

Metode razgradnje, izolacije i identifikacije mikroplastike prisutne u sadržaju probavila riba

Datković, Dubravka

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:405125>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJI

Dubravka Datković

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJI

Dubravka Datković

**METODE RAZGRADNJE, IZOLACIJE I IDENTIFIKACIJE
MIKROPLASTIKE PRISUTNE U SADRŽAJU
PROBAVILA RIBA**

DIPLOMSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Komentor: dr.sc. Vlatka Filipović Marijić

Članovi ispitnog povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

doc. dr. sc. Vesna Očelić Bulatović

dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

Zagreb, rujan 2023.



Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekata Hrvatske zaklade za znanost „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ (IP-2019-04-9661) i „Integrirana procjena odgovora akvatičkih organizama na izloženost metalima: ekspresija gena, bioraspoloživost, toksičnost i biomarkerski odgovori“ (IP-2020-02-8502) na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu i Institutu Ruđer Bošković. Dio uzoraka osiguran je u okviru projekata Ribarsko-znanstvene suradnje s Općinom Gradac te Gradom Ploče, u okviru mjere I.3. Partnerstva između znanstvenika i ribara, u sklopu provedbe Operativnog programa za pomorstvo i ribarstvo Republike Hrvatske.

ZAHVALA

Prije svega, zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Dajani Kučić Grgić i komentorici dr. sc. Vlatki Filipović Marijić na stručnom vodstvu, konstruktivnim savjetima, riječima ohrabrenja i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se asistenticama Martini Miloloži i Kristini Bule te tehničarki Marijani Vidaković na strpljenju, trudu i uloženom vremenu, ali i savjetima za izradu ovog rada.

Za kraj, veliko hvala mom suprugu Ivanu, mojoj obitelji, prijateljima, a osobito kolegici i prijateljici Mariji Kuštro s kojom sam, uz puno zajedničkog rada i truda, osvojila Rektorovu nagradu te hvala i Studentskoj sekciji Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa koji su mi bili velika podrška i motivacija u dosadašnjem studiranju.

SAŽETAK

Plastika je postala sveprisutan materijal u vodenim ekosustavima. Masovna proizvodnja dovela je i do masovnog nastajanja plastičnog otpada koji raznim procesima u prirodi postaje mikroplastični (MP) otpad te nerijetko završi upravo u vodenim staništima. Zbog dokazanih toksičnih učinaka na živi svijet MP se smatra globalnom onečišćujućom tvari u slatkovodnim i morskim ekosustavima, osobito zbog mogućnosti transporta kroz trofičke razine sve do čovjeka.

Ribe su u vodi konstantno izložene riziku unosa i akumulacije MP čestica u njihov organizam. Mogu poslužiti kao dobri bioindikator, a dosadašnja istraživanja ukazuju na visoku stopu pronalaska čestica MP-a u probavnom sustavu riba. Razvijanje metoda za izolaciju i točno kvantificiranje MP-a u morskim i slatkovodnim staništima sve je važnije. Za praćenje prostorne distribucije i vremenskih trendova morskog MP otpada, izrazito je važno razviti i implementirati standardizirane protokole, kako bi se učinkovito i točno odredila količina MP-a u različitim staništima.

U ovome radu ispitivao se utjecaj razgradnje primjenom četiri različite metode na izolaciju i određivanje MP čestica iz probavila riba iz slatkovodnih i morskih ekosustava Republike Hrvatske. Dobiveni rezultati ukazuju da je kombinacija dušične kiseline, HNO_3 i fluorovodične kiseline, HF najprikladnija metoda za izolaciju MP iz probavila riba, s minimalnim utjecajem na njezinu strukturu. U sadržaju probavila svih analiziranih jedinki riba identificirane su MP čestice, čime smo potvrdili njezinu prisutnost i unos u organizme vodenih ekosustava.

Ključne riječi: mikroplastika, bioindikator, ribe, metodologija izolacije mikropalstike

ABSTRACT

Plastic has become a ubiquitous material in aquatic ecosystems. Its mass production has also led to the mass formation of plastic waste, which through various processes in nature becomes microplastic (MP) waste and often ends up in aquatic habitats. Due to its proven toxic effects on living things, MP is considered a global contaminant in freshwater and marine ecosystems, especially regarding the possible transportation through trophic levels, all the way to humans. In water, fish are constantly exposed to the risk of ingestion and accumulation of MP particles in their organism. They can serve as good bioindicators, and previous research indicates a high rate of finding MP particles in the digestive system of fish.

Development of methods for isolation and accurate quantification of MP in marine and freshwater habitats is increasingly important. For monitoring of the spatial distribution and temporal trends of marine MP debris, development and implementation of standardized protocols is highly important, in order to efficiently and accurately determine the quantity of MP in different habitats.

In this work, the influence of digestion by four different methodologies on isolation and determination of MP particles from the intestine of fish from freshwater and marine ecosystems of the Republic of Croatia were examined. The obtained results indicate that combination of nitric acid, HNO₃, and hydrofluoric acid, HF represents the most appropriate methodology for MP isolation from fish intestine, with minimum influence on its structure. The particles of MP were identified in the gut content of all analysed fish, therefore confirming its presence and uptake in aquatic organisms.

Key words: microplastic, bioindicators, fish, methodology for microplastic isolation

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opći dio	2
2.1. Vodeni ekosustavi	2
2.1.1. Morski ekosustavi	2
2.1.2. Slatkovodni ekosustavi	3
2.2. Onečišćenje vodenih ekosustava	3
2.3. Mikroplastika	5
2.3.1. Polietilen (PE)	6
2.3.2. Polistiren (PS)	7
2.3.3. Poli(vinil-klorid) (PVC)	7
2.3.4. Polipropilen (PP)	8
2.4. Mikroplastika u vodenom ekosustavu	10
2.5. Morske i slatkovodne ribe kao bioindikatori	12
2.5.1. Vrste bioindikatorskih riba iz vodenih ekosustava u Hrvatskoj	14
2.5.1.1. Morske ribe	14
2.5.1.2. Katadromne ribe	16
2.5.1.3. Slatkovodne ribe	17
2.6. Izolacija mikroplastike iz riba	17
3. Eksperimentalni dio	20
3.1. Materijali	20
3.1.1. Mikroplastika	20
3.1.2. Silicijev dioksid	20
3.1.3. Kemikalije	21
3.1.4. Uzorci riba	21
3.2. Mjerni instrumenti i oprema	23
3.3. Metode rada	23

3.3.1. Analize na mikroplastici	23
3.3.2. Analize na silicijevom dioksidu, SiO ₂	26
3.3.3. Analize na probavilu riba	26
4. Rezultati i rasprava	28
4.1. Odvage MP-a primjenom razgradnje s HNO ₃	28
4.2. Odvage MP-a primjenom razgradnje s kombinacijom HNO ₃ i H ₂ O ₂	29
4.3. Odvage MP-a primjenom razgradnje s kombinacijom HNO ₃ i HF	30
4.4. Odvage MP-a primjenom razgradnje s 10% KOH	30
4.5. Razgradnja SiO ₂ primjenom četiri različite metode.....	32
4.6. FTIR-ATR analiza	33
4.7. Biometrijski pokazatelji riba korištenih za izolaciju MP-a iz sadržaja probavila	35
4.8. Izolacija i identifikacija MP-a iz sadržaja probavila riba.....	37
5. Zaključak.....	43
6. Popis kratica	44
7. Literatura.....	45

1. Uvod

Onečišćenje plastikom posljednjih godina zabrinjava znanstvenu zajednicu te postaje jedan od glavnih globalnih problema u sektoru zaštite okoliša. Prisutnost plastike u okolišu posljedično utječe i na organizme, ponajviše jer se razgrađuje na mikroplastiku (MP, čestice manje od 5 mm) koju nalazimo u različitim vrstama vodenih životinja, uključujući i ribe koje putem hranidbenog lanca lako mogu prenijeti čestice MP sve do ljudi. Upravo se zbog svojih toksičnih učinaka na ribe i ljude MP smatra globalnim problemom današnjice.

Ribe su vitalni izvor ljudskih proteina koji su neophodni za rast i razvoj tijela te su važan dio prehrambenih navika ljudi. Zbog toga je onečišćenje ribe MP-om velika opasnost i za ljudsko zdravlje te zahtijeva posebnu pozornost. Nakon izlaganja MP-u, zasebno ili u kombinaciji s drugim onečišćujućim tvarima, ribe mogu doživjeti niz zdravstvenih problema. MP može uzrokovati oštećenje tkiva, oksidativni stres i promjene u ekspresiji gena povezanih s imunološkim sustavom, dok se na razini organizma uočavaju negativne promjene poput usporavanja rasta i abnormalnosti u ponašanju.¹

Za praćenje prostorne distribucije i vremenskih trendova morskog MP otpada, od vitalne je važnosti razviti i implementirati standardizirane protokole koji mogu učinkovito i točno detektirati i kvantificirati MP u različitim staništima, poput morskih i slatkovodnih ekosustava. Osim toga, vrlo važno je razviti i pouzdane metode izolacije i određivanja MP u organizmima. U riba se provodi izolacija MP čestica iz probavila, kao mjesta unosa putem hrane, što predstavlja zahtjevan proces. S jedne strane nužno je razgraditi organski dio crijevnog sadržaja, ali i ukloniti anorganski dio koji se unese hranom s morskog dna, poput kamenčića i sl., pritom pazeći da se očuva plastiku u izvornom obliku, odnosno da se prilikom izolacije ne deformira ili na bilo koji način promijene njezina svojstva, oblik, veličina ili boja.

U tu svrhu su u ovom radu ispitane četiri metode razgradnje MP-a pomoću različitih kombinacija otopina HNO_3 , H_2O_2 , KOH i HF . Primjenom pet vrsta MP-a (LDPE, HDPE, PS, PVC i PP) ispitala se i odredila optimalna metoda razgradnje, koja minimalno utječe na izvorni oblik MP-a. Nakon izlaganja kiselinama, analizirala se MP kvantitativno (odvaga) i kvalitativno (mikroskopski i FTIR-ATR spektroskopijom) kako bi se utvrdilo da li je došlo do narušavanja oblika i strukture ispitivanih vrsta MP-a. Zatim se provela konkretna primjena razgradnjom i izolacijom MP-a iz probavila morskih i slatkovodnih riba primjenom metode koja se prethodno pokazala kao najuspješnija, a to je bila kombinacija HNO_3 i HF , kojom je uspješno izolirana MP iz sva 22 uzorka jedinki riba.

2. Opći dio

2.1. Vodeni ekosustavi

Ekosustav ili biogeocenoza je prirodna zajednica živih organizama i nežive prirode koji međusobno djeluju na jednome staništu, a izmjena tvari među njima je kružna. Ekosustav čine životne zajednice biocenoze, odnosno biljke (fitocenoza) i životinje (zoocenoza) te neživi okoliš tj. biotop u užem smislu.¹ U svim ekosustavima u prirodi najbitnije je načelo samoregulacije, tj. održavanja broja pripadnika na optimalnoj razini. Svaka promjena jednoga dijela ekosustava uzrokuje promjene u ponašanju cjeline.

Vodeni ekosustavi uključuju oceane, jezera, rijeke, potoke, ušća i močvarna područja. Međutim, dijele se na dvije osnovne skupine, a to su morski i slatkovodni ekosustavi koji pokrivaju čak 70% Zemljine površine. U navedenim područjima žive živa bića koja ovise o vodi i takvi ekosustavi su vrlo krhki i podložni onečišćenju jer ih sve povezuje upravo voda.² Klasifikacija vodenih ekosustava raspodijeljena je prema organizmima od dna do vrha, a čine ju: bentos (organizmi koji žive na dnu mora ili slatkovodnih sustava), nekton (organizmi koji se aktivno kreću neovisno o strujama), plankton (organizmi koji plutaju) i neuston (organizmi koji žive na površini vodenih tijela).²

2.1.1. Morski ekosustavi

Morski ekosustav je vrsta vodenog ekosustava kojeg karakterizira slana voda kao glavna komponenta. Uključuje razne oblike ekosustava, kao što su mora, oceani, slane močvare, koraljni grebeni, plitke obalne vode, estuariji, obalne lagune sa slanom vodom, stjenovite obale i obalna područja. Veliki morski ekosustavi nalaze se oko rubova kontinenata. Velik broj njih, točnije 66 u svijetu, je ugroženo te je zaštićeno određenim mjerama zaštite prema različitim ekološkim kriterijima. Čak 75% globalnog ulova morske ribe dolazi upravo iz navedenih područja te doprinose globalnom gospodarstvu s procijenjenih 12,6 trilijuna dolara godišnje.³

Morski ekosustavi izvor su ogromnog biološkog bogatstva, kojega čine različiti biološki čimbenici poput primarnih proizvođača, algi i morskih biljki, zatim primarnih potrošača, zooplanktona i mekušaca, ali i sekundarnih potrošača poput malih riba mesožderki te tercijarnih potrošača poput velikih riba mesožderki. Također određeni abiotički čimbenici definiraju karakteristike ovih prirodnih ekosustava, kao npr. temperatura, slanost, pH vode i drugi te količina sunčeve svjetlosti koja dopire do ekosustava.^{2,3}

2.1.2. Slatkovodni ekosustavi

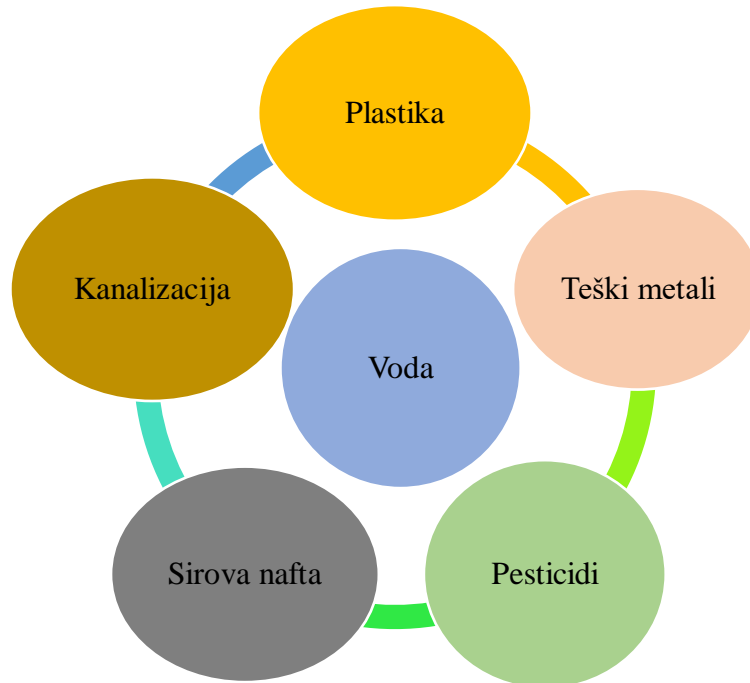
Svako živo biće na Zemlji treba vodu da bi preživjelo, od toga više od 100 000 vrsta, uključujući i ljude, treba slatku vodu da bi preživjelo. Manje od tri posto vode na našem planetu je slatka voda, od čega je manje od polovice dostupno kao tekućina, ostatak je zatočen kao led u polarnim kapama i ledenjacima. Iz tih su razloga slatkovodni ekosustavi dragocjen resurs. Slatkovodni ekosustavi prirodno dijele resurse među staništima. Ekosustavi u rijekama i potocima donose soli i hranjive tvari s planina u jezera, bare i močvare na nižim nadmorskim visinama, a na kraju te hranjive tvari odnose u ocean. Takvi vodeni putevi također omogućuju migrirajućim vrstama da donesu hranjive tvari iz oceana u uzvodne slatkovodne ekosustave.⁴ Uz navedeno, i vodeni organizmi su u stalnim međusobnim interakcijama kroz hranidbenu mrežu ekosustava, ali i u interakciji sa svojim okolišem.

2.2. Onečišćenje vodenih ekosustava

Oba navedena ekosustava pružaju širok raspon dobara i usluga kao i prirodne resurse, načine trgovanja i prijevoza te mogućnosti za rekreaciju ljudske populacije. Zaštita navedenih funkcija zahtijeva širok pristup. Politike o slatkovodnom i morskom okolišu trebaju se integrirati s onima o prilagodbi klimatskim promjenama i biološkoj raznolikosti, ali također i s različitim povezanim sektorima kao što su poljoprivreda, turizam, energetika i prijevoz. Europski slatkovodni resursi pod sve su većim pritiskom, a priobalna područja i mora značajno su se izmijenila kao posljedica ljudskih aktivnosti kroz protekla stoljeća. To je uzrokovalo ekološke promjene u priobalnim i morskim ekosustavima kao što su onečišćenje vode i eutrofikacija, gubitak biološke raznolikosti, uništavanje krajolika i erozija obale. Najčešći izvori onečišćenja vodenih ekosustava prikazani su na Slici 1.

