Kvantifikacija i karakterizacija mikroplastike u uzgojnih i divljih kamenica (Ostrea edulis) uz hrvatsku obalu Jadrana

Vranjić, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:226:225597

Rights / Prava: Attribution 4.0 International / Imenovanje 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of University Department of Marine Studies

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

Ema Vranjić

KVANTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA MIKROPLASTIKE U UZGOJNIH I DIVLJIH KAMENICA (*OSTREA EDULIS*) UZ HRVATSKU OBALU JADRANA

Diplomski rad

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

KVANTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA MIKROPLASTIKE U UZGOJNIH I DIVLJIH KAMENICA (*OSTREA EDULIS*) UZ HRVATSKU OBALU JADRANA

Diplomski rad

Predmet: Zaštićena morska područja

Mentor:
Doc. dr. sc. Zvjezdana Popović Perković

Student:
Ema Vranjić

Split, rujan 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Morsko ribarstvo

Diplomski rad

KVANTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA MIKROPLASTIKE U UZGOJNIH I DIVLJIH KAMENICA (*OSTREA EDULIS*) UZ HRVATSKU OBALU JADRANA

Ema Vranjić

Sažetak

U disertaciji su predstavljeni rezultati istraživanja kvantifikacije i karakterizacije mikroplastike kod vrste *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) duž hrvatske obale Jadrana. Uzorci su prikupljeni na tri lokacije uključujući sjeverni (Limski kanal), srednji (Šibenski kanal) i južni Jadran (Malostonski zaljev). Na svakoj lokaciji je prikupljeno 10 divljih i 10 uzgojnih jedinki. Rezultati pokazuju prisustvo mikroplastike u uzgojnih i divljih jedinki vrste *O. edulis* na svim područjima uzorkovanja. Analizom su pronađene različite kategorije mikroplastike kod uzgojnih jedinki vrste *O. edulis* i to fragmenti (0,58 MP/g), vlakna (0,7 MP/g) i peleti (0,04 MP/g). Ukupan broj mikroplastike je varirao od 0,33 to 5,43 komada/jedinci. Prosječne dužine različitih pronađenih kategorija su bile 20,55 μm, 31,88 μm and 456,57 μm. Pronađene čestice mikroplastike analizirane su Micro-Raman spektrometrom.

(39 stranica, 30 slika, 7 tablica, 44 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: školjkaši, *Ostrea edulis*, plastika, mikroplastika, Jadran

Mentor: Doc. dr. sc. Zvjezdana Popović Perković

Ocjenjivači: 1. Doc. dr. sc. Maja Krželj
2. Izv. prof. dr. sc. Josipa Ferri
3. Doc. dr. sc. Zvjezdana Popović Perković

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Department of Marine Studies
Graduate study Marine Fishery

MSc Thesis

QANTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MICROPLASTICS IN FARMED AND WILD OYSTERS (OSTREA EDULIS) ALONG THE CROATIAN ADRIATIC COAST

Ema Vranjić

Abstract

The dissertation presents the results of research on quantification and characterization of microplastics in *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) species along Croatian Adriatic coast. Samples were collected from three locations: Mali Ston bay, Šibenik channel and Lim bay. In each area, 10 wild and 10 farmed oysters were collected. The results indicate the presence of microplastics in both farmed and wild oysters in all sampling areas. The analysis showed multiple types of microplastic including fragments (0.58 MP/g), fibers (0.7 MP/g) and other items (0.04 MP/g). The number of total microplastic varied from 0.33 to 5.43 items/individual. The mean sizes of the diferent categories of microplastic particles were 20.55 μm, 31.88 μm and 456.57 μm. Detected microplastic particles were analysed with Micro-Raman spectrometer.

(39 pages, 30 figures, 7 tables, 44 references, original in: Croatian)

Keywords: bivalves, *Ostrea edulis*, plastics, microplastics, Adriatic

Supervisor: Zvjezdana Popović Perković, PhD / Assistant Professor

Reviewers: 1. Maja Krželj, PhD / Assistant Professor
2. Josipa Ferri, PhD / Associate Professor
3. Zvjezdana Popović Perković, PhD / Assistant Professor

SADRŽAJ:

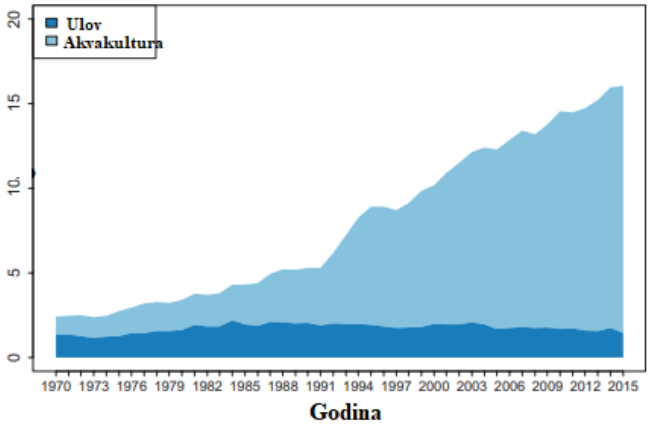
1. UVOD 1
1.1. Rasprostranjenost i biološke osobine vrste *Ostrea edulis* 3
1.2. Tehnologija uzgoja vrste *Ostrea edulis* 7
. 1.3. Plastika u morskom okolišu 9
1.4. Mikroplastika 11
1.5. Dosadašnja istraživanja mikroplastike na školjkašima 12
1.6. Svrha i ciljevi rada 13
2. MATERIJALI I METODE 14
2.1. Prikupljanje uzoraka 14
2.2. Osnovni hidrografski parametri 14
2.3. Izolacija mikroplastike iz vrste *Ostrea edulis* 15
2.4. Analiza podataka 21
3. REZULTATI 23
3.1. Osnovni hidrografski parametri 23
3.2. Biometrijski podatci 24
3.3. Kategorije mikroplastike pronađene kod vrste *Ostrea edulis* 24
3.4. Dužinski raspon mikroplastike kod vrste *Ostrea edulis* 28
3.5. Analiza čestica mikroplastike MICRO-Raman spektrometrom 32
4. RASPRAVA 34
5. ZAKLJUČAK 36
6. LITERATURA 37

1. UVOD

Školjkaši su velika skupina beskralježnjaka iz koljena mekušaca (Mollusca). To su vodene, pretežno morske životinje spljoštena bilateralno simetrična tijela obavijena mekim plaštem čiji vanjski epitel izlučuje ljušture. Ljuštura školjkaša ima nekoliko funkcija: predstavlja kostur za vezivanje mišića, štiti od predatora, kod nekih vrsta sprječava ulazak pijeska u plaštanu šupljinu. Unutar ljušture, nalazi se plašt školjkaša koji se sastoji od dva režnja tkiva koja u potpunosti zatvaraju školjkaša unutar ljušture. S unutarnje strane ljuštura vidljiva je plaštena crta (palijalna crta), koja označava mjesto gdje mišićni rub plašta prirasta za ljušture. Glavna uloga plašta je bioakumulacija metala i organskih kontaminanata, iako su škrge, bubrezi i probavna žijezda bitniji u tom procesu. Tijelo školjkaša sastoji se samo od trupa i stopala, a glava je reducirana. Na krajevima tijela su izmetni i škržni otvor. S donje strane tijela je prstasto ili sjekirasto mišićavo stopalo. Stopalo se pojavljuje kad je dužina larve oko 200 μm i postaje funkcionalna kada larva dosegne oko 260 μm dužine (Gosling, 2003). Glavna uloga stopala je ukopavanje u pijesak i mulj. Neki školjkaši u stopalu imaju bisusnu žlijezdu, čiji se sekret – bisus – u vodi brzo stvrdne, a služi im za prihvaćanje za tvrdu podlogu. Kod nekih školjkaša (*Ostrea*) stopalo je potpuno nestalo pa su za čvrstu podlogu prihvaćeni ljušturom (Marguš i Teskeredžić, 2004). Na prednjem dijelu tijela školjkaša nalazi se usni otvor, na koji se nastavljaju jednjak, srednje crijevo i želudac (prošireno srednje crijevo), koji je okružen parnim digestivnim žlijezdama. Cirkulatorni sustav je zatvoren. Krv iz škrga ulazi u dvije pretklijetke, iz njih u jednu klijetku, odakle je izvode prednja i stražnja arterija. Vene čine sustav sinusa kroz koji krv dolazi u škrge. Dišni organi sastoje se od dva reda škržnih listića (lamella) smještenih ispod plašta. Velika površina škrga omogućuje laku izmjenu plinova, a osim toga, svojim sustavom treplji škrge čine glavne organe za skupljanje hrane filtriranjem. Na svakom škržnom vlakancu mogu se razlikovati prednje, bočno-prednje i bočne treplje. Sitne čestice promjera oko 0,05 mm tjerane trepljama dospiju u usta, a odavde u jednjak i želudac. Tvari koje su skupljene filtriranjem pomoću hranidbenih struktura, a nisu ušle u probavilo, obično se nazivaju pseudofekalije. Količina vode koja u toku jednog sata prođe kroz škrge iznosi kod kamenice *Crassostrea virginia* pri 20°C oko 18 litara, dok *Ostrea edulis* za jedan sat propusti pri 15°C oko 12,5 litara vode (Marguš i Teskeredžić, 2004). Od osjetnih organa školjkaši imaju statociste (organe za ravnotežu) i jednostavno građene oči. Većina školjkaša razdvojena je spola (gonohoristi), ali ima i dvospolaca (hermafroditi). Gonade su parne, ali su nekad toliko blizu da ih je teško detektirati. Kod kamenica gonade se

nalaze na vanjskoj površini probavne žlijezde (Gosling, 2003). Oplodnja je vanjska jer većina morskih školjkaša izbacuju svoje spolne produkte u more. Neki školjkaši (Ostreidea) imaju unutarnju oplodnju a početni ličinački stadiji razvijaju se u plaštenoj šupljini pa u okoliš izlaze razvijeni oblici ličinki. Svi školjkaši vezani su za vodeni okoliš. Većina živi potpuno ukopana u meku podlogu dna ili provodi semisesilni ili sesilni način života. Mnogi morski školjkaši su jestivi. Kontrolirano se, u znatnim količinama, uzgajaju kamenice (Ostreoidea), dagnje (Mytiloidea) i češljače (Pectinoidea). Među jestivim školjkašima u Jadranu odlikuju se kamenica (*O. edulis*), dagnja (*Mytilus galloprovincialis*), jakovska kapica (*Pecten jacobaeus*), prstac (*Lithophaga lithophaga*), kunjka (*Arca noae*), kućica (*Tapes decussatus*) i prnjavica (*Venus verrucosa*) (Marguš i Teskeredžić, 2004).

Morski školjkaši uzgajaju se stoljećima i prepoznati su kao održivi resurs niskog prehrambenog lanca koji hranu nabavljaju u njihovom okolišu. Ukupna proizvodnja školjkaša u 2015. godini iznosila je 16 milijuna tona (Smaal i sur., 2019), što je oko 14% ukupne akvakulturne proizvodnje. Akvakultura i ulov školjkaša bilježe stalni porast, od 5 do 16 milijuna tona godišnje tijekom razdoblja 1995-2015 (Smaal i sur., 2019) (Slika 1). Akvakultura školjkaša danas dominira nad divljim ulovom gotovo deveterostruko (89%), a ta se brojka i dalje povećava.



Slika 1. Evolucija ukupne globalne proizvodnje (milijun tona po godini) školjkaša u akvakulturi i ulov (izvor: Smaal i sur., 2019).

Posljednjih godina, postojanje mikroplastike i njen potencijalni utjecaj na organizme i ljudsko zdravlje dobivaju veliku javnu i znanstvenu pozornost (Andrady i sur., 2003). Zbog lakog uzorkovanja, načina ishrane, sedentarnog načina života i niza drugih karakteristika školjkaši se uvelike koriste kao indikatorske vrste. Zbog globalnog porasta konzumacije

školjkaša jako je bitna uspostava monitoringa prisutnosti čestica mikroplastike kod uzgojnih a i divljih jedinki radi potencijalne direktne ugroze ljudskog zdravlja i kontroliranja mogućeg ulaska mikroplastike u hranidbenu mrežu te potencijalnog direktnog utjecaja mikroplastike na energetski metabolizam školjkaša a time i na efikasnost akvakulturne proizvodnje.

1.1. Rasprostranjenost i biološke osobine vrste *Ostrea edulis*

Taksonomski položaj (Sabelli i sur., 1990)

Razred: Bivalvia Linnaeus, 1975.

Red: Ostreoida Ferussac, 1822.

Natporodica: Ostreidea Rafinesque, 1815.

Porodica: Ostreidae Rafinseque, 1815.

