



Gimnazija in srednja šola  
Kočevje

Melamin

Melamin d. d. Kočevje



*Komunalna Kočevje*

Komunalna Kočevje d. o. o.

# VPLIV ZOOPLANKTONA NA SEDIMENTACIJO MIKROPLASTIKE IZ ČISTILNE NAPRAVE

(ekologija z varstvom okolja)

Avtor:

Jan Mihelič

Mentorica:

Zorica Potisk, prof. bio.

Somentorja:

Dr. Žiga Ogorelec, mag. ekol. biod.

Dr. Miha Kavšek, univ. dipl. inž. kem. inž.

Kočevje, marec 2025

## POVZETEK

Mikroplastika onesnažuje kopenske ekosisteme, veliko pa je konča tudi v vodnih telesih, kot so jezera, reke in morja. Delci mikroplastike imajo lahko različno gostoto. Če je slednja manjša od gostote vode, delci plavajo oz. lebdijo. Takšni delci tudi pogosteje prihajajo v stik z zooplanktonskimi organizmi. Slednji lahko te delce nehote zaužijejo in izločijo združene z iztrebkom. Ni pa znano, ali ta proces poveča sedimentacijo in s tem odstranjevanje mikroplastike iz vodnega stolpca jezerskih ekosistemov. Z raziskavo smo želeli ugotoviti, ali mikroplastika, ki gre skozi prebavni sistem zooplanktona, skupaj z iztrebkom potone na dno. Za namen raziskave smo uporabili vrsto mikroplastike, ki se pojavlja na izpustu Komunalne čistilne naprave Kočevje v reko Rinžo. V podjetju Melamin smo opravili kemijsko FTIR–analizo, ki je omogočila identifikacijo prisotnih vrst mikroplastike v vzorcu. Na osnovi rezultatov smo zooplanktonske organizme, ki smo jih zajeli v Rudniškem jezeru, izpostavili identificiranim vrstam mikroplastičnih delcev. Po končanih poskusih smo s primerjanjem razlike mas mikroplastike v vodnem stolpcu poskusnih in kontrolnih posod ugotovili razlike, ki niso bile statistično značilne. Vseeno pa je bil viden trend, da je bilo ob prisotnosti zooplanktona v vodi manj mikroplastike. Za prihodnje raziskave predlagamo večje število ponovitev poskusa in testiranje posameznih zooplanktonskih skupin. Tako bi lahko preverili kateri taksoni s svojim prehranjevanjem uspešno odstranjujejo mikroplastiko iz vodnega stolpca in tako pospešuje njeno usedanje v sediment, kjer je biološko manj dostopna.

**Ključne besede:** mikroplastika, zooplankton, FTIR–analiza, čistilna naprava

## ABSTRACT

Microplastics pollute terrestrial ecosystems, and a large amount ends up in bodies of water, such as lakes, rivers and seas. Microplastic particles can have different densities. If their density is lower than that of water, the particles float or remain suspended. Such particles are more likely to come into contact with zooplankton organisms. The latter can involuntarily ingest these particles and excrete them combined with faeces. However, it is not known whether this process increases sedimentation and thereby removes microplastics from the water column of lake ecosystems. The aim of this research was to determine whether microplastics that pass through the digestive system of zooplankton sink to the bottom together with faeces. For the purpose of the research, we used a type of microplastic found at the discharge point of the Wastewater Treatment Plant Kočevje into the Rinža River. At the company Melamin we conducted the chemical FTIR analysis, which enabled the identification of the types of microplastics present in the sample. Based on the results, we exposed zooplankton organisms, which we collected from Lake Rudniško, to the identified types of microplastic particles. After the experiments, we compared the difference in the mass of microplastics in the water column of experimental and control containers and found differences that were not statistically significant. However, a trend was observed indicating that there were fewer microplastics in the water in the presence of zooplankton. For future research, we suggest a greater number of repetitions of the experiment and testing of individual zooplankton groups. This way we could check which taxa successfully remove microplastics from the water column through their feeding, thus accelerating their settling into sediment, where they are less biologically accessible.

**Keywords:** microplastics, zooplankton, FTIR analysis, wastewater treatment plant

## **ZAHVALA**

Pri raziskovalnem delu in oblikovanju raziskovalne naloge so mi pomagali mnogi. Najprej bi se rad zahvalil podjetju Komunalni Kočevje, in sicer zaposlenim na čistilni napravi Kočevje, ki so mi omogočili zajem vzorca mikroplastike iz čistilne naprave Kočevje. Zahvala gre tudi podjetju Melamin d. d. Kočevje, in sicer zaposlenim v razvojnem laboratoriju, ki so mi pomagali pri izvedbi oksidacije z vodikovim peroksidom. Za pomoč pri ATR-FTIR analizi in mikroskopiranju se zahvaljujem zaposlenim v ekološkem in analitskem laboratoriju. Gimnaziji in Srednji šoli Kočevje se zahvaljujem za dostop do šolskega laboratorija. Somentorju dr. Mihi Kavšku se zahvaljujem za pomoč pri kemijskem delu raziskovalne naloge, dr. Žigi Ogorelcu pa za pomoč pri biološkem delu, ter stalnemu svetovanju skozi celoten potek raziskovalne naloge. Posebna zahvala gre mentorici prof. Zorici Potisk za stalno spremljanje in spodbudo v procesu nastajanja raziskovalne naloge ter strokovno pomoč. Prof. Danieli Lavrič se zahvaljujem za lekturo besedila. Nenazadnje se za podporo, razumevanje in potrpljenje zahvaljujem tudi družinskim članom, še posebej očetu za pomoč pri organizaciji dela.

## KAZALO VSEBINE

POVZETEK.....	1
ABSTRACT .....	2
ZAHVALA .....	3
KAZALO SLIK.....	5
KAZALO TABEL .....	5
KAZALO ENAČB.....	6
TABELA OKRAJŠAV .....	6
1 UVOD .....	7
1.1 Opredelitev problema .....	7
1.2 Namen in cilj raziskovalne naloge .....	8
1.3 Hipotezi.....	8
2 TEORETIČNO OZADJE.....	9
2.1 Mikroplastika.....	9
2.2 Kemijska oksidacija z vodikovim peroksidom .....	9
2.3 Kemijska FTIR-analiza .....	10
2.4 Komunalna čistilna naprava Kočevje .....	11
2.5 Zooplankton .....	11
2.5.1 Nižji raki ( <i>Entomostraca</i> ) .....	12
2.5.2 Valjavci ( <i>Aschelminthes</i> ) .....	14
3 EKSPERIMENTALNO DELO .....	15
3.1 Oprema in seznam kemikalij .....	15
3.2 Zajem mikroplastike na iztoku čistilne naprave Kočevje.....	16
3.3 Priprava mikroplastike na FTIR-analizo.....	18
3.4 Eksperiment z uporabo zooplanktona.....	24
4 REZULTATI.....	28
4.1 Vrste mikroplastike na iztoku čistilne naprave .....	28
4.2 Vpliv zooplanktona na mikroplastiko .....	30
5 RAZPRAVA.....	35
6 ZAKLJUČEK.....	37
7 VIRI IN LITERATURA .....	38

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shema čistilne naprave z rdeče označenim mestom zajema mikroplastike.....	16
Slika 2: Notranjost 800 µm filtra na cevovodu tehnološke vode. ....	17
Slika 3: Slika koščka mikroplastike pod mikroskopom pri 50-kratni povečavi.....	17
Slika 4: (a) Namestitev PET-filtrov za zajem mikroplastike. (b) Nameščeni filtri. ....	18
Slika 5: (a) Vsebina 500µm PET-filtra po odstranitvi. (b) Vsebina 80 µm PET- filtra po odstranitvi. (c) Vsebina 10 µm PET-filtra po odstranitvi.....	19
Slika 6: (a) Digestorij z reaktorjem. (b) Oksidacija bioloških snovi v reaktorju. ....	21
Slika 7: (a) Večji kos plastike v vzorcu. (b) Prikaz ročnega zbiranja plastičnih delcev iz vzorca. ....	21
Slika 8: Slika vzorca nekaj zajetih delcev mikroplastike pod mikroskopom na 20-kratni povečavi. ....	22
Slika 9: Material biološkega izvora v vzorcu.....	22
Slika 10: (a) Skupni vzorec zbranih delcev plastike. (b) Banjice posameznih skupin mikroplastike. ....	23
Slika 11: Prikaz primera FTIR-spektra za en izbran delec iz prve skupine (ujemanje s PET znaša 92,36 %). ....	23
Slika 12: Izbrani viri vrst plastike za pripravo laboratorijsko izdelane mikroplastike (PET-plastenka: HDPE-rumen pokrovček; PP-bel pokrovček). ....	24
Slika 13: Kotačniki v vzorcu prvega poskusa zajema zooplanktona. ....	25
Slika 14: Neuspeli poskus gojenja zooplanktona. ....	25
Slika 15: Zajem zooplanktona na Rudniškem jezeru. ....	26
Slika 16: Vseh 8 eksperimentalnih posod. ....	27
Slika 17: Deleži posameznih skupin zajete mikroplastike (v utežnih %). ....	30
Slika 18: Prikaz meritve dolžine vodne bolhe. ....	31
Slika 19: Prikaz meritve dvoklopnika. ....	32
Slika 20: Prikaz meritve kalanoidnega kopepoda. ....	32
Slika 21: Zajeti delec mikroplastike DPDA 6182 (polietilen etil akrilat). ....	35