Dobro ekološko stanje ekosustava koncept je od širokog interesa za koji je teško dati jednu preciznu znanstvenu definiciju. Temelji se na višestrukim usporedbama stanja otpornosti i stabilnosti ekosustava i predstavlja koncept koji se razvija i nadograđuje. Ekološki stabilan i održivi ekosustav bi trebao održavati svoju razinu metaboličke aktivnosti i unutarnju strukturu i organizaciju te se oduprijeti vanjskim stresorima.³ Kada su promjene koje uzrokuju ljudske aktivnosti prevelike ili prenagle, ekosustavi se bore da se oporave. Zagađenje nastupa kada direktni ili indirektni (posredni) unos tvari, vibracija, topline ili buke u zrak, vodu ili na tlo, nastao kao posljedica ljudske aktivnosti, može štetno utjecati na zdravlje ljudi i kvalitetu okoliša, izazvati oštećenja materijalnih vrijednosti ili oštetiti vrijednosti prirodnog okoliša (prema 2(2) Direktivi o cjelovitoj prevenciji i kontroli onečišćenja br. 96/61/EC).

Ispuštanje različitih onečišćujućih tvari u vodene okoliše rezultat je mnogih antropogenih aktivnosti koje ugrožavaju zdravlje živih bića i narušavaju kvalitetu okoliša. Vodeni okoliši su sakupljači antropogenog onečišćenja, bilo da se radi o kemikalijama ili čvrstim onečišćujućim tvarima.⁵



Slika 1. Najčešći izvori onečišćenja vodenih ekosustava

Jedini morski ekosustav u Republici Hrvatskoj je Jadransko more, koje je iznimno prirodno, gospodarsko i turističko bogatstvo i treba ga očuvati jer je podložno onečišćenju. Istočni dio obale Jadranskog mora je posebno pod utjecajem prekograničnog onečišćenja u južnom dijelu, što u velikoj mjeri šteti kvaliteti življenja i turističkom gospodarstvu. Tako se iz Bosne i Hercegovine rijekom Neretvom donosi seonečišćujuće tvari do ušća Neretve i tog dijela Jadranskog mora, što uključuje i vidljivo onečišćenje plastičnim otpadom i to prvenstveno ostacima plastičnih vrećica i PET boca. Značajno je i onečišćenje južnog dijela Jadrana otpadom koji, nošen morskim strujama, dolazi iz Crne Gore i Albanije na južne jadranske otoke i poluotok Pelješac.⁶ Međutim osim onečišćenja koja dolaze iz drugih zemalja, značajno je onečišćenje nastalo u Hrvatskoj kao rezultat turističkih i poljoprivrednih aktivnosti, nepravilnog zbrinjavanja otpada, ali i nereguliranih industrijskih procesa koji se odvijaju u neposrednoj blizini rijeka i mora.

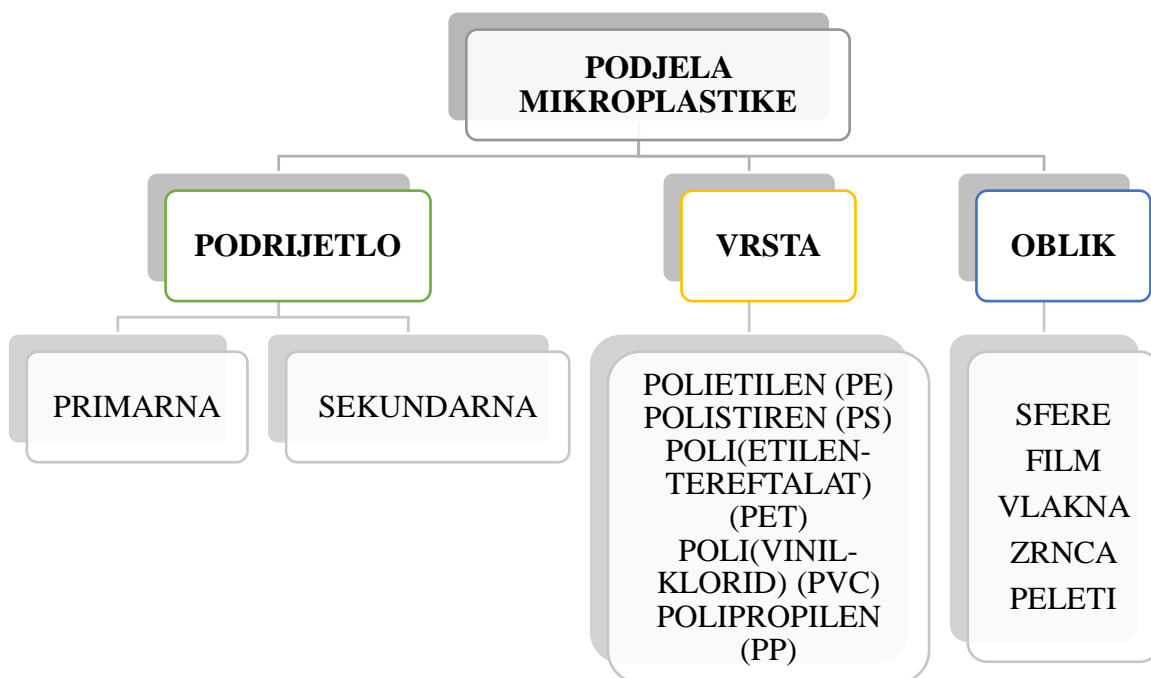
Zaštita slatkovodnih i morskih resursa i osiguravanje njihove ekološke kvalitete temelj je okolišne politike EU. Okvirna direktiva o vodama (WFD) koja je donesena 2000. i Okvirna

direktiva o morskoj strategiji (MSFD) iz 2008. okvir su za upravljanje cjelokupnim vodnim ekosustavima. Međutim, cilj Okvirne direktive o vodama za 2015. ostvaren je samo za 53 % površinskih voda u Europi. Ostatak površinskih voda i dalje je u lošem ekološkom stanju.⁷

2.3. Mikroplastika

Kao novi pojam „*mikroplastika*“ se uvela još 1968. godine, a tada je predstavljala deformaciju plastičnih materijala, no znanstvenici su je 1970. godine definirali kao manje fizičke dijelove plastike, a to je pojam pod kojim je i danas poznajemo.⁸

Konkretnija podjela plastike, koja je usvojena 2004. godine, prema veličini čestica je sljedeća: svi polimerni materijali čija se veličina kreće između 1 μm i 5 mm spadaju u skupinu mikroplastike (MP), veće od 5 mm mezoplastike (MEP), a one veće od 1 cm makroplastike (MAP). Postoje razne podjele mikroplastike, a osim prema veličini, značajna je i podjela prema podrijetlu na primarnu i sekundarnu mikroplastiku.⁸ Glavne skupine u različitim podjelama MP-a prikazane su na Slici 2. Prema podrijetlu MP dijelimo na primarnu (MP koja kao takva dospjeva u okoliš) i sekundarnu (plastika koja se djelovanjem okolišnih čimbenika u okolišu razgradi na MP).



Slika 2. Podjela MP-a

MP dolazi iz puno različitih izvora uključujući i plastične ostatke ambalažnog otpada koji se razgrađuju na sve manje i manje komade. Osim toga, mikrozrnca MP-a često se dodaju kao piling proizvodima za zdravlje i ljepotu, kao što su neka sredstva za čišćenje i paste za zube,

kako bi poboljšali njihova fizikalna svojstva. MP čestice prolaze kroz sustave za filtriranje vode i završavaju u oceanu i drugim vodama, predstavljajući potencijalnu prijetnju vodenim organizmima.⁹

Na MP se mogu vezati i razne onečišćujuće tvari. To mogu biti poliklorirani bifenili (PCB) i diklordifeniltrikloretan (DDT), koji su dobro poznati po svojoj visokoj toksičnosti i postojanosti u okolišu. Zbog velikih specifičnih površina i hidrofobnosti imaju potencijal kemijske adsorpcije na površini MP-a.¹⁰ PCB je kancerogen, mutagen i teratogen, dok DDT ima štetne posljedice na neurološki sustav i imunodeficijenciju. MP može adsorbirati ulja za podmazivanje, teške metale, razna onečišćenja i kemikalije, kao i mikroorganizme čime se povećavaju njihovi toksični učinci i postaju štetniji za organizme.^{10,11}

2.3.1. Polietilen (PE)

Polietilen (PE) je plastomerni materijal s najvećom proizvodnjom (više od 100 x 10⁶ kg/god.) i primjenom među plastičnim proizvodima. Pripravljen je već 1933. zagrijavanjem etilena pri visoku tlaku i visokoj temperaturi. Jednostavna linearna struktura u izduženim konformacijama omogućuje njegovu laku kristalizaciju pa se polietilen morfološki sastoji od kristalnih i amorfni područja, a o njihovu udjelu ovise i mehanička svojstva. Međutim, makromolekule PE nisu potpuno linearne, već sadrže i bočne skupine koje pridonose njihovoj granatosti i tako smanjuju stupanj kristalnosti, tj. gustoću PE. Na temelju molekularne građe i svojstava, PE se kao konstrukcijski materijal dijeli u nekoliko vrsta, od kojih su najvažnije polietilen niske gustoće (kratica LDPE, gustoća od 0,910 do 0,925 g/cm³, temperatura omekšavanja 85 do 87 °C), linearni polietilen niske gustoće (PE-LLD, od 0,926 do 0,940 g/cm³) i polietilen visoke gustoće (HDPE, od 0,941 do 0,960 g/cm³, 127 °C).¹²

HDPE, linearna verzija PE jest lagana svestrana sintetička smola napravljena polimerizacijom etilena koja se proizvodi na niskim temperaturama i tlakovima. Nedostatak grana u njegovoj strukturi omogućuje polimernim lancima da se zbijeno skupe, što rezultira gustim, visoko kristalnim materijalom visoke čvrstoće i umjerene krutosti. S talištem koje je za 20 °C (36 °F) više od LDPE, može izdržati uzastopno izlaganje 120 °C (250 °F) tako da se može sterilizirati. Proizvodi od HDPE uključuju lijevane boce dobivene puhanjem, poput onih za mlijeko i sredstva za čišćenje kućanstva, zatim vrećice za namirnice ekstrudirane puhanjem, građevinske folije i poljoprivredni malč, a isto tako i brizgane kante, čepove, kućišta uređaja i igračke. Kodni broj HDPE za recikliranje plastike je 2 (Slika 3.).¹³

LDPE, razgranati oblik PE, je bio prva plastika koja je ušla u uobičajenu komercijalnu upotrebu u pakiranju, u kasnim 1940-im godinama. Polimerizira se iz etilena i za razliku od

HDPE-a, ima jako razgranatu strukturu, s dugim i kratkim granama, koje ometaju kristalizaciju. Niži postotak kristalnosti daje LDPE-u nižu gustoću od HDPE-a i čini ga mekšim i fleksibilnijim, a donekle smanjuje njegovu sposobnost barijere. Dobra otpornost LDPE-a na kemikalije i ulja, zajedno s njegovom niskom cijenom, čine ga izvrsnim za mnoge primjene fleksibilnog pakiranja. Iako je prozirniji od HDPE-a, u konačnici LDPE ima mutan izgled. Topi se na nižoj temperaturi od HDPE-a, što je nedostatak kada se želi toplinska stabilnost, ali je prednost kada se koristi kao sloj za toplinsko zavarivanje u fleksibilnom pakiranju.¹⁴ Kodni broj LDPE za recikliranje plastike je 4 (Slika 3.).¹³

2.3.2. Polistiren (PS)

Polistiren (PS) je tvrda, čvrsta i prozirna sintetička smola proizvedena polimerizacijom stirena. Široko se koristi u industriji usluživanja hrane, poput pladnjeva, pribora za jelo za jednokratnu upotrebu, ali i za pjenaste čaše, tanjure i zdjele. Polistiren je također kopolimeriziran ili pomiješan s drugim polimerima, dajući tvrdoću i krutost brojnim važnim proizvodima od plastike i gume.¹⁵ Prisutnost fenilnih (C_6H_5) skupina ključna je za svojstva PS. Čvrsti PS je proziran zahvaljujući velikim molekularnim skupinama u obliku prstena koje sprječavaju pakiranje polimernih lanaca u bliske, kristalne rasporede. Osim toga, fenilni prstenovi ograničavaju rotaciju lanaca oko ugljik-ugljik veza dajući polimeru njegovu zapaženu krutost.^{15,16}

I kod PS razlikujemo više vrsta istog. Tako je poznat žilavi polistiren (PS-HI), nazvan i modificirani PS koji je dvofazni sustav polistirena i fino dispergiranih čestica elastomera (veličine 1 do 5 μm), najčešće polibutadiena. Čestice su ravnomjerno raspoređene, što materijalu daje veliku udarnu žilavost i otpornost prema lomu.^{17,18} Pjenasti PS (ekspandirani, celularni, poznat kao stiropor) proizvodi se impregniranjem PS-a lakohlapljivim kapljevinama, koje zagrijavanjem ekspandiraju i stvaraju posebnu strukturu materijala. Tako nastaje tzv. čvrsta pjena, koja je vrlo lagana te je izvanredan materijal za toplinsku i zvučnu izolaciju u građevinarstvu, za ambalažu robe osjetljive na udar, za izradbu plovaka, pojaseva za spašavanje, dijelova čamaca i pontona. Kodni broj PS za recikliranje plastike je 6 (Slika 3.).¹⁸

2.3.3. Poli(vinil-klorid) (PVC)

Poli(vinil-klorid) (PVC) je na tržištu dostupan kao jeftina plastika s vrlo širokom primjenom, uključujući ambalažu, spremnike, igračke, medicinske i građevinske materijale. Obično se može pronaći u krutom i fleksibilnom obliku. Čvrsti PVC se između ostalog koristi

u građevinarstvu za razne ploče, cijevi i prozorske profile, dok fleksibilni oblik PVC-a uključuje igračke, pribor za pisanje i razne medicinske dijelove poput cijevi, vrećica za krv te drugog medicinskog pribora.¹⁹

Većina komercijalnog PVC-a proizvodi se postupkom suspenzijske polimerizacije, iako se emulzijska polimerizacija PVC-a također koristi za proizvodnju PVC-a visokog stupnja za proces proizvodnje rukavica. Ima visoku temperaturu staklenog prijelaza (T_g), što ograničava njegovu primjenu u regijama s hladnom klimom. Kad je temperatura primjene niža od T_g , posebno zimi kada temperatura padne ispod nule, PVC je vrlo krto i lako se lomi, čak i kada je izložen malim opterećenjima. Za korištenje PVC-a na niskim temperaturama ili za transformaciju krutog PVC-a u savitljivi PVC, dodatak plastifikatora ključan je za podmazivanje gibanja PVC lanaca, tako da lanci mogu kliziti jedan između drugog kada dođe do deformacije.^{19,20} Kodni broj PVC-a za recikliranje plastike je 3 (Slika 3.).

