



Mikroplastika u podzemnim vodama RH - suradnja učenika i speleologa

Mihaela Marceljak Ilić | prof. savjetnik, XV. gimnazija, Zagreb

*Mikroplastika u uzorku vode
Autor: Mihaela Marceljak Ilić*

Uvod

Ovaj članak prikazat će važnost suradnje učenika, speleologa i lokalne zajednice u rješavanju sveprisutnog, gorućeg pitanja zagađenja krškog podzemlja mikroplastikom s obzirom na to da su metode uklanjanja mikroplastike iz vode tek u procesu istraživanja. Unatoč rastućem broju istraživanja na temu mikroplastike, zasad još ne postoji konsenzus o definiciji mikroplastike, već se predlaže sljedeća definicija:

Mikroplastika je bilo koja sintetička čvrsta čestica ili polimerna matrica, pravilnog ili nepravilnog oblika i veličine u rasponu od 1 μm do 5 mm, primarnog ili sekundarnog proizvodnog podrijetla, koja je netopiva u vodi (Frias i Nash, 2019). Čestice mikroplastike manje od 5 μm teško su precizno mjerljive klasičnim svjetlosnim mikroskopima, stoga se determiniraju drugim metodama. Čestice manje od 1 μm spadaju u kategoriju nanoplastike.

Osim nedostatka prave definicije mikroplastike, nedostaje i stavka u Zakonu o vodama (NN 66/19) o dozvoljenim količinama ili broju komadića mikroplastike u određenom volumenu vode za piće, što uvelike smanjuje važnost i doprinos svih istraživanja na danu temu i primjenjivost rezultata u borbi za zaštitu okoliša i izvora pitkih voda.

Unatoč rastućem interesu i istraživanju utjecaja mikroplastike na ljudsko zdravlje, većina istraživanja ograničena je na životinjske modele (miševe, štakore, vodene organizme) ili *in vitro* na stanične kulture.

Utjecaj mikroplastike na ljudsko zdravlje

Tek se u posljednjih nekoliko godina objavljuju radovi koji se bave zdravstvenim učinkom čestica mikro i nanoplastike na ljudska tkiva. U nedavno objavljenom izvješću Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), koja je iznijela osvrt na prisutnost mikroplastike u plastičnim bocama za vodu, navedeno je da otkrića predstavljaju zanemarivu opasnost za zdravlje ljudi zbog nedostatka istraživanja koja bi dokazala suprotno (WHO, 2019).

Prata i dr. (2020) daju izvrstan pregled znanstvenih istraživanja o učinku mikroplastike na zdravlje ljudi, što uključuje opis načina izlaganja mikroplastici te fiziologije njene toksičnosti. Mikroplastika može utjecati na crijevnu

mikrofloru, koja potom može dodatno doprinijeti probavnim, metaboličkim i imunološkim problemima (Bastyans i dr., 2022). No postoje različiti čimbenici koji utječu na to hoće li izlaganje mikroplastici imati štetan učinak na zdravlje ljudi.

U nekoliko studija pokušalo se kvantificirati ljudsku izloženost česticama mikroplastike. Prosječni stanovnik gutanjem i udisanjem unosi od 74 000 do 120 000 čestica mikroplastike godišnje. Ove procjene dodatno su povećane za 90 000 kod pojedinaca koji unose preporučeni unos vode pijuci samo vodu iz plastičnih boca. Većina mikroplastike konzumira se putem flaširane vode, koja u prosjeku sadrži 94 čestice mikroplastike po litri (Cox i dr., 2019).