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Zbrani podatki o procesu razgradnje biološkega materiala. ....	20
Tabela 2: Rezultati ATR-FTIR-kemijske analize vrst zajete plastike. ....	28
Tabela 3: Podatki iz literature o gostotah vrst plastike. ....	29
Tabela 4: Mase posameznih skupin zajete mikroplastike. ....	29
Tabela 5: Prikaz izmerjenega števila in velikosti zooplanktonskih organizmov v posodi P1 ter izračunane suhe mase organizmov. ....	33
Tabela 6: Prikaz mase filter papirjev, mase posušenih filtrov z mikroplastiko in zooplanktonom ter izračunane mase preostale mikroplastike iz vodnega stolpca v poskusnih in kontrolnih posodah. ....	34

## KAZALO ENAČB

Enačba 1: Potek fotolize.....	10
Enačba 2: Tvorba hidroksilnih radikalov.....	10
Enačba 3: Oksidacija organskih snovi z vodikovim peroksidom.....	10
Enačba 4: L1 je enak dolžini vodne bolhe brez repa v mm, L2 je enak dolžini dvoklopnika, L3 je enak dolžini kalanoidnega kopepoda brez končnih ščetin v $\mu\text{m}$ . .....	31

## TABELA OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
FTIR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
ATR	atenuirana totalna refleksija
PE	polietilen
PET	polietilen tereftalat
PP	polipropilen
HDPE	polietilen visoke gostote
DPDA 6182	polietilen etil akrilat
PU	poliuretan
PS	polistiren
T-4A	mazivo (ATR knjižnica)
KČN	komunalna čistilna naprava
SD	standardna deviacija

## 1 UVOD

Onesnaženje voda z mikroplastiko predstavlja velik okoljski problem. Količina mikroplastike v okolju je neposredno povezana z globalno rastjo produkcije plastike, ki se iz leta v leto povečuje. Leta 2023 je svetovna produkcija plastike znašala 413,8 milijonov ton (Statista Research Department, 2025). Le-ta v okolju razpade na koščke, ki so manjši od 5 mm in takšne koščke plastike imenujemo mikroplastika (J.P.G.L. & Nash, 2019).

### 1.1 Opredelitev problema

Mikroplastični delci zaidejo v tla, vodo in celo v zrak, pri čemer pridejo v stik z organizmi, na katere imajo lahko negativen vpliv. S pitjem vode ali nenamernim zaužitjem pri neselektivnem hranjenju le-ta vstopa v prehranjevalne verige različnih živali in ljudi. Mnoge raziskave o vplivu mikroplastike na vodne organizme so pokazale, da zaužita mikroplastika upočasnjuje rast organizmov zaradi motenj pri prehranjevanju, zmanjšuje pa tudi plodnost (Eunju, Jin-Yong, & Mostafa, 2024). Novejše študije so pokazale, da lahko v nekaterih primerih mikroplastika negativno vpliva na človeško zdravje. Povišane koncentracije mikroplastike so že odkrili v človeškem telesu, predvsem v možganih, jetrih in ledvicah (Nihart, 2025), sam mehanizem negativnega vpliva pa še ni dovolj dobro raziskan.

Manj raziskav je bilo izvedenih z namenom ugotavljanja, kako organizmi, s katerimi pride mikroplastika v stik, vplivajo na njeno prisotnost v okolju in v prehranskih verigah. Največ mikroplastike je prisotne v celinskih vodah in morjih ter v njihovih sedimentih. Večina čistilnih naprav ni zmožna filtracije in odstranjevanja lebdečih mikroplastičnih delcev (Roth, 2025).

Mikroplastika, ki v vodi plava oz. lebdi, bolj ogroža zdravje ljudi in vodnih organizmov kot mikroplastika, ki potone. Slednja ima namreč večjo gostoto kot voda in se posledično nalaga v sedimentu. Plavajoča mikroplastika pogosto pride v stik z zooplanktonskimi organizmi, ki jo lahko zaužijejo, in tako vstopa v prehranjevalno verigo ljudi.

## 1.2 Namen in cilj raziskovalne naloge

Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali lahko zooplanktonski organizmi v procesu filtracije vodnega medija vplivajo na plovnost mikroplastike in s tem prispevajo k zmanjšanju količine mikroplastike v vodnem stolpcu. Z namenom, da bi zagotovili avtentičnost poskusa, smo identificirali vrste mikroplastike, prisotne v okolju. Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali zooplanktonski organizmi prispevajo k zmanjšanju prisotnosti mikroplastike v vodnem stolpcu.

## 1.3 Hipotezi

Postavili smo dve hipotezi:

1. Na izpustu Komunalne čistilne naprave Kočevje se najpogosteje pojavlja ena izmed vrst mikroplastike: polietilen ali polipropilen ali polietilen tereftalat (PE ali PP ali PET).
2. Zooplanktonski organizmi zmanjšujejo količino mikroplastike v vodnem stolpcu.

## 2 TEORETIČNO OZADJE

### 2.1 Mikroplastika

Z izrazom mikroplastika poimenujemo trdne plastične delce polimerov, katerih velikost ne presega 5 mm in so slabo biološko razgradljivi (J.P.G.L. & Nash, 2019). Mikroplastika lahko prihaja v naravno okolje z namensko proizvodnjo in uporabo mikroplastike, kot so npr. pilingi in bleščice v kozmetiki. Takšne vrste mikroplastike imenujemo primarna mikroplastika, saj v okolje vstopi že v obliki mikroplastike. Drugi način vnosa pa je z obrabo ali razpadom večjih plastičnih kosov, kot sta npr. obraba avtomobilskih pnevmatik in izpadanje sintetičnih vlaken iz tkanin pri pranju in nošenju oblačil. Takšno mikroplastiko imenujemo sekundarna mikroplastika.

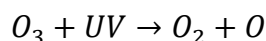
Mikroplastika, ki je prisotna v naravnem okolju, je škodljiva za žive organizme, saj se preko prehranjevalnih verig akumulira v živih bitjih, kar ima negativne posledice za celotne ekosisteme. V EU je do leta 2016 poraba namensko proizvedene mikroplastike znašala 145.000 ton letno, od tega je 42.000 ton letno te mikroplastike prešlo v naravno okolje. Poleg tega je v okolje vsako leto prešlo še dodatnih 176.000 ton mikroplastike zaradi obrabe ali razpada večjih kosov mikroplastike (European chemical agency, 2025).

Ker mikroplastika predstavlja zelo velik okoljski problem, je v letu 2023 Evropska komisija sprejela uredbo, ki prepoveduje namerno uporabo mikroplastike v izdelkih. Cilj sprejete uredbe je zmanjšati onesnaževanje okolja z mikroplastiko za 500.000 ton v obdobju 20 let od sprejema uredbe (Evropska komisija, 2023). Koliko mikroplastike se dejansko nahaja v okolju, ni enostavno oceniti. V literaturi najdemo podatke, da so na izpuhkih čistilnih naprav med najpogostejšimi delci mikroplastike iz PE, PP in PET (Manh, Thao, Ngo, & Thom, 2022). Za določanje vrst mikroplastike v okoljskih vzorcih se uporablja FTIR-analiza, pred tem pa se vzorec pogosto prečisti z vodikovim peroksidom, ki oksidira in odstrani veliko biološkega materiala, ki ni mikroplastika.

### 2.2 Kemijska oksidacija z vodikovim peroksidom

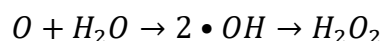
Vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) je prisoten v naravnem okolju, tako v atmosferi, kakor tudi v vodah. Vodikov peroksid v naravi nastaja pretežno zaradi razpada ozona ( $O_3$ ) pod

vplivom UV-svetlobe na molekule kisika ( $O_2$ ) in proste kisikove atome ( $O$ ). Ta proces imenujemo fotoliza (Enačba 1).



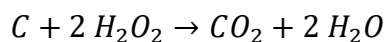
*Enačba 1: Potek fotolize.*

Prosti kisikovi atomi ( $O$ ) so zelo reaktivni in lahko nadalje reagirajo z vlogo v zraku ( $H_2O$ ) ter tvorijo reaktivne hidroksilne radikale ( $\bullet OH$ ), ki nadalje tvorijo naravni vodikov peroksid (Enačba 2).



*Enačba 2: Tvorba hidroksilnih radikalov.*

Naravni vodikov peroksid deluje kot oksidant organskih polutantov tako v vodi kakor tudi v zraku. Najvišje koncentracije vodikovega peroksida v vodi so prisotne v rekah in jezerih ter v padavinskih vodah (dež, sneg) zaradi spiranja vodikovega peroksida iz atmosfere. Nižje koncentracije vodikovega peroksida so prisotne v onesnaženih vodah in morjih (Duca & Travin, 2020). Ob stiku organskih snovi z vodikovim peroksidom lahko pride do popolne oksidacije organskih snovi (Enačba 3).



*Enačba 3: Oksidacija organskih snovi z vodikovim peroksidom.*

To je eksotermna reakcija, katere hitrost je odvisna od koncentracije vodikovega peroksida, temperature, prisotnosti katalizatorjev in vrste organskih snovi. Nizka koncentracija vodikovega peroksida pri sobni temperaturi omogoča selektivno oksidacijo organskih snovi biološkega izvora, pri čemer je vpliv na oksidacijo mikroplastike majhen.