2.3.4. Polipropilen (PP)

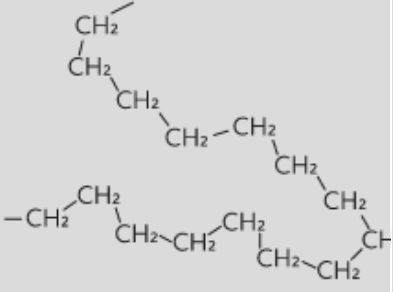
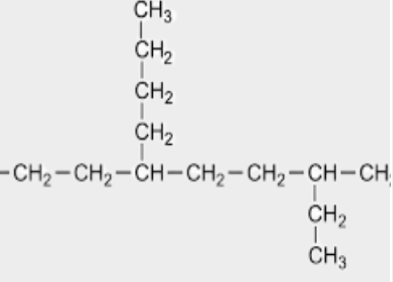
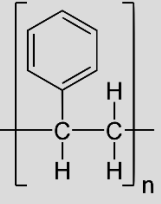
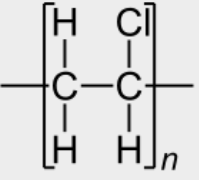
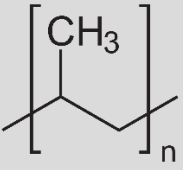
Polipropilen (PP) je termoplastični materijal molekulske formule $(C_3H_6)_n$, nastao polimerizacijom monomera propilena. Prisutan je u mnogim industrijama. PP se razlikuje u molekularnoj strukturi pa može biti izotaktički, sindiotaktički i ataktički. Industrijski proizvodi temelje se na izotaktičkom PP-u, koji također uključuje kopolimer propilena i malu količinu etilena.²¹ U biti, molekula se sastoji od atoma ugljika s vezanim atomima vodika, a vezana za svaki drugi atom ugljika je viseća metilna skupina (CH_3). Metilne skupine mogu imati razne prostorne rasporede u odnosu na ugljikov lanac, ali u praksi se samo izotaktički oblik (tj. s metilnim skupinama raspoređenim duž iste strane lanca) prodaje u značajnim količinama.²²

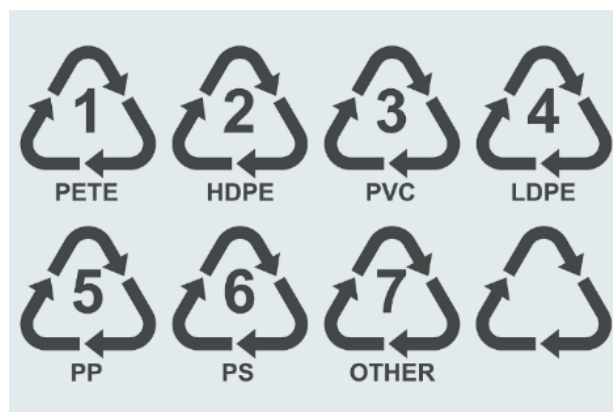
PP je pogodan je za razne tehnike obrade što ga čini vrlo traženim materijalom.⁴⁰ Može se obraditi praktički svim metodama, uključujući injekcijsko prešanje, puhanje, ekstrudiranje, puhani i lijevani film, termoformiranje, itd. Jedan je od najkorištenijih vrsta plastomera kao što je prethodno navedeno, a razlog tomu su također i umjereni troškovi izrade te vrlo dobra svojstva.²²

Primjenjuje se za potrebe krute ambalaže i ambalaže za hranu što danas ujedno predstavlja i najveći problem s nastalim otpadom. Polipropilenska vlakna glavni su dio kućnog namještaja kao što su presvlake i tepisi za unutarne i vanjske prostore. Upravo takve primjene iskorištavaju prednosti žilavosti, otpornosti, vodootpornosti i kemijske inertnosti polimera. Međutim, zbog svoje vrlo niske apsorpcije vlage, ograničene sposobnosti upijanja boje i niske točke omekšavanja, što je važan čimbenik kod glačanja i prešanja, PP je važan materijal u

tekstilnoj industriji.^{21,22} Isto tako, PP nalazi svoju primjenu i u medicinskim proizvodima, primjerice kirurškim maskama.²³ Kodni broj PP-a za recikliranje plastike je 5 kao što je prikazano na Slici 3. Osnovne karakteristike, uključujući strukturnu formulu, svojstva i primjenu svih prethodno nabrojanih vrsta plastike prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz osnovnih karakteristika različitih vrsta plastike¹²⁻²³

VRSTA PLASTIKE	STRUKTURNA FORMULA	SOJSTVA	PRIMJENA
HDPE		Visoke vlačne čvrstoće, krutosti i otpornosti na udarce, otporan na kemikalije i UV, savitljiv i stabilan	Boce za mlijeko, građevinske folije, poljoprivredni malč, čepovi, igračke.
LDPE		Manje gustoće od HDPE, ali vrlo čvrst. otporan na mrlje, električnu izolaciju i vodootporan. Prirodno proziran i dobro odbija svjetlost	Spremnici, boce, cijevi, plastični dijelovi računalnih komponenti, čepovi, zatvarači, vrećice za zamrzivač.
PS		Male težine, otporan na vlagu, dimenzionalno stabilan i izdržljiv. Odlična toplinska svojstva. Lako se oblikuje.	Toplinska i zvučna izolacija, ambalaža za osjetljivu robu, pojasevi za spašavanje.
PVC		Visoka udarna snaga, ali manja zatezna čvrstoća. Manje otporan na kemikalije. Krt i lomljiv.	Cijevi, prozorski oblici, igračke, razni medicinski pribor.
PP		Velika žilavost, otpornost, vodootpornosti i kemijska i toplinska inernost. Proziran.	Tepisi i presvlake, kirurške maske, pribor za jelo.

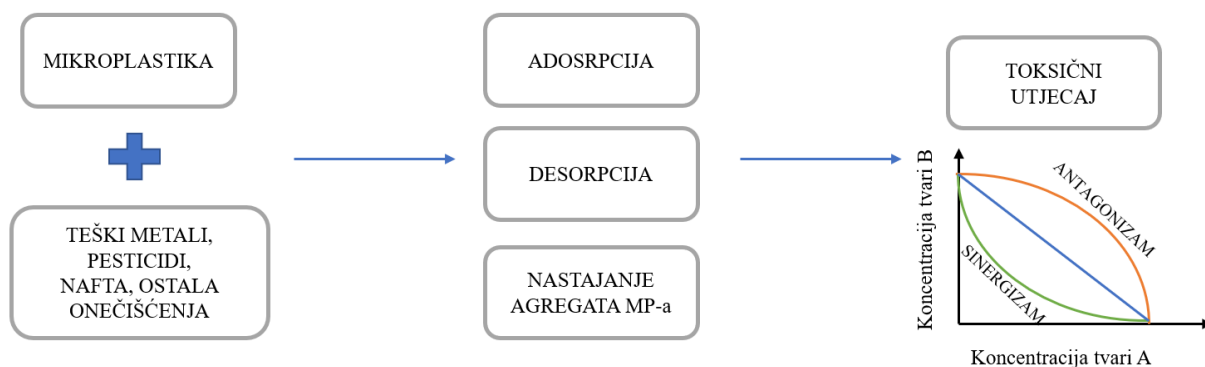


Slika 3. Prikaz oznaka brojeva za recikliranje različitih vrsta plastike

2.4. Mikroplastika u vodenom ekosustavu

Onečišćenje morskih i slatkovodnih ekosustava plastikom, a posebno MP globalni je ekološki problem koji izaziva sve veću znanstvenu zabrinutost. To je potaknulo velik broj istraživanja o prisutnosti MP, njezinoj interakciji s kemijskim onečišćujućim tvarima, unosu u vodene organizme te štetnim utjecajima.

Velika količina proizvedene plastike završi u okolišu te pod djelovanjem različitih okolišnih procesa dolazi do njene razgradnje i prijenosa u ostale dijelove ekosustava. MP izaziva ekološke probleme zbog štetnih svojstava te sposobnosti adsorbiranja različitih štetnih tvari na svoju površinu. MP pronađena u organizmima negativno utječe na plodnost, te izaziva promjene u ponašanju, imunološke reakcije, probavne probleme, razne upale i oštećenja crijeva, kao i mnoge druge, a u konačnici i smrtnost.²⁴⁻²⁶ Prijenos, interakcija i moguće posljedice MP-a u okolišu prikazani su na Slici 4.

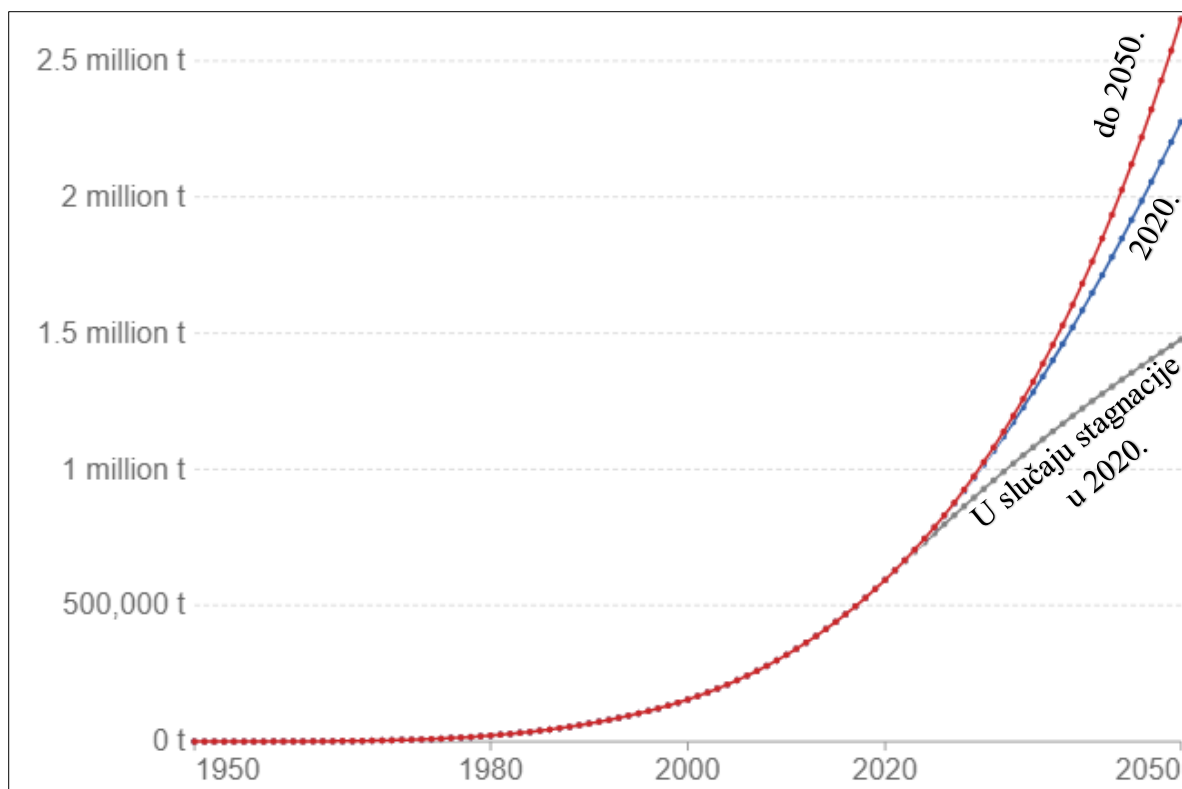


Slika 4. Shematski prikaz interakcije MP-a s toksičnim tvarima te moguće posljedice

Istraživanja o MP-u u okolišu, osobito vodenom okolišu, su vrlo zahtjevna s obzirom da se radi o iznimno malim česticama i da se metodologija istraživanja na istim i dalje razvija. Uzorkovanje vodenih sustava vrši se najčešće pomoću mreža veličine pora 300 μm , a uzorkuje se površinska voda, točnije na 25 cm dubine, iako brojna istraživanja pokazuju da čak oko 50% čestica ima promjer manji od 300 μm te da se brojne čestice plastike raspodjeljuju u vodenom stupcu pa se nalaze ispod površinskih 25 cm.²⁷ Osim načina uzorkovanja, veliki utjecaj na koncentraciju MP ima i godišnje doba prilikom kojeg se provodi uzorkovanje te okolišni uvjeti poput vjetera i valova.²⁸ Kako bi se ispravno ocijenio proces trofičkog prijenosa i toksični učinak mikroplastike na različitim trofičkim razinama potrebno je uzeti u obzir niz čimbenika koji su uključeni u to, poput načina unosa, bioakumulacije i biomagnifikacije MP i njima povezanih kemikalija.²⁶⁻²⁸

S obzirom na dokazanu prisutnost MP u vodenim staništima (i slatkovodnim i slanim), organizmi koji žive u tim područjima izloženi su potencijalnom riziku od mikroplastike. Trofički prijenos MP u vodi je brži od istog u drugim staništima, stoga se putem hranidbenog lanca brže prenose čestice MP na sve organizme.²⁹

Proizvodnja plastike znatno je porasla s 2 milijuna tona u 1950. na 367 milijuna tona u 2020. godini (oko 0,3 % manje nego u 2019. zbog utjecaja COVID-19). Nadalje, procjenjuje se da će proizvodnja dodatno porasti na oko 600 milijuna tona u 2025.³⁰ Na Slici 5. su prikazani dosadašnji podaci i predviđanje akumulacije mikroplastike do 2050. na površini oceana. Nedavne studije su pokazale da je od ukupno proizvedene plastike samo 9-10 % reciklirano, još 10-11 % je spaljeno, a 30 % je još uvijek u upotrebi zbog dugog životnog vijeka. Preostalih 50 % je odloženo na odlagalištima ili raspršeno u okolini.²⁸ Onečišćenje plastikom posebno je prisutno u estuarijima, što ukazuje da onečišćenje iz rijeka lako dopijeva do obala te mora i oceana, što je tipičan put prijenosa onečišćenja do morskih ekosustava.



Slika 5. Dosadašnji podaci i predviđanje akumulacije mikroplastike na površini oceana ³¹

2.5. Morske i slatkovodne ribe kao bioindikatori

Bioindikatori su organizmi koji, zbog svojih specifičnih fizioloških svojstava, mogu poslužiti kao pouzdani pokazatelji određenih značajki tla, vode ili zraka promjenom nekih od bioloških značajki (npr. ukazati na stupanj onečišćenja, koncentraciju određenih elemenata ili kemijskih spojeva, promjene pH, slanosti i dr.).³² To su organizmi ili zajednice organizama čijim se biološkim promjenama i reakcijama može reprezentativno procijeniti situacija ekosustava u kojemu se nalaze. Utjecaj ljudskih aktivnosti na vodena tijela zahtijeva odgovarajuće alate za praćenje novonastalih promjena kako bi se omogućilo otkrivanje i karakterizacija uzoraka i izvora kemijskih, fizikalnih i bioloških onečišćenja vodenih staništa. Među tim alatima veliku važnost imaju akvatički organizmi (školjkaši, rakovi, ribe, žabe, kukci, alge i biljke) koji su identificirani su kao potencijalni bioindikatori. U praćenju dugoročnih promjena određenog vodnog tijela ribe su poznate kao korisni te pouzdani pokazatelji učinaka na biotu u različitim uvjetima staništa.³³ Zbog prehrane na vrhu hranidbenog lanca i života u vodenim sredinama ribe su posebno ranjive i izložene onečišćenju, a u usporedbi s beskralješnjacima su uglavnom osjetljivije na mnoge toksične tvari te su time pogodan organizam za indikaciju dobrog ekološkog stanja ekosustava. Kao organizmi na vrhu vodenog

prehrambenog lanca, ribe mogu akumulirati metale, organske, ali i druge onečišćujuće tvari poput MP i prenijeti ih do ljudi, što potvrđuje istraživanje Atlantika prikazano u Tablici 2.

Raznolikost vrsta riba koje se nalaze u različitim vodenim staništima omogućuje im da različito reagiraju na specifične stresore iz okoliša. Neke su vrste visoko specijalizirane te nisu otporne na onečišćenje staništa dok su pak neke druge vrste visoko tolerantne na utjecaj onečišćenja. Praćenjem promjena u broju, sastavu i distribuciji vrsta riba, kao i različitih biomarkera koji ukazuju na biološke promjene organizma, znanstvenici mogu procijeniti sveukupno ekološko stanje vodenih ekosustava i identificirati potencijalne poremećaje, uključujući i razinu onečišćenja MP-om.^{33,34} Proučavajući raspodjelu i koncentraciju MP-a u ribljim populacijama, istraživači mogu dobiti uvid u opseg plastičnog onečišćenja u određenim vodenim tijelima i identificirati potencijalna žarišta kontaminacije, što u konačnici može pomoći u razvoju ciljanih strategija u svrhu zaštite vodenih ekosustava.

Istraživanje Gomes-Silva i sur. (2020) o procjeni primjene riba kao bioindikatora u urbanim vodotocima, pokazalo je značajnu korelaciju s parametrima kvalitete vode u određenih vrsta riba i potvrdilo ih kao korisne bioindikatore.³⁵ Također, prema istraživanju Capó i sur. (2022) tri ispitivane vrste riba (*Mullus surmuletus*, *Boops boops* i *Engraulis encrasicolus*) pokazale su antioksidativne reakcije u organizmu kao reakciju na unos MP iz okoliša.³⁶ Sambolino i sur. (2023) pratili su potencijalnu korelaciju ftalnih estera i unosa MP u riba i lignji te je potvrđena značajna korelacija za četiri od sedam ispitivanih estera, što se moglo povezati s razinom onečišćenja ispitivanog područja.³⁷ Uz navedene, postoji niz drugih znanstvenih radova koji potvrđuju korelaciju onečišćenja i različitih bioloških promjena u riba.

Ribe koje žive u slatkovodnim ekosustavima, ali i u morima i oceanima osjetljive su na gutanje MP.³⁴ Učestalost pojavljivanja MP u gastrointestinalnom traktu (GIT) i škragama riba sjeveroistočnog Sredozemlja varirala je između 66-100% odnosno 68-90% kao što je prikazano u Tablici 2.³⁸

Sredozemno more je poluzatvoreno vodeno tijelo s raznolikim unosom svježe vode. Visoko urbanizirana obalna područja okružena su mnogim izvorima onečišćenja, poput sustava za pročišćavanje otpadnih voda, raznih turističkih objekata, industrijskih ispusta, poljoprivrednih otjecanja, intenzivnog broskog prometa, turističkih i ribolovnih aktivnosti, koja uzrokuju značajne probleme. Više od 80% morskog otpada u Sredozemnom moru sastoji se od plastike.³⁹

Tablica 2. Prikaz vrsta, broja i duljine riba ispitanih na gutanje MP i povezanu količinu MP u sadržaju njihovih crijeva iz Atlantskog oceana³⁹

Vrsta	Broj seciranih riba	Prosječna duljina ribe /mm	Broj riba koje sadrže MP	Postotak riba s MP /%
<i>Myctophum punctatum</i>	86	67,86 ± 7,49	64	74,42
<i>Benthoosema glaciale</i>	69	57,93 ± 5,80	47	68,12
<i>Diaphus rafinesquii</i>	34	75,15 ± 8,25	24	70,59
<i>Lampanyctus macdonaldi</i>	16	243,34 ± 221,15	12	75,00
<i>Serrivomer beanii</i>	14	496,76 ± 258,95	13	92,86
<i>Stomias boa</i>	9	70,31 ± 58,99	6	66,67
<i>Gonostoma denudatum</i>	5	17,84 ± 4,00	5	100,00

2.5.1. Vrste bioindikatorskih riba iz vodenih ekosustava u Hrvatskoj

2.5.1.1. Morske ribe

Kao što je prethodno navedeno, ribe imaju mnoge čimbenike koji ih čine dobrim bioindikatorima te su u Jadranskom moru izabrane tri vrste koje čine dio ljudske prehrane, a jednostavno se determiniraju i uzorkuju te omogućavaju praćenje promjena u ribljoj populaciji koje ukazuju na potencijalnu opasnost za ljudsko zdravlje, te narušenu ravnotežu u vodenom ekosustavu.