Rod: *Ostrea* Linnaeus, 1758.

Vrsta: *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758.

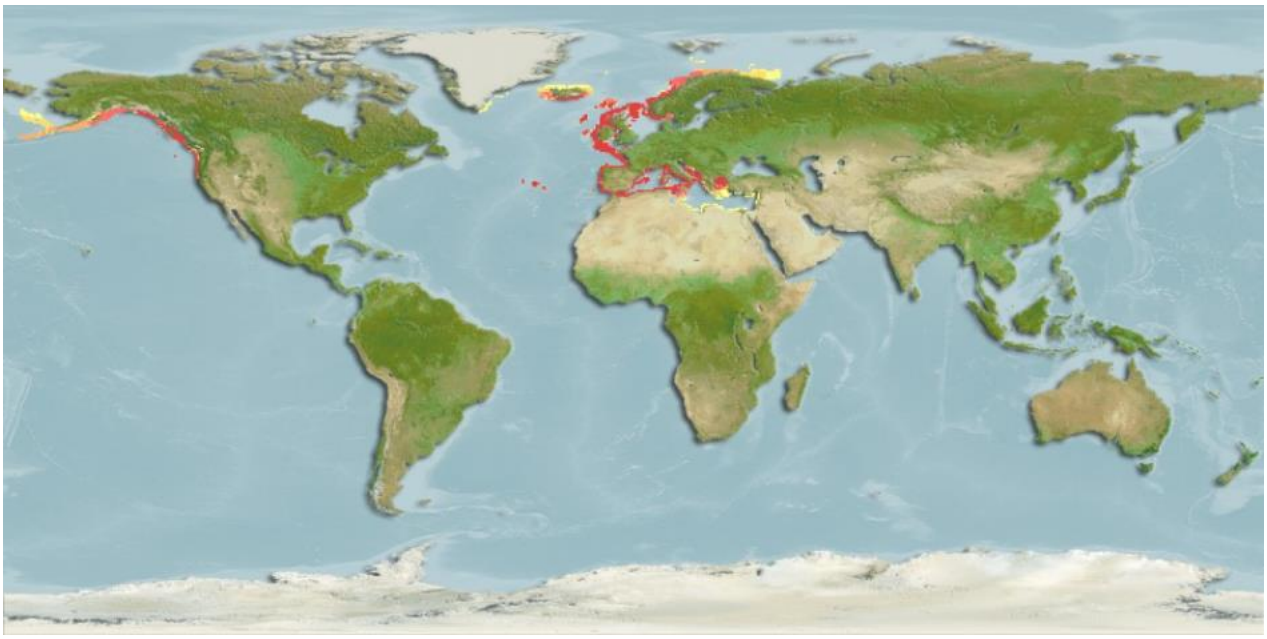
Nazivi: Hrvatski: europska plosnata kamenica

Ostali hrvatski narodni nazivi: oštriga, ostrega, ostriga, oštrga, loštriga, štroliga i jestiva kamenica (Marguš, 1998.)

Uzgoj kamenica u svijetu potječe još od antičkih vremena. Ljudi su rano prepoznali njihovu prehrambenu vrijednost i kakvoću, pa je zbog toga kultura uzgoja kamenica veoma stara (Tomšić i Lovrić, 2004). Prirodne populacije vrste *O. edulis* nalazimo od obale Norveške do voda u blizini Maroka, preko Sredozemnog mora i Crnog mora kao što vidimo na Slici 2. Nakon ciljane introdukcije u četrdesetim i pedestim godinama prošlog stoljeća nalazimo je i u Sjevernoj Americi od Mainea do Rhode Islanda (FAO, 1989).

Ostrea edulis (Linnaeus, 1758) je školjkaš koji ima ovalnu ljušturu s grubom, ljuskavom površinom. Kod ove vrste nije prisutna bilateralna simetrija ljuštura, već se razlikuju po veličini i obliku. Lijeva ljuštura je duboko konkavna i pričvršćena za podlogu, dok je desna ravna s grubljim rubovima i sjedi unutar lijeve strane, djelujući kao poklopac. Unutarnji dio ljuštura je gladak i obično biserne, bijele ili plavkasto-sive boje, često s tamnije plavim područjima. Vanjski dio ljušture je bijele, žućkaste ili kremaste boje sa svijetlo smeđim ili plavkastim koncentričnim trakama na desnoj ljušturi (Slika 3). Ligament je unutarnji, tamnosmeđe boje, a smješten je u trokutastom udubljenju. Brava nema zubiće, a

ožiljak mišića zatvarača dobro je vidljiv, blijed, katkad bijele boje. Obje strane kljunova i dio unutarnjeg ruba ljušture su nazubljeni, a to je posebno naglašeno na rubu lijeve ljušture, gdje završavanju radijalna rebra (Nerlović, 2005). Kamenice mogu doseći i više od 20 cm te joj životni vijek može biti više od 20 godina (FAO, 1989).

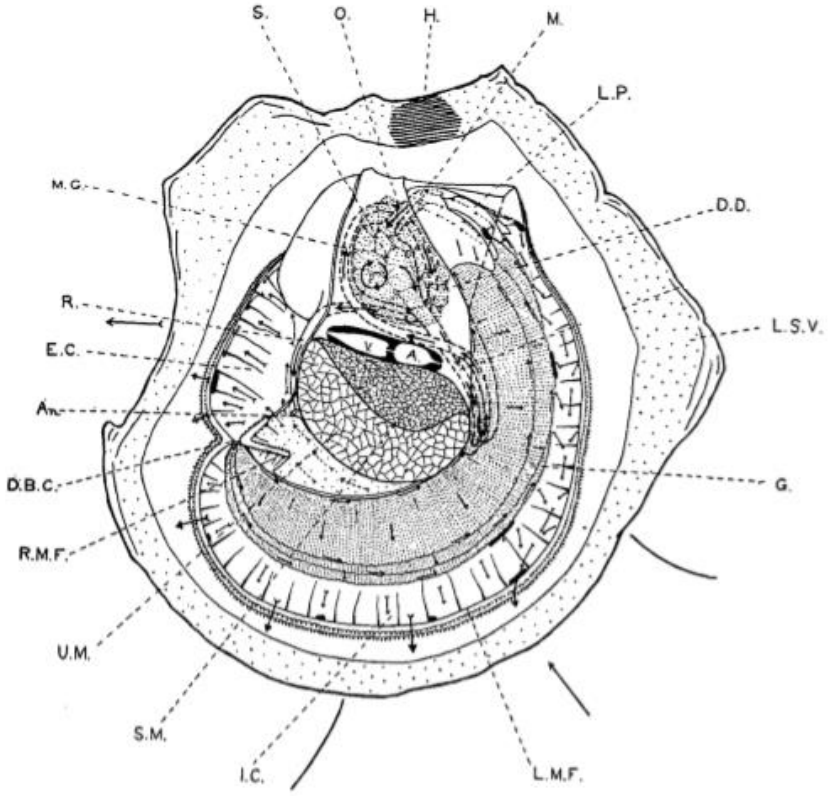


Slika 2. Karta rasprostranjenosti europske plosnate kamenice *Ostrea edulis* (izvor: www.sealifebase.ca).



Slika 3. Morfološke karakteristike europske plosnate kamenice *Ostrea edulis* (izvor: www.animalbase.uni-goettingen.de).

Anatomska građa europske plosnate kamenice (*O. edulis*) (Slika 4) se najbolje može opisati preko Slike 4 na kojoj je prikazana lijeva ljuštura. Površina plašta (L.M.F.) je transverzalno nazubljena i omeđena je zadebljanim rubom koji nosi dva reda malih pipaka. Plaštana šupljina je podijeljena na inhalacijske (I.C.) i ekshalacijske komore (E.C.), pri čemu je prva inhalacijska komora četiri puta veća i sadrži škrge (G.), koje se sastoje od četiri demibranhije, unutarnji su širi od vanjskih, a unutarnji na lijevoj strani je najširi od svih. Vanjske demibranhije su pričvršćena direktno za plašt, a unutarnji za plašt s vanjske strane i jedan za drugog iznutra. Škrge se prostiru u polukrugu od spoja između desnog i lijevog nabora plašta što tvori podjelu između inhalacijskih i ekshalacijskih komora (D.B.C.) do labijalnih usana (L.P.). Latter se sastoji od triangularnih zalisaka spojenih širokom bazom i raspoređenih u dva para, po jedan na svakoj strani usta (M.). Za razliku od ostalih Lamellibranchia, unutarnje i vanjske usne dviju strana su spojene jedne s drugima u području usta (M.). Vanjske usne su spojeni oko četvrtine svoje duljine, tako da su usta potpuno ograđena. Usta su uski horizontalni prorez i vode u kratki jednjak (O.) koji ima isti oblik u poprečnom presjeku i prolazi unatrag i prema dolje u želudac (S.) (Yonge, 1926).



Slika 4. Anatomska građa kamenice (*Ostrea edulis*), An- anus; D.B.C.- prostor između inhalacijskih i ekshalacijskih komora; D.D.- digestivna divertikula; E.C.- ekshalacijske

komore; G.- škrge; H.- brava; I.C.- inhalacijske komore; L.M.F.- lijevi plaštani preklop; L.P.- labialne usne; L.S.V.- lijeva ljuštura; M.- usta; M.G.- crijevo; O.- jednjak; R.- rektum; R.M.F.- desni plaštani preklop; S.- želudac; S.M.- aduktorni mišić (dio s prugastim vlaknima); U.M.- aduktorni mišić (dio s glatkim vlaknima); V.- komora (izvor: Yonge, 1926).

Europska plosnata kamenica (*O. edulis*) živi na čvrstoj podlozi u plitkim obalnim vodama do dubine od 20 m. Kamenica, koja je istaknuti mekušac u zoni plime i oseke, kao i drugi školjkaši, u svom ličinačkom stadiju se može pojaviti i u drugim morskim područjima. Duljina odrasle kamenice je oko 10-12 cm. Može se naći u estuarijima i tolerira salinitete do 23‰. Često se javlja u pijesku, na blatnom šljunku i stijenama. Kamenice su tzv. filter-feederi jer filtriraju fitoplankton i druge čestice iz morske vode (Rummel i sur., 2016). Europska je kamenica hermafrodit s ritmičkom izmjenom spola. Promjena spola može nastupiti više puta unutar godišnje sezone mrijesta, ali bez mogućnosti samooplodnje. Kamenica se može definirati kao protoandrični hermafrodit, ona spolno sazrijeva najprije kao mužjak. Nakon toga slijedi inverzija spola, pa se pojavljuje razvojna faza ženke, vremenski u drugoj godini. Promjena spola iz mužjaka u ženku se događa mnogo sporije nego obratno, jer stvaranje jajnih stanica više iscrpljuje organizam nego proizvodnja spermatozoida. Inverzija spola u pojedine jedinke vrste *O. edulis* nastavlja se dalje tijekom života, a može nastupiti u vrlo kratkom vremenu, od samo nekoliko dana (Lapègue i sur., 2006).

Uzduž hrvatske obale imamo mnogo položaja na kojima postoje povoljni uvjeti za život kamenice, njezina prirodna rasprostranjenost je vrlo ograničena. Prema pismenim podacima može se pretpostaviti da je samoniklih kamenica oduvijek bilo u Malostonskom zaljevu, Limskom kanalu, pulskom i okolnim zaljevima (Berc, 1994). Gustoća tih naselja je toliko mala da nemaju osobitog privrednog značenja. Lokacije gdje se kamenica može uspješno uzgajati moraju biti zaštićeni od većeg udaranja valova, a veliko značenje ima priliv slatkih voda i lagana strujanja. Samo takve lokacije obiluju fitoplanktonom, što je za život kamenice iznimno značajno. Uzduž Jadranske obale postoji priličan broj lokacija s navedenim karakteristikama od kojih se mogu istaknuti svi zaljevi i kanali Istre, Creska uvala, Klimno na Krku, Novigradsko more, Pirovački zaljev, Pašmanski kanal, Šibenski kanal, neke manje uvale oko Splita, Malostonski zaljev i Mljetska jezera. Od spomenutih značajna uzgajališta kamenica pronalazimo u Limskom kanalu, Malostonskom zaljevu i Šibenskom kanalu. Uzevši u cjelini, na Jadranskom primorju postoje vrlo povoljni uvjeti za život i uzgoj kamenica i njezino razmnožavanje (Berc, 1994).