### 2.3 Kemijska FTIR-analiza

Analiza FTIR (infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo) je laboratorijska tehnika za identifikacijo organskih snovi z uporabo žarka infrardeče svetlobe (IR). Le-ta predstavlja del elektromagnetnega spektra svetlobe z valovno dolžino ( $\lambda$ ) med 700 nm in 1 mm, ki se nahaja v območju med vidno svetlobo in mikrovalovi. Pri FTIR-analizi se uporablja ožje območje infrardeče svetlobe valovnih dolžin ( $\lambda$ ) od 2,5  $\mu m$  do 25  $\mu m$  (Bruker, 2025).

Pri FTIR-analizi trdnih organskih vzorcev, kot je mikroplastika, se najpogosteje uporablja tehnika ATR-FTIR (atenuirana totalna refleksija). ATR-FTIR-tehnika za razliko od FTIR-tehnike ne zahteva posebne priprave vzorca. Pri uporabi ATR-FTIR-tehnike se trdni vzorec položi na ATR-kristal in izvede meritve. Inštrument ATR-FTIR usmeri žarek infrardeče svetlobe valovnih dolžin od 2,5  $\mu\text{m}$  do 25  $\mu\text{m}$  na površino vzorca. Žarek prodre zgolj nekaj mikrometrov globoko v vzorec. Pri tem se zaradi kemijske strukture vzorca nekatere valovne dolžine infrardeče svetlobe absorbirajo, druge valovne dolžine pa se odbijejo nazaj do detektorja inštrumenta. S tem pridobimo ATR-FTIR-spekter merjenega vzorca. S primerjavo izmerjenega spektra ter baze shranjenih spektrov inštrument lahko izračuna delež ujemanja z znanim referenčnim spektrom. To nam omogoča kemijsko identifikacijo merjenega vzorca mikroplastike z visoko zanesljivostjo (Georg & Bernhard, 2013).

## **2.4 Komunalna čistilna naprava Kočevje**

Komunalna čistilna naprava (KČN) Kočevje ima kapaciteto 28.000 populacijskih enot in je namenjena prečiščevanju komunalnih odpadnih voda mesta Kočevje in njegove bližnje okolice. Na prečiščevanje se poleg odpadne vode iz kanalizacijskega omrežja preko fekalne postaje sprejemajo tudi greznični mulji iz vasi na področju občin Kočevje in Kostel ter industrijske odpadne vode iz zaprtega odlagališča in kompostarne v Mozlju. Na napravo je bilo konec leta 2023 preko kanalizacijskega omrežja priključenih 11.146 prebivalcev ter lokalni zavodi in podjetja. V letu 2023 je KČN prečistila 1.426.729  $\text{m}^3$  odpadnih voda. Čistilne naprave za odpadne vode so eden glavnih točkovnih virov mikroplastike za vodna telesa (Bodzek, 2024).

## **2.5 Zooplankton**

Zooplankton sestavlja heterogena skupina pretežno mikroskopskih planktonskih organizmov, ki živijo predvsem v stoječih in počasi tekočih vodah. Po načinu naselitve jezera jih uvrščamo med pelagial, saj plavajo in lebdiyo v prosti vodi. V horizontalni smeri jih premikajo vodni tokovi, v vertikalni smeri vodnega stolpca pa se pogosto premikajo z aktivnim plavanjem. Mnogim planktonskim organizmom to omogočajo razvejane tipalnice oz. antene in dvovejnate okončine. Lebdiyo lahko tudi s pomočjo bičkov ali pa s

posebnimi strukturami, ki povečujejo vzgon in zmanjšajo hitrost potapljanja v globlje plasti (Lalli & Parsons, 1993).

Kot heterotrofni organizmi se prehranjujejo z bakterioplanktonom, detritom in s predstavniki združbe avtotrofnih planktonskih organizmov, kot so alge in cianobakterije. Sami so vir hrane za organizme na višjih trofičnih ravneh, kot so npr. ribe (Duiker & Wefer, 1994). Predstavljajo torej povezovalni člen med primarnimi proizvajalci in potrošniki ter so zato pomemben del prehranjevalnih verig v vodnih ekosistemih (Lampert, 1978). Zooplankton je ena najštevilčnejših skupin organizmov v vodnih telesih, ki prihajajo v stik z mikroplastiko in jo lahko konzumirajo.

Zooplanktonsko združbo jezera v glavnem tvorijo vodne bolhe (*Cladocera*), ceponožci oz. kopepodni raki (*Copepoda*), dvoklopniki (*Ostracoda*) in kotačniki (*Rotatoria*) (Matoničkin, 1981).

### **2.5.1 Nižji raki (*Entomostraca*)**

Raki (*Crustacea*) sodijo med členonožce (*Arthropoda*). Glavo imajo zraslo z oprsem v glavoprsje. Zadnji člen glave lahko tvori gubo, ki je povečana v koš (carapax). Njihove členjene okončine na glavi predstavljata dva para tipalnic oz. anten, en par spodnjih čeljusti (mandibula) in dva para zgornjih čeljusti (maxila). Na oprsnem delu in zadku so eno- ali dvovejnate okončine. Pri nižjih rakah se telo konča s furko. Za razliko od višjih rakov dihajo skozi telesno površino. Skoraj vsi nižji planktonski raki so filtratorji. »Precejalni« aparat predstavljajo ščetine, nameščene tako na tipalkah in čeljustih kot tudi na nogah. S prvimi tipalkami zaznavajo kemične in mehanske dražljaje, z drugimi tipalkami pa večinoma plavajo (Matoničkin, 1981).

Zaužita hrana gre direktno v cevasto prebavilo. Vsebina črevesa se peristaltično premika, zato je pri prosojnih vrstah vidna pod mikroskopom. Barva telesa planktonskih rakcev je tako odvisna od zaužite hrane v črevesu in tudi od različno obarvanih maščobnih kapljic v telesni votlini. Maščobne kapljice zmanjšujejo specifično težo in hitrost tonjenja; nakopičene v maščobnih celicah predstavljajo tudi vir energije za proizvodnjo jajčec. Večina vrst rakov je enospolnikov (gonohoristi), razvoj pa je povezan s preobrazbo (metamorfozo) preko različnih oblik ličink (Matoničkin, 1981).

### **Ceponožci (*Copepoda*)**

Ceponožci, imenovani tudi kopepodni raki, so razred organizmov in so prisotni v skoraj vseh morjih ter celinskih vodah. Nekatere podvrste lahko živijo v sedimentih, medtem ko večina njih živi v vodnem stolpcu. Njihova velikost v povprečju znaša od 1 do 2 mm. Običajno imajo eno pikčasto oko in dva para anten, od katerih je prvi par večji. Z njimi lahko plavajo. Samičke nosijo jajčeca v dveh vrečkah na zadnjem delu telesa. Prehranjujejo se z lovljenjem fitoplanktona. Prvi par dvovejnatih okončin je spremenjen v čeljustne nožice (maxilipediji). Posamezen organizem lahko zaužije do 373.000 fitoplanktonskih celic dnevno. Da zadovoljijo svoje prehranske potrebe, morajo dnevno prefiltrirati volumen vode, ki je približno milijonkrat večji od volumna njihovega telesa (Kiørboe, 2010). Prehranjevanje kopepodnih organizmov je selektivno, kar pomeni, da ti organizmi s pomočjo kemoreceptorjev izbirajo primeren vir hrane; lahko tudi večje kose hrane (Koehl & Strickier, 1981). Obe značilnosti prehranjevanja sta ključni za izvedbo eksperimenta.

### **Vodne bolhe (*Cladocera*)**

Vodne bolhe so majhni raki, katerih povprečna dolžina znaša od 0,2 do 6,0 mm (Forró, Korovchinsky, A. Kotov, & Petrusek, 2008). V Sloveniji je znanih več kot 400 vrst (Virant-Doberlet, 1997). Najpogostejši habitat, ki ga poseljujejo, so celinske vode. Kot predstavniki nižjih trofičnih ravni so vir hrane za številne vodne organizme. Imajo kratko, bočno sploščeno telo, prosojen koš, šest parov listastih nog in navzdol usmerjeno glavo z dvema paroma anten. Drugi par velikih in ščetinastih anten je bistveno večji od prvega para, zato jih uporabljajo za premikanje. Vodne bolhe so večinsko filtratorji. V ustni odprtini imajo ščetinaste strukture, ki kot glavnik »prečesavajo« delce v vodi. To pomeni, da si vodni tok z delci potiskajo skozi glavnikaste strukture, ki so nameščene v ustni odprtini. Na slednjih se zadržijo tisti delci, ki presegajo velikost filtra oz. razmaka med ščetinami. Te strukture uporabljajo za uživanje fitoplanktona, detrita in bakterij. Zgornja meja velikosti prefiltriranega delca je odvisna od velikosti vstopne odprtine in širine ustnega aparata, kar vpliva na zgornjo mejo velikosti zaužitih delcev hrane (Virant-Doberlet, 1997).

### **Dvoklopniki (*Ostracoda*)**

Dvoklopniki so dobili ime po značilnem košu, ki je v obliki dveh med seboj sklepno vezanih lupin. Ti sta, kot pri školjkah, ojačani z apnencem. Povprečna velikost dvoklopnikov znaša nekaj milimetrov. Imajo 3-5 parov nog, na glavi pa imajo dva para tipalnic. S pomočjo drugega para tipalnic plavajo. Prehranjujejo se pretežno s fitoplanktonom (Wakayama, 2007) in organskim drobirjem. V Sloveniji je znanih 18 vrst.

### **2.5.2 Valjavci (*Aschelminthes*)**

Valjavci ali valjasti črvi so skupina nečlenarjev. Njihovo telo je pokrito s kutikulo, v prerezu je bolj ali manj okroglo in ni členjeno. Krvožilja in dihal nimajo, imajo pa zadnjično odprtino, so evprokti (Podobnik & Devetak, 2008).