Trlja blatarica (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758)

Vrste iz porodice Mullidae, posebice vrste roda *Mullus* odlični su bioindikator promjena temperature i drugih čimbenika na prirodnim staništima, utjecaja ribarstva te klimatskih promjena.⁴⁰ Nastanjuju različita staništa, uglavnom blizu dna litorala na dubinama

od 1 m do 500 m, a najčešće se nalaze na šljunčanim i kamenitim dnima. Hrane se malim bentičkim beskralješnjacima. Postaju spolno zrele u prvoj godini života između 10 i 14 cm ukupne dužine, a najintenzivniji mrijest odvija se na dubinama između 60 i 70 m. Ženke su uglavnom veće (28 - 29 cm) od mužjaka koji gotovo nikad nisu veći od 20 cm. Jedinka trlje blatarice prikazana je na Slici 6.



Slika 6. Trlja blatarica (*Mullus barbatus* Linnaeus, 1758) (izvor: dr. sc. Vlatka Filipović Marijić)

Oslić (*Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758)

Oslić je u hranidbenom lancu Jadranskog mora jedan od vršnih predatora, ali i jedna od najvažnijih komercijalnih vrsta zbog svoje veličine i hranidbenih vrijednosti. Dobra je bioindikatorska vrsta iz više razloga, a ključni su položaj u hranidbenom lancu, dugi životni vijek i široka rasprostranjenost. Ova vrsta obitava na dubinama od 30 m do 1000 m, a najčešće se može naći od 70 m do 370 m. Tijekom dana živi na dnu, a tijekom noći migrira u pliće slojeve. Oslići mogu doživjeti i 20 godina te narasti i do 140 cm ukupne dužine tijela. Minimalna referentna veličina za očuvanje oslića je 20 cm. Hrane se uglavnom inćunima, srdelama i ugoticama te lignjama i lignjunima ⁴¹, a oslić se može vidjeti na Slici 7.



Slika 7. Oslić (*Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758) (izvor: dr. sc. Vlatka Filipović Marijić)

Arbun (*Pagellus erythrinus* Linnaeus, 1758)

Poput oslića i ova vrsta je komercijalno važna, ali je i dobar bioindikator. Hrani se bentičkim i pelagičkim vrstama te na taj način može dati uvid i u stanje morskog dna i vodenog

stupca. Omnivor je, ali u prehrani prevladavaju karnivorne osobine te se hrani bentičkim beskralješnjacima, glavonošcima i malom ribom. Prosječna razlika u duljini tijela između spolova je 2,8 cm. Ženke su dominantne u populaciji. Živi na geografski široko rasprostranjenom području Atlantika i Mediterana, a javlja se na tvrdim i pješčanim dnima do dubine od 250 m.⁴² Arbun je prikazan na Slici 8.



Slika 8. Arbun (*Pagellus erythrinus* Linnaeus, 1758) (izvor: dr. sc. Vlatka Filipović Marijić)

2.5.1.2. Katadromne ribe

Katadromna vrsta riba jest ona čije se razdoblje mladosti događa u morskoj vodi, a zatim jedinke migriraju u slatku vodu kako bi prošle sazrijevanje. Nakon toga, većinu svog životnog ciklusa provode u slatkoj vodi. Glavni predstavnik katadromnih vrsta u Jadranskom moru je jegulja (Slika 9.). Tijelo je obavijeno slojem sluzi koji jegulji omogućava provlačenje kroz gusto raslinje u rijekama, a također i puzanje po obali i mulju pri niskom vodostaju. Hrani se jajašcima riba, ribljom mladi, ličinkama kukaca, puževima, ali i jajašcima žaba, malim punoglavcima i kukcima. Jegulja je većinom noćna životinja, kada izlazi iz skrovišta u potrazi za hranom. Jegulje koje žive u Europi nisu spolno zrele, a spolno sazrijevaju u dobi od 6. do 30. godine, ovisno o spolu i području. Tada im se boja mijenja te iz svojih slatkovodnih staništa putuju prema Sargaškom moru, gdje se mrijeste i ugibaju. Ličinke jegulja putuju nazad prema Europi i dolaskom na određite mijenjaju izgled u odrasle jegulje i ulaze u slatku vodu, tj., na ušća i u rijeke. U Hrvatskoj jegulje žive u ušćima nekoliko rijeka: Neretve, Zrmanje, Krke i Cetine.⁴³



Slika 9. Jegulja (*Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758) ulovljena u ušću Neretve (izvor: dr. sc. Vlatka Filipović Marijić)

2.5.1.3. Slatkovodne ribe

I slatkovodne ribe, kao i prethodno navedene morske i katadromne, mogu biti dobri bioindikatori. Najpoznatiji takav predstavnik na području Republike Hrvatske jest potočna pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) prikazana na Slici 10. To je autohtona vrsta u Republici Hrvatskoj i dominantna riba u gornjim i srednjim dijelovima rijeka jer preferira hladnije i brze vodotoke. Ima vrlo izraženu mogućnost prilagodbe, koloniziranja novih vodenih tokova, a poznata je i kao važan izvor hrane. Potočna pastrva je predator koji se hrani manjim ribama i žabama, školjkašima, ličinkama kukaca i kukcima koji lete iznad površine vode te se tako nalazi na vrhu hranidbenih lanaca u vodenim ekosustavima gdje živi.⁴⁴



Slika 10. Potočna pastrva (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) (izvor: P. Mustafić, preuzeto iz Mrakovčić i sur., 2006)

2.6. Izolacija mikroplastike iz riba

Razvijanje metoda za točno kvantificiranje mikroplastike u morskim i slatkovodnim staništima sve je važnije. Za praćenje prostorne distribucije i vremenskih trendova morskog MP otpada, od vitalne je važnosti da se razviju i implementiraju standardizirani protokoli koji mogu učinkovito i točno kvantificirati MP u različitim staništima.⁴⁵

Trenutna istraživanja daju jasne dokaze diljem svijeta kako pelagičke i bentonske riba, kao i morski sisavci gutaju MP, te se većina MP nakuplja u njihovim želucima.⁴⁶

Tehnike uzorkovanja uključuju izolaciju MP iz ribljih tkiva, što počinje pravilnim prikupljanjem uzoraka. Znanstvenici koriste različite tehnike uzorkovanja, uključujući ulov koćom, mrežama stajaćicama ili ručnim mrežama, ovisno o indikatorskoj vrsti i ciljevima istraživanja. Ove metode omogućuju istraživačima da uhvate uzorke ribe iz različitih staništa,

od obalnih područja do dubokomorskih okruženja, kako bi dobili sveobuhvatno razumijevanje kontaminacije MP-om.⁴⁷ Nakon što se uzorci ribe prikupe, provodi se disekcija kako bi se odvojili različiti organi, poput gastrointestinalnog trakta, jetre i mišićnog tkiva. Svaki organ može imati različite količine nakupljene MP, odražavajući selektivno gutanje i obrasce zadržavanja u različitim dijelovima tijela. Zatim se pomoću enzimskih, kemijskih i drugih postupaka izdvaja MP iz određenog tkiva ribe što je prikazano u Tablici 3.^{47,48}

Sve veća potražnja za pouzdanim i brzim analitičkim protokolima za određivanje MP u bioti naglašava dva glavna analitička aspekta: obradu uzorka i karakterizaciju čestica. U literaturi se mogu pronaći različiti načini za uklanjanje biološkog materijala kako bi se izolirale druge čestice, ali kompromis između uništavanja organske tvari i očuvanja svojstava plastike je vrlo izazovan.^{46,47}

Tablica 3. Prikaz metoda izolacije MP-a iz tkiva riba⁴⁵⁻⁴⁸

Metoda	Opis metode
Enzimska razgradnja	Enzimi razgrađuju tkivo, a preostala MP ide na daljnju analizu
Kiselinska razgradnja	Uključuje korištenje jakih kiselina za otapanje organske tvari, ostavljajući MP kao talog
Filtracija	Propuštanje razgrađenog ribljeg tkiva kroz fini mrežasti filter za odvajanje MP od tkiva
Odvajanje na temelju gustoće	Oslanja se na razlike u gustoći MP i ribljeg tkiva koje se odvaja
Sonikacija	Primjena ultrazvučnih valova za uništavanje ribljeg tkiva i izdvajanje MP
Centrifugiranje	Kombiniranje filtracije s centrifugiranjem za učinkovito odvajanje MP

Najčešće se koriste kombinacije otopina različitih kemikalija kako bi se uspješno izolirala MP iz organskog tkiva ribe ili nekog drugog vodenog organizma. Monteiro i sur. (2022) promatrali su utjecaj četiri otopine za razgradnju (10%-tna otopina KOH, Fentonov reagens (30% H₂O₂ + Fe(II)) te 7% i 10% natrijev hipoklorit (NaClO)) na MP koristeći uzorke slatke vode. NaClO otopine pokazale su najveću stopu uklanjanja organske tvari (86 ± 1% za

7%, odnosno $90 \pm 1\%$ za 10%), nakon 6 h na 50 °C, a njihov utjecaj pri tome na neobrađene i ostarjele polimere (polietilen, polipropilen, polistiren, polivinil klorid, najlon, polietilen tereftalat) nije doveo do promjene težine, vizualne, površinske strukture, Fourierove transformacije infracrvenog spektra i karbonilnog indeksa.⁴⁹

Istraživanje Tuttle i sur. (2023) provedeno je oskidativno kiselinom metodom, koja uključuje razgradnju preko noći (16-18 h) u 5 M dušičnoj kiselini s 0,3 M natrijevim persulfatom zagrijanom na 80 °C. Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije (FTIR) i analiza sadržaja ugljika potvrdili su plastičnu stabilnost polimera tijekom razgradnje. Međutim, čini se da su neki aditivi podložni razgradnji što je dokazano FTIR rezultatima koji ukazuju na gubitak N,N'-etilenbis(stearamida) iz polietilena.⁵⁰

Bitno je napomenuti da različite metode mogu biti prikladnije za specifične ciljeve istraživanja i mogu imati različite stupnjeve učinkovitosti i preciznosti. Istraživači bi trebali pažljivo odabrati odgovarajuću metodu na temelju svojih ciljeva istraživanja i vrste ribljeg tkiva s kojim rade. Osim toga, odgovarajuće kontrole i koraci validacije ključni su kako bi se osigurala točnost i pouzdanost dobivenih rezultata. Stoga je jasno da još mnogo izazova stoji u svrhu pronalaska prikladne metode.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroplastika

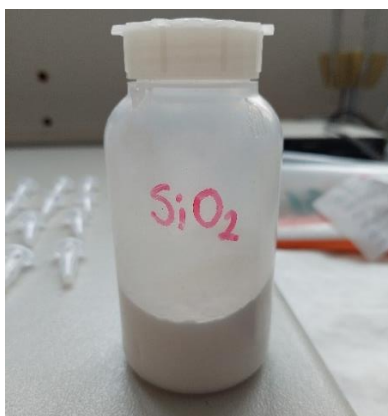
Za određivanje optimalne metode razgradnje i izolacije MP iz sadržaja probavila riba, bilo je potrebno ispitati utjecaj odabranih otopina na razgradnju pet vrsta MP-a, tj. LDPE, HDPE, PVC, PP i PS. Sve vrste MP-a nabavljene su i korištene u obliku kuglica (Slika 11.), što je omogućilo jednostavniju izolaciju i vaganje nakon razgradnje te provjeru strukture.



Slika 11. Uzorci pet različitih vrsta MP-a koji su primijenjeni u obliku kuglica u svrhu odabira optimalne metode razgradnje

3.1.2. Silicijev dioksid

U svrhu određivanja optimalne metode razgradnje sadržaja probavila, prije primjene na uzorcima iz riba ispitivao se i utjecaj različitih metoda na razgradnju SiO_2 , kvarca prikazanog na Slici 12. S obzirom da sadržaj probavila riba sadrži i sediment, odnosno pijesak, kamenčiće i sl., a njihov sastavni dio je kvarc, ispitano je koja od metoda uspješno uklanja kvarc.



Slika 12. Silicijev dioksid korišten u eksperimentu

3.1.3. Kemikalije

U svrhu ispitivanja utjecaja različitih metoda razgradnje na MP i njezinu izolaciju i determinaciju iz sadržaja probavila riba, korištene su kombinacije četiri različite otopine:

Dušične kiseline, HNO_3 , 67-69%

Vodikovog peroksida, H_2O_2 ,

Fluorovodične kiseline, HF ,

Kalijevog hidroksida, KOH , 10%

3.1.4. Uzorci riba

Terenski dio i ulov morskih riba proveden je u ribolovnoj zoni G5 u okviru projekta Ribarsko-znanstvene suradnje s Općinom Gradac, u okviru mjere I.3. Partnerstva između znanstvenika i ribara, prioritet Europske unije „Poticanje okolišno održivog, resursno učinkovitog, inovativnog, konkurentnog i na znanju utemeljenog ribarstva“, u sklopu provedbe Operativnog programa za pomorstvo i ribarstvo Republike Hrvatske. Uzorkovanje su proveli lokalni ribari, a svi su uzorci ulovljeni ribolovnom mrežom kočom za vrijeme komercijalnog ulova 25. svibnja 2021. na potezu od Gradca prema Pločama i Pelješcu.

Ulov katadromnih riba proveden je u okviru projekta Ribarsko-znanstvene suradnje s Gradom Ploče, u okviru mjere I.3. Partnerstva između znanstvenika i ribara, prioritet Europske unije „Poticanje okolišno održivog, resursno učinkovitog, inovativnog, konkurentnog i na znanju utemeljenog ribarstva“, u sklopu provedbe Operativnog programa za pomorstvo i ribarstvo Republike Hrvatske. Uzorkovanje su proveli lokalni ribari 27. svibnja 2021. u donjem toku rijeke Neretve.

Slatkovodne ribe su ulovljene u gornjem toku rijeke Krke u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2020-02-8502 „Integrirana procjena odgovora akvatičkih organizama na izloženost metalima: ekspresija gena, bioraspoloživost, toksičnost i biomarkerski odgovori (BIOTOXMET)“. Ulov su proveli članovi Laboratorija za biološke učinke metala Instituta Ruđer Bošković korištenjem elektroagregata na postaji kod grada Knina (27. travnja 2021.) i na izvoru rijeke Krke (28. travnja 2021.).

Iz ulovljenih riba seciranjem su se na terenu odvajala probavila (Slika 13.), koja su pohranjena u posudice i zamrznuta do daljnje obrade u laboratoriju.



Slika 13. Prikaz seciranja ribe i odvajanja probavila

Nakon što je određena optimalna metoda razgradnje na temelju provedenih eksperimenata s pet vrsta MP i SiO₂, izabrana metoda je primijenjena na uzorcima probavila riba iz slatkovodnih i morskih sustava Republike Hrvatske. U laboratoriju su probavna tkiva odmrznuta te je iz svakog izoliran sadržaj probavila (Slika 14.).



Slika 14. Pohranjeni i odleženi uzorci probavila riba

3.2. Mjerni instrumenti i oprema

U radu je korištena sljedeća oprema:

- analitička vaga (Mettler Toledo – Excellence plus model-XP205DR/M, Švicarska) za precizno vaganje;
- digestor (Lach-Ner model-LN900, Češka) za rad s opasnim kemikalijama;
- sterilizator/sušionik (NUVE model FN 055, Turska) za provedbu sušenja i sterilizacije;
- sustav za filtraciju koji čine vakuum pumpa, membranski lijevak i celulozno nitratni (C/N) membranski filteri veličine pora 0,45 μm (Merck, Millipore, Njemačka) za filtraciju MP-a i uzoraka sadržaja probavila riba;
- stereo lupa (model PLTL 2400D) i svjetlosni mikroskop opremljen kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus model SZX10, Japan) za pregledavanje i determinaciju MP-a;
- infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR-ATR, Shimadzu model 8400S, Japan) korištena je za potrebe determinacije i određivanja strukture uzoraka MP-a.