1.2. Tehnologija uzgoja vrste *Ostrea edulis*

U svijetu se općenito, na dva načina uzgajaju kamenice. Prvi je uzgoj na morskom dnu, primjenjuje se u sjevernim morima s velikim oscilacijama plime i oseke. Navedeni način je neusporedivo jeftiniji od drugoga, tzv. mediteranskog načina. Kamenice koje se polože na dno prekrivene pijeskom, uzgajaju se do tržišne veličine bez dodatnih troškova proizvodnje. Pritom, uzgajivač za vrijeme oseke dolazi na uzgajalište prikupiti štetočine (zvijezde, puževe) koji se hrane kamenicom (Šimunović, 2004).

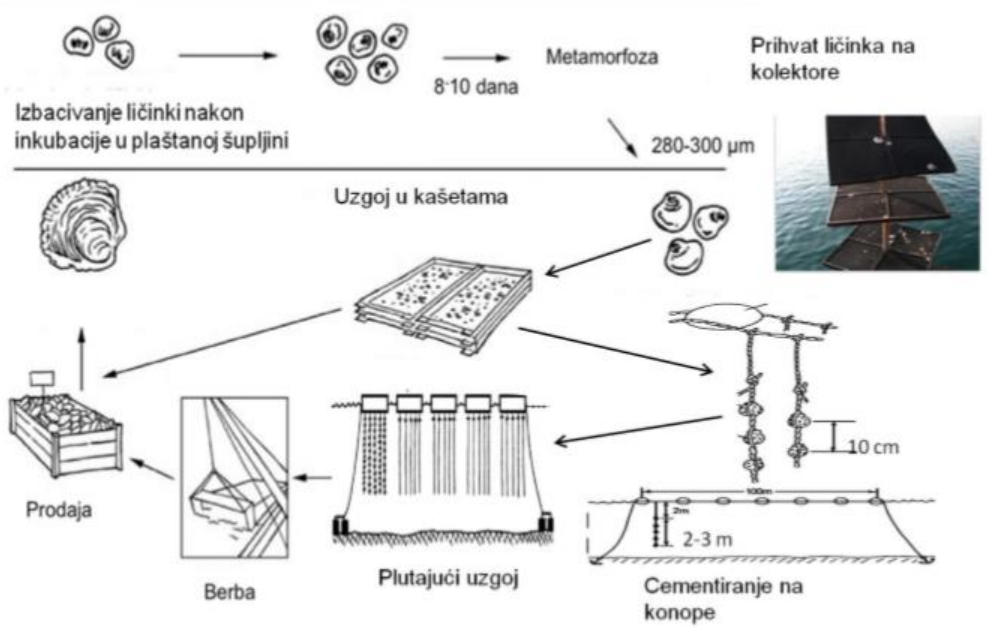
Uzgoj kamenice (*Ostrea edulis*) duž jadranske obale još uvijek se temelji na sakupljanju ličinki iz njihovog prirodnog staništa. Za prihvat mlađi se od davnina u more bacaju snopovi grana od trišlje i česvine, a u novije doba se koriste kolektori (poliester).



Slika 5. Linijski pergolar s vrstom *Ostrea edulis* (slika: Z. Popović Perković).

Grane duljine do 1 m se osuše i pocinčanom žicom se uvežu u snopiće. Snopovi se polažu u more, na dubinu od 5 do 15 m, kada u populaciji kamenica ima najmanje 5% jedinki u stanju mrijesta (u lipnju i rujnu). Veličina kamenica pri vađenju snopova je od 8 do 20 mm. Nakon vađenja iz mora snopići se režu na komade duljine 20 cm, tako da na svakom snopiću dolazi 10 do 15 mladih kamenica. Odresci se u raznim pravcima upletu u meko upleten

kokosov konopac. Upletene pletenice mlađi se vješaju u parkove na dubini 0,5 m i dalje u odnosu na razinu mora, tako da ne dodiruju dno. Pri kraju drugog razdoblja uzgoja (u dobi 12 do 18 mjeseci), veličina kamenica je 4 do 6 cm i dozrele su za cementiranje. Najpovoljnije razdoblje za cementiranje je početak lipnja. Kamenice se skidaju s pletenica, peru i sortiraju po veličini u tri razreda. Mlade kamenice se cementiraju po dvije na krajevima štapića od vrijesa ili česvine, a u današnje vrijeme na konopac (Slika 5). Cementiraju se po dvije nasuprot na razmaku 15 do 20 cm, a zatim se konopac veže na mjesto gdje će kamenica narasti do tržišne veličine. Nakon cementiranja kamenice se vješaju na linijske pergolare u razmacima od 0,5 m. Kamenice su spremne za sakupljanje od 6 do 15 mjeseci nakon cementiranja (Slika 6).

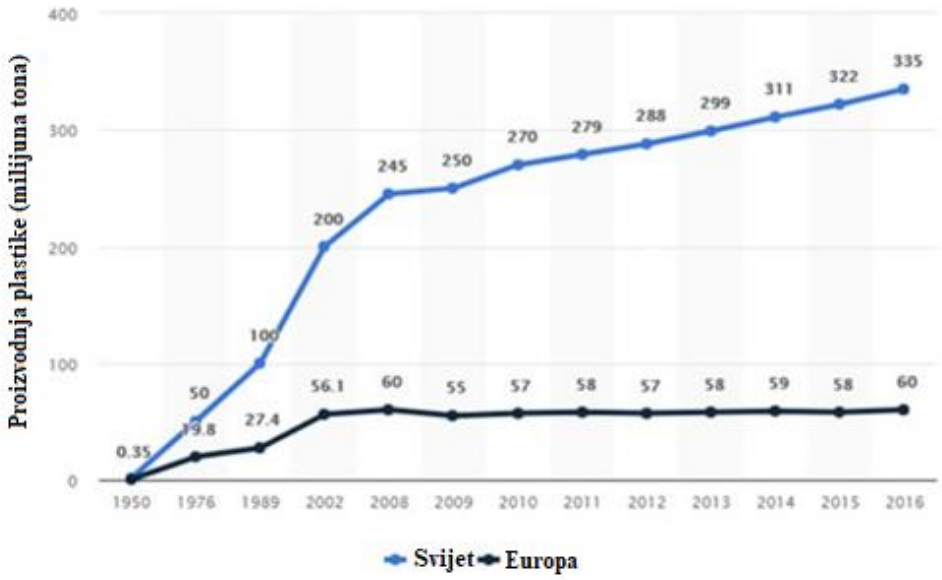


Slika 6. Faze uzgoja vrste *Ostrea edulis* (izvor: www.fao.org).

Ovaj način uzgoja se kod nas primjenjuje gotovo tisuću godina. Danas se sve više u uzgoju upotrebljavaju plutajući parkovi. Danas se kamenice u zadnjem razdoblju uzgoja stavljaju u okrugle kaveze (najlon). U njima stoje do konzumne veličine. Uzgoj kamenica traje najviše tri godine (Anonimus, 2013).

1.3. Plastika u morskom okolišu

Uloga i važnost plastike u gospodarstvu je proteklih 50 godina postojano rasla. Globalna se proizvodnja plastike od 60-ih godina prošlog stoljeća povećala za dvadeset puta te je 2018. iznosila 359 milijuna tona (PlasticsEurope, 2019). Očekuje se da će se u razdoblju od narednih 20 godina ponovno udvostručiti (Andrady, 2003) (Slika 7).



Slika 7. Globalna proizvodnja plastike (izvor: www.plasticseurope.com).

Kao svestrani, lagani, snažni i potencijalno prozirni materijal, plastika je idealna za različite primjene. Njihova niska cijena, izvrsna svojstva barijera za kisik/vlagu i mala težina čine ih izvrsnim materijalima za pakiranje. Konvencionalni materijali kao što su staklo, papir i metal zamjenjuju se jeftinim plastičnim ambalažama. Gotovo trećina proizvodnje plastičnih smola se pretvara u potrošni materijal za pakiranje koji uključuje stavke za jednokratnu uporabu koje obično susrećemo među otpadom na plažama (Andrady, 2003).

U pakiranju se koristi nekoliko širokih klasa plastike: polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS), polietilen tereftalat (PET) i poli(vinil-klorid) (PVC). Opsežna ribolovna, rekreacijska i pomorska uporaba oceana, kao i demografske promjene koje pogoduju naseljavanju obalnih područja, povećat će količine plastičnog otpada u oceanima. Cijela globalna ribarska flota sada koristi plastičnu opremu, a neki se alati neprestano gube ili se čak nepažljivo odbacuju na moru tijekom uporabe. PE i PP, kao i najlon se prvenstveno koriste u

primjenama ribolovnog alata (Andrady, 2011). Oko 18% morskog plastičnog otpada pronađenog u oceanu, pripisuje se ribarskoj industriji. Akvakultura također može biti značajan čimbenik plastičnog otpada u oceanima. Ostatak se uglavnom dobiva iz izvora na kopnu. Kvantificiranjem plutajućeg plastičnog otpada površinskih voda ozbiljno se podcjenjuje količina plastike u oceanu. Vidljivost plastike koja pluta zahtijeva da bude pozitivno plutajuća u morskoj vodi (specifična težina morske vode je 1,025 g/cm^3). Međutim kao što se vidi iz Tablice 1, samo nekoliko plastičnih materijala koji se uobičajeno koriste u morskom okolišu imaju specifičnu gustoću manju od one u morskoj vodi (Andrady, 2011).

Tablica 1. Specifične gustoće i podrijetlo vrsta plastike koje susrećemo u morskom okolišu (Browne, 2007).

Vrsta plastike	**Specifična gustoća(g/cm^3)**	**Podrijetlo**
Polietilen niske gustoće (LDPE)	0,91-0,93	Plastične vreće, bove, slamke
Polietilen visoke gustoće (HDPE)	0,94	Boce za mlijeko i sokove
Polipropilen (PP)	0,85-0,83	Poklopci za bove, ribarske mreže
Polistiren (PS)	1,04	Plastični pribor, posude za hranu
Najlon	1,15	Ribarske mreže
Polietilen tereftalat (PET)	1,37	Plastične boce
Poli(vinil-klorid) (PVC)	1,38	Plastične boce, čaše
Pjenasti polistiren	0,9	Plovci, kutije za mamce
Celulozni acetat (CA)	1,47	Filteri od cigareta

Posljednjih desetljeća zagađenje oceana antropogenim otpadom prepoznato je kao ozbiljan globalni problem. Morski otpad je generalno definiran kao bilo koji proizvedeni ili prerađeni kruti otpad koji završava u morskom okolišu iz bilo kojeg izvora. Zagađenje mora podrazumijeva namjeran ili slučajan unos otpada od strane čovjeka u morski okoliš (uključujući i estuarije), što dovodi do štetnih učinaka kao što su ometanje morskih

djelatnosti, uključujući ribolov, narušavanje kvalitete morske vode i šteta za žive organizme (Andrady i sur., 2003). U morskom otpadu dominiraju sintetski materijali od kojih je najviše plastike. Plastični materijali zauzimaju 60-80% morskog otpada koje se akumulira na pješanim obalama. Alimba i Faggio (2019) u svom radu objašnjavaju tri termina: mezoplastika (od 500μm do 5mm), mikroplastika (od 50 do 500μm) i nanoplastika (manje od 50 μm). Otpad kao što su plastične boce, industrijski otpad, omoti od hrane i mnogi drugi, završavaju u morski okoliš putem vjetra, oborinskih voda i ispust kanalizacije. Akumulacija plastike i drugih sintetskih predmeta u morskom okolišu može pomoći u identifikaciji mogućeg izvora. Ovisno o kemijskoj strukturi, plastični materijali su podložni termičkoj oksidaciji, fotooksidativnoj degradaciji, biodegradaciji i u nekim slučajevima čak i hidrolizi (Andrady i sur., 2003). Uobičajene vrste plastike koje nalazimo u morskom okruženju razgrađuju se prvenstveno putem fototermalnih oksidacijskih procesa. Kemijski putevi povezani s trošenjem plastike na moru u suštini su isti kao na kopnu. Neke od kemijskih promjena rezultiraju smanjenjem mehaničkih svojstava materijala koja ovise o vremenu izlaganja. U idealnom slučaju, brže stope okolišne degradacije su poželjne samo kod morskog otpada što dovodi do smanjenja štete na morski život i utjecaja na obalno područje. Pod pojmom degradacije podrazumijevamo gubitak korisnih svojstava nakon kemijskih promjena u plastičnim materijalima (Andrady i sur., 2003).