### **Kotačniki (*Rotatoria*)**

Kotačniki se najpogosteje pojavljajo v celinskih vodah. Imajo sodčkasto, teleskopsko vpotegljivo telo, ki ima vrstno značilno število celic. V povprečju merijo od 0,1 do 0,5 mm. Nekatere vrste kotačnikov so lahko prisotne tudi v morjih. Njihovo valjasto oblikovano prozorno telo je razdeljeno na tri glavne dele: glavo, trup in nogo. Gibljiva noga ima na koncu dva »prsta« s cementnimi žlezami, ki omogočajo pritrnitev na podlago. Na glavi imajo kotačni organ iz dveh migetalčnih pasov, s katerima vrtinčijo hrano in se premikajo. Njihov prebavni sistem vključuje mišičasto žrelno strukturo (mastaks), v katerem se nahajajo utrjene čeljustne strukture, imenovane trofi, ki omogočajo lovljenje, drobljenje in obdelavo delcev hrane (Ricci & Fontaneto, 2009). Najbolj pogost način prehranjevanja pri kotačnikih je filtracija delcev hrane. Nekateri kotačniki se lahko prehranjujejo z aktivnim plenjenjem in strganjem sedimenta (Arndt, 1993).

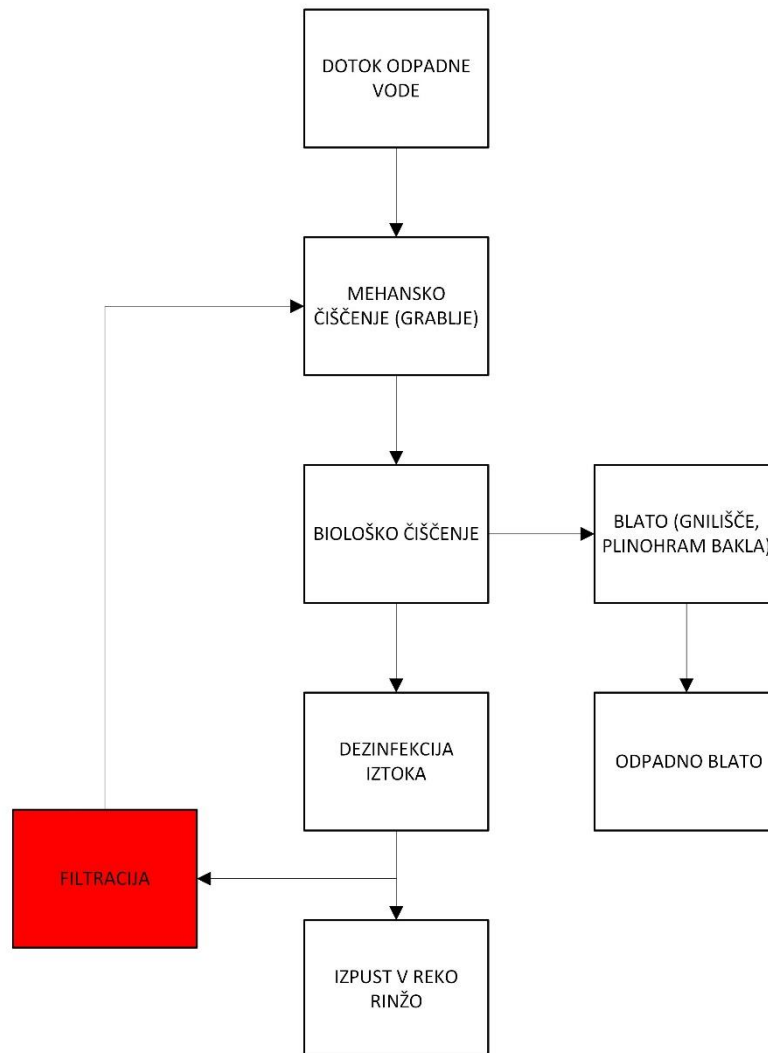
### 3 EKSPERIMENTALNO DELO

#### 3.1 Oprema in seznam kemikalij

- SATI-filter
- PET-filtri (500  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ )
- digitalni mikroskop (digital microscope VHX-6000 Keyence)
- svetlobni mikroskop (Zeiss)
- laboratorijski reaktor (Buchi)
- laboratorijska nuča
- filter papir (Macherey-Nagel MN 640 w; premer 90 mm)
- laboratorijska tehtnica (Mettler Toledo AT200), (napaka inštrumenta: 0,015-0,03 mg)
- planktonska mreža (250  $\mu\text{m}$ , 1500  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ )
- laboratorijski sušilnik (Kambič SP-120 easy)
- laboratorijska steklovina
- ATR-FTIR-spektrometer (Thermo scientific Nicolet iS5)
- vodikov peroksid (30 % vodna raztopina)
- digestorij

### 3.2 Zajem mikroplastike na iztoku čistilne naprave Kočevje

Eksperimentalni del raziskovalne naloge se je začel z ogledom Komunalne čistilne naprave Kočevje z namenom, da bi se seznanili s postopkom delovanja.



Slika 1: Shema čistilne naprave z rdeče označenim mestom zajema mikroplastike.

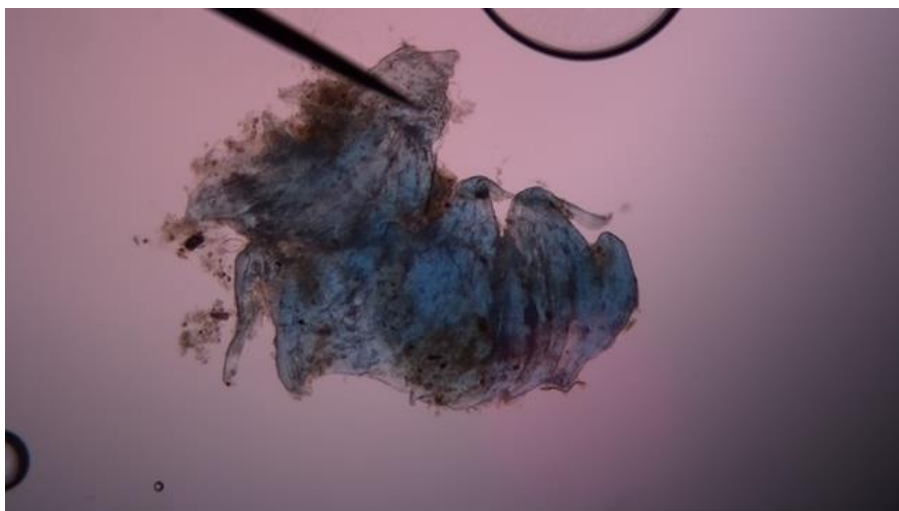
Da bi ugotovili, ali je mikroplastika prisotna na filtru tehnološke vode na izpustu iz čistilne naprave v reko Rinžo, smo s pomočjo zaposlenega vzdrževalca očistili 800 µm filter. Filtriranje te vode izvajajo z namenom odstranjevanja večjih delcev, preden jo ponovno uporabijo za pranje grobega filtra (grablje) na dotoku odpadne vode.

Za kratek čas smo ustavili pretok tehnološke vode in odstranili filter. Postavili smo ga v veliko vedro, v katerem smo ga škropili z vodovodno vodo. To je povzročilo, da se je material, ki je bil ujet v porah filtra, ločil. V vedru je ostala voda s koščki mikroplastike, večjimi od 800  $\mu\text{m}$ , različnih barv in oblik. Poleg teh delcev pa je bil v vodi prisoten tudi biološki material, npr. alge in bakterije. Vzorec te vode smo kasneje v šolskem laboratoriju pregledali s postopkom mikroskopiranja.



*Slika 2: Notranjost 800  $\mu\text{m}$  filtra na cevovodu tehnološke vode.*

Pri mikroskopiranju smo posneli nekaj fotografij teh koščkov in jih nato primerjali z ostalimi fotografijami mikroplastike na internetu. Na podlagi tega smo domnevali, da gre za mikroplastiko. Naknadno smo sestavo delcev identificirali še s kemijsko ATR-FTIR analizo.



*Slika 3: Slika koščka mikroplastike pod mikroskopom pri 50-kratni povečavi.*

Po preliminarnih poskusih smo se lotili zajema mikroplastike. Na povratno cev tehnološke vode smo namestili 3 PET-filte z različnimi premeri por: 500  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$  in

10  $\mu\text{m}$ . Odločili smo se, da jih ne bomo namestili prečno med spoj dveh cevi, pač pa s plastičnimi vezicami zaporedno na stranski ventil pred originalno nameščenim 800  $\mu\text{m}$  filtrom. Voda je po filtraciji skozi filtre iztekala na tla oziroma v odtočni jašek. Zajem tehnološke vode za čiščenje grobega mehanskega filtra na čistilni napravi je periodičen postopek, zato je voda skozi filtre tekla neenakomerno in v različnih količinah. Po petnajstih dneh smo filtre odstranili. Na filtrih smo opazili veliko količino organskih snovi.

Filtre smo takoj po odstranitvi previdno premestili v plastične vreče (vsak filter v svojo vrečo), da bi zmanjšali možnosti kontaminacije filtrov z drugimi delci iz okolja. Filtre z različno velikostjo por smo izbrali z namenom, da bi ob koncu filtracije lažje mikroskopirali posamezne filtre, saj bi se delci mikroplastike razlikovali po velikostnih razredih:  $>500 \mu\text{m}$ ,  $80\text{-}500 \mu\text{m}$  in  $10\text{-}80 \mu\text{m}$ .