3.3. Metode rada

3.3.1. Analize na mikroplastici

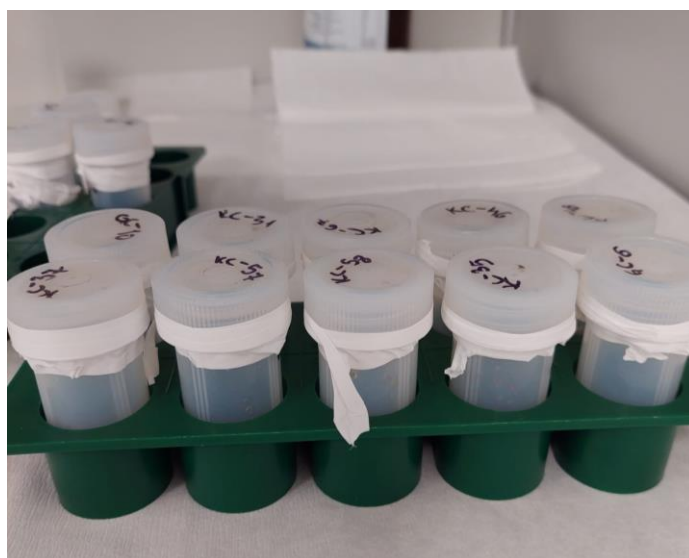
Procjena utjecaja metoda razgradnje na izolaciju i strukturu MP-a provedena je na pet vrsta MP u obliku kuglica veličine oko 1-3 mm. Svaka vrsta MP-a je izvagana što preciznije u odvagama 0,03-0,05 g u teflonske posudice, u koje su se naknadno u digestoru oprezno

dodavale kemikalije u kombinacijama prema Tablici 4. Ukupan volumen dodanih kemikalija za svaki uzorak MP iznosio je 3,5mL.

Tablica 4. Odvage kemikalija korištene za četiri metode razgradnje MP-a

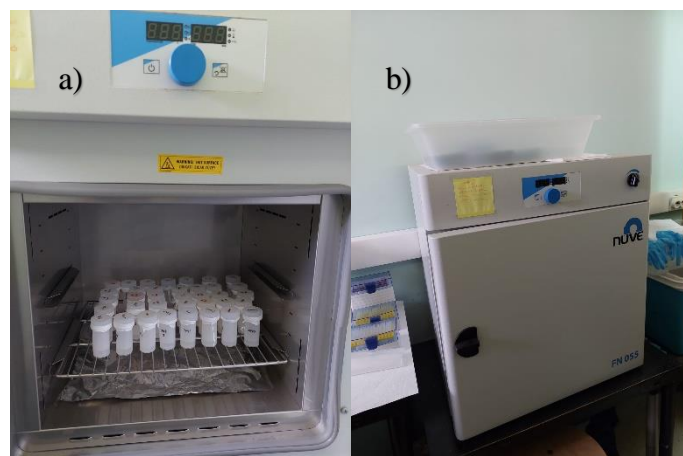
Naziv kemikalije	Volumen dodan u teflon bočicu
Dušična kiselina, HNO ₃	3,5 mL
Dušična kiselina, HNO ₃ i vodikov peroksid, H ₂ O ₂	2,3 mL + 1,2 mL
Dušična kiselina, HNO ₃ i fluorovodična kiselina, HF	3,3 mL + 0,2 mL
10 %-tni kalijev hidroksid, KOH	3,5 mL

Zatim su se teflonske bočice omotale 100 % P.T.F.E. trakom kako bi se osigurali uvjeti minimalnog isparavanja kemikalija iz bočica (Slika 15.).



Slika 15. Teflonske bočice s uzorcima omotane 100 % P.T.F.E. trakom

Tako spremne teflonske bočice zatim su postavljene u sušionik na 3,5 h pri temperaturi od 85 °C kao što je prikazano na Slici 16.



Slika 16. Sušionik u koji su smještene teflonske bočice s uzorcima MP-a te dodane četiri kombinacije kemikalija za razgradnju

Nakon sušenja i temperiranja na sobnu temperaturu, uzorci iz teflonskih bočica filtrirali su se u digestoru pomoću sustava za filtriranje (membranski lijevak i vakuum pumpa) kao što je prikazano na Slici 17.



Slika 17. Filtriranje uzoraka pomoću sustava za filtriranje (membranski lijevak i vakuum pumpa)

Nakon filtriranja, uzorci MP-a zaostali na filter papiru veličine pora $0,45\ \mu\text{m}$ su se dobro osušili do konstantne mase te ponovno vagali i naknadno analizirali pomoću infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR-ATR) kao što je prikazano na Slici 18.



Slika 18. FTIR-ATR uređaj za analizu filtrirane MP

FTIR-ATR (spektroskopija prigušene ukupne refleksije) je analiza koja se provodi radi karakterizacije funkcionalnih skupina u kemijskoj strukturi. Način provođenja je da se na dijamantnu strukturu stavi MP tako da prekriva cijelu površinu dijamanta te se određuju karakteristične funkcionalne skupine svakog polimera. Rezultat je odgovarajući spektar okarakteriziranog polimera s pripadajućim karakterističnim funkcionalnim skupinama koje se nalaze u kemijskoj strukturi tog polimera. Analizirajući i uspoređujući spektre MP-a prije (originalne kuglice plastike nabavljene komercijalno) i nakon izlaganja kemikalijama (kuglice MP-a nakon provedene razgradnje), bilo je moguće utvrditi je li uistinu došlo do razgradnje ispitivanih polimera.

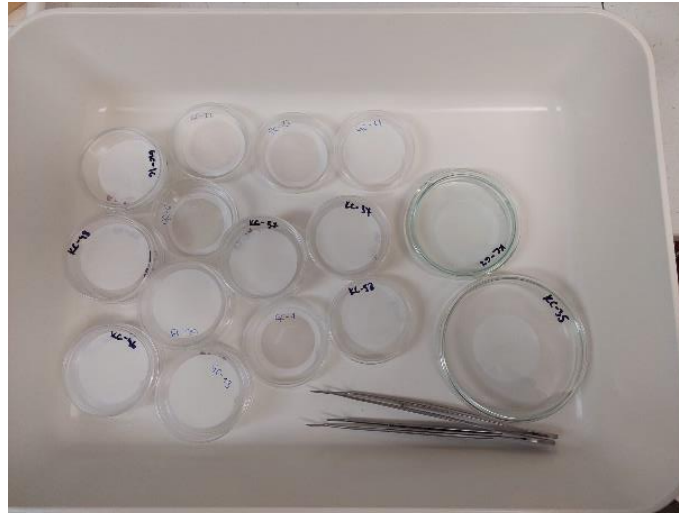
3.3.2. Analize na silicijevom dioksidu, SiO₂

Na isti način kao što je pojašnjeno u poglavlju 3.3.1. ispitivala se i razgradnja SiO₂ pomoću četiri metode (Tablica 4.). Jedina razlika u potupku u odnosu na kuglice MP-a je što nakon razgradnje u sušioniku uzorke SiO₂ nije bilo potrebno filtrirati, jer se nije kvantitavno određivao utjecaj razgradnje, već je bilo važno vizualno odrediti koja metoda dovodi do potpune razgradnje SiO₂.

3.3.3. Analize na probavilu riba

Nakon što je određen utjecaj metoda razgradnje na izolaciju i strukturu MP-a, izabrana optimalna metoda (HNO₃ i HF) je korištena za razgradnju sadržaja iz probavila riba. Iz uzoraka tkiva probavila riba sa Slike 14. je pojedinačno odvojen sadržaj probavila u teflonske posudice i odvagano je 0,1-0,2 g za analize. Na isti način kao i MP-a, razgrađen je sadržaj probavila riba u sušioniku 3,5 h pri temperaturi od 85 °C te zatim filtriran preko filtera veličine pora 0,45 µm.

Filter papiri s uzorcima nakon filtriranja i sušenja prikazani su na Slici 19. Ovako spremni filtrirani uzorci najprije su se promatrali pod stereo lupom pri povećanju 15-40 puta kako bi se indentificiralo prisustvo MP-e (Slika 20.), a zatim su mikroskopirani pomoću svjetlosnog mikroskopa s kamerom te su fotografirani.



Slika 19. Osušeni filter papiri veličine čestica 0,45 μm nakon razgradnje i filtriranja sadržaja probavila riba



Slika 20. Stereo lupa za promatranje uzoraka pod povećanjem 10-40 puta

4. Rezultati i rasprava

Za svaku od primijenjenih metoda razgradnje MP-a, korišteni su niže prikazani rezultati kako bi se utvrdilo dolazi li do njihovog utjecaja na masu i strukturu pojedinih vrsta MP-a. Osim toga, na temelju dobivenih rezultata odredila se optimalna metoda razgradnje koja ne utječe na oblik i količinu MT-a u okolišnim uzorcima, a time i njezinu uspješnu determinaciju. S obzirom da se procjena temeljila na razlikama u odvagama u svim tablicama su korištene oznake navedene u Tablici 5.

Tablica 5. Oznake različitih odvaga MP-a korištenih u eksperimentu

m_1 – početna masa MP-a prije razgradnje
m_2 – masa MP-a nakon razgradnje, filtracije i sušenja
m_R – konačna razlika u odvagama MP-a nakon i prije razgradnje ($m_2 - m_1$)

4.1. Odvage MP-a primjenom razgradnje s HNO_3

Metoda razgradnje s HNO_3 primijenjena je na MP-u različitih vrsta u obliku kuglica, koje su nabavljene komercijalno (Slika 11.).

Tablica 6. Odvage kuglica različitih vrsta MP-a prije i nakon razgradnje s HNO_3

Vrsta MP-a	m_1 /g	m_2 /g	$m_R (m_2 - m_1)$ /g	$m_R (m_2 - m_1)$ /%	Srednja vrijednost m_R /%
HDPE1	0,0443	0,0444	0,0001	0,2257	0,4053
HDPE2	0,0513	0,0516	0,0003	0,5848	
PP1	0,0339	0,0343	0,0004	1,1799	0,58995
PP2	0,0550	0,0550	0	0	
LDPE1	0,0559	0,0563	0,0004	0,7156	1,1342
LDPE2	0,0322	0,0327	0,0005	1,5528	
PS1	0,0040	0,0023	-0,0170	-4,2500	-4,925
PS2	0,0375	0,0354	-0,0021	-5,600	
PVC	0,0438	0,0386	-0,0052	-11,8721	-11,8721

Iz Tablice 6. je vidljivo kako je došlo do manjih odstupanja u odvagama kuglica plastike prije i nakon procesa razgradnje s HNO_3 . Gubitci u masi ne postoje za HDPE, LDPE i PP, odnosno postoje samo varijacije u odvagama koje se kreću u rasponu 0,41-1,13 % srednjih vrijednosti. Ova manja odstupanja su moguća zbog pogreške vaganja te tretiranja uzoraka

tijekom razgradnje, što može dovesti do neznatnih varijacija u odvagama (razlike u masi 0-0,0005 g). Gubitak mase je zabilježen za preostale dvije tretirane vrste MP-a i iznosio je prosječno 4,9 % za PS, odnosno 11,9 % za PVC. Takvi rezultati su popraćeni i vizualnim oštećenjem, koje je bilo vidljivo na kuglicama plastike nakon tretiranja dušičnom kiselinom, posebno na PS-u.

4.2. Odvage MP-a primjenom razgradnje s kombinacijom HNO₃ i H₂O₂

Druga korištena metoda razgradnje uključivala je kombinaciju 2,3 mL HNO₃ i 1,2 mL H₂O₂, te je također primijenjena na kuglicama MP-a različitih vrsta. Dobivene odvage MP-a su navedene u Tablici 7.

Tablica 7. Odvage kuglica različitih vrsta MP-a prije i nakon razgradnje s HNO₃ i H₂O₂

Vrsta MP-a	m_1 /g	m_2 /g	$m_R (m_2 - m_1)$ /g	$m_R (m_2 - m_1)$ /%	Srednja vrijednost m_R /%
HDPE1	0,0335	0,0335	0	0	0
HDPE2	0,0552	0,0552	0	0	
PP1	0,027	0,0272	0,0002	0,7407	0,4745
PP2	0,048	0,0481	0,0001	0,2083	
LDPE1	0,0296	0,0296	0	0	0,1634
LDPE2	0,0612	0,0614	0,0002	0,3268	
PS1	0,0096	0,0097	0,0001	1,0417	1,75845
PS2	0,0404	0,0414	0,001	2,4752	
PVC	0,0379	0,0374	-0,0005	-1,3193	-1,3193

Iz Tablice 7. je vidljivo kako je došlo do manjih odstupanja u odvagama kuglica plastike prije i nakon procesa razgradnje s HNO₃ i H₂O₂. Kao što je i prethodno spomenuto, manja odstupanja su moguća zbog pogreške vaganja te tretiranja uzoraka tijekom razgradnje, što može unijeti malu pogrešku u izračunu. Prema tome, očigledno je da gubitak mase od 1,3 % postoji za PVC, dok za ostale vrste MP-a ne postoje gubitci u masi, već za PP i PS postoje samo varijacije u odvagama koje se kreću u rasponu 0,16-1,76 % srednjih vrijednosti.

4.3. Odvage MP-a primjenom razgradnje s kombinacijom HNO₃ i HF

Treća metoda razgradnje primijenjena je također na kuglicama MP-a različitih vrsta, a koristila se kombinacija 3,2 mL HNO₃ i 0,2 mL HF. Dobivene odvage MP-a su prikazane u Tablici 8.

Tablica 8. Odvage kuglica različitih vrsta MP-a prije i nakon razgradnje s HNO₃ i HF

Vrsta MP-a	m_1 /g	m_2 /g	$m_R(m_2-m_1)$ /g	$m_R (m_2-m_1)$ /%	Srednja vrijednost m_R /%
HDPE1	0,0382	0,0381	-0,0001	-0,2618	0,2297
HDPE2	0,0416	0,0419	0,0003	0,7212	
PP1	0,0185	0,0187	0,0002	1,0811	0,9607
PP2	0,0476	0,048	0,0004	0,8403	
LDPE1	0,0152	0,0152	0	0	0,58925
LDPE2	0,0594	0,0601	0,0007	1,1785	
PS1	0,0075	0,0078	0,0003	4	5,9106
PS2	0,0358	0,0386	0,0028	7,8212	
PVC	0,0386	0,0346	-0,004	-10,3627	-10,3627

Iz Tablice 8. se vidi kako je došlo do manjih odstupanja u odvagama kuglica MP-a prije i nakon procesa razgradnje s HNO₃ i HF. Najmanje odstupanje u masi primjećuje se kod HDPE i LDPE uzoraka (srednja vrijednost m_R 0,23 i 0,59 %), dok gubitaka u masi nema ni za PP i PS (srednja vrijednost m_R 0,96 i 5,91 %). Jedino PVC pokazuje gubitak mase (srednja vrijednost m_R -10,4 %), kao i u prethodne dvije metode..

4.4. Odvage MP-a primjenom razgradnje s 10% KOH

Četvrta metoda razgradnje primijenjena je kao 3,5 mL 10%-tne KOH na kuglicama MP različitih vrsta, a rezultati odvaga su navedeni u Tablici 9.

Tablica 9. Odvage kuglica različitih vrsta MP-a prije i nakon razgradnje s 10% KOH

Vrsta MP-a	m_1 /g	m_2 /g	$m_R (m_2-m_1)$ /g	$m_R (m_2-m_1)$ /%	Srednja vrijednost m_R /%
HDPE1	0,0253	0,0255	0,0002	0,7905	0,6495
HDPE2	0,059	0,0593	0,0003	0,5085	
PP1	0,0164	0,0165	0,0001	0,6098	0,5218
PP2	0,0461	0,0463	0,0002	0,4338	
LDPE1	0,0146	0,0147	0,0001	0,6849	0,7897
LDPE2	0,0559	0,0564	0,0005	0,8945	
PS1	0,0051	0,0053	0,0002	3,9216	3,14815
PS2	0,0379	0,0388	0,0009	2,3747	
PVC	0,0335	0,0336	0,0001	0,2985	0,2985

Iz Tablice 9. je vidljivo kako je došlo do manjih odstupanja odvaga kuglica plastike prije i nakon procesa razgradnje s 10% KOH. U ovom slučaju nema gubitaka mase, čak je za razliku od prethodnih metoda, odstupanje u odvagama najmanje za PVC ($m_R = 0,3 \%$), dok se za ostale vrste MP-a razlike u odvagama nakon i prije razgradnje kreću u rasponu 0,52-3,15 %. Očigledno je da sve varijacije u odvagama ne prelaze 1 %, osim za PS (3,15 %).