Kada se konzumiraju gutanjem, ovisno o svojoj veličini, čestice mikroplastike mogu se eliminirati ili apsorbirati. Preko 90 % čestica mikroplastike eliminira se probavom, a samo one manje od 150 μm mogu prodrijeti kroz probavni epitel te završiti u tijelu (Kannan i Vimalkumar, 2021), inducirati upalu ili utjecati na crijevnu mikrofloru. Kada se udahnu, čestice mikroplastike mogu lokalno uzrokovati upalu ili se krvožilnim i limfnim sustavom premjestiti u druge dijelove tijela. Utvrđeno je da se samo čestice mikroplastike manje od 10 μm apsorbiraju preko pluća kroz alveole (Kannan i Vimalkumar, 2021). Mikroplastika je pronađena u ljudskoj posteljici, plućima, krvi te stolici (Schwabl i dr., 2019). Ragusa i dr. (2021) pronašli su u prosjeku 12 čestica mikroplastike u uzorku od 23 g posteljice u četiri od šest analiziranih posteljica inače zdravih majki s normalnim trudnoćama. Mikroplastika je obdukcijama pronađena i u ljudskim plućima, i to prosječno 33 čestice mikroplastike i četiri vlakna u 13 od 20 uzoraka plućnog tkiva srednje težine 3,28 g. Sve čestice mikroplastike bile su manje od 5,5 μm , a veličina vlakna kretala se od 8,12 do 16,8 μm (Amato-Lourenço i dr., 2021). U analiziranim uzorcima krvi 22 zdrava odrasla darivatelja krvi otkriveno je da 77 % darivatelja prosječno ima 1,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ plastičnih čestica u uzorku krvi (Leslie i dr., 2022). Drugim riječima, prema ovim rezultatima, u krvi odraslog čovjeka cirkulira oko 8 mg plastike, što je ugrubo ekvivalent dvije sjemenke sezama.

Istraživanja na životinjama pokazala su da mikroplastika potencijalno može imati štetne učinke na metabolizam (Prata i dr., 2020). Sama toksičnost

Kako je počela suradnja XV. gimnazije s Čistim podzemljem?

Sada kada ste upoznati s učincima mikroplastike, jasnije ćete uvidjeti odakle je proizašla potreba za suradnjom i istraživanjem količine mikroplastike u podzemlju. Iskreno, ne sjećam se ni godine ni datuma kada sam sudjelovala na stručnom usavršavanju na kojem me predava-nje dr. sc. Ruđera Novaka o zagađenju hrvatskog podzemlja plastikom silno pogodilo i potaklo na razmišljanje, ali i na izradu scenarija kako pomoći i kako uključiti učenike u borbu protiv ilegalnog odlaganja otpada. Sjećam se da sam pristupila Ruđeru i rekla: »Kada ću imati ideju za suradnju, javim se!« Prošlo je par godina, sve su mi se ideje činile suhoparne, a i Covid-19 *lockdown* nas je zatvorio u naša mala privatna podzemlja.

Slika 1. Otpad u Gaćinoj jami
Autor: Tonči Rađa



U proljeće 2021. godine u sklopu GLOBE programa (Global Learning and Observations to Benefit the Environment) pojavio se novi pokusni protokol kroz kampanju Microplastic Monitoring Protocol Trial (MMPT) (Sutti i dr., 2021). Ovoj kampanji priključio se velik broj škola iz Europe, a zadatak je bio analizirati vodene ekosustave na prisutnost čestica mikroplastike te ujedno sudjelovati u nadogradnji protokola i metode rada koju bi koristili učenici u cijelome svijetu. Tijekom prezentacije novog protokola i ideja za projektne zadatke učenicima sam poslala fotografiju (Slika 1) onečišćenog podzemlja koju sam našla na stranicama inicijative Čisto podzemlje.

Andrea Brzica, tada učenica prvog razreda XV. gimnazije, došla je s prijedlogom o proširivanju našeg istraživanja na podzemlje te je imala prijedlog za projekt i suradnju. Stupili smo u kontakt s Čistim podzemljem i dogovorili plan suradnje u kojem bi speleolozi prilikom speleoloških istraživanja prikupljali uzorke vode iz podzemlja iz kojih će se utvrđivati prisutnost mikroplastike. S obzirom na to da nije bilo previše podataka u nama dostupnoj literaturi, ovaj izazov činio mi se još privlačnijim, te je tako sve krenulo i mi smo ušetali u »podzemlje« s nadom da nećemo naći previše mikroplastike.

Suradnju smo još jednom utvrdili u svibnju 2022. godine, kada je Speleološki odsjek HPD-a »Željezničar« zajedno s XV. gimnazijom iz Zagreba dobio potporu za projekt »Jame bez drame – podzemlje bez mikroplastike«. Projekt je sufinancirala INA u sklopu ekološkog natječaja »Zeleni pojas«, koji se provodi devetu godinu za redom. Ciljevi projekta bili su čišćenje špilje u Crnom lugu, provođenje edukativnih predavanja poglavito namijenjenih učenicima osnovnih i srednjih škola te nabava novih mikroskopa pomoću kojih će učenici gimnazije utvrditi pojavu mikroplastike u uzorcima vode iz podzemlja.