1.4. Mikroplastika

Postoji sve veća zabrinutost zbog implikacija različitih mikročestica u morskom okolišu. Većina mikročestica su sitni plastični fragmenti poznati kao mikroplastika. Brojnost i globalna raspodjela mikroplastike u vodenim ekosustavima se stalno povećava tijekom posljednjih desetljeća, a također je opaženo smanjenje prosječne veličine plastičnog otpada u istom vremenskom razdoblju (Bergmann i sur., 2015). Mikroplastika obuhvaća vrlo heterogenu skupinu čestica koje se razlikuju po veličini, boji, obliku, kemijskom sastavu, gustoći i drugim karakteristikama. Razlikujemo primarnu i sekundarnu mikroplastiku (Bergmann i sur., 2015). Plastika koja je proizvedena da bude mikroskopske veličine je definirana kao primarna mikroplastika. Obično se koristi u sredstvima za čišćenje lica i kozmetici, a u medicini kao vektori za lijekove. Sekundarna mikroplastika nastaje razgradnjom većeg plastičnog materijala u manje fragmente. Fragmentacija je uzrokovana

kombinacijom mehaničkih sila, npr. valovi ili fotokemijski procesi izazvani sunčevom svjetlošću. Mikroplastika obično pluta na površini mora zbog manje gustoće. Međutim, plovnost i specifična težina plastike mogu se promijeniti tijekom vremena zbog vremenskih utjecaja i obrastanja, što rezultira raspodjelom na morskoj površini, u vodenom stupcu i na morskom dnu (Bergmann i sur., 2015). Obbard i sur. (2014) su dokazali prisustvo mikroplastike na Arktiku. Zbog globalnih klimatskih promjena dolazi do ubrzanog otapanja leda na tom području i do istovremenog oslobađanja mikroplastike u arktički morski ekosustav. Mikroplastika je trenutno najbrojniji oblik otpada u moru i njena gustoća neprestano raste (Green, 2016).

1.5. Dosadašnja istraživanja mikroplastike na školjkašima

Iako trenutno postoje opsežni dokazi o ingestiji mikroplastike u različite morske organizme, potencijalne posljedice izlaganja još nisu u potpunosti procijenjene i/ili shvaćene (Doyle i sur., 2020). Među morskim vrstama, školjkaši se redovito koriste kao pokazatelji onečišćenja okoliša zbog široke distribucije, lake dostupnosti i visoke toleracije na širok spektar onečišćenja okoliša (Cho i sur., 2018). Cho i sur. (2018) u svom radu iznose rezultate istraživanja količine mikroplastike u četiri najvažnije komercijalne vrste školjkaša konzumirane u Koreji. Kamenica (*Crassostrea gigas*), dagnja (*Mytilus edulis*), kućica (*Tapes philippinarum*) i češljača (*Patinopecten yessoensis*) zauzimaju 79-84% sveukupne konzumacije školjkaša u Koreji. U sve četiri vrste su detektirane čestice mikroplastike. Cole i Galloway (2015) su istraživali sposobnost ingestije čestica nanoplastike i mikroplastike ličinke pacifičke kamenice (*C. gigas*) te su dokazali da ličnike imaju sposobnost ingestije čestica nanoplastike kao i čestica mikroplastike. Sussarellu i sur. (2015) su proveli istraživanje na Pacifičkoj kamenici (*C. gigas*). Kamenicu su izlagali česticama polistirena u veličinama od 6µm i 2µm. Kamenice su unijele polistiren od 6µm prije nego od 2µm. Također, uočili su negativne učinke na reproduktivno zdravlje, što je značajno utjecalo na plodnost. Smanjenje brzine sperme u izloženih kamenica je iznosila 23% što može dovesti do smanjenja sposobnosti oplodnje oocita. Waite i sur. (2018) analiziraju prisutnost mikroplastike u uzorcima iz estuarija od školjkaša (*Crassostrea virginica*) i raka (*Panopeus herbstii*) prikupljenih na istoku obale središnje Floride. Na lokacijama gdje je bila veća

količina čestica mikroplastike u moru, bila je također i u školjkašima. Najbrojnija vrste mikroplastike su bila vlakna, koja povezuju s otpadnim vodama i septičkim jamama.

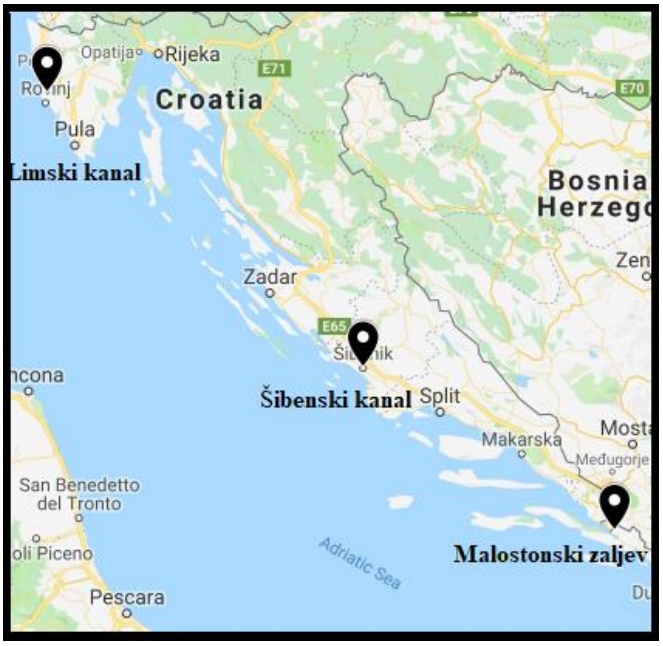
1.6. Svrha i ciljevi rada

Svrha i cilj ovog istraživanja je prvi puta provesti kvantifikaciju i karakterizaciju čestica mikroplastike na istočnoj strani Jadranskog mora (Malostonski zaljev, Šibenski kanal i Limski kanal) u uzgojnih i divljih jedinki vrste *O. edulis* kao inicijalni korak u daljnjem istraživanju opterećenosti navedene vrste utjecajem mikroplastike.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Prikupljanje uzoraka

Jedinke vrste *Ostrea edulis* su prikupljene na 3 lokacije duž Jadranske obale. Mjesta uzorkovanja su bila Malostonski zaljev (42°59′30"N 17°25′00"E), Šibenski kanal (43°43′35,7"N 15°51′55,9"E) i Limski kanal (45°07′59"N 13°38′08"E) (Slika 8). Na svakoj lokaciji uzeto je 20 kamenica, 10 uzgojenih i 10 divljih, te su zabilježeni okolišni parametri (lokacija sakupljanja, stanište, vrsta, datum, dubina, salinitet i temperatura), prikazani u Tablici u rezultatima (Tablica 3). Kako bi se izbjegla kontaminacija mikroplastikom uzrokovana transportom ili drugim čimbenicima iz okoline, prikupljeni uzorci su pakirani u aluminijske posude koje su prekrivene aluminijskom folijom, zatim transportirani u laboratorij i pohranjeni na -20ºC do daljnje analize.



Slika 8. Lokacije prikupljanja uzoraka: Malostonski zaljev, Šibenski kanal i Limski kanal.

2.2. Osnovni hidrografskih parametri

S ciljem procjene i određivanja osnovnih hidrografskih parametara koji bi mogli imati eventualni utjecaj na metabolizam školjkaša prilikom ingestije čestica mikroplastike na različitim lokacijama izmjereni su prilikom uzorkovanja pomoću YSI sonde (Slika 9).



Slika 9. YSI sonda korištena za prikupljanje hidrografskih parametara (izvor: www.geotechnics.co.nz).

Parametri su izmjereni na tri lokacije: Malostonski zaljev, Šibenski kanal i Limski kanal. Izmjereni parametri su uključivali količinu otopljenog kisika, elektrovodljivost, salinitet, temperaturu i tlak zraka. Ovaj dio istraživanja je proveden od kolovoza do rujna 2018. godine na dubini od 0,5 m do 10 m.

2.3. Izolacija mikroplastike iz vrste *Ostrea edulis*

Za izolaciju mikroplastike iz jedinki vrste *O. edulis* korišten je prilagođeni protokol iz znanstvenih radova Li i sur. (2016) i Cho i sur. (2018). Prije početka rada svo je potrebno posuđe oprano i isprano 3 puta s ultra čistom destiliranom vodom filtriranom kroz membranski filter (Ahlstrom, ReliaDisc Membrane Filters) promjera 0,45 μm koji je prikazan na Slici 10.



Slika 10. Membranski filter za filtriranje destilirane vode (slika: Z. Popović Perković).

Poslagano je 10 jedinki s jedne lokacije na podlogu prekrivenu aluminijskom folijom da bi se odmrznule kao što je prikazano na Slici 11.



Slika 11. Označavanje i odmrzavanje vrste *Ostrea edulis* (slika: Z. Popović Perković).

Duljina i širina kamenica je izmjerena elektronskom pomičnom mjerkom Powerfix Profi + u mm do vrijednosti od dvije decimale (Slika 12).



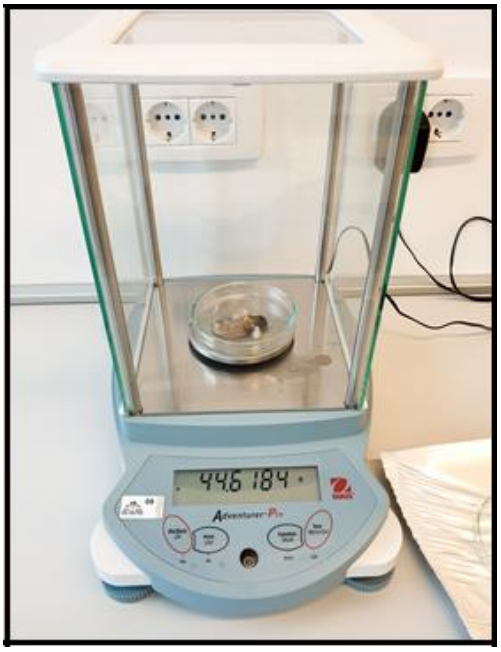
Slika 12. Prikupljanje biometrijskih podataka na vrsti *Ostrea edulis* (slika: E. Vranjić).

Nakon mjerenja jedinke vrste *O. edulis* su otvorene te je skalpelom odvojeno tkivo od ljušture. Navedeni postupak je obavljen u improviziranom laminaru da bi smanjili kontaminaciju mikroplastikom iz laboratorija (Slika 13).



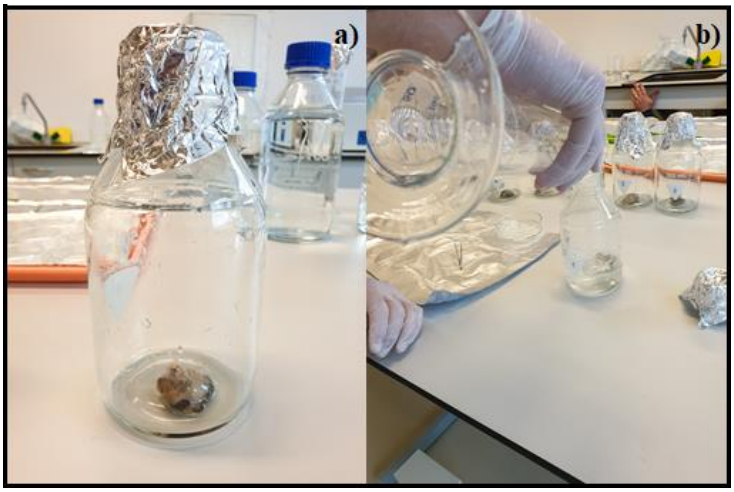
Slika 13. Odvajanje tkiva vrste *Ostrea edulis* (slika: E. Vranjić).

Čitavo tkivo jedinki vrste *O. edulis* je stavljeno u petrijevu zdjelicu te je izvagana težina mokrog tkiva svake pojedine označene jedinke (Slika 14).



Slika 14. Vaganje mase mesa vrste *Ostrea edulis* (slika: E. Vranjić).

Nakon vaganja, tkivo kamenica je stavljeno u konusnu tikvicu (250 ml sa širokim vratom) te je označen ID školjkaša (Slika 15a). Započet je postupak razgradnje tkiva koristeći 30% H_2O_2 a da bi se razgradila prirodna organska tvar kako bi se olakšalo otkrivanje komadića mikroplastike. Dodano je 20 ml 30% H_2O_2 po 1g mokrog tkiva (Slika 15b). Kontrola je procesuirana zajedno s uzorcima tkiva jedinki za svaku od lokacija posebno za divlje i za uzgojne jedinke s ciljem provjere eventualne kontaminacije iz okoline. Kontrola je uključivala 20 ml H_2O_2 i 180 ml filtrirane destilirane vode.