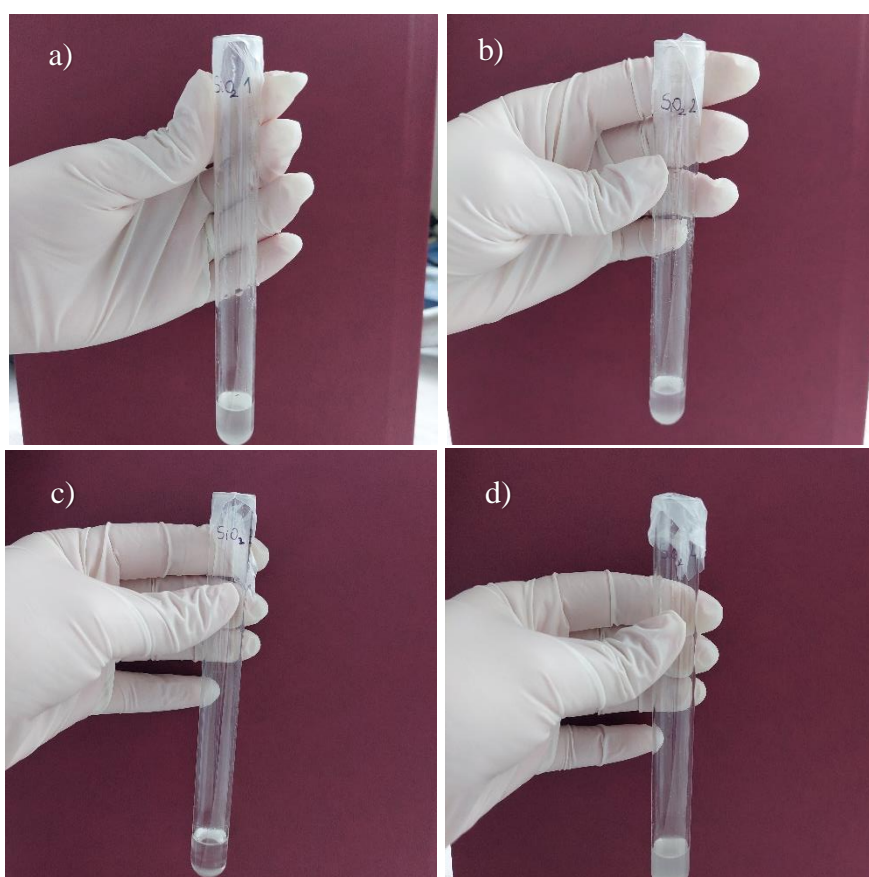
Gledajući generalno, odstupanja u odvagama nakon provedene četiri metode razgradnje u odnosu na početne vrijednosti su se kretala u rasponu srednjih vrijednosti 0-11,9 %, što predstavlja male razlike. Najveća odstupanja su postojala za PVC, koji je za sve metode pokazao gubitak mase nakon razgradnje (srednja vrijednost m_R od -1,32 do -11,9 %), osim s 10% KOH kada je m_R iznosio 0,3 %. Zatim su malo veće varijacije u odvagama određene za PS, za koji je srednja vrijednost m_R od -4,93 do 5,91 %. Za ostale tri vrste MP-a, HDPE, LDPE i PP su razlike u odvagama nakon i prije razgradnje bile jako male, odnosno srednja vrijednost m_R je iznosila od 0 do 1,13 %. Ove razlike nisu značajne i mogu ukazivati i na pogreške u vaganju i samoj manipulaciji uzoraka tijekom razgradnje. S obzirom na dobivene male razlike u odvagama, a i činjenicu da su sve ispitane metode poznate kao prikladne u razgradnji bioloških materijala, možemo ih smatrati kao dovoljno prikladnima i minimalno invazivnima u razgradnji MP-a. S obzirom da je ciljani materijal razgradnje u ovom radu sadržaj probavila

riba, koji osim biološkog materijala sadrži i sediment, pijesak i sl., izbor najprikladnije metode za razgradnju sadržaja probavila temeljio se i na rezultatima razgradnje kvarca.

4.5. Razgradnja SiO_2 primjenom četiri različite metode

Prethodno navedene metode razgradnje primijenjene su i na usitnjene čestice silicijevog dioksida, SiO_2 . Na ovaj način željeli smo utvrditi postoje li razlike u utjecaju razgradnje na SiO_2 različitim kombinacijama prethodno navedenih otopina jer je SiO_2 sastavni dio sedimenta, kojeg nalazimo i u sadržaju probavila riba.

Na Slici 21. prikazani su rezultati razgradnje SiO_2 sljedećim metodama: a) HNO_3 ; b) HNO_3 i H_2O_2 c) HNO_3 i HF ; d) 10% KOH



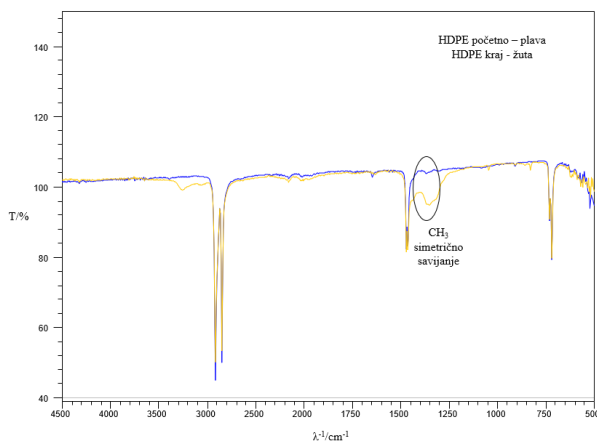
Slika 21. Izgled otopine SiO_2 nakon razgradnje sa sljedećim metodama: a) HNO_3 ; b) HNO_3 i H_2O_2 ; c) HNO_3 i HF ; d) 10% KOH

Kao što se vidi na Slici 21. c) do potpune razgradnje SiO_2 došlo je primjenom kombinacije HNO_3 i HF . To se očituje po prozirnosti otopine, odnosno potpuna razgradnja je potvrđena ako dobijemo bistru otopinu. U ovom slučaju jedino je otopina nakon razgradnje s HNO_3 i HF u potpunosti prozirna, dok su otopine nakon razgradnje s ostalim metodama ostale mutne (Slika 21. a), b) i d)). Stoga se može zaključiti kako je optimalna metoda za razgradnju

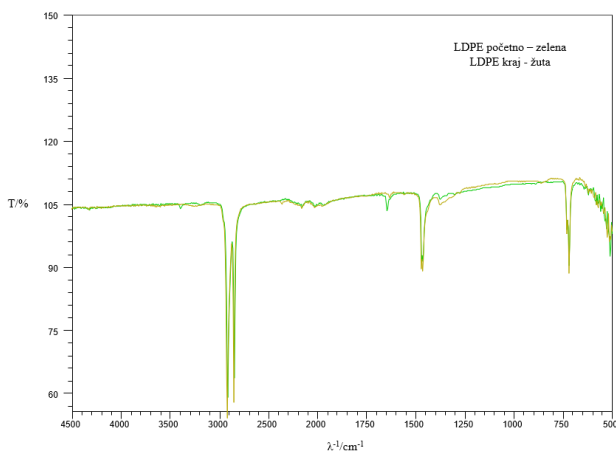
sadržaja iz probavila riba metoda s kombinacijom HNO₃ i HF, jer se jedino s ovom metodom može razgraditi i sediment, kamenčići i sl. koji su se unose prilikom hranjenja u probavilo riba.

4.6. FTIR-ATR analiza

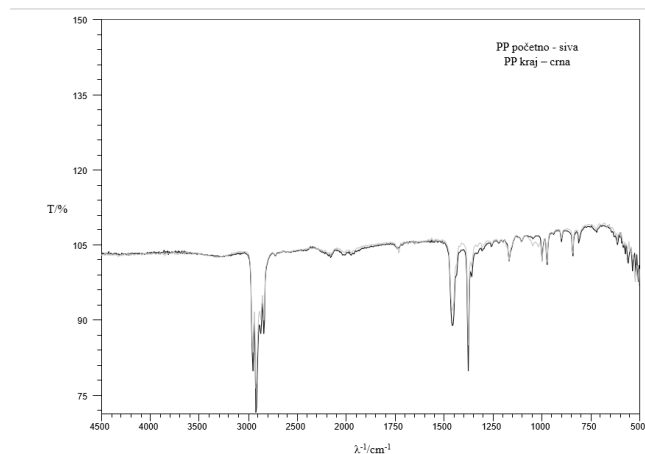
Na Slikama 22. do 26. prikazani su FTIR spektri za ispitivane vrste plastike, HDPE, LDPE, PP, PS i PVC, prije i nakon postupka razgradnje metodom koja se pokazala uspješna u uklanjanju SiO₂, odnosno metodom koja je uključivala kombinaciju HNO₃ i HF. Postupak analize opisan je u poglavlju 3.3.1.(metode).



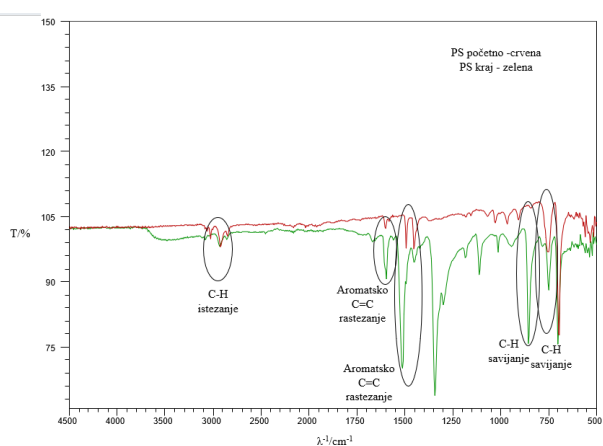
Slika 22. FTIR spektar snimljen prije (kontrola) i nakon razgradnje HDPE-a



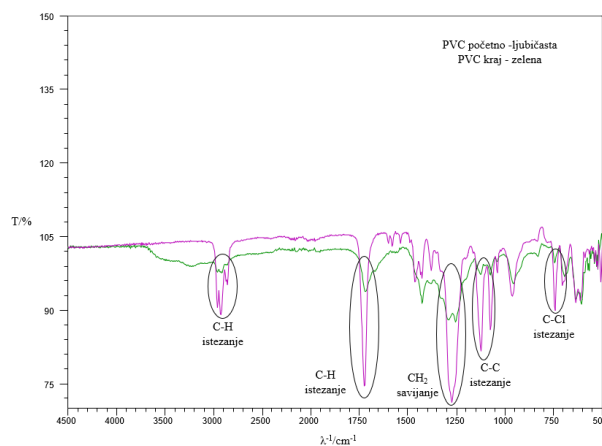
Slika 23. FTIR spektar snimljen prije (kontrola) i nakon razgradnje LDPE-a



Slika 24. FTIR spektar snimljen prije (kontrola) i nakon razgradnje PP-a



Slika 25. FTIR spektar snimljen prije (kontrola) i nakon razgradnje PS-a



Slika 26. FTIR spektar snimljen prije (kontrola) i nakon razgradnje PVC-a

Ova analiza provela se u svrhu utvrđivanja potencijalno nastalih promjena tijekom razgradnje u funkcionalnim skupinama koje karakteriziraju kemijsku strukturu ispitivanih polimera. Na taj način se može ustanoviti je li primijenjenom metodom 3,3mL HNO₃ i 0,2mL

HF došlo do narušavanja strukture ispitivane MP. Rezultati FTIR-ATR analiza ukazuju da je do značajnih promjena u strukturi došlo kod uzoraka PS-a i PVC-a. Analiza PS-a ukazuje da je došlo do istezanja C-H veze, zatim do aromatskog istezanja dvostrukih veza između 2 ugljikova atoma te i do savijanja C-H veze (Slika 25.). Kod PVC mikročestica došlo je do istezanja C-H veze, zatim savijanja CH₂ veza, te istezanja C-C i C-Cl veza (Slika 25.). Ovi rezultati se slažu s analizom masa nakon i prije razgradnje s HNO₃ i HF, gdje je do najvećih gubitaka došlo upravo kod čestica PS-a i PVC-a (srednje vrijednosti m_R = 5,91 i -10,4 %, Tablica 8.), a koje su i vizualno bile oštećene nakon provedbe pokusa. Kod uzorka za HDPE je došlo do jedne strukturne promjene, odnosno do simetričnog savijanja CH₃ veze (Slika 22.), dok kod uzoraka za LDPE i PP nije uopće došlo do promjena (Slike 23. i 24.). I ovi rezultati se slažu s analizom masa nakon razgradnje, gdje su srednje vrijednosti razlika u odvagama nakon i prije razgradnje za HDPE, LDPE i PP bile ispod 1 % (Tablica 8.). I druga istraživanja također idu u prilog ovim rezultatima, poput Chaudhary i sur. (2022.) koji su objavili da u kontaktu dušične kiseline i polimera može doći do razgradnje kroz proces poznat kao oksidativna razgradnja. To uključuje kidanje polimernih lanaca zbog reakcije dušične kiseline s funkcionalnim skupinama polimera, kao što su dvostruke veze ugljik-ugljik ili aromatski prstenovi. Oksidacija može dovesti do stvaranja novih funkcionalnih skupina, kao što su karboksilne kiseline, koje mogu promijeniti svojstva polimera, uključujući njegovu mehaničku čvrstoću i toplinsku stabilnost.⁵¹ Međutim, jako je bitno naglasiti da PE i PP pokazuju otpornost na dušičnu kiselinu zbog svoje vrlo inertne prirode, što je upravo bio i rezultat ovog dijela rada. Isto tako, HF može uzrokovati hrapavost površine i potencijalno smanjenje kemijske otpornosti polimera, stoga je i učinak HF bitan, iako je korištena u vrlo maloj količini u ovom pokusu.⁵² Dobiveni rezultati su značajni jer potvrđuju mogući utjecaj postupaka razgradnje i primijenjenih kemikalija na MP, čime ona može biti djelomično oštećena, što je izrazito bitno uzeti u obzir za daljnje analize iste.

4.7. Biometrijski pokazatelji riba korištenih za izolaciju MP-a iz sadržaja probavila

Nakon što smo utvrdili prethodnim eksperimentima da je optimalna metoda razgradnje MP-a i SiO₂ kombinacija HNO₃ i HF, ista se primijenila za izolaciju MP-a razgradnjom sadržaja probavila iz ukupno 22 uzorka morskih, katadromnih i slatkovodnih riba.

Biometrijski parametri morskih riba, trlje blatarice, oslića i arbuna, koje su korištene za potrebe ovog diplomskog rada su prikazani u Tablici 10.

Tablica 10. Biometrijski parametri jedinki trlje blatarice, oslića i arbuna ulovljenih uz obalu južnog Jadranskog mora u području Gradca i Ploča. Prikazane su srednje vrijednosti i raspon minimalnim i maksimalnih vrijednosti za svaki parametar.

	Trlja blatarica (n = 4)	Oslić (n = 4)	Arbun (n = 4)
Ukupna dužina / cm	19,33 ± 1,29 (17,50 – 20,50)	24,6 ± 3,62 (20,30 – 28,90)	19,28 ± 2,10 (17,10 – 21,70)
Ukupna masa / g	95,00 ± 17,32 (70,00 – 110,00)	145,00 ± 45,09 (80,00 – 180,00)	102,50 ± 25,00 (70,00 – 130,00)
Kondicijski indeks / g cm⁻³* 100	1,31 ± 0,11 (1,16 – 1,42)	0,96 ± 0,17 (0,75 – 1,16)	1,43 ± 0,20 (1,27 – 1,71)

Biometrijski parametri katadromne (jegulja) i slatkovodne (potočna pastrva) vrste riba koje su korištene za potrebe ovog diplomskog rada su prikazani u Tablici 11.

Tablica 11. Biometrijski parametri jegulja iz rijeke Neretve i potočnih pastrva iz rijeke Krke. Prikazane su srednje vrijednosti i raspon minimalnim i maksimalnih vrijednosti za svaki parametar.

	Jegulja (n = 2)	Potočna pastrva (n = 5)	Potočna pastrva (n = 3)
	donji tok rijeke Neretve	izvor rijeke Krke	rijeka Krka kod Knina
Ukupna dužina / cm	37,50 ± 5,66 (33,50 – 41,50)	22,94 ± 6,56 (15,00 – 30,00)	14,97 ± 0,87 (14,00 – 15,70)
Ukupna masa / g	110,00 ± 42,43 (80,00 – 140,00)	131,86 ± 99,18 (31,00 – 251,20)	35,37 ± 6,30 (29,00 – 41,60)
Kondicijski indeks / g cm⁻³* 100	0,20 ± 0,01 (0,20 – 0,21)	0,92 ± 0,05 (0,87 – 1,00)	1,05 ± 0,13 (0,92 – 1,18)

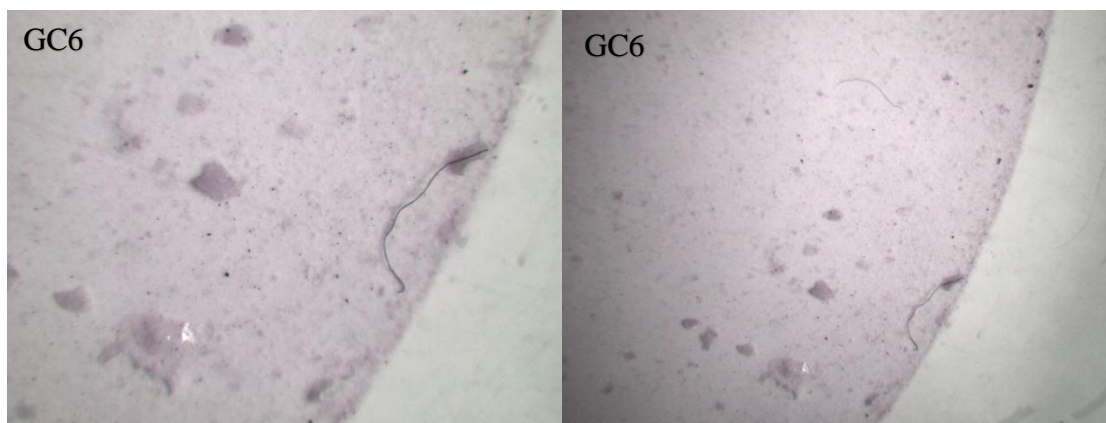
Odvage sadržaja probavila koja su razgrađene metodom HNO₃ i HF prikazane su u Tablici 12. Sadržaj probavila je označen oznakom GC za morske, a KC za slatkovodne ribe. Brojevi riba se odnose na njihov popis iz terenskog formulara.