U sklopu projekta napravljene su i prve edukacije provedene u OŠ Luke Perkovića u Brinju. Speleolozi Lovro Lučev i dr. sc. Tana Tandarić

održali su radionice vezane uz krš i podzemlje. Učenici grupe »MIOC GLOBE« održali su radionice o mikroplastici u vodi (Slika 2). Idući dan edukacija je nastavljena akcijom čišćenja obližnje

Špilje u Gornjem lugu, pri čemu je provedeno educiranje lokalnog stanovništva i volontera (Slika 3). Sjajan tim ljudi, sjajna energija, jedva čekamo nove terene!



Slika 2. Radionica u OŠ Luke Perkovića u Brinju
 Autor: Mihaela Marceljak Ilić



Slika 3. Jame bez drame i MIOC GLOBE ekipa u akciji
 Autor: Daniela Crnjak

mikroplastike je u tome da uzrokuje oksidativni stres i na taj je način toksična za stanicu (Prata i dr., 2020). Nekoliko istraživanja na životinjama naglašava da čestice mikroplastike i plastični aditivi mogu poremetiti metabolizam masti, što se može povezati s rastućom stopom pretilosti u svijetu (Kannan i Vimalkumar, 2021).

Utjecaj mikroplastike na okoliš

Dio čestica mikroplastike pronađen u ljudskim tkivima unesen je putem hrane ili zraka, stoga je bitno i naglasiti utjecaj mikroplastike na ostale organizme, a posebice na primarne potrošače u ekosustavu, jer mikroplastika koja se ne razrađuje daje efekt biomagnifikacije u hranidbenom lancu (Chae i dr., 2018).

Što se tiče ekotoksikologije, istraživanja utjecaja mikro i nanoplastike na slatkovodne organizme pokazala su različit negativan utjecaj na ponašanje te na biokemijske i histološke parametre, što se, primjerice, odražava kroz promjene u morfologiji jetrenog tkiva, metabolizmu lipida i lokomotornim sposobnostima (Chae i dr., 2018). Istraživanja na punoglavcima vodozemaca ukazuju da koncentracija mikroplastike od 10^3 čestica po litri uzorka uzrokuje veliku smrtnost, a manje koncentracije fiziološke i morfološke promjene (Boyrcroft i dr., 2019).

Valja naglasiti da su punoglavci veoma važni primarni potrošači u vodenim ekosustavima, pa veoma lako unose čestice mikroplastike tijekom hranjenja, što za posljedicu može imati promjenu njihovih hranidbenih navika, a time indirektno utjecati na važne procese u ekosustavu, poput primarne produkcije i kruženja nutrijenata (Seale, 1980; Whiles i dr., 2012). Punoglavci su hrana ribama (Bosch i dr., 2006), a odrasli vodozemci većinom su kopneni organizmi, stoga akumulacija mikroplastike u njihovim sustavima i tkivima može predstavljati glavni put prijenosa ovog zagađenja iz vodenog ekosustava kroz trofičke razine hranidbenih mreža na kopnene ekosustave (Larsen i dr., 2016).

Biomagnifikacija ili bioakumulacija predstavlja porast akumulacije nerazgrađivih molekula u tkivima kod vrsta koje se nalaze na višoj poziciji u lancu ishrane.

Trofička razina je položaj organizma u hranidbenom lancu.

Gledano s toksikološkog stajališta, čestice mikroplastike mogu predstavljati rizik za organizme kao i kemikalije. Jedan od najistraženijih sastojaka plastike je bisfenol A, za koji se zna da ometa prirodne hormone oponašajući ih i vežući se na njihove receptore, te remeti aktivnosti ekspresije gena (Prata i dr., 2020; Segovia-Mendoza i dr., 2020). Nadalje, mikroplastika može vezati druge organske ili anorganske zagađivače, primjerice teške metale, a vezanjem mikroorganizama na svojoj površini može tvoriti plastične biofilme (Oberbeckmann i dr., 2015).

Zašto podzemlje i podzemne vode?