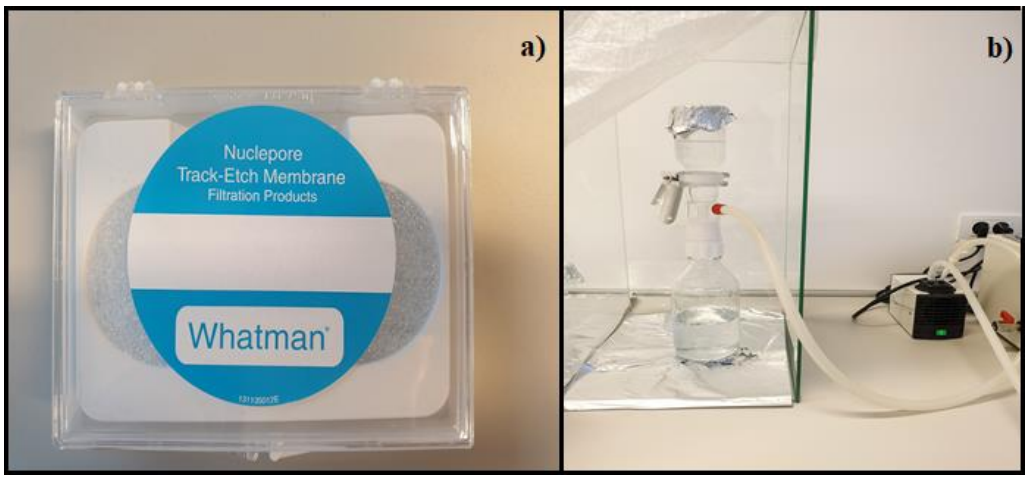
Slika 15. a) Stavljanje čitavog tkiva vrste *Ostrea edulis* u konusnu tikvicu
b) Dodavanje H_2O_2 u konusnu tikvicu s tkivom (slika: E. Vranjić).

Provedena je razgradnja tkiva u vremenskom razdoblju od 48 sati na temperaturi od 55 do 65ºC u vodenoj kupelji VWR, model VWB 12 (Slika 16).



Slika 16. Inkubacija tkiva u vodenoj kupelji na temperaturi od 55 do 65°C, u trajanju od 48h (slika: E. Vranjić).

Nakon 48 h razgradnje tkiva u vodenoj kupelji na temperaturi od 55-65°C razrijeđen je sadržaj u konusnoj tikvici s destiliranom vodom u omjeru 1:10. Suspenzija je profiltrirana kroz membranski filter (Whatman, Nucleopore Track-Etch Membrane 2µm) (Slika 17a) te je konusna tikvica isprana 3 puta sa 50 ml destilirane vode (Slika 17b).



Slika 17. a) Membranski filter Whatman, promjera 2µm **b)** Filtriranje suspenzije kroz membranski filter (slika: E. Vranjić).

Osušen je filter papir na sobnoj temperaturi preko noći (Slika 18a), te nakon sušenja filter papir je pregledan za prisustvo mikroplastike pomoću stereo lupe (Slika 18b).



Slika 18. a) Filter papiri u petrijevim zdjelicama **b)** Olympus SZX 10 stereo lupa (slika: E. Vranjić).

Analiza dobivenih uzoraka na filter papirima je provedena na Olympus SZX 10 stereo lupi pod povećanjem od ~ 100 puta povezanom sa računalom i fotoaparat Olympus DP25 kojim su fotografirani uzorci (Slika 19). Stereo lupa je obložena zaštitnom folijom da bi se spriječila eventualna kontaminacija iz laboratorija. Na svakom od uzoraka su analySIS Image Processing programom izmjerene vrijednosti duljine svakog komadića mikroplastike u veličinskom rasponu do 200µm. Za divlje jedinke uzorci su samo izbrojani a za uzgojene jedinke su izbrojani s mjerenjem vrijednosti duljina komadića mikroplastike.



Slika 19. Stereo lupa obložena zaštitnom folijom povezana s računalom (slika: Z. Popović Perković).

U Tablici 2. prikazane su kategorije mikroplastike iz prilagođenog protokola izolacije komadića mikroplastike.

Tablica 2. Kategorije mikroplastike (uzeto iz EU TG ML Master List).

Kategorije mikroplastike
Fragmenti
Peleti
Granule
Filamenti
Filmovi
Pjena
Ostalo (neplastični materijali)
Nekategorizirane čestice mikroplastike

2.4. Analiza podataka

Dobiveni podaci su analizirani u programu Excel 2009 te u statističkom R programu gdje je napravljena analiza podataka. Izolirane čestice mikroplastike iz vrste *O. edulis* poslane su na Institut Ruđer Bošković, Zavod za fiziku materijala, na analizu Micro-Raman

spektrometru (Slika 20). Micro-Raman spektroskopija je metoda pomoću koje se mogu istraživati vibracijska svojstva materije u čvrstom, tekućem i plinovitom stanju. Komplementarna je infracrvenoj spektroskopiji. Zbog izuzetne osjetljivosti može registrirati molekulski sastav uzoraka volumena do jednog kubičnog mikrona.



Slika 20. Raman spektrometar T64000 s INNOVA 400 argon laserom (izvor: https://www.irb.hr/).

3. REZULTATI

3.1. Osnovni hidrografski parametri

Vrijednosti hidrografskih parametara su izmjerene na tri lokacije: Malostonski zaljev (42°59´30"N 17°25´00"E), Šibenski kanal (43°43´35,7"N 15°51´55,9"E) i Limski kanal (45°07´59"N 13°38´08" E) (Tablica 3). Hidrografski parametri su se mjerili na 0,5 m i 10 m dubine na sve tri lokacije.

Tablica 3. Hidrografski parametri izmjereni u Malostonskom zaljevu, Šibenskom kanalu i Limskom kanalu.

	Ston	**Šibenik**	**Lim**
Datum uzorkovanja	**13.9.2018.**	**11.10.2018.**	**18.9.2018.**
DO mg/L (0,5 m)	12,2	17,60	16,22
DO mg/L (10 m)	15,64	15,86	9,32
DO % / L (0,5 m)	183,6	212,8	239,5
DO % / L (10 m)	227,2	219,6	131,1
vodljivost ms/cm (0,5 m)	52,60	30,90	53,90
vodljivost ms/cm (10 m)	52,4	53,00	53,1
salinitet ppt (0,5 m)	35,20	21,86	35,80
salinitet ppt (10 m)	35,2	38,5	37,8
temp °C (0,5 m)	24,30	19,50	24,80
temp °C (10 m)	24,1	20,8	21,7

Iz navedenih hidrografskih parametara može se zaključiti da su razine saliniteta površine i dna najvarijabilnije u Šibenskom kanalu, dok su na ostalim lokacijama relativno jednake. Temperature u pod površinskom i pridnenom dijelu vodenog stupca su bile najvarijabilnije u Limskom kanalu.

3.2. Biometrijski podatci

Rezultati biometrije prikazani su u Tablici 4.

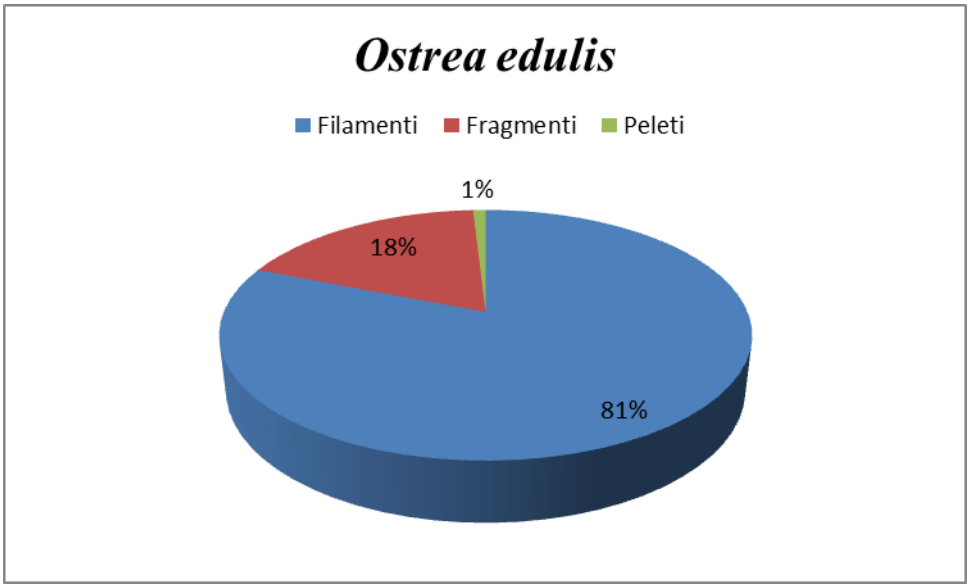
Tablica 4. Biometrijski parametri školjkaša.

Lokacija	Stanište	Broj uzorkovanih školjkaša	Prosječna dužina školjkaša (mm)	Prosječna širina školjkaša (mm)
Malostonski zaljev	Uzgojne	10	79,772	65,874
Malostonski zaljev	Divlje	10	87,132	62,394
Šibenski kanal	Uzgojne	10	79,13	62,065
Šibenski kanal	Divlje	10	85,436	71,395
Limski kanal	Uzgojne	10	74,812	65,255
Limski kanal	Divlje	10	87,856	71,282

Mjerenjem prosječnih dužina uzorkovanih jedinki može se vidjeti da su najmanje uzgojne jedinke prikupljene u Limskom kanalu, dok su najveće divlje jedinke prikupljene također u Limskom kanalu. Najmanji primjerak jedinke je sakupljen u Šibenskom kanalu, uzgojna populacija, veličine 70,81 mm, dok je najveći primjerak bio prisutan u divljim populacijama u Limskom kanalu, 107,26 mm.

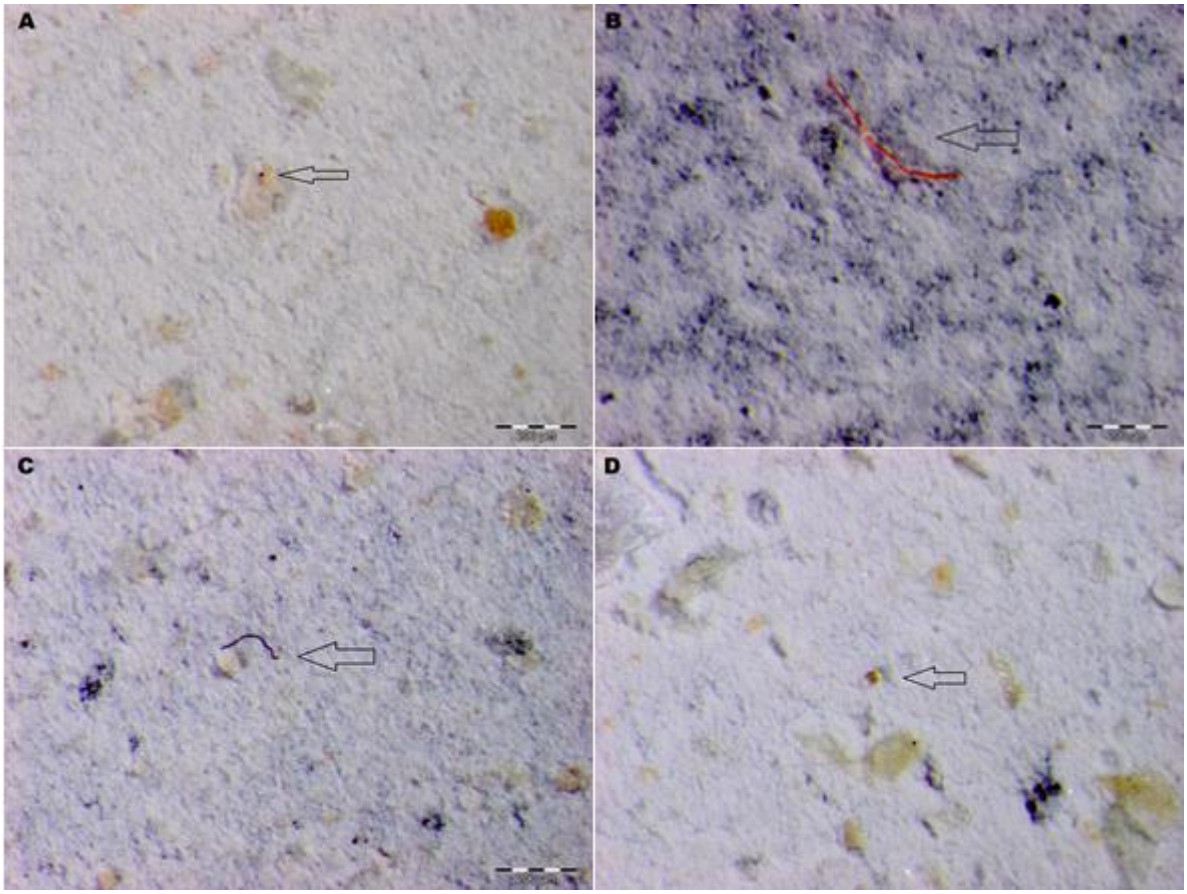
3.3. Kategorije mikroplastike pronađenih kod vrste *Ostrea edulis*

Analizom je pronađeno više kategorija mikroplastike od kojih su najbrojniji bili filamenti, zatim fragmenti te peleti (Slika 21).