Tablica 12. Odvage sadržaja probavila riba koji su razgrađeni s HNO₃ i HF

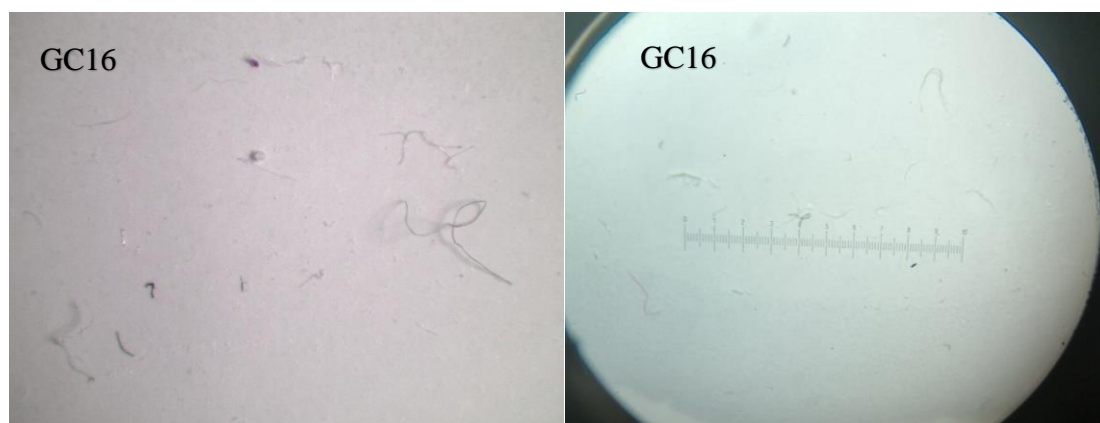
Vrsta ribe	Oznaka uzorka	Masa sadržaja probavila / g
Trlja blatarica	GC 1	0,1719
	GC 6	0,1080
	GC 8	0,1227
	GC 10	0,1455
Oslić	GC 13	0,1149
	GC 15	0,1340
	GC 16	0,0325
	GC 19	0,1167
Arbun	GC 22	0,2556
	GC 23	0,1146
	GC 26	0,1359
	GC 27	0,0993
Jegulja	GC 61	0,0669
	GC 68	0,0749
Potočna pastrva – rijeka Krka kod Knina	GC 31	0,1028
	GC 35	0,1075
	GC 37	0,1725
Potočna pastrva – izvor rijeke Krke	GC 46	0,1187
	GC 48	0,2352
	GC 57	0,1025
	GC 58	0,1442
	GC 67	0,1644

4.8. Izolacija i identifikacija MP-a iz sadržaja probavila riba

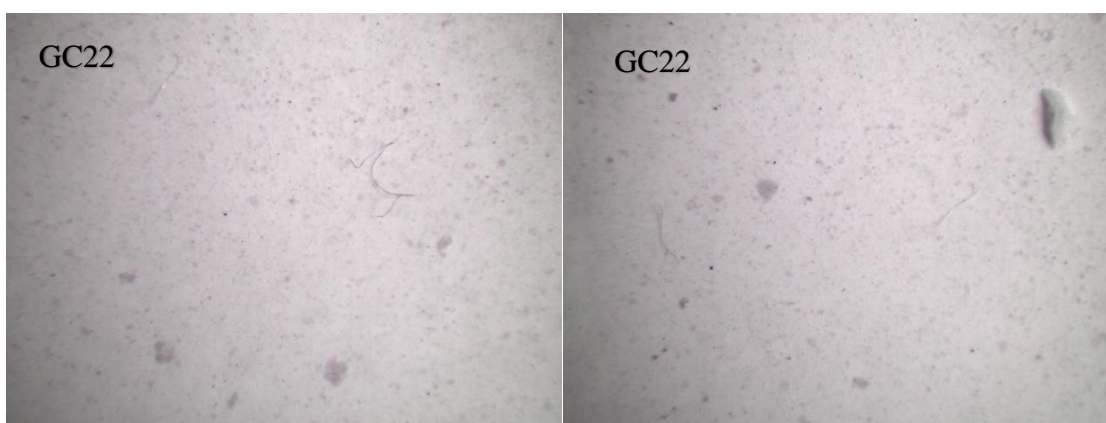
Razgradnja probavila riba metodom HNO₃ i HF provedena je na isti način kao i kuglice MP-a te je prisutnost MP-a utvrđena u svih 22 uzoraka riba. Daljnji postupak uključivao je izolaciju MP-a iz probavnog sadržaja metodom membranske filtracije i sušenja, a identifikacija je provedena promatranjem uzoraka pod stereo lupom. Na Slikama 27. – 33. prikazane neke od fotografija na kojima su izdvojeni izolirani uzorci MP-a pregledani pod stereo lupom .



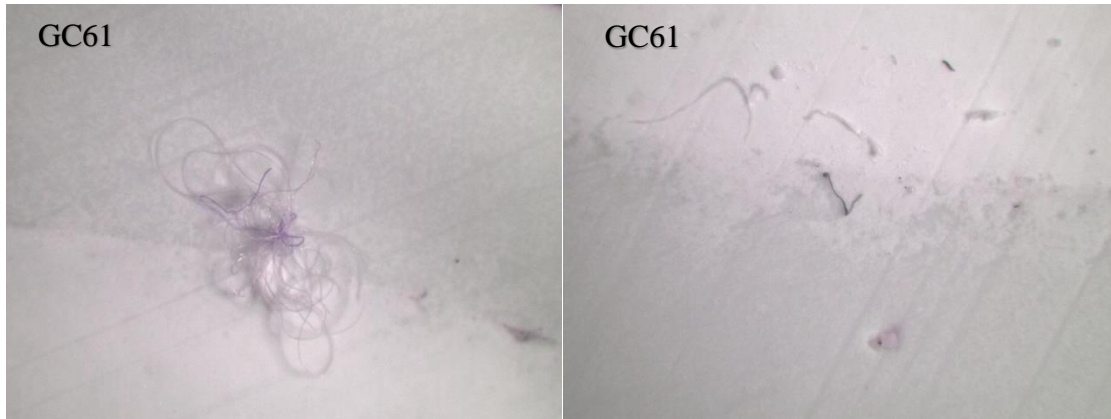
Slika 27. Prikaz MP-a izoliranog iz sadržaja probavila trlje blatarice pod stereo lupom (povećanje 20x)



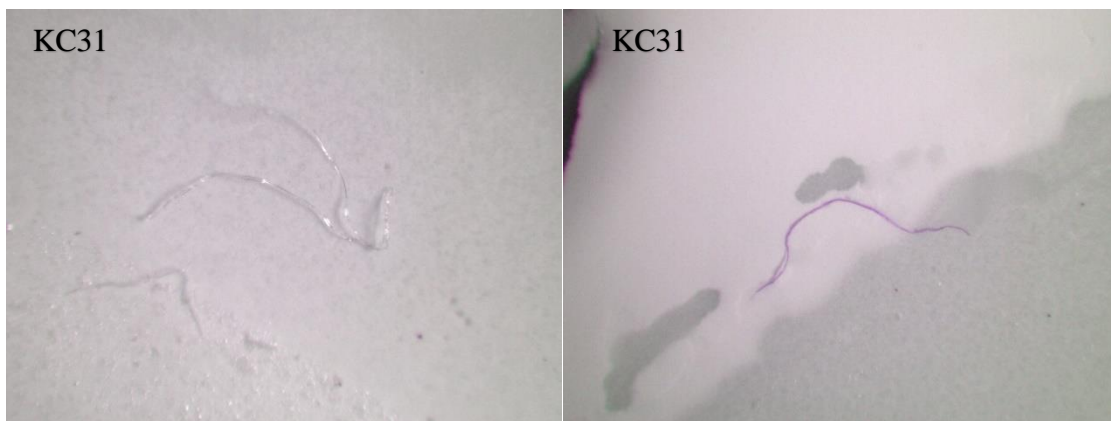
Slika 28. Prikaz MP-a izoliranog iz sadržaja probavila oslića pod stereo lupom (povećanje 15x)



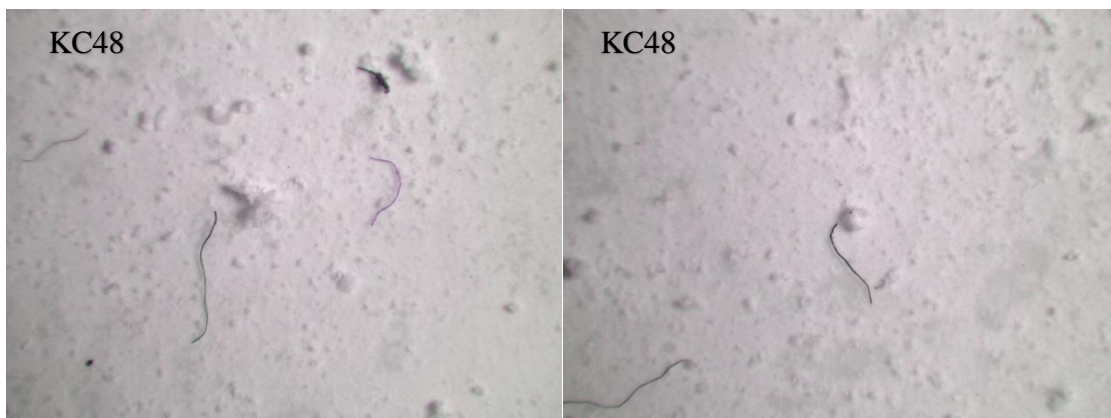
Slika 29. Prikaz MP-a izoliranog iz sadržaja probavila arbuna pod stereo lupom (povećanje 20x)



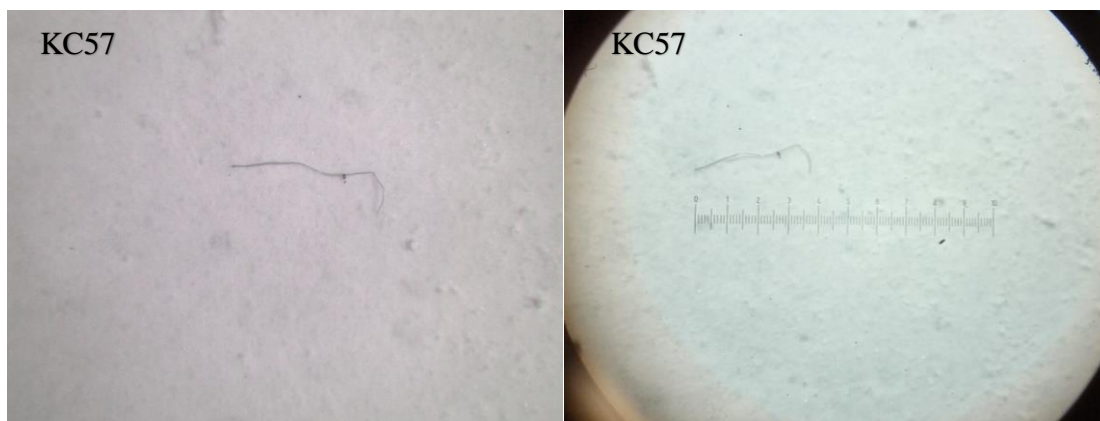
Slika 30. Prikaz MP-a izoliranog iz sadržaja probavila jegulje pod stereo lupom
(povećanje 20x)



Slika 31. Prikaz MP-a izoliranog iz sadržaja probavila ribe potočne pastrve pod stereo lupom
(povećanje 20x)



Slika 32. Prikaz MP-a izoliranog iz sadržaja probavila potočne pastrve pod stereo lupom
(povećanje 10x)



Slika 32. Prikaz MP-a izoliranog iz sadržaja probavila ribe potočne pastrve pod stereo lupom (povećanje 30x)

U Tablicama 13. i 14. navedena su povećanja korištena na stereo lupi za promatranje razgrađenih uzoraka sadržaja probavila riba te promjene koje su bile vidljive.

Tablica 13. Podaci o povećanju na stereo lupi te zapažanja tijekom pregleda uzoraka razgrađenog sadržaja probavila riba iz južnog dijela Jadranskog mora (obalno područje kod Gradca i Ploča – trlja blatarica, oslić i arbun)

Vrsta ribe i oznaka uzorka	Povećanje na stereo lupi	Zapažanja
Trlja blatarica (GC1)	20	Nema puno MP
Trlja blatarica (GC6)	20	Par vlakana, bijele „točkice“
Trlja blatarica (GC8)	45	Zabilježeno par sitnih vlakana
Trlja blatarica (GC10)	15	I manja i veća vlakna prisutna, ali ne puno
Oslić (GC13)	25	Vlakna u boji
Oslić (GC15)	20	Par sitnih vlakana, različitih boja
Oslić (GC16)	15	Puno sitnih vlakana
Oslić (GC19)	20	Zabilježeno vlakno
Arbun (GC22)	15	Fragmenti MP-a u boji i sitne točkice
Arbun (GC23)	15	Vlakna u različitim bojama
Arbun (GC26)	35	Nema puno vlakana
Arbun (GC27)	20	Nekoliko vlakana

Tablica 14. Podaci o povećanju na stereo lupi te zapažanja tijekom pregleda uzoraka razgrađenog sadržaja probavila riba iz riječnih ekosustava primorske Hrvatske (rijeka Krka - potočna pastrva i rijeka Neretva – jegulja)

Vrsta ribe i oznaka uzorka	Povećanje na stereo lupi	Zapažanja
Potočna pastrva (GC31)	20	Puno manjih vlakana raznih boja
Potočna pastrva (GC35)	45	Dosta malo MP
Potočna pastrva (GC37)	30	Pronađeno samo jedno vlakno
Potočna pastrva (GC46)	20	Dugačka vlakna na rubovima
Potočna pastrva (GC48)	10	Jako velika vlakna
Potočna pastrva (GC57)	30	Vlakna u boji, bijele „točkice“
Potočna pastrva (GC58)	40	Malo zabilježene MP, par vlakana
Potočna pastrva (GC67)	10	Nekoliko vlakana u boji, bijele „točkice“
Jegulja (GC61)	20	Zapetljana vlakna raznih boja
Jegulja (GC68)	35	Veliko dugačko crno vlakno i druga manja

Iz Slika 27. – 33. te iz Tablica 13. i 14. vidljivo je kako su u uzorcima riba iz riječnih sustava, tako i u uzorcima riba iz Jadranskog mora prisutne čestice MP-a koje se razlikuju prema obliku, veličini i boji, a među njima su najčešće pronađeni oblici vlakna. To je važan podatak je se daljnjim analizama može odrediti njihovo podrijetlo i starost, a i neke druge značajke. Količina pronađene MP varirala je neovisno o tome radi li se uzorcima riba iz slatkovodnih ili morskih ekosustava. Kao što se vidi u Tablicama 13. i 14., u nekima uzorcima je nađena mala količina MP-a što dodatno potvrđuje da je važno izabrati metodu razgradnje koja će ukloniti sav biološki materijal i sediment, odnosno sve osim MP-a, a to je u našem slučaju kombinacija HNO₃ i HF. I druga istraživanja idu u prilog takvim rezultatima, poput Holerrova i sur. (2021.) koji su objavili da MP pronađena u ribama pokazuje različita svojstva te obuhvaća širok raspon veličina i oblika. Te čestice mogu varirati od mikroznaca, vlakana i fragmenata do većih plastičnih predmeta.⁵³ Također, prema istraživanju Jinghang Wu i sur. (2020.) izdužena vlakna mogu se zadržati u probavnom traktu, dok se manje sferne čestice mogu infiltrirati u različite tjelesne sustave. Svojstva MP pronađene u sadržaju probavila riba otkrivaju složen i višestruk izazov te su potreba daljnja istraživanja kako bi se odredila prisutnost i utjecaj MP-a na organizme unutar vodenih ekosustava. Razumijevanje ovih

svojtava ne samo da daje uvid na načine na koje MP stupa u interakciju s ribama i drugim akvatičkim organizmima, već također naglašava važnost usvajanja sveobuhvatnih strategija za ublažavanje njihovog utjecaja.