Svježa podzemna voda zauzima 4 000 000 km² (0,2986 %) površine našeg planeta, od čega obnovljive zalihe podzemne vode u RH iznose 9.133×10^6 m³/god (Vlada RH, 2016). Dakle, malo je ovoga blaga koje je neprocjenjivo ne samo zato što je izvor pitke vode, već i jer je bitan ekosustav. No, unatoč silnoj važnosti podzemlja, ljudi nisu svjesni kako njihovo neodgovorno ponašanje može utjecati na buduće generacije. Kroz razgovor s lokalnim stanovništvom mogu se čuti neki od argumenata za odlaganje otpada u regularni otpad, pa čak i u prirodu: »Pa plastika se ionako razgrađuje tek za 1000 godina, pa nam neće naštetiti jer nas neće biti.« Plastika se vrlo sporo ili gotovo nikako ne razgrađuje, ona se pod utjecajem vjetra, sunca i valova raspada na sitnije fragmente, odnosno mikroplastiku, prilikom čega se akumulira u okolišu (Silva i dr., 2018). Primjerice, plastična čaša koja ostane u prirodi kroz godinu dana bit će smrvljena zbog okolišnog utjecaja, a mrvice koje nastanu mogu oborinskim vodama biti odnesene do podzemnih spremišta pitke vode. U podzemlju našeg krša dosad je evidentirano preko 900 ilegalnih odlagališta koja ugrožavaju georaznolikost, jedinstvenu faunu i važne zalihe podzemne pitke vode. Nažalost, krška područja gotovo se u potpunosti preklapaju s područjima na kojima se nalaze onečišćene špilje i jame (Novak, 2018).

Prisutnost mikroplastike u vodenim ekosustavima može utjecati na hranjenje, rast, reprodukciju

Mikroplastika u MIOC-u

U XV. gimnaziji, svima bolje poznatoj pod nazivom MIOC, od 1997. godine provodi se program GLOBE. U sklopu programa koji je ugrađen u školski kurikulum od proljeća 2021. provodi se uzorkovanje i identifikacija čestica mikroplastike po protokolima kampanje Microplastic Monitoring Protocol Trial (MMPT). Kroz suradnju s inicijativom Čisto podzemlje razvio se projekt čiji je cilj determinacija količine mikroplastike u podzemnim vodama te kroz edukacije i suradnje dugoročno utjecati na smanjenje i sanaciju podzemnih ilegalnih odlagališta, koja su jedan od najvećih izvora ulaska plastike u krške podzemne vode.

Kako bismo osigurali uspješnost svoje ideje, započete su edukacijske radionice za učenike škole, a jedno od prvih predavanja održala je dr. sc. Petra Kovač Konrad, koja je ujedno i donijela prve uzorke vode iz podzemlja (Slika 4).



Slika 4. Predavanje Petre Kovač Konrad o važnosti podzemnih voda
Autor: Mihaela Marceljak Ilić

i preživljavanje vodenih organizama (Foley i dr., 2018). Kroz istraživanja u morskom ekosustavu otkriveno je da kemijski dodaci plastici: omekšivači, sredstva koja smanjuju zapaljivost, antimikrobne čestice i nanočestice titan dioksida (TiO₂ NPs), koji se dodaju kako bi se poboljšala njena svojstva, predstavljaju opasne okolišne zagađivače jer na svoju površinu mogu vezati pesticide, herbicide, teške metale i različite druge supstance koje imaju negativan učinak na morske organizme. Taj negativan učinak očituje se na poremećaj ekspresije gena, enzimske aktivnosti, oksidaciju slobodnih radikala na molekularnoj razini, što dovodi do pojave oksidativnog stresa, apoptoze i upalnih procesa na staničnoj razini. Kod morskih organizama ovi negativni

učinci smanjuju plodnost, izazivaju poremećaje metabolizma i pojavu tumora (Guzzetti i dr., 2019).

Materijali i metode

Kako bi prikupili što više podataka za provođenje istraživanja, speleolozi iz inicijative Čisto podzemlje tijekom svojih akcija čišćenja i istraživanja krških jama uzorkovali su vodu u podzemlju. Prema metodi rada, na svakoj lokaciji bilo je potrebno izmjeriti temperaturu vode te uzeti tri uzorka vode (Slika 3) u boce od 500 ml (Suti i dr., 2021). Nekim speleološkim terenima priključila se i naša učenica Andrea Brzica (Slika 5) kako bi demonstrirala metodu uzorkovanja vode i napravila analizu vode prema GLOBE protokolima.