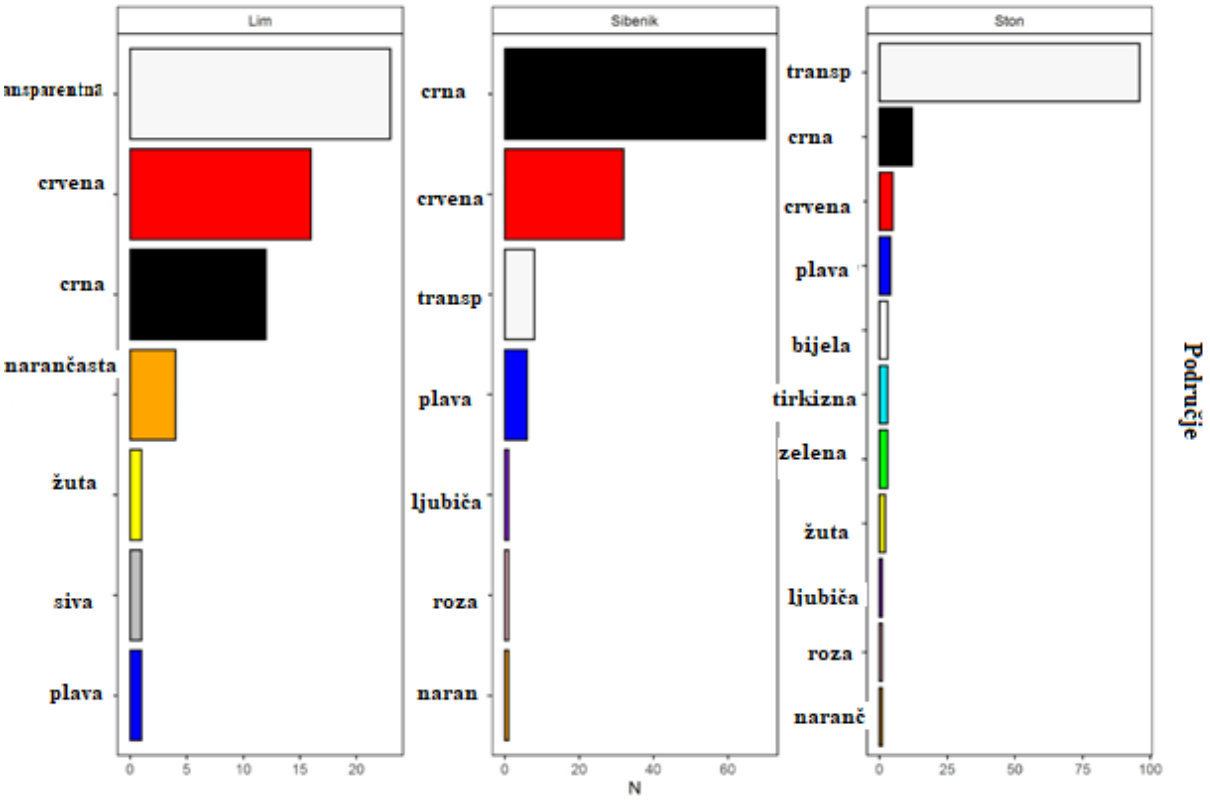
Slika 21. Prikaz postotka zastupljenosti vrsta mikroplastike u vrste *Ostrea edulis* kod divljih i uzgojnih jedinki.

Sve tri kategorije mikroplastike su se pojavljivale u različitim bojama (Slika 23).



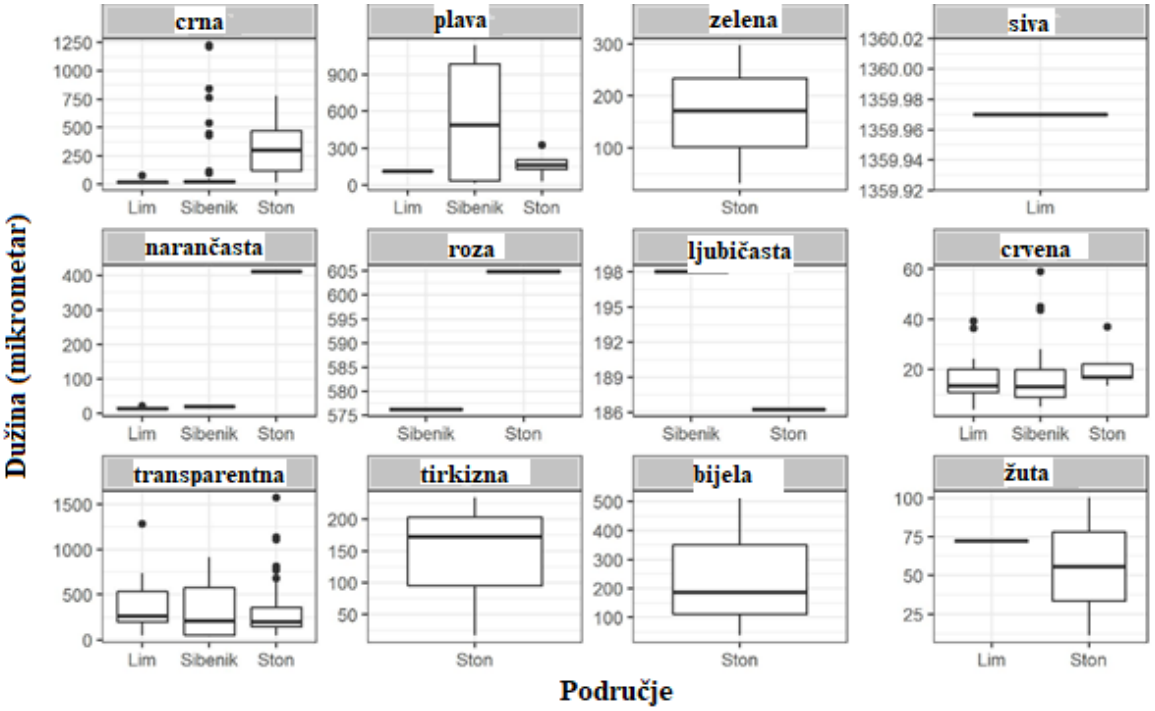
Slika 22. Slike različitih tipova mikroplastike u kamenicama iz Jadrana. Strelice prikazuju crveni fragment (A), crveni i crni filament (B,C) i narančasti pelet (D).

Na Slici 23 se može vidjeti pojavnost boja čestica mikroplastike pronađenih u uzgojnim jedinkama vrste *Ostrea edulis* u Limskom kanalu i Malostonskom zaljevu. Najzastupljenija boja je prozirna dok u Šibenskom kanalu prevladava crna boja čestica mikroplastike.



Slika 23. Analiza boja po lokacijama uzorkovanja za uzgojne kamenice.

Na Slici 24 mogu se vidjeti najzastupljenije boje čestica mikroplastike pronađenih kod uzgojnih jedinki sa sve tri lokacije uzorkovanja. Grafovi također prikazuju dužine čestica po bojama i području.



Slika 24. Grafovi duljine čestica mikroplastike, područje i boje koje su pronađene kod uzgojnih jedinki.

3.4. Dužinski raspon mikroplastike kod vrste *Ostrea edulis*

Veličina mikroplastike se mjerila samo kod uzgojnih kamenica. Raspon veličina u tkivima ispitivanih kamenica se kretao između 5µm i 1500 µm. U Tablici 5 mogu se vidjeti dužinske podatke za različite kategorije mikroplastike prisutne u uzgojnih jedinki vrste *O. edulis* u Limskom kanalu, Šibenskom zaljevu i Malostonskom zaljevu.

Tablica 5. Dužinski podatci za kategorije mikroplastike prisutne u uzgojnih jedinki vrste *Ostrea edulis* u Limskom kanalu, Šibenskom zaljevu i Malom Stonu, N- broj pronađenih čestica, MIN- minimalna dužina čestica, MAX- maksimalna dužina čestica, MEAN- srednjak dužina čestica, SD- standarna devijacija dužine čestica.

Područje	Kategorija	N	MIN	MAX	MEAN	SD
Limski kanal	fragment	30	3,99	72,1	17,33	12,92
	filament	27	32,31	1359,97	377,82	342,07
	ostalo	1	13,38	13,38	13,38	NA
Šibenski kanal	fragment	94	5,11	111,07	21,84	16,75
	filament	17	43,68	1223,94	695,3	349,38
	ostalo	8	8,87	65,18	34,47	24,69
Malostonski zaljev	fragment	11	11,09	42,87	22,49	10,24
	filament	119	31,74	1571,48	296,6	243,4
	ostalo	1	47,81	47,81	47,81	NA

U Tablici 6 mogu se vidjeti ukupan broj pronađenih čestica mikroplastike kod uzgojnih jedinki vrste *Ostrea edulis*. Izračunat je broj čestica mikroplastike po jedinici koji je iznosio 10,27, te se također mogu vidjeti broj čestica mikroplastike po gramu analiziranog tkiva koji je iznosio 1,32 g.

Tablica 6. Kvantifikacija ukupno pronađenih čestica mikroplastike kod uzgojnih jedinki vrste *Ostrea edulis,* N – broj pronađenih čestica mikroplastike u analiziranih školjkaša; MP/N – broj čestica mikroplastike po jedinci; W – ukupna težina tkiva jedinki; N/g – broj čestica mikroplastike po gramu analiziranog tkiva.

N	MP/N	W (g)	N/g
308	10,27	233	1,32

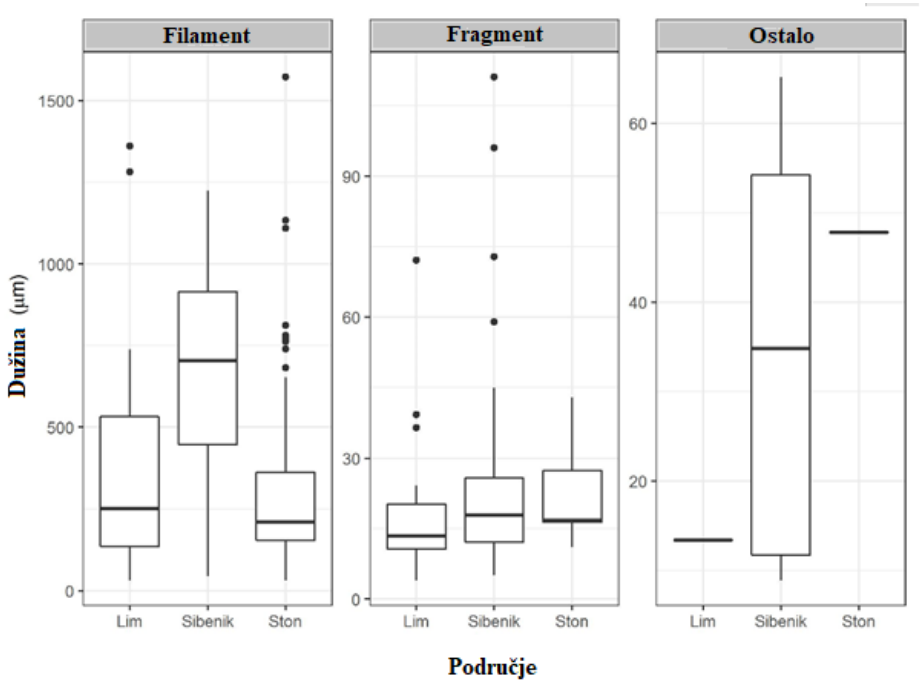
Tablica 7 prikaziva kvantifikaciju određenih kategorija čestice mikroplastike kod uzgojnih jedinki vrste *O. edulis.* Može se vidjeti da su najveći broj pronađenih čestica mikroplastike činili filamenti, a to nam i pokazivaju rezultati broja čestica mikroplastike po gramu analiziranog tkiva koji je za filamente bio najveći (0,7).

Tablica 7. Kvantifikacija određenih kategorija čestica mikroplastike kod uzgojnih jedinki vrste *Ostrea edulis,* N – broj pronađenih čestica mikroplastike u analiziranih školjkaša po

kategoriji mikroplastike; ID – broj uzorkovanih školjkaša; MP/N – broj mikroplastike po jedinci po kategoriji mikroplastike; W – ukupna težina tkiva jedinki; N/g – broj čestica mikroplastike po gramu analiziranog tkiva po kategoriji mikroplastike.