*Slika 4: (a) Namestitev PET-filtrov za zajem mikroplastike. (b) Nameščeni filtri.*

### **3.3 Priprava mikroplastike na FTIR-analizo**

Filtre, ki smo jih shranili v plastične vreče, smo v šolskem laboratoriju analizirali z mikroskopiranjem. Za varnost pri delu je bilo poskrbljeno z uporabo laboratorijske delovne halje, zaščitnih rokavic in očal, hkrati pa smo zagotovili stalno zračenje prostora; v filtrih so bile namreč verjetno prisotne bakterije, alge in druge možne zdravju škodljive snovi.

Pri mikroskopiranju smo na dveh filtrih (500  $\mu\text{m}$  in 80  $\mu\text{m}$ ) ugotovili prisotnost koščkov mikroplastike in biološkega materiala. Največ mikroplastike in biološkega materiala je bilo na 500  $\mu\text{m}$  filtru, saj so se veliki kosi biološkega materiala skozi proces filtracije postopoma nabirali in tako prispevali k zmanjšanju prepustnosti filtra. Predvidevali smo, da so se na ta filter ujeli tudi delci mikroplastike, manjši od 500  $\mu\text{m}$ .

Na 10  $\mu\text{m}$  filtru ni bilo opaziti mikroplastike podobnih delcev ne s prostim očesom ne z mikroskopom, zato tega vzorca nismo uporabili pri nadaljnjem delu.

V nadaljevanju je bilo pomembno ločiti mikroplastiko od biološkega materiala. Ker se je ročno odstranjevanje delcev izkazalo za zelo zamudno, smo biološki material, ki bi vplival na rezultate FTIR-analize, odstranili s kemijskim postopkom oksidacije.



Slika 5: (a) Vsebina 500 $\mu\text{m}$  PET-filtra po odstranitvi. (b) Vsebina 80  $\mu\text{m}$  PET-filtra po odstranitvi. (c) Vsebina 10  $\mu\text{m}$  PET-filtra po odstranitvi.

### Odstranitev biološkega materiala

Postopek razgradnje biološkega materiala smo opravili v razvojnem laboratoriju podjetja Melamin, pri čemer smo najprej opravili preliminarne poskuse. Za odstranitev biološkega materiala od delcev mikroplastike, ki so bili ujeti na filtrih, smo kot najprimernejšo in dokaj enostavno metodo izbrali raztapljanje biološkega materiala z vodikovim peroksidom. Metoda razgradnje z vodikovim peroksidom poteka pri sobni temperaturi, atmosferskem tlaku in brez uporabe katalizatorja. Dodatna uporabna vrednost tega postopka je sočasno razkuževanje vzorca. Reakcija razgradnje se konča, ko se ves ogljik izloči v obliki ogljikovega dioksida.

Za varnost pri delu smo poskrbeli tako, da smo nosili zaščitne rokavice, očala, haljo. Zaščita dihal ni bila potrebna, saj je celoten poskus potekal v reaktorju, ki je bil postavljen v digestoriju z odsesavanjem. Za varnost je bilo poskrbljeno v skladu s predpisanim varnostnim listom za delo s 30 % vodikovim peroksidom.

V dveh ločenih postopkih smo izvedli razgradnje biološkega materiala iz 500  $\mu\text{m}$  in iz 80  $\mu\text{m}$  filtra. Postopek raztapljanja je bil pri obeh filtrih enak. Najprej smo posamezen filter narezali na koščke velikosti 4  $\text{cm}^2$  in jih stehali. Oksidacijo biološkega materiala smo opravili v digestoriju, v katerem smo imeli na voljo reaktor z vgrajenim mehanskim mešalom. Odmerili smo toliko vode, da je bilo mešanje enakomerno. Hitrost vrtenja

mešala smo nastavili tako, da je mešanje potekalo enakomerno. Sproti smo s kapalko postopoma dodajali vodikov peroksid.

Z namenom, da bi se prepričali, da se je ves biološki material razgradil, smo naslednji dan dodali še pribl. 30 % količine peroksida, ki smo ga porabili za reakcijo prejšnji dan. Ko se je raztopina popolnoma prenehala peniti, smo ustavili mešanje in odlili vso vodo iz reaktorja v veliko čašo. Koščke filtra in mikroplastiko, ki se je prijela na stene reaktorja, smo spravili v plastenko, ki je preprečila kontaminacijo vzorcev. Nato smo opravili postopek nučiranja.

*Tabela 1: Zbrani podatki o procesu razgradnje biološkega materiala.*

Velikost por filtra	Skupna masa vzorca pred razgradnjo [g]	Volumen vode [ml]	Hitrost mešanja [rpm]	1. dodajanje H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [ml]	2. dodajanje H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [ml]
500 µm	19,16	766,4	250	127,20	38,32
80 µm	9,45	428,0	250	71,33	21,40

Pri postopku nučiranja smo uporabili cev, erlenmajerico, nučo in filter papir. Nučo smo postavili na erlenmajerico in nanjo tudi namestili cev, s katero smo ustvarili podtlak, saj je bila ta priključena na centralni vakuumski sistem. Na nučo smo dali fin filter papir in vklopili črpalko. Ko smo odnučirali vso vodo iz čaše, smo filter papir, na katerem je bila mikroplastika, atmosfersko posušili. Nato smo ta isti filter papir dodatno posušili še v sušilniku pri 40 °C. Po sušenju v sušilniku smo filter papir z mikroplastiko shranili v plastenki, prav tako pa smo shranili tudi posušene koščke PET-filtra z mikroplastiko. Med delom smo opazili, da je vodikov peroksid delno razbarval mikroplastiko in raztopil biološki material z izjemo trdih lupin oreščkov, školjk in kamenčkov.

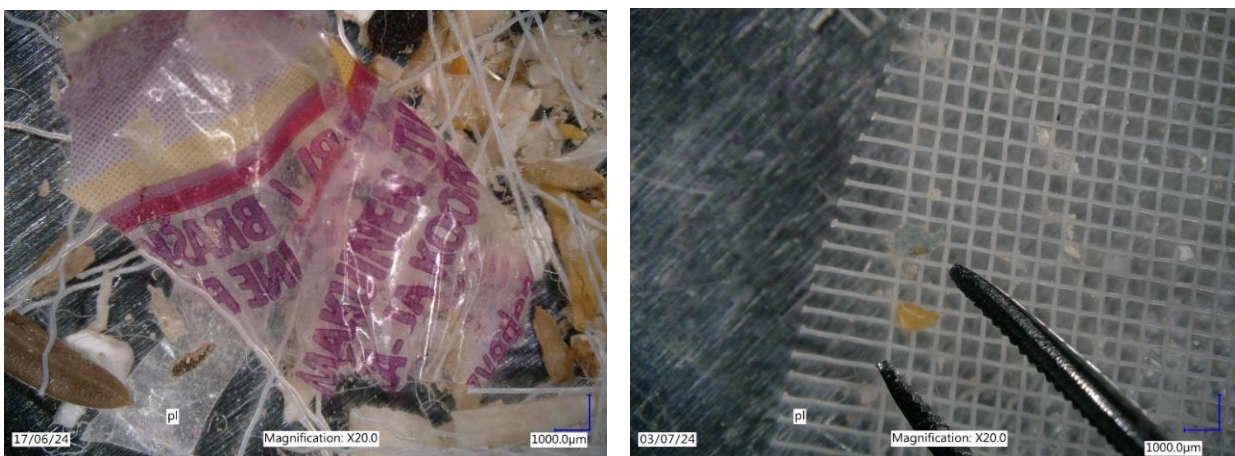


Slika 6: (a) Digestorij z reaktorjem. (b) Oksidacija bioloških snovi v reaktorju.

### Ročno zbiranje mikroplastike

Ločevanje mikroplastike od koščkov PET-filtrov in od filtrirnega papirja smo izvajali z ročno separacijo pod mikroskopom. Na ta način smo pridobili skupni vzorec zbrane mikroplastike iz 500  $\mu\text{m}$  in 80  $\mu\text{m}$  filtra. Pri delu smo uporabljali svetlobni mikroskop (digital microscope VHX-6000 Keyence).

Pri mikroskopiranju smo iskali predvsem delce različnih barv (modra, rumena, oranžna), oblik in velikosti, pa tudi koščke plastike, večje od 5 mm, saj bi ti koščki v okolju postopoma razpadli na mikroplastične delce.



Slika 7: (a) Večji kos plastike v vzorcu. (b) Prikaz ročnega zbiranja plastičnih delcev iz vzorca.

V vzorcu smo opazili večje število oranžnih delcev iste oblike (Slika 8). Teh koščkov je bilo zelo veliko, zato smo sklepali, da imajo isti vir, kar smo kasneje potrdili z nadaljnjo ATR-FTIR-analizo.



*Slika 8: Slika vzorca nekaj zajetih delcev mikroplastike pod mikroskopom na 20-kratni povečavi.*

Med ločevanjem mikroplastike smo opazili delce biološkega izvora, kot so lupine oreščkov in polžje hišice (Slika 9).