5. Zaključak

Pronalaženje odgovarajuće metode za izolaciju MP-a iz probavila riba ključno je iz nekoliko razloga, a to je prije svega procjena utjecaja MP-a na akvatičke organizme i vodeni okoliš. Proučavanje prisutnosti MP-a u riba pomaže znanstvenicima u procjeni utjecaja onečišćenja plastikom na okoliš, omogućavajući bolje razumijevanje načina na koji se te onečišćujuće tvari kreću kroz hranidbene mreže i utječu na život u moru, a posljedično i na život ljudi. Nadalje, učinkovito donošenje politike i regulatornih mjera koje se bave onečišćenjem MP-om zahtijeva pouzdane podatke. Odgovarajuća metoda izolacije, uključujući metode razgradnje, omogućuje praćenje prisutnosti i trendova onečišćenja MP-om u ribljim populacijama tijekom vremena, što je ključno za praćenje utjecaja i promjena u razinama onečišćenja.

Provedbom istraživanja i usporedbom rezultata iz ovog diplomskog rada, zaključili smo da je optimalna metoda izolacije MP-a iz sadržaja probavila riba razgradnja kombinacijom dušične i fluorovodične kiseline. Upravo je metoda koju smo izabrali omogućila uklanjanje biološkog materijala i sedimenta iz uzorka te time i dobru vidljivost i identifikaciju MP-a u kompleksnom uzorku poput sadržaja probavila riba. To je potvrđeno i na uzorcima slatkovodnih, katadromnih i morskih riba, iz čijeg je sadržaja probavila uspješno izolirana i identificirana MP u 100 % uzoraka. Izolirana MP bila je različitih svojstava neovisno o tome jesu li uzorci bili iz slatkovodnih ili morskih ekosustava, a najčešće pronađeni oblici bila su vlakna. Međutim, bitno je i napomenuti kako se ovom metodom razgradnje utječe na strukturu MP-a, odnosno moguća je djelomična razgradnja polimera PVC i PS, dok nema utjecaja na HDPE, LDPE i PP, što smo potvrdili razlikama u odvagama kuglica različitih vrsta MP-a nakon i prije razgradnje te FTIR-ATR analizom.

Prema svemu navedenom, može se zaključiti kako se metoda razgradnje s dušičnom i fluorovodičnom kiselinom može uspješno primijeniti za izolaciju i identifikaciju MP-a iz sadržaja probavila riba, međutim uzimajući u obzir saznanje da je moguće oštećenje PVC i PS mikročestica primjenom ove metode. Razvijanje metoda za izolaciju i identifikaciju različitih vrsta MP-a u ribama može pomoći u prepoznavanju primarnih izvora onečišćenja i usmjeravanju napora za njihovo uklanjanje ili bar ublažavanje utjecaja na okoliš. Zbog toga je važno nastaviti razvijati uspješne metode izolacije MP-a iz bioloških materijala jer su točni podaci o MP-u u ribama ključni za lokalne zajednice, vladu i organizacije za postavljanje smjernica, standarda i propisa usmjerenih na smanjenje onečišćenja plastikom i zaštitu vodenih ekosustava i ljudskog zdravlja.

6. Popis kratica

DDT - diklordifeniltrikloretan

FTIR - infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

HRZZ – Hrvatska zaklada za znanost

HDPE – polietilen visoke gustoće

LDPE – polietilen niske gustoće

MAP - makroplastika

MEP - mezoplastika

MP – mikroplastika

MSFD – Okvirna direktivna o morskoj strategiji

PCB – poliklorirani bifenili

PET - polietilen tereftalat

PP - polipropilen

PS - polistiren

P.T.F.E. - politetrafluoreten

PVC – poli(vinil-klorid)

WFD – Okvirna direktiva o vodama

7. Literatura

- [1.] *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 27. 3. 2023. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=17383>
- [2.] Kristen K. Beck, Michael-Shawn Fletcher, Brent B. Wolfe, Krystyna M. Saunders, Aquatic ecosystem response to climate, fire, and the demise of montane rainforest, Tasmania, Australia, *Global and Planetary Change*, Volume 223, 2023, 104077, ISSN 0921-8181, <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2023.104077>.
- [3.] Kenneth Sherman, Large Marine Ecosystems, *Encyclopedia of Ocean Sciences (Third Edition)*, Academic Press, 2019, Pages 709-723, ISBN 9780128130827, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11117-0>.
- [4.] <https://education.nationalgeographic.org/resource/freshwater-ecosystem/> , pristupljeno 27. 3. 2023.
- [5.] Bashir I, Lone FA, Bhat RA, Mir SA, Dar ZA, Dar SA. Concerns and Threats of Contamination on Aquatic Ecosystems. *Bioremediation and Biotechnology*. 2020.; :1–26. doi: 10.1007/978-3-030-35691-0_1.
- [6.]Parlamentarno pitanje - E-010637/2014 https://www.europarl.europa.eu/doceo/document//E-8-2014-010637_HR.html , pristup 27. 3. 2023.
- [7.] European environmental agency, Slatkovodni i morski okoliš, 2020., <https://www.eea.europa.eu/hr/themes/water/intro>, pristup 27. 3. 2023.
- [8.] Crawford, C. B., Quinn, B., Microplastics, standardisation and spatial distribution i The interactions of microplastics and chemical pollutants, u: *Microplastic Pollutants*, Amsterdam, 2017., 101–130, 131-157.
- [9.] NOAA. What are microplastics?, <https://oceanservice.noaa.gov/about/welcome.html#cite>, pristup 3.4.2023.
- [10.] Li, J., Liu, H., Chen, J. P., Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Research*, 2017.
- [11.] Shrivastava, Anshuman, *Introduction to Plastics Engineering, Plastic Properties and Testing* 2018.; 49–110.
- [12.] polietilen. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 5. 4. 2023. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=49145>>.

- [13.] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "high-density polyethylene". *Encyclopedia Britannica*, 20 Mar. 2023, <https://www.britannica.com/science/high-density-polyethylene>. pristupljeno 10. 4. 2023.
- [14.] S.E. Selke, R.J. Hernandez, Packaging: Polymers in Flexible Packaging, Editor(s): K.H. Jürgen Buschow, Robert W. Cahn, Merton C. Flemings, Bernhard Ilschner, Edward J. Kramer, Subhash Mahajan, Patrick Veyssièrè, *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier, 2001, 6652-6656, ISBN 9780080431529, <https://doi.org/10.1016/B0-08-043152-6/01176-1>.
- [15.] Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "polystyrene". *Encyclopedia Britannica*, 24 Mar. 2023, <https://www.britannica.com/science/polystyrene>. pristupljeno 11. 10. 2023.
- [16.] Abdu Mohammed, DK Nageswara Rao, Investigation on mechanical properties of flax fiber/expanded polystyrene waste composites, *Heliyon*, Volume 9, Issue 3, 2023, e13310, ISSN 2405-8440, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13310>.
- [17.] *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021., polistiren. pristupljeno 11. 4. 2023.
<<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=49224>>.
- [18.] Kik, K., Bukowska, B., & Sicińska, P. (2020). Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environmental Pollution*, 262, 114297. doi:10.1016/j.envpol.2020.114297
- [19.] Lee Tin Sin, Bee Soo Tueen, Plastics and environmental sustainability issues, *Plastics and Sustainability*, Elsevier, 2023, 1-43, ISBN 9780128244890, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824489-0.00006-4>.
- [20.] Ayodeji Emmanuel Amobonye, Prashant Bhagwat, Suren Singh, Santhosh Pillai, Biodegradability of Polyvinyl chloride, *Biodegradability of Conventional Plastics*, Elsevier, 2023, 201-220, ISBN 9780323898584, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89858-4.00017-8>.
- [21.] Maier C., Calafut T, Polypropylene, 1998., 3-9, 27-47
- [22.] Spoerk, M., Holzer, C., Gonzalez-Gutierrez, J. (2020), Material extrusion-based additive manufacturing of polypropylene: A review on how to improve dimensional inaccuracy and warpage. *J. Appl. Polym. Sci.*, 137, 48545. doi: <https://doi.org/10.1002/app.48545>
- [23.] <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polypropylene-pp-plastic#Properties>, Pristupljeno 11.4.2023.
- [24.] Wang, W., Gao, H., Jin, S., Li, R., Na, G., The ecotoxicological effects of microplastics on aquatic food web, from primary producer to human: A review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173 (2019) 110–117

- [25.] Yu, Q., Hu, X., Yang, B., Zhang, G., Wang, J., Ling W., Distribution, abundance and risks of microplastics in the environment, *Chemosphere*, 249 (2020) 126059.
- [26.] Laskar, N., Kumar, U., Plastics and microplastics: A threat to environment, *Environmental Technology & Innovation*, 14 (2019) 100352.
- [27.] Waldschläger, K., Lechthaler, S., Stauch, G., Schüttrumpf, H., The way of microplastic through the environment – Application of the source-pathway-receptor model (review), *Science of the Total Environment*, 713 (2020) 136584.
- [28.] Hui, M., Shengyan, P., Shibin, L., Yingchen, B., Mandal, S., Baoshan, X., Microplastics in aquatic environments: Toxicity to trigger ecological consequences, *Environmental Pollution*, 261 (2020) 114089
- [29.] Au, S. Y., Lee, C. M., Weinstein, J. E., van den Hurk, P., & Klaine, S. J. (2017). Trophic transfer of microplastics in aquatic ecosystems: Identifying critical research needs. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 13(3), 505–509. doi:10.1002/ieam.1907
- [30.] R. Geyer, J. R. Jambeck and K. L. Law, *Sci. Adv.*, 2017, 3, e1700782.
- [31.] Lebreton et al., A global mass budget for positively buoyant macroplastic debris in the ocean. *Nature Scientific Reports.*, 2019., <https://www.nature.com/articles/s41598-019-49413-5>
- [32.] bioindikator. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno 21. 4. 2023.
<<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=7745>>.
- [33.] Okwuosa, Obinna B., Eyo, Joseph E., Omovohwovie Emmanuel E., Role Of Fish as Bioindicators: A Review, 2019., *IRE Journals*, Vol 2 Issue 11, ISSN: 2456-8880
<https://www.irejournals.com/formatedpaper/17030571.pdf>
- [34.] Dalia Saad, Patricia Chauke, Ewa Cukrowska, Heidi Richards, Josiane Nikiema, Luke Chimuka, Hlanganani Tutu, First biomonitoring of microplastic pollution in the Vaal river using Carp fish (*Cyprinus carpio*) “as a bio-indicator”, *Science of The Total Environment*, Vol 836, 2022, 155623, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155623>.
- [35.] Gomes-Silva, Guilherme, et al. "Using native and invasive livebearing fishes (Poeciliidae, Teleostei) for the integrated biological assessment of pollution in urban streams." *Science of The Total Environment* 698 (2020): 134336.
- [36.] Capó, X.; Morató, M.; Alomar, C.; Rios-Fuster, B.; Valls, M.; Compa, M.; Deudero, S. A Biomarker Approach as Responses of Bioindicator Commercial Fish Species to Microplastic Ingestion: Assessing Tissue and Biochemical Relationships. *Biology* 2022, 11, 1634. <https://doi.org/10.3390/biology11111634>

- [37.] Annalisa Sambolino, Eva Iniguez, Inma Herrera, Manfred Kaufmann, Ana Dinis, Nereida Cordeiro, Microplastic ingestion and plastic additive detection in pelagic squid and fish: Implications for bioindicators and plastic tracers in open oceanic food webs, *Science of The Total Environment*, Volume 894, 2023, 164952, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164952>.
- [38.] Ece Kılıç, Nebil Yücel, Microplastic occurrence in the gastrointestinal tract and gill of bioindicator fish species in the northeastern Mediterranean, *Marine Pollution Bulletin*, Vol 177, 2022, 113556, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113556>.
- [39.] Wieczorek, Alina & Morrison, Liam & Croot, Peter & Allcock, A. & MacLoughlin, Eoin & Savard, Olivier & Brownlow, Hannah & Doyle, Thomas. (2018). Frequency of Microplastics in Mesopelagic Fishes from the Northwest Atlantic. *Frontiers in Marine Science*. 5. 10.3389/fmars.2018.00039.
- [40.] Species Fact Sheets – *Mullus barbatus*, FAO, <http://www.fao.org/fishery/species/3207/en> pristupljeno: 17.8.2023.
- [41.] Species Fact Sheets – *Merluccius merluccius*, FAO, <http://www.fao.org/fishery/species/2238/en> , pristupljeno: 17.8.2023.
- [42.] Species Fact Sheets – *Pagellus erythrinus*, FAO: <http://www.fao.org/fishery/species/2369/en> (pristupljeno: 17.8.2023.)
- [43.] Species Fact Sheets – *Anguilla anguilla* FAO, https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/anguilla_anguilla/en, pristupljeno: 17.8.2023.
- [44.] Species Fact Sheets – *Salmo trutta* FAO, <https://www.fao.org/fishery/en/introsp/2385/en>, pristupljeno: 17.8.2023.
- [45.] Cole, M., Webb, H., Lindeque, P. *et al.* Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Sci Rep* **4**, 4528 (2014). <https://doi.org/10.1038/srep04528>
- [46.] Adrián López-Rosales, Jose Andrade, Verónica Fernández-González, Purificación López-Mahía, Soledad Muniategui-Lorenzo, bA reliable method for the isolation and characterization of microplastics in fish gastrointestinal tracts using an infrared tunable quantum cascade laser system, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 178, 2022, 113591, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113591>.
- [47.] Walter Dellisanti, Matthew Ming-Lok Leung, Karen Wing-Kei Lam, Youji Wang, Menghong Hu, Hoi Shing Lo, James Kar Hei Fang, A short review on the recent method development for extraction and identification of microplastics in mussels and fish, two major groups of seafood, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 186, 2023, 114221, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114221>.

- [48.] Devangshi Debraj, M. Lavanya, Microplastics everywhere: A review on existing methods of extraction, *Science of The Total Environment*, Volume 893, 2023, 164878, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164878>.
- [49.] Silvia S. Monteiro, Teresa Rocha-Santos, Joana C. Prata, Armando C. Duarte, Ana Violeta Girão, Pedro Lopes, Tiago Cristovão, João Pinto da Costa, A straightforward method for microplastic extraction from organic-rich freshwater samples, *Science of The Total Environment*, Volume 815, 2022, 152941, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.152941>.
- [50.] Erin Tuttle, Aron Stubbins, An optimized acidic digestion for the isolation of microplastics from biota-rich samples and cellulose acetate matrices, *Environmental Pollution*, Volume 322, 2023, 121198, ISSN 0269-7491, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121198>.
- [51.] Chaudhary, A.K., Chitriv, S.P. & Vijayakumar, R.P. Influence of nitric acid on biodegradation of polystyrene and low-density polyethylene by *Cephalosporium species*. *Arch Microbiol* **204**, 489 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03089-0>
- [52.] F.M. Fowkes, Acid-Base Interactions in Polymer Adhesion, J.M. Georges, Tribology Series, Elsevier, Volume 7, 1981, 119-137, ISSN 0167-8922, [https://doi.org/10.1016/S0167-8922\(08\)70878-2](https://doi.org/10.1016/S0167-8922(08)70878-2).
- [53.] Aneta Hollerová, Nikola Hodkovicová, Jana Blahová, Martin Faldyna, Petr Maršálek, Zdeňka Svobodova, Microplastics as a potential risk for aquatic environment organisms – a review, *ACTA VET. BRNO* 2021, 90: 099–107; <https://doi.org/10.2754/avb202190010099>
- [54.] Jinghang Wu, Mingxiang Lai, Yaowen Zhang, Jingjing Li, Hanghai Zhou, Rijin Jiang, Chunfang Zhang, Microplastics in the digestive tracts of commercial fish from the marine ranching in east China sea, China, *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, Volume 2, 2020, 100066, ISSN 2666-0164, <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2020.100066>.

Životopis

Dubravka Datković (rođ. Tavra) [REDACTED] Pohađala je prirodoslovno-matematički smjer 3. gimnazije u Zagrebu od 2013. do 2017. godine. Zatim je upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Ekoinženjerstvo. Tijekom studiranja aktivno piše članke za znanstveno-popularni časopis Reaktor ideja te je od 2020. do 2022. godine obnašala dužnost glavne urednice. Obranila je završni rad 2021. godine na temu "Primjena slatkovodne mikroalge *Scenedesmus* sp. za određivanje toksičnosti mikroplastičnih čestica polipropilena" pod mentorstvom doc. dr. sc. Dajane Kučić Grgić na Zavodu za industrijsku ekologiju. Dobitnica je dvije Rektorove nagrade. Bila je aktivna članica Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa od 2019. do rujna 2023. S kolegicama je i pokrenula projekt "Eko globus" i mnoge druge projekte u sklopu Studentske sekcije HDKI-ja. Sudjelovala je i volontirala na mnogim znanstvenim i stručnim skupovima poput HSKIKI-ja, SiC-a, SMLKI-ja itd. U ljeto 2022. sudjelovala je na Work&Travel USA programu u SAD-u u Kaliforniji.