdašnja“. Osim toga, vodila je demonstrature iz kolegija Beskralješnjaci, radila godinu dana kao edukator u Zoološkom vrtu i šest godina kao edukator u Javnoj ustanovi Maksimir, te održavala STEM radionice za učenike za razne poslodavce. Za izdavačku kuću Alfa je sudjelovala u osmišljanju i izvođenju radionica iz biologije, a za Školsku knjigu je sastavljala dodatne udžbeničke sadržaje.

Trenutno radi kao nastavnica biologije i kemije u Privatnoj klasičnoj gimnaziji s pravom javnosti.