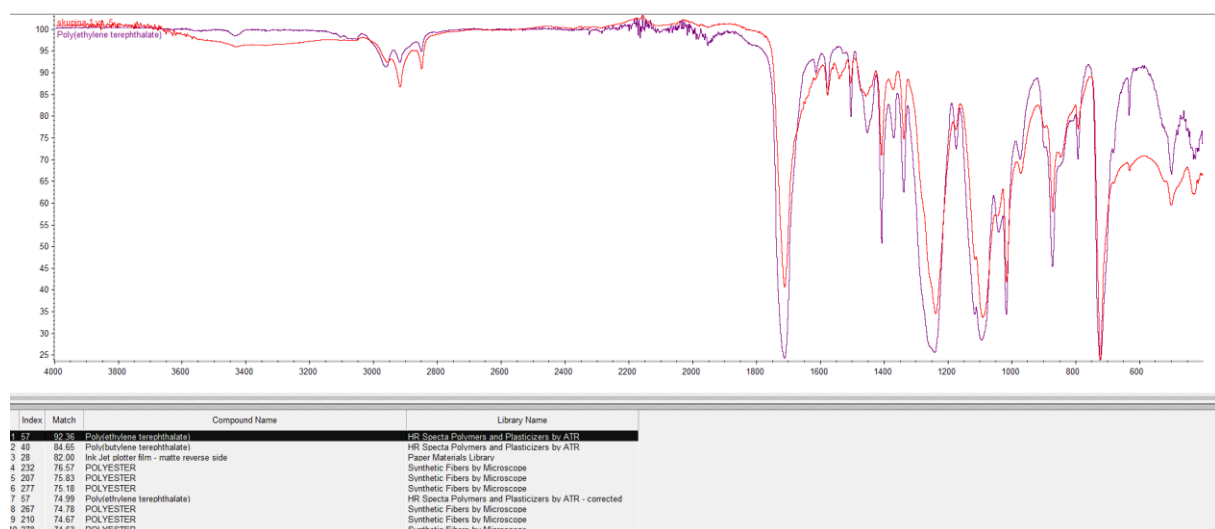
*Slika 9: Material biološkega izvora v vzorcu.*

Skupni vzorec zbrane mikroplastike sem razvrstil v 10 skupin po podobnosti delcev (Slika 10).



Slika 10: (a) Skupni vzorec zbranih delcev plastike. (b) Banjice posameznih skupin mikroplastike.

Pred ATR-FTIR-analizo vsakega izbranega delca mikroplastike smo s filcem počistili kristal ATR-FTIR-analizatorja in posneli ozadje spektrov. Pri analizi posnetih spektrov smo uporabljali elektronske knjižnice za identifikacijo materialov. Vsak delec smo namestili na ATR-kristal in ga stisnili z vgrajenim stiskalnikom. Meritev FTIR-spektra posameznega delca je trajala približno 3 min. Ko je bila meritev zaključena, smo pridobili rezultat v obliki spektra in odstotne verjetnosti, da je košček sestavljen iz določene vrste plastike. Za vsak delec mikroplastike smo privzeli, da je sestavljen iz tiste vrste plastike, pri kateri je bilo ujemanje najvišje.



Slika 11: Prikaz primera FTIR-spektra za en izbran delec iz prve skupine (ujemanje s PET znaša 92,36 %).

### 3.4 Eksperiment z uporabo zooplanktona

#### Laboratorijska priprava mikroplastike

Skupni vzorec pridobljene mikroplastike ni bil primeren za izvedbo eksperimenta z zooplanktonom, ker so bili delci večji od 100  $\mu\text{m}$ , zato smo se odločili za laboratorijsko pripravo mikroplastike, manjše od 100  $\mu\text{m}$ , saj zooplanktonski organizmi, kot npr. vodne bolhe lahko zaužijejo samo tako majhne delce mikroplastike (Dieter, 2005).

Odločili smo se, da bomo za potrebe eksperimenta z zooplanktonom uporabili: polipropilen, polietilen visoke gostote in polietilen teraftalat, ker so se te vrste mikroplastike pojavljale v vzorcu zajete mikroplastike na izpustu čistilne naprave.



Slika 12: Izbrani viri vrst plastike za pripravo laboratorijsko izdelane mikroplastike (PET-plastenka: HDPE-rumen pokrovček; PP-bel pokrovček).

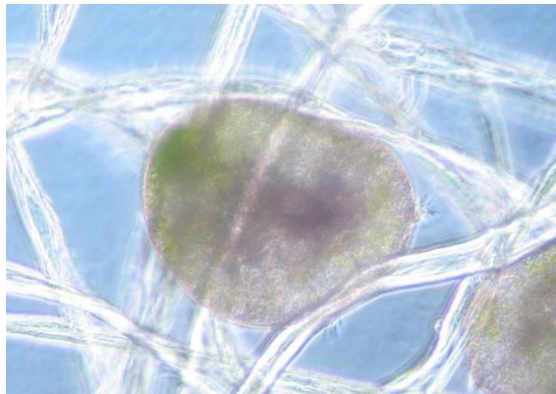
Izbrali smo nekaj večjih kosov plastike, kot so npr. platenke in pokrovčki. Med slednjimi smo s FTIR-analizo preverili njihovo kemijsko sestavo in izbrali tri posamezne kose plastike, sestavljene iz PET, PP in HDPE.

Laboratorijske vzorce mikroplastike smo izdelali z brušenjem izbranih večjih kosov plastike. Izbrali smo več različno grobih brusilnih papirjev, med katerimi je samo brusilni papir z granulacijo P600 omogočal izdelavo mikroplastike, manjše od 100  $\mu\text{m}$ . Velikosti pripravljenih delcev smo preverili z meritvami pod mikroskopom. Tako smo z uporabo brusilnega papirja P600 pripravili 0,127 g zmesi mikroplastike (0,034 g PP; 0,061 g HDPE ; 0,032 g PET). Pri delu smo uporabljali osebno varnostno opremo.

## Postopek zajemanja zooplanktona

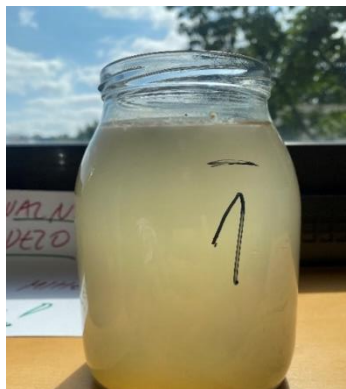
Za izvedbo eksperimenta smo zooplankton zajeli v lokalnem stoječem vodnem telesu, v Rudniškem jezeru v Kočevju. To smo počeli v zgodnjih večernih urah (ob sončnem zahodu), saj je takrat koncentracija zooplanktona na gladini večja kot podnevi (določene vrste imajo dnevno-nočne vertikalne migracije). Postopek zajemanja zooplanktona smo morali zaradi različnih težav ponoviti večkrat.

Pri prvem zajemu smo v vodnem stolpcu opazili nadpovprečno prisotnost kodačnikov, za katere smo najprej mislili, da so majhni koščki premoga. Tovrstna povečana prisotnost kodačnikov v Rudniškem jezeru je bila neobičajen pojav, zato vzorca prvega zajema zooplanktona nismo uporabili, saj bi lahko prisotnost kodačnikov vplivala na rezultate eksperimenta mikroplastike z zooplanktonom. Odločili smo se, da bomo počakali, da se bo številčnost kodačnikov vrnila na normalno količino, in kasneje ponovili poskus zajema zooplanktona.



Slika 13: Kodačniki v vzorcu prvega poskusa zajema zooplanktona.

Pri drugem poskusu zajema zooplanktona je prišlo do problema pri shranjevanju zooplanktona v kozarcih, v katere smo dodali nekaj zemlje. Organska snov v zemlji je povzročila razvoj mikroorganizmov in s tem povečano porabo kisika, kar je najverjetneje privedlo do pogina zooplanktona. Zato smo v nadaljnjem delu zmanjšali količino zemlje, ki smo jo dodali v kozarce.



Slika 14: Neuspeli poskus gojenja zooplanktona.

Pri tretjem poskusu zajema smo uporabili 250  $\mu\text{m}$  planktonsko mrežo z zajemno odprtino premera 30 cm, ki smo jo vlekli tik pod vodno gladino med počasno vožnjo s čolnom. Nekajkrat smo mrežo dvignili in jo sprali z vodo iz jezera. Tako smo v vedru zbrali zadostno količino zooplanktonskih organizmov, večjih od 250  $\mu\text{m}$ . Iz zajetega vzorca smo s filtracijo skozi 1500  $\mu\text{m}$  filter odstranili večje trdne delce ter ličinke dvokrilcev (*Chaoborus sp.*), ki bi zaradi prehranjevanja z zooplanktonom lahko zmanjšali njegovo številčnost v načrtovanih poskusih. Tako smo dobili skupino zooplanktonskih organizmov jezerske vode, velikosti med 250  $\mu\text{m}$  in 1500  $\mu\text{m}$ . V jezeru smo dobili pretežno kopepodne rake. Da bi zagotovili večjo raznolikost zooplanktonskih organizmov, smo v bližnji mlaki zajeli še vodne bolhe in dvoklopnike, ki smo jih dodali v jezersko vodo s kopepodi za poskusno obravnavo.



Slika 15: Zajem zooplanktona na Rudniškem jezeru.

Za kontrolno obravnavo pa smo potrebovali enake pogoje, a brez zooplanktonskih organizmov, zato smo za slednjo jezersko vodo prefiltrirali skozi 100  $\mu\text{m}$  filter.

### **Izvedba eksperimenta z zooplanktonom**

Za poskus smo izbrali 8 volumsko enakih steklenih posod. V vsako posodo smo dali ščepec prekuhane zemlje. V 4 poskusne posode smo nalili enako količino zajete jezerske vode z zooplanktonom. Pri tem smo pazili, da smo pri vsakokratnem zajetju izbrane količine s čašo premešali vodo v vedru tako, da smo s čašo izvajali gibe v obliki osmic. Zaradi enakomernega mešanja smo privzeli, da je bila v vsakem zajemu količina zooplanktona približno enaka. V ostale 4 kontrolne posode smo po istem postopku nalili jezersko vodo, prefiltrirano skozi 100  $\mu\text{m}$  filter.