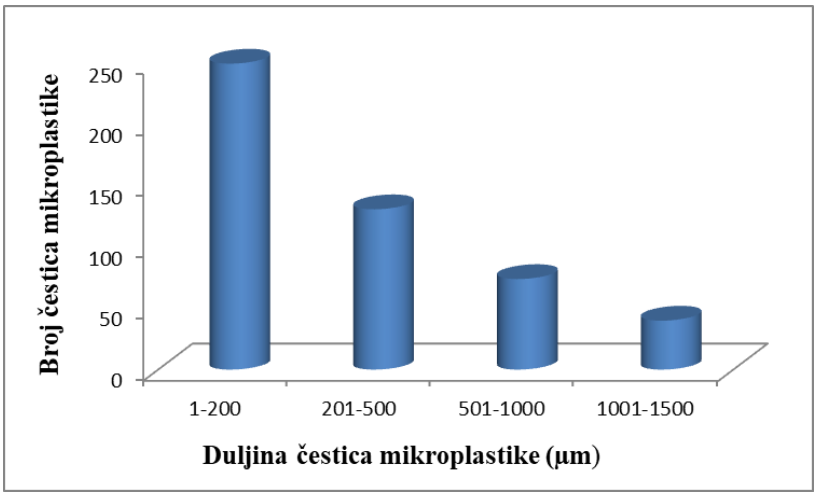
TIP	N	ID	MP/N	W (g)	N/g
fragment	135	30	4,5	233	0,58
ostalo	10	30	0,33	233	0,04
filament	163	30	5,43	233	0,7

Najveći broj fragmenata pronađen je na lokaciji Šibenski kanal (94) (Tablica 5). Veličinski raspon fragmenata se kretao ispod 30 µm (Slika 25). Pronađeni filamenti su imali razne dužinske raspone, ali najveći srednjak filamenata je imala lokacija Šibenski kanal (Tablica 5).



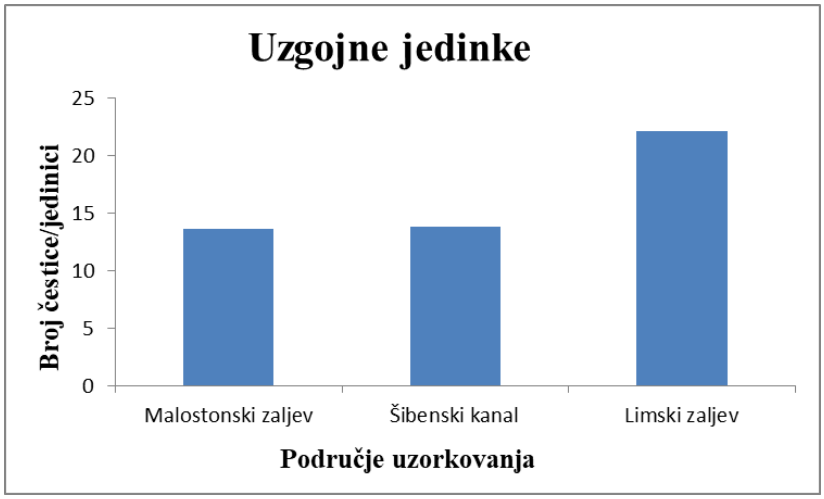
Slika 25. Dužinski rasponi kategorija mikroplastike (vlakna, fragmenti, ostali) u Limskom kanalu (Lim), Šibenskm zaljevu (Šibenik) i Malostonskom zaljevu (Ston) kod uzgojnih jedinki vrste Ostrea edulis.

Kao što se može vidjeti na Slici 26 najveći broj mikroplastike se nalazi unutar raspona 1-200 µm.

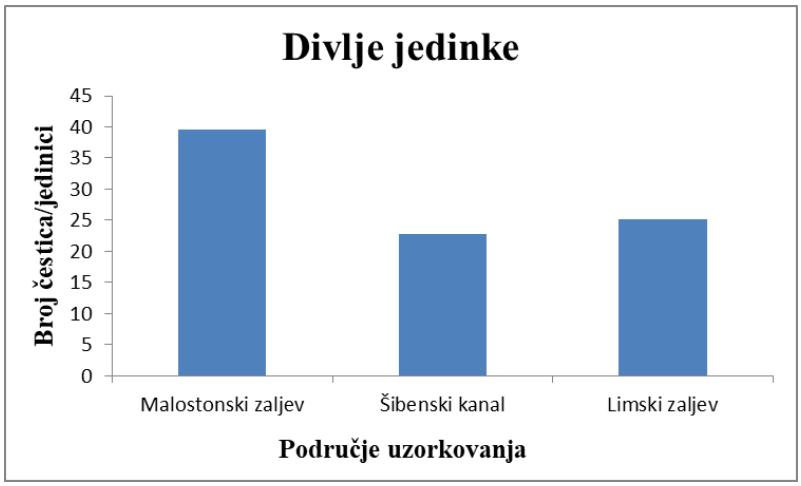


Slika 26. Veličinska raspodjela čestica mikroplastike u uzgojnih kamenica duž Jadranske obale.

Tijekom ispitivanja uzoraka zaključeno je da su čestice mikroplastike prisutne na svim uzorkovanim područjima. Uspoređen je broj čestica mikroplastike među uzgojnim i divljim jedinkama (Slika 27 i 28). Kao što je vidljivo iz Slike 28 veći broj čestica je pronađen kod divljih kamenica. Kod uzgojnih kamenica najveći broj čestica mikroplastike pronađen je u Limskom kanalu, 22,1 čestica po jedinci vrste *O. edulis*, dok je u Malostonskom zaljevu pronađeno najmanje, 13,6 čestica (Slika 27). Što se tiče divljih kamenica najveći broj čestica je pronađen u Malostonskom zaljevu od čak 39,6 čestica po kamenici, dok je u Šibenskom kanalu pronađeno najmanje, 22,7 čestica po kamenici (Slika 28).



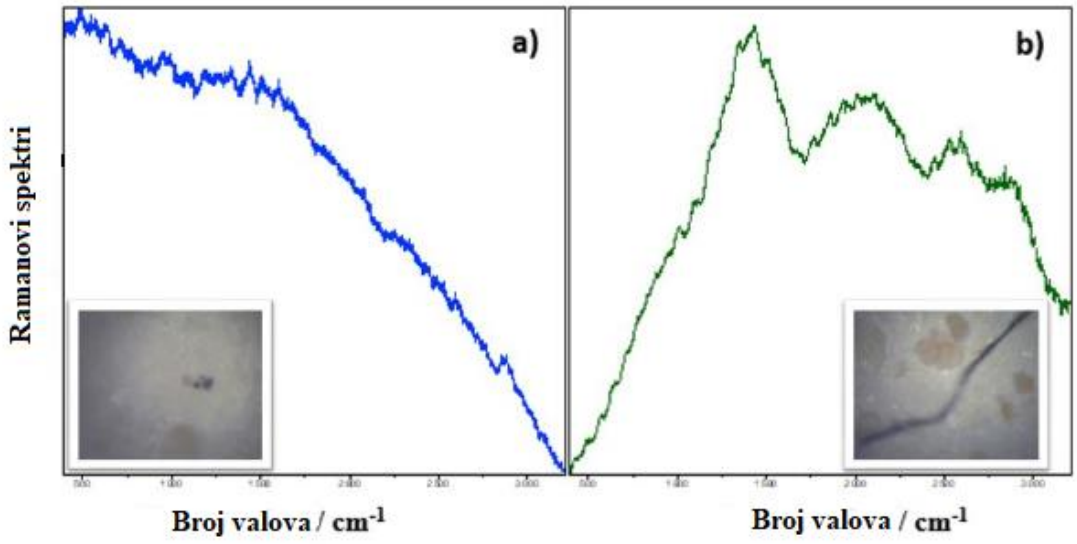
Slika 27. Prosječan broj čestica mikroplastike u vrste *Ostrea edulis* prema području uzorkovanja kod uzgojnih jedinki.



Slika 28. Prosječni broj čestica mikroplastike u vrste *Ostrea edulis* prema području uzorkovanja kod divljih jedinki.

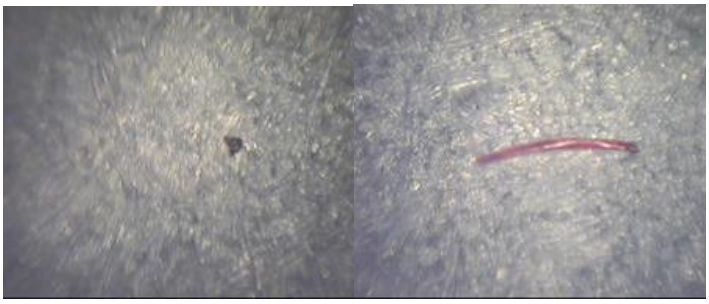
3.5. Analiza čestica mikroplastike MICRO-Raman spektrometrom

Pomoću mikro-Raman spektrometra detektirane su neke vrste plastičnih materijala prisutne u analiziranim uzorcima. Na uzorku kamenica (B7-I) pronađeno je više različitih fragmenata i vlakno. Crni fragment, kakav je prikazan na slici, dao je vrpce na 1094 (moguće potječe od oksida), 1344, 1438 cm^{-1} i nekoliko vrpci u području 2800 do 2950 cm^{-1} (područje C-H vibracija). Analizom tamnog vlakna dobivene su vrpce na 1002, 1086, 1343 i 1430 cm^{-1} (Slika 29).



Slika 29. Ramanovi spektri: a) crnog fragmenta i b) vlakna.

Na uzorku jedne jedinke vrste *O. edulis* (B7-III) je pronađeno više sitnih fragmenata, no pod optičkim mikroskopom Ramanovog spektrometra nije bilo moguće odrediti boju. Analizom tamnijih fragmenata pojavljivale su se vrpce na 638, 1089, 1343, 1530 cm^{-1} te niz vrpci u području 2850 do 2950 cm^{-1}. Analiza vlakna (sa slike 29 i 30) rezultirala je vrpcama na 1040, 1130, 1135, 1350 (jaka), 1402, 1440 i 1587 cm^{-1}.



Slika 30. Uzorak B7-III, fragment i vlakno.

Analiza tamnijih fragmenata je pokazala spektar analogan spektu iz rada Frére i sur. (2016) koji pokazuje da se radi polivinil-kloridu koji se upotrebljava u proizvodnji plastičnih boca i čaša, te poliamidu koji se koristi za proizvodnju plastičnih vreća, bova i slamki. Analiza vlakna je pokazala spektar analogan spektru iz istog rada koji ukazuje na polietilen koji se koristi u proizvodnji ambalažnog materijala za prehrambene, farmaceutske, tekstilne i druge proizvode (boce, folije, vreće, itd.).

4. RASPRAVA

Sve češće se izvješćuje o prisutnosti čestica mikroplastike u rastućem broju morskih organizama iz različitih trofičkih razina, uključujući zooplankton, kozice, školjkaše, dekapodne rakove, ribe, morske sisavce i morske ptice (Carbery i sur., 2018). Veličina mikroplastike može biti najvažniji faktor u određivanju raspona organizama koji ih gutaju (Andrady, 2011). Biološki unos prvenstveno ovisi o veličini čestice u odnosu na prirodni plijen, dok gustoća čestica određuje položaj u vodenom stupcu, a samim time i vjerovatnost da će je organizam susresti (Carbery i sur., 2018). Organizmi koji obitavaju u površinskim vodama vjerovatno će naići na plastiku sa specifičnom gustoćom manjom od morske vode poput polistirena (PS), polipropilena (PP) i polietilena (PE), dok će bentički organizam naići na obrađene vrste plastike, uključujući polietilentetraftalat (PET) i polivinil klorid (PVC) (Carbery i sur., 2018). Frias i sur. (2014) provode istraživanje o prisutnosti čestica mikroplastike u zooplanktonu na području Portugalske obale. Istraživanje je pokazalo prisutnost mikroplastike u 61% uzoraka zooplanktona. Također, Teuten i sur. (2007) u svom radu izvješćuju o prisutnosti mikroplastike u pjeskulji (*Arenicola marina*). Budući da je *A. marina* u dnu prehrambenog lanca, kao i zooplankton, postoji potencijalna opasnost za prenošenje mikroplastike u više razine hranidbene mreže. Školjkaši koji se hrane filtracijom mora, kao kamenice, pokazali su ingestiju mikroplastike u prirodnim i akvakulturnim staništima, te potencijalno negativne efekte na metaboličke aktivnosti (Green, 2016). Pojedina kamenica može filtrirati 5-25 L morske vode kroz 1 h, ukljanjajući čestice iz vodenog stupca i koncentrira ih u sediment kao biodepoziciju koja je vjerovatno ključni mehanizam kojim su plutajuće čestice transportirane s površine u sediment (Green, 2016).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju prisutnost čestica mikroplastike kod uzgojnih i divljih populacija kamenice uz hrvatsku obalu Jadranskog mora. Analiza Raman spektrofotometra je pozitivno identificirala čestice kao mikroplastiku. Uzgoj školjkaša, kao što su kamenice, odvija se u priobalnim područjima a zbog načina hranjenja izložene su zagađivačima prisutnim u morskoj vodi, uključujući i mikroplastiku. Ingestija mikroplastike različitih oblika i veličina, dokazana je u laboratorijskim uvjetima (Van Cauwenberghe i sur., 2014). Mathalon i Hill (2014) su proveli istraživanje o prisutnosti mikroplastike na području Nove Škotske i Kanade. Dokazali su prisutnost filamenata mikroplastike u divljih i uzgojnih populacija školjkaša. Uzgojne populacije su imale značajno veće koncentracije mikroplastike u usporedbi s divljim. Rezultat tome mogu biti plastične linije polipropilena koje se koriste

kod uzgoja. Iz rezultata se može vidjeti veća prisutnost čestica mikroplastike kod divljih kamenica u Malostonskom zaljevu. Razlog veće količine mikroplastike kod divljih vrsta mogu biti antropogena onečišćenja kao na primjer otpadne vode i brodski promet ili veća starost uzorkovanih organizama. Drugačija metoda analize količine mikroplastike, različita mjesta uzorkovanja i fiziološka razlika između kamenica može utjecati na različito dobivene rezultate. Kroz pokuse hranjenja utvrđeno je da se mikroplastika iz probavnog trakta premjestila u krvožilni sustav u samo 3 dana (Mathalon i sur., 2014). Isto tako, nakupljanje mikroplastike u probavnom traktu može uzrokovati blokade i inducirati sitost u organizmu, što dovodi do smanjenja indeksa kondicije jedinki (Mathalon i sur., 2014).