Slika 5. Izlazak na teren i uzorkovanje
Autor: Petra Kovač Konrad



Nakon uzorkovanja voda se transportira u putnom hladnjaku ili zaleđuje kako bi se spriječio razvoj bakterija. Vodu je potrebno filtrirati u najkraćem mogućem roku (unutar 24 sata). Nakon donošenja uzoraka s terena, pripremu za analizu i samu analizu uzoraka proveli su učenici XV. gimnazije uz moj nadzor. Uzorak vode potrebno je filtrirati kako bi se izdvojile čestice veće od 45 μm (a u većini slučajeva i one veličine samo nekoliko mikrometara), koje se potom analiziraju mikroskopiranjem. Filtriranje se provodilo kroz membranske filtre promjera pora 45 μm , za što je neophodna oprema za vakuum filtraciju (Slika 6a). Na početku, u nedostatku vakuumske pumpe, učenici su se služili različitim alternativnim metodama, što je vidljivo na Slici 6b. Na ovaj je način stvoren vakuum te se uspješno filtriralo, no bilo je potrebno nešto više vremena.

Nakon filtriranja uzorci su se sušili u zatvorenim Petrijevim zdjelicama na sobnoj temperaturi.

Kroz sve ove korake bilo je potrebno paziti da se uzorak sekundarno ne kontaminira mikroplastikom. To uključuje izbjegavanje korištenja lakova sa šljokicama, šminke, sjenila, sjajila i pudera, a posebice onih koji sadrže svjetlucave čestice. U danima obrade i analize uzoraka izbjegavano je korištenje preparata za njegu tijela koji sadrže čestice mikroplastike.

Najzahtjevniji dio rada je mikroskopiranje i analiza uzoraka. S obzirom na to da se u uzorcima mogu pronaći alge, pijesak, ostaci raspadnutih životinja i biljaka, gljivica, vlakna organskog i anorganskog podrijetla, učenici koji su sudjelovali u analizi prošli su edukaciju. Edukacija je provedena putem baze fotografija kojoj imamo pristup zahvaljujući međunarodnoj suradnji u okviru školskog GLOBE projekta. Baza fotografija je opsežna i sadrži fotografije uzoraka mikroplastike, sintetskih vlakana, celuloznih vlakana i bioloških uzoraka. Učenici su »trenirali oko« na različite



Slika 6a. Oprema za filtriranje
 Autor: Mihaela Marceljak Ilić

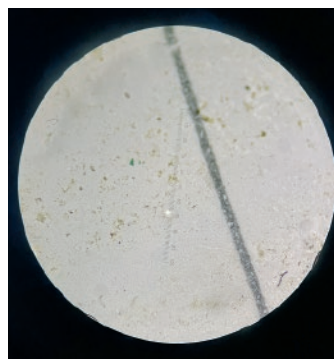
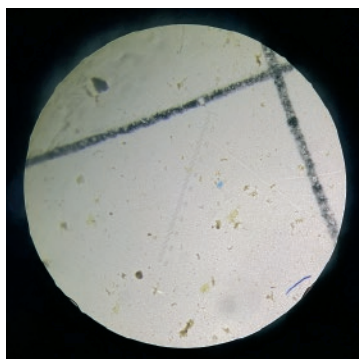
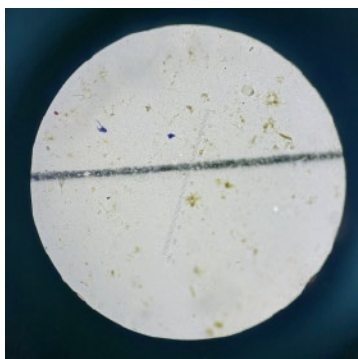
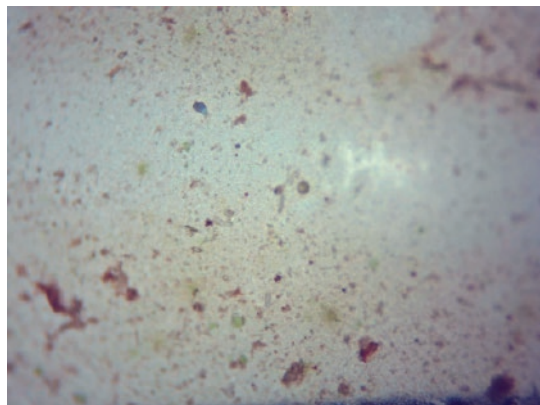
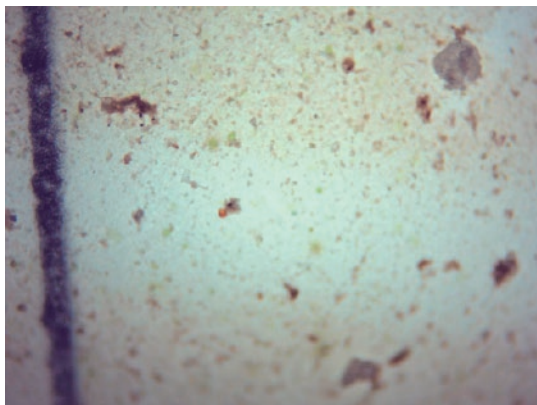
čestice kako bi pri uzorkovanju imali fokus na moguće plastične čestice. Mikroskopiranje jednog filtra zahtijeva oko tri sata rada (Slika 7), a ukoliko postoji sumnja na vrstu čestice, fotografirani uzorci (Slika 8) potom se analiziraju i uspoređuju s bazom. S obzirom na to da je ovo veoma zahtjevan proces, učenici su krenuli s izradom softvera za analizu mikroplastike koji zasad s pouzdanošću od 75 % klasificira uzorak fotografiran na mikroskopu u jednu od gore navedenih kategorija te se na taj način osoba koja radi analizu može bolje fokusirati samo na bitne uzorke.