Za poskus smo pripravili eno čajno žličko mikroplastike, ki je zadoščala za pripravo pogojev s precej višjimi koncentracijami mikroplastike, kot so običajno v naravi. Procentualno razmerje mikroplastičnih delcev v zmesi je znašalo: PET-25,2 %, PP-26,8 % in HDPE-48,0 %. Mikroplastično zmes smo enakomerno razdelili na vseh 8 eksperimentalnih posod tako, da je njena masa v vsaki posodi znašala 0,014 g. Posode smo postavili na okensko polico in zagotovili, da so bile vse enako izpostavljene sončni svetlobi.



*Slika 16: Vseh 8 eksperimentalnih posod.*

V tridnevnem poskusu smo vsak dan s stekleno palčko premešali in odstranili mikroplastične delce, ki so se prijeli robov in steklenih sten posod, ter jih vrnil v vodni stolpec.

### **Določanje količine mikroplastike v vodnem stolpcu po eksperimentu z zooplanktonom**

Po treh dneh smo v ekološkem laboratoriju po principu natege ločili vodni stolpec od usedline. To smo storili po treh dneh, kar glede na povprečno filtracijsko stopnjo zooplanktona (0,5 ml/uro), pomeni da so zooplanktonski organizmi večkrat prefiltrirali celoten volumen vode (Marvalin & Lazarek, 1988). Tako smo odstranili vodo, v kateri je bila mikroplastika, ki se ni usedla na dno posode, ter zooplankton. Ta postopek smo izvedli v vseh osmih posodah. Mikroplastične delce in zooplankton smo iz vodnega stolpca izolirali z nučiranjem. Na filter papirju smo dobili zmes mikroplastike in zooplanktona in jo v sušilniku posušili ter stehtali.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Vrste mikroplastike na iztoku čistilne naprave

Zajeti mikroplastiki iz čistilne naprave, ki smo jo razdelili v 10 skupin, smo s ATR-FTIR-analizo določili kemijsko sestavo izbranih delcev (glej sliko 13). Izbrane skupine delcev so bile različnih barv. V skupini 1 so bili prisotni delci rumene barve, v skupinah 2 in 6 so bili delci rdeče barve, v skupini 3 so bili delci oranžne barve, v skupini 4 so bili delci modre barve, v skupini 7 so bili delci črni, v skupini 8 pa so bili zeleni. V ostalih skupinah so bili delci razbarvani in rjavkasti.

Za analizo smo iz vsake skupine izbrali 5 delcev, iz 3., 5. in 10. skupine pa smo zaradi velikega števila razpoložljivih delcev izbrali 10 delcev.

Tabela prikazuje rezultate ATR-FTIR analize za vse izbrane delce v vseh 10 skupinah zajete mikroplastike.

Tabela 2: Rezultati ATR-FTIR-kemijske analize vrst zajete plastike.

Skupina	Zaporedni delec mikroplastike iz pozamezne skupine									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	PET	PET	PET	PET	PET	/	/	/	/	/
2	PP	PP	kalcijev stearat	PP	PP	/	/	/	/	/
3	DPDA 6182	DPDA 6182	DPDA 6182	kalcijev stearat	DPDA 6182	DPDA 6182	DPDA 6182	DPDA 6182	DPDA 6182	DPDA 6182
4	PP	PE	kalcijev stearat	PP	PE	/	/	/	/	/
5	PE	org. snov	PP	PP	parmez an sir	PE	kalcijev stearat	DPDA 6182	PE	PP
6	PP	kalcijev stearat	T-A4	PP	PP	/	/	/	/	/
7	HDPE	PE	PE	PE	PE	/	/	/	/	/
8	PE	PE	PP	PU	PE	/	/	/	/	/
9	parafin	/	najlon	parafin	PP	/	/	/	/	/
10	najlon	PE	PS	DPDA 6182	PP	kalcijev stearat	DPDA 6182	kalcijev stearat	HDPE	org. snov

Identificirali smo 11 vrst mikroplastike, in sicer PE, PP, PET, HDPE, DPDA 6182, PU, PS, T-A4, parafin, kalcijev stearat ter najlon. Njihova gostota znaša od 0,88 do 1,15 g/cm<sup>3</sup> (Tabela 3).

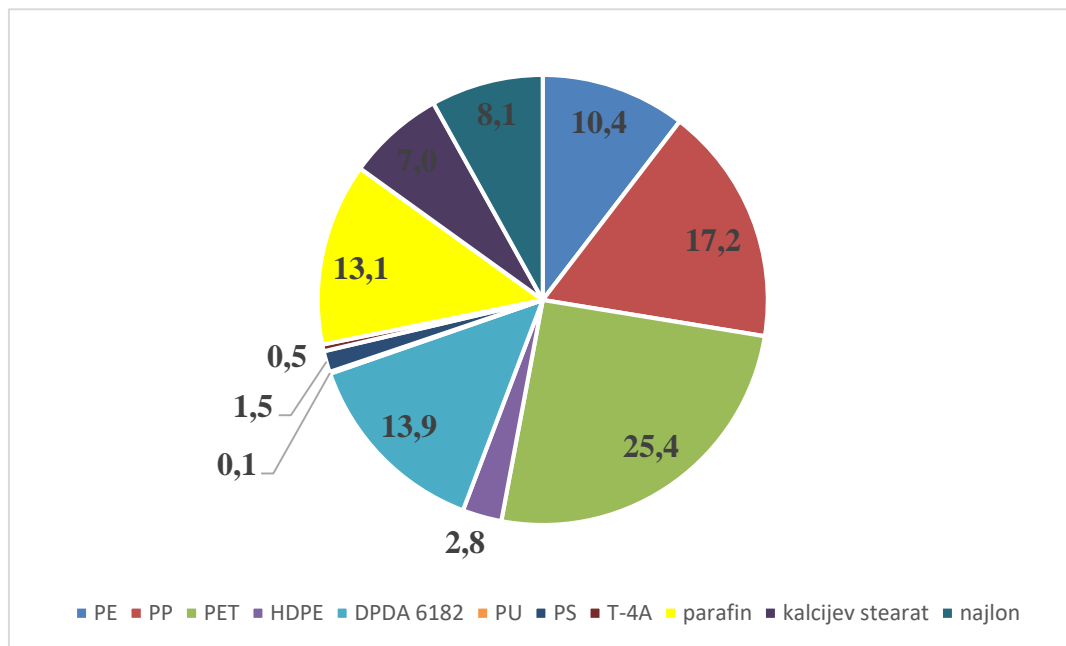
*Tabela 3: Podatki iz literature o gostotah vrst plastike.*

<b>Vrsta mikroplastike</b>	<b>Gostota (g/cm<sup>3</sup>)</b>
PE	0,88–0,96
PP	0,89–0,92
PET	1,20–1,45
HDPE	0,93–0,97
DPDA 6182	0,93
PU	1,05–1,25
PS	1,04–1,07
T-4A	/
parafin	0,88–0,92
kalcijev stearat	1,08
najlon	1,15

Iz rezultatov o masi desetih skupin zajete mikroplastike in rezultatov kemijske sestave izbranih delcev mikroplastike lahko izračunamo deleže posamezne vrste zajete mikroplastike. Pri izračunu smo predpostavili, da se izmerjena masa posamezne skupine mikroplastike enakomerno porazdeli na ugotovljene vrste mikroplastike. Pri sedmi skupini, pri kateri vsi delci tehtajo skupno 0,0254 g, smo analizirali 5 delcev mikroplastike. Eden od petih izbranih delcev je bil iz HDPE, ostali štirje pa iz PE. Tako smo 1/5 skupne mase pripisali HDPE in 4/5 skupne mase PE. Skupna masa zbranih plastičnih delcev iz vseh skupin je znašala 0,44 g.

*Tabela 4: Mase posameznih skupin zajete mikroplastike.*

<b>SKUPINA</b>	<b>Masa plastike [g]</b>
<b>1</b>	0,0994
<b>2</b>	0,0130
<b>3</b>	0,0414
<b>4</b>	0,0074
<b>5</b>	0,0534
<b>6</b>	0,0095
<b>7</b>	0,0254
<b>8</b>	0,0025
<b>9</b>	0,1284
<b>10</b>	0,0596



Slika 17: Deleži posameznih skupin zajete mikroplastike (v utežnih %).

Iz grafa je razvidno, da se najpogosteje pojavlja mikroplastika iz PET in PP. Sledijo mikroplastika iz DPDA 6182, parafin in nato PE.

## 4.2 Vpliv zooplanktona na mikroplastiko

Eksperiment, s katerim smo želeli ugotoviti, ali zaužiti mikroplastični delci potonejo skupaj z iztrebkom po prebavi v zooplanktonskih organizmih, je potekal paralelno v 4 poskusnih posodah (P1–P4). Za primerjavo je vzporedno potekal eksperiment v 4 kontrolnih posodah (K1–K4), v katerih ni bilo zooplanktona. Po končanem 3-dnevnem eksperimentu smo izvedli nučiranje vodnega stolpca skozi filter papir. Uporabljene filter papirje za nučiranje poskusnih in kontrolnih vzorcev smo pred uporabo stehtali. Po izvedenem nučiranju sta bila na filtrih prisotna preostala mikroplastika iz vodnega stolpca in zooplankton. Pridobljene vzorce filter papirjev od nučiranja smo posušili in pridobili maso posušenih filtrov.