Ova studija daje prve podatke o brojnosti i karakterizaciji mikroplastike u uzgojnim i divljim kamenicama uz hrvatsku obalu Jadrana. Rezultati pokazuju onečišćenje mikroplastikom svih analiziranih uzoraka na svim lokacijama koja u usporedbi s rezultatima Li i sur. (2015) i Cho i sur. (2018) nije visoka (Slika 30, Slika 31). Od čestica mikroplastike detektiranih u tkivima kamenica filamenti su činili najveći broj (Tablica 4) u skladu s drugim studijama Sjevernog mora (Karlsson i sur., 2017), Atlantkog oceana (Lusher i sur., 2014; Cole i sur., 2014), europskim (De Witte i sur., 2014) i internacionalnim (Rochman i sur., 2015; Li i sur., 2016). Najzastupljenije boje čestica mikroplastike bile su prozirna i crna. Te dvije boje se mogu povezati s materijalima koji se koriste pri uzgoju kamenica, prozirni pergolari, crne bove. Li i sur. (2018) također u svom radu izvješćuju o najvećoj brojnosti pronađenih prozirnih čestica mikroplastike, dok Fang i sur. (2019) pronalaze najviše crnih i plavih čestica mikroplastike.

Otpad iz mora je problem globalnog razmjera, a povijest onečišćenja morskog okoliša seže do samih početaka povijesti ljudske civilizacije. Konzumacija raznolikih proizvoda, nakon čije potrošnje slijedi neadekvatno odlaganje, doveli su do zabrinjavajućeg stanja u kojem se danas nalaze, kako kopneni tako i vodeni prostori Planeta, te biljne i životinjske zajednice koje u njima žive. Morsko onečišćenje predstavlja predmet istraživanja brojnih znanstvenika i društava za zaštitu okoliša, te mnogi smatraju da upravo onečišćenje mora prestavlja najopasniji oblik onečišćenja okoliša (Setälä i sur., 2014).

Među beskralježnjacima, školjkaši su vrijedni indikatorski organizmi koji mogu ukazati na razine različitih zagađivača u okolišu (Sofilić, 2014). Upravo zbog navedenog, školjkaši mogu predstavljati bioindikatore razine zagađenja mikroplastikom u moru. Mjerenje količine mikroplastike u školjkašima izravan je put za procjenu ekoloških rizika koje donosi unos plastike i mikroplastike u morske ekosustave.

5. ZAKLJUČAK

Ovo je prvi rad u kojem se iznose rezultati o prisutnosti mikroplastike u uzgojnih i divljih jedinki vrste *Ostrea edulis* uz hrvatsku obalu Jadranskog mora. Definirani su kvantitativni i kvalitativni rezultati o sadržaju mikroplastike u sjevernom, srednjem i južnom Jadranu. Rezultati pokazuju prisustvo mikroplastike kako u uzgojnim tako i u divljim populacijama jedinki vrste *O. edulis*. Zbog navedenog postoji hitna potreba za karakterizacijom, kvantificiranjem i procjenom budućeg utjecaja povećanja razine mikroplastike kako na Jadran tako i na svjetske oceane.

6. LITERATURA

Alimba CG, Faggio C. 2019. Microplastics in the marine environment: Current trends in environmental pollution anchanisms of toxicological profile. Environmental Toxicology and Pharmacology, 68: 61-74.

Andrady AL, Gregory MR. 2003. Plastics in marine environment. Plastics and the Environment, str. 379-398.

Andrady AL. 2011. Microplastics in the marine environment. Marine Pollution Bulletin, 62: 1596-1605.

Berc T. 1994. Uzgoj školjkaša u Limskom kanalu. Maturalni rad.

Bergmann M, Gutow L, Klager M. 2015. Marine Anthropogenic Litter, str. 117-140.

Bonello G, Varrella P, Pane L. 2018. First Evaluation of Microplastic Content in Benthic Filter-feeders of the Gulf of La Spezia (Ligurian Sea). Aquatic Food Product Technology, 1049-8850.

Browne MA. 2007. Environmental and biological consequences of microplastic within marine habitats. Dostupno sa: https://pearl.plymouth.ac.uk/bitstream/handle/10026.1/1299/485479.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Carbery M, O´Connor W, Palanisami T. 2018. Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. Environment International, 115: 400-409.

Cho Y, Joon Shim W, Jang M, Han GM, Hong SH. 2018. Abundance and characteristics of microplastics in market bivalves from South Korea. Environmental Pollution, 245: 1107- 116.

Cole M, Webb H, Lindeque PK, Filemann ES, Halsband C, Galloway TS. 2014. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. Science Reports 4, 4528.

Cole M, Galloway TS. 2015. Ingestion of Nanoplastics and Microplastics by Pacific Oyster Larvae. Environmental Science Technology, 49,24.

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

DeFishGear, 2015. Protocol for macro litter ingested in fish stomachs. Dostupno sa: https://mio-ecsde.org/wp-content/uploads/2014/12/Biota_Macro-and-micro-litter_final.pdf

Doyle D, Frias J, Nash R, Gammell M. 2020. Current environmental microplastic levels do not alter emergence behaviour in the intertidal gastropod *Littorina littorea*. Marine Pollution Bulletin 151.

Fang C, Zheng R, Chen H, Hong F, Lin L, Lin H, Guo H, Bailey C, Segner H, Mu J, Bo J. 2019. Comparison of microplastic contamination in fish and bivalves from two major cities in Fujian province, China and the implications for human health. Aquaculture 512, 734322.

FAO, 1989. *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758. (*Ostreidae).* Dostupno sa: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Ostrea_edulis/en

FAO, 2009. In cultured aquatic species fact sheets. Ostrea edulis. Dostupno sa: http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/en/en_europeanflatoyster.htm

Frére L, Paul- Pont I, Moreau J, Soudant P, Lambert C, Huvet A, Rinner E. 2016. A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and Chemical characterizations of microplastic litter. Marine Pollution Bulletin.

Frias JPGL, Otero V, Sobral P. 2014. Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. Marine Environmental Research, 95: 89-95.

Green DS. 2016. Effects of microplastics on European flat oyster, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities. Environmental Pollution, 216: 95-103.

Gosling E. 2003. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. Dostupno sa: https://books.google.hr/books?hl=hr&lr=&id=mnQtr7GAjy0C&oi=fnd&pg=PR5&dq=bivalve+&ots=kXJuYTIIJr&sig=ER1JnRCAA0YMaHKYlCcYMuyYll4&redir_esc=y#v=onepage&q=bivalve&f=false

Karlsson TM, Vethaak AD, Almroth BC, Ariese F, van Velzen M, Hassellov M, Leslie HA. 2017. Screening for microplastics in sediment, water, marine invertebrates and fish: Method development and microplastics accumulation. Marine Pollution Bulletin, 403-408.

Lapègue S, Beaumont A, Boudry P, Goulletquer P. 2006. European flat oyster – *Ostrea edulis*, GENIMPACT – final report, str. 68-73.

Li J, Yang D, Li L, Jabeen K, Shi H. 2015. Microplastics in commercial bivalves from China. Environmental Pollution, 207: 190-195.

Li J, Qu X, Su L, Zhang W, Yang D, Kolandhasamy P, Li D, Shi H. 2016. Microplastics in mussels along the coastal waters of China. Environmental Pollution, 214: 177-184.

Li HX, Ma LS, Lin L, Ni ZX, Xu XR, Shi HH, Yan Y, Zheng GM, Rittschof D. 2018. Microplastics in oysters Saccostrea cucullata along the Pearl River Estuary, China. Environmental Pollution, 236: 619-625.

Lusher AL, Burke A, O´Connor I. 2014. Microplastics pollution in the Northeast Atlantic Ocean: Validated and opportunistic sampling. Marine Pollution Bulettin, 325-333.

Mathalon A, Hill P. 2014. Microplastic fibers in the intertidal ecosystem surrounding Halifax Harbor, Nova Scotia. Marine Pollution Bulletin, 81(1).

Marguš D, Teskeredžić E. 2004. Školjkaši ušća rijeke Krke – izlov i kontrolirani uzgoj, 62, str. 27-32.

Nerlović V. 2005. Utjecaj prehrane fitoplanktonom na razvoj ličinke kamenice *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 u laboratorijskim uvjetima uzgoja. Dostupno sa: http://fulir.irb.hr/921/1/mr_nerlovic_vedrana.pdf

Obbard RW, Sadri S, Qi Wong Y, Khitun AA, Baker I, Thompson RC. 2014. Global warming releases microplastic legacy frozen in Artic Sea ice. Earth´s Future 2(6), 315-320.

Anonimus, 2013. Uzgoj kamenica. Dostupno sa: http://www.opcina-starigrad.hr/HTML/Uzgoj%20kamenica.html

PlasticsEurope, 2019. Plastics – the Facts 2019. An analysis of European plastics production, demand and waste data. Dostupno sa: https://www.plasticseurope.org

Rochman CM, Tahir A, Williams SL, Baxa DV, Lam R, Miller JT, The FY, Werorilangi S, Teh SJ. 2015. Antropogenic debris in seafood: plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. Science Reports, 5: 14340.

Rummel CD, Loder MGJ, Fricke NF, Lang T, Griebeler EM, Janke M, Gerdts G. 2016. Plastic ingestion by pelagic and demersal fish from North Sea and Baltic Sea. Marine Pollution Bulletin, 102: 134-141.

Setälä O, Fleming-Lehtinen V, Lehtinienmi M. 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. Environmental Pollution 185, str. 77-83.

Smaal AC, Ferreira JG, Petersen JGJK, Strand Ø. 2019. Goods and Services of Marine Bivalves. Dostupno sa: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-96776-9.pdf

Sofilić T. 2014. Ekotoksikologija. Dostupno sa: http://bib.irb.hr/datoteka/743709.Tahir_Sofilic_EKOTOKSIKOLOGIJA.pdf

Sussarellu R, Suquet M, Thomas Y, Lambert C, Fabioux C, Pernet MEJ, Le Goïc N, Quillien V, Mingant C, Epelboin Y, Corporeau C, Guyomarch J, Robbens J, Puaul-Pont I, Soudant P, Huvet A. 2015. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. PNAS, 2430-2435.

Šimunović A. 2004. Malostonski zaljev – biser Jadrana, str. 12-16

Teuten EL, Rowland SJ, Galloway TS, Thompson RC. 2007. Potential for Plastics to Transport Hydrophobic Contaminants. Environmental Science & Technology, 41(22): 7759-7764.

Tomšić S, Lovrić J. 2004. Povijesni pregled uzgoja kamenica u Malostonskom zaljevu, str. 17-23.

Van Cauwenberghe L, Janssen CR. 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. Environmental Pollution, 193: 65-70.

Waite HR, Donnelly MJ, Walters LJ. 2018. Quantity and types of microplastics in the organic tussues of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and Atlantic mud crag *Panopeus herbstii* from a Florida estuary. Marine Pollution Bulletin, 129: 179-185.

Yonge CM. 1926. Structure and Physiology of the Organs of Feeding and Digestion in Ostrea edulis, str. 297-299.