Slika 6b. Alternativni načini nadomjestaka vakuumske pumpe
 Autor: Mihaela Marceljak Ilić



Slika 7. Mikroskopiranje
 Autor: Mihaela Marceljak Ilić



Slika 8. Mikroplastika u uzorku vode
Autor: Mihaela Marceljak Ilić

Preliminarni rezultati i rasprava

Tijekom dosadašnje suradnje od speleologa je pristiglo desetak uzoraka iz krškog podzemlja i sve do sada preliminarno analizirane vode nažalost sadrže komadiće mikroplastike i sintetska vlakna. Na izvoru Omble (Slika 9) u uzorku od 500 ml vode nađeno je 38 suspektnih mikroskopskih vlakana, odnosno komadića mikroskopskih veličina manjih od 25 μm , za koje se pretpostavilo da su plastičnog podrijetla. Daljnjom analizom utvrđeno je da su osam čestica sintetska vlakna, pet komadića mikroplastike, dok su ostale 23 celulozna vlakna te dvije čestice za koje nije moguće pouzdano odrediti radi li se o komadićima mikroplastike. Dakle, od sumnjivih mikroskopski analiziranih uzoraka koji su plivali u vodi 34 % ih je plastičnog podrijetla. Potrebno je naglasiti da još uvijek pri analizi postoji problem s uočavanjem prozirnih komadića

mikroplastike, te da je navedeni broj čestica mikroplastike možda i veći. Analize uzoraka koje uključuju bojanje nisu dio protokola za učenike jer uključuju skupe metode bojanja.

Radi li se o puno ili malo mikroplastike? Je li količina dozvoljena ili prekoračena? Odgovor na ova pitanja teško je utvrditi jer u Zakonu o vodama RH ta kategorija nije definirana, odnosno uopće ne postoji stavka o dozvoljenoj količini mikroplastike u vodi za piće u Pravilniku o pitkim vodama RH!

Rezultate analize podzemnog toka Omble moguće je usporediti s rezultatima istraživačkog rada učenice Lucije Glavičić Marović jer je njen rad koristio istu metodu uzorkovanja i analize. Ona u svom istraživačkom radu navodi da se u nezaštićenom području zapadnoistarskog akvatorija u 500 ml vode nalazi devet komadića

mikroplastike, a u moru, u području Nacionalnog parka Brijuni, pet komadića mikroplastike, dok u izvoru Omble imamo 13 komadića (Glavičić Marović, 2022). Ponavljam, ove vrijednosti ne govore ništa dok god se u Zakonu o vodama RH ne definira dozvoljena količina mikroplastike u pitkim vodama. Radovi na ovu temu su rijetki i koriste većinom kemijske analize plastike, a ne broj čestica mikroplastike.

Ovaj uzorak prikupljen je istog dana kada su speleoronioci pronašli tri jedinke čovječje ribice i time potvrdili da je izvor Omble njihovo stanište. Može li ova količina mikroplastike štetno utjecati na čovječju ribicu? Provedeno je dosta istraživanja utjecaja mikroplastike na vodozemce, čija se brojnost drastično smanjuje, a smatra se da je ovo smanjenje rezultat podložnosti stresu koji uzrokuje više različitih okolišnih čimbenika (Collins, 2010; Blaustein i dr., 2011) te da mikroplastika u interakciji s čimbenicima stresa može doprinijeti još većem smanjenju brojnosti vodozemaca (Horton i dr., 2017). Primjerice, istraživanja utjecaja koncentracije mikroplastike na smrtnost punoglavaca primaljske žabe (*Alytes obstetricans*) pokazala su da koncentracije od 10^3 čestica mikroplastike po ml uzrokuju smrtnost osam od devet punoglavaca,

a manje koncentracije fiziološke i morfološke promjene (Boyero i dr., 2019).

U drugim speleološkim objektima obuhvaćenim ovim projektom situacija je malo drugačija, što je materijal za novu priču i novi članak, koji će biti objavljen nakon što uzorci iz svih speleoloških objekata budu analizirani.

Zaključak

Završetak analize količine mikroplastike iz vodotoka hrvatskih krških jama nam je smjernica za nastavak rada. Danas se razvijaju nove tehnike kojima će se u budućnosti voda moći čistiti od onečišćenja mikroplastikom, a jedna od mogućih metoda je pomoću magnetiziranih nanočestica Fe_3O_4 (Shi i dr., 2022). Do trenutka primjene ovih metoda može proći i par desetljeća, stoga se nadam da će naši rezultati istraživanja mikroplastike u podzemnim vodama pridonijeti promjeni postojećeg Pravilnika o pitkim vodama RH, te da će uskoro i zakonski biti regulirana dozvoljena količina mikroplastike u vodama. To bi ujedno bilo i zakonsko uporište u daljnjim »borbama« za smanjenje odlaganja plastike u krškim jamama kako bi se smanjilo zagađenje okoliša i osiguralo poboljšanje kvalitete ljudskog zdravlja.

Slika 9. Izvor Omble
Izvor: Čisto podzemlje



Literatura

- Amato-Lourenço, L. F., Carvalho-Oliveira, R., Júnior, G. R., dos Santos Galvão, L., Ando, R. A., Mauad, T., 2021: Presence of airborne microplastics in human lung tissue, *Journal of Hazardous Materials* 416, 126124, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126124.
- Anderson, O. S., Nahar, M. S., Faulk, C., Jones, T. R., Liao, C., Kannan, K., Weinhouse, C., Rozek, L. S., Dolinoy, D. C., 2012: Epigenetic responses following maternal dietary exposure to physiologically relevant levels of bisphenol A, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53 (5), 334-342, DOI: 10.1002/em.21692.
- Bastyans, S., Jackson, S., Fejer G., 2022: Micro and nano-plastics, a threat to human health? *Emerg Top Life Sci.* 6 (4), 411-422, DOI: 10.1042/ETLS20220024.
- Chae, Y., Kim, D., Kim, S. W., An, Y. J., 2018: Trophic transfer and individual impact of nanosized polystyrene in a four-species freshwater food chain, *Scientific Reports* 8, DOI: 10.1038/s41598-017-18849-y.
- Cox, K. D., Covernton, G. A., Davies, H. L., Dower, J. F., Juanes, F., Dudas, S. E., 2019: Human Consumption of Microplastics, *Environmental Science & Technology* 53 (12), 7068-7074, DOI: 10.1021/acs.est.9b01517.
- Foley, C. J., Feiner, Z. S., Malinich, T. D., Höök, T. O., 2018: A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates, *Science of The Total Environment*, 631-632, 550-559, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.
- Franks, F., 2000: *Water: A matrix of life*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge CB4 OWE, United Kingdom.
- Frias, J. P. G. L., Nash, R., 2019: Microplastics: Finding a consensus on the definition, *Marine Pollution Bulletin* 138, 145-147, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.11.022.
- Glavičić Marović, L., 2022: Prisutnost mikroplastike u zaštićenom i ne zaštićenom akvatoriju zapadne obale Istre, *Bioznalac* 8, <https://www.hbd-sbc.hr/bioznalac/> (13. 1. 2023.)
- Guzzetti, E., Sureda, A., Tejada, S., Faggio, C., 2018: Microplastic in Marine Organism: Environmental and Toxicological Effects, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 64, 164-171, DOI: 10.1016/j.etap.2018.10.00.
- Kannan, K., Vimalkumar, K., 2021: A Review of Human Exposure to Microplastics and Insights Into Microplastics as Obesogens, *Front. Endocrinol.* 12, 724989. DOI: 10.3389/fendo.2021.724989.
- Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., Lamoree, M. H., 2022: Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood, *Environment International* 163, 107199, DOI: 10.1016/j.envint.2022.107199.
- Narodne novine, 2019: Zakon o vodama, Narodne novine 66, https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_07_66_1285.html (26. 1. 2023.)
- Novak, R., 2018.: Otpad u podzemlju, <https://cistopodzemlje.info/hr/o-nama/o-otpadu-u-podzemlju/> (15. 11. 2022.)
- Oberbeckmann, S., Löder, M. G. J., Labrenz, M., 2015: Marine microplastic-associated biofilms – a review, *Environmental Chemistry* 12 (5), 551-562, DOI: 10.1071/EN15069.
- Prata, J. C., da Costa, J. P., Lopes, I., Duarte, A. C., Rocha-Santos, T., 2020: Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects, *Sci Total Environ* 702, 134455, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134455.
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., Giorgini, E., 2021: Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta, *Environment International* 146, 106274, DOI: 10.1016/j.envint.2020.106274.
- Rahman, A., Sarkar, A., Yadav, O. P., Achari, G., Slobodnik, J., 2021: Potential human health risks due to environmental exposure to nano- and microplastics and knowledge gaps: A scoping review, *Science of the Total Environment* 757, 143872, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143872.
- Schwabl, P., Köppel, S., Königshofer, P., Bucsecs, T., Trauner, M., Reiberger, T., Liebmann, B., 2019: Detection of Various Microplastics in

- Human Stool, *Annals of Internal Medicine* 171 (7), 453-457, DOI: 10.7326/M19-0618.
- Segovia-Mendoza, M., Nava-Castro, K. E., Palacios-Arreola, M. I., Garay-Canales, C., Morales-Montor, J., 2020: How microplastic components influence the immune system and impact on children health: Focus on cancer, *Birth Defects Research* 112 (17), 1341-1361, DOI: 10.1002/bdr2.1779.
 - Shi, X., Zhang, X., Gao, W., Zhang, Y., He, D., 2022: Removal of microplastics from water by magnetic nano-Fe₃O₄, *Science of the Total Environment* 802, 149838, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149838.
 - Silva A. B., Costa M. F., Duarte A. C., 2018: Biotechnology advances for dealing with environmental pollution by micro(nano)plastics: Lessons on theory and practices, *Current Opinion Environmental Science & Health* 1, 30-35, DOI: 10.1016/j.coesh.2017.10.005.
 - Sutti, A., Robottom, S., Sutti, S., 2021: An Accessible MICROPLASTICS MONITORING Protocol, <https://www.globe.gov/web/italy/home/news/-/newsdetail/14334/an-accessible-microplastics-monitoring-protocol> (1. 11. 2022.)
 - Vlada Republike Hrvatske, 2016: VODNO-GOSPODARSKA OSNOVA HRVATSKE – Strategija upravljanja vodama, <https://vlada.gov.hr/UserDocsImages//2016/Sjednice/Arhiva//127-03.pdf> (17. 12. 2022.)
 - WHO, 2019: Microplastics in drinking-water, <https://www.who.int/publications/item/9789241516198> (3. 11. 2022.)

Microplastics in the subterranean waters of the Republic of Croatia – Collaboration between students and speleologists

This article presents an overview of cooperation between XV. Gymnasium and Clean Underground initiative and Speleology Department CMS »Željezničar« with a common aim to determine the amount of microplastics in underground waters, and through cooperation with and education of local communities decrease illegal deposits of waste into caves which represent the biggest source of plastics in our underground waters. Microplastics have been found in the human placenta, lungs, blood and stool, and may present a risk to human health. Croatian karst has a large storage of underground water, but unfortunately caves have become illegal garbage dumps with large amounts of plastics in them. This article presents a method which enables students to analyse the presence of microplastics particles in water, as well as preliminary results of underground water analysis from Ombla spring. Within 500 ml water sample from Ombla spring, 13 pieces with plastic origin have been found. Since there are no references to compare the results with, the results have been compared with student research done with the same method in protected and unprotected areas of west Istrian Adriatic. Since the Croatian Water Act does not define the amount of microplastics allowed in water, every further discussion is biased and inadequate. The future aim is to finish the analysis of the amount of microplastics in Croatian karst underground waters with hope that our results will help make change and give support in fight against illegal garbage dumps within Croatian karst.