Za izračun mase preostale mikroplastike iz vodnega stolpca v poskusnih posodah (P1–P4) in v kontrolnih posodah (K1–K4) smo od izmerjene skupne mase posušenega filtra odšteli maso posameznega filter papirja ter maso posušenega zooplanktona. Filter papirji pred tehtanjem niso bili posušeni, kar je zaradi ravnovesne zračne vlažnosti filtrov bistveno

vplivalo na izračun mase mikroplastike iz vodnega stolpca v poskusnih posodah. Zato smo mase neposušanih filter papirjev zmanjšali za povprečno razliko v masi med neposušanimi in posušanimi filter papirji. Povprečno razliko smo izračunali tako, da smo štiri naključne neposušene filter papirje stehtali, jih posušili in še enkrat stehtali. Ugotovili smo, da povprečna razlika v masi med neposušanimi in posušanimi filter papirji znaša 0,018 g.

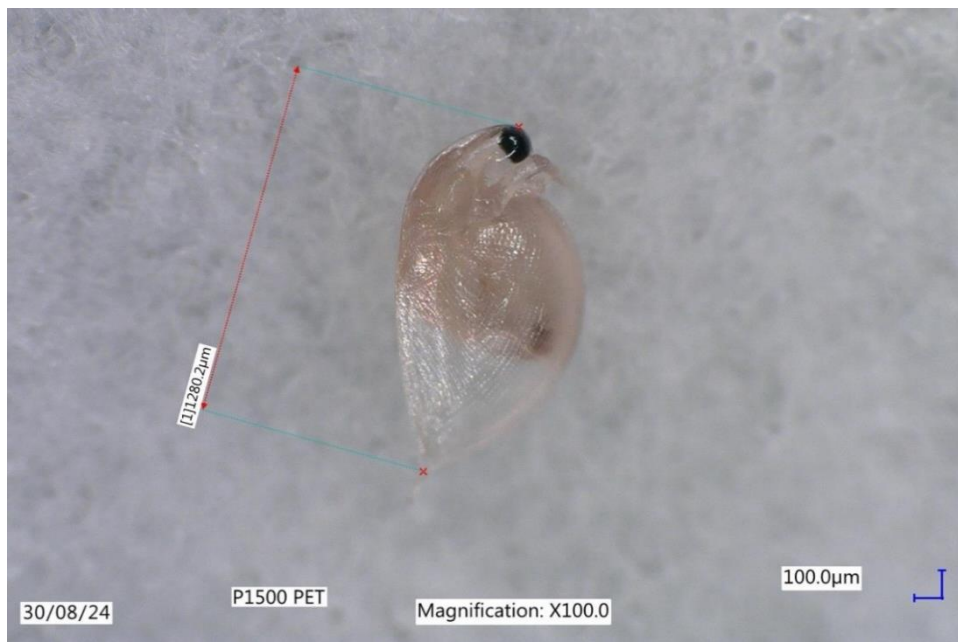
Maso posušenega zooplanktona v poskusnih posodah smo izračunali tako, da smo po nučiranju poskusne posode P1 na filter papirju prešteli vse zooplanktonske organizme in posameznim vrstam zooplanktona izmerili povprečno velikost. Iz literature (Leszek A. Bledzki, 2016), (Geller, 1989) smo pridobili enačbe za izračun mase posušenih zooplanktonskih organizmov določene velikosti (Enačba 4).

$$m(\text{vodne bolhe}) = e^{(1,5674+3,3611 \cdot \log(L1))},$$

$$m(\text{dvoklopnika}) = 26,6 \cdot (L2)^{3,13},$$

$$m(\text{kalanoidnega kopepoda}) = 7,9 \cdot 10^{-7} \cdot (L3)^{2,33}$$

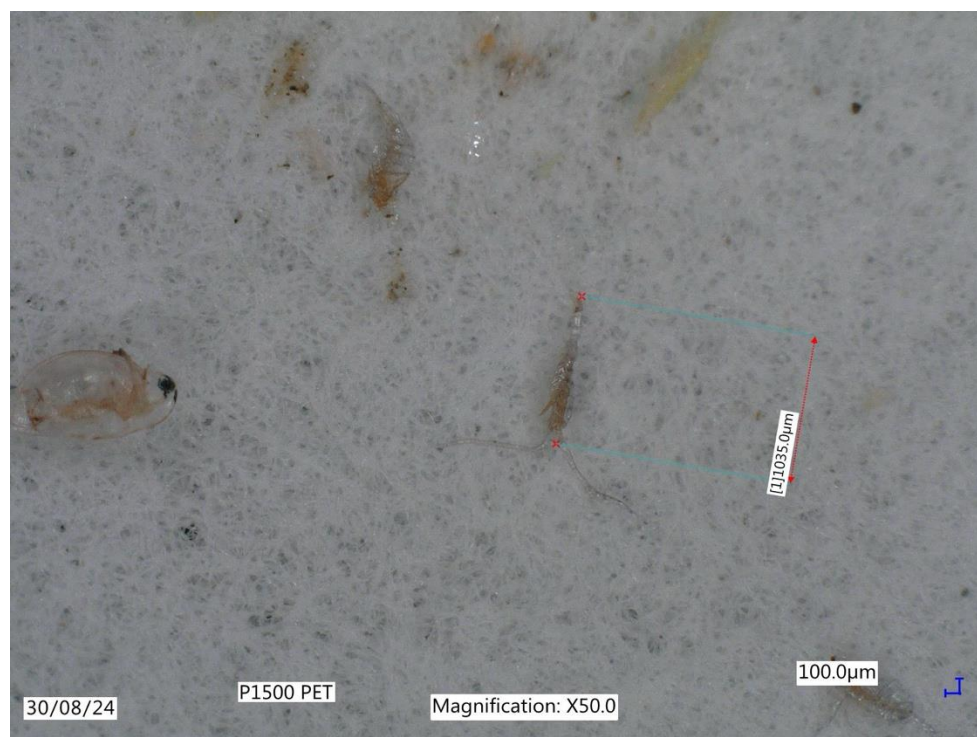
Enačba 4:  $L1$  je enak dolžini vodne bolhe brez repa v mm,  $L2$  je enak dolžini dvoklopnika,  $L3$  je enak dolžini kalanoidnega kopepoda brez končnih ščetin v  $\mu\text{m}$ .



Slika 18: Prikaz meritve dolžine vodne bolhe.



Slika 19: Prikaz meritve dvoklopnika.



Slika 20: Prikaz meritve kalanoidnega kopepoda.

*Tabela 5: Prikaz izmerjenega števila in velikosti zooplanktonskih organizmov v posodi P1 ter izračunane suhe mase organizmov.*

	Vodne bolhe	Dvoklopniki	Kanaloidni kopepodi
Število organizmov	42	12	256
Povprečna velikost ( $\mu\text{m}$ )	1087	712	1024
Masa enega posušenega organizma (izračunana na podlagi povprečne velikosti in enačbe iz literature; $\mu\text{g}$ )	6,35	9,19	7,14
Izračunana skupna masa posušenih organizmov ( $\mu\text{g}$ )	266,70	110,28	1827,84

Skupna masa vseh posušenih zooplanktonskih organizmov v poskusni posodi P1 je znašala 2,2 mg. Pri eksperimentu z uporabo zooplanktona smo zaradi načina vzorčenja (delanje »osmic«) privzeli, da je masa zooplanktonskih organizmov v vseh štirih poskusnih posodah enaka. Masa dodane zmesi mikroplastike v posamezno posodo je znašala 14 mg.

Maso mikroplastike iz vodnega stolpca v posameznih posodah smo izračunali tako, da smo od mase posušenega filtra z mikroplastiko in zooplanktonom odšteli izračunano maso posušenega filter papirja ter izračunano maso posušenih zooplanktonskih organizmov. Maso zooplanktona v kontrolnih posodah smo zanemarili.

*Tabela 6: Prikaz mase filter papirjev, mase posušenih filtrov z mikroplastiko in zooplanktonom ter izračunane mase preostale mikroplastike iz vodnega stolpca v poskusnih in kontrolnih posodah.*

Šifra posode	Masa neposušenega filter papirja (g)	Masa posušenega filtra z mikroplastiko in zooplanktonom (g)	Izračunana masa posušenega filter papirja (g)	Izračunana masa mikroplastike iz vodnega stolpca (mg)
P1	1,484	1,477	1,466	8,8
P2	1,550	1,536	1,532	1,8
P3	1,516	1,516	1,498	15,8
P4	1,521	1,511	1,503	5,8
K1	/	/	/	/
K2	1,535	1,537	1,517	20,0
K3	1,488	1,480	1,470	10,0
K4	1,514	1,512	1,496	16,0

Povprečna masa mikroplastike iz vodnega stolpca v štirih poskusnih posodah je znašala 8,1 mg (+/- 0,0059 SD), povprečna masa mikroplastike iz vodnega stolpca v kontrolnih posodah pa 15,3 mg (+/- 0,0054 SD). Glede na dejstvo, da je bilo v vsako posodo dodane 14 mg zmesi mikroplastike, smo lahko izračunali delež preostale mikroplastike v vodnem stolpcu v poskusnih posodah. Ta je znašala 58 %. Na podlagi tega, lahko sklepamo, da je delež sedimentirane mikroplastike v teh posodah znašal 42 %. V kontrolnih posodah je bila masa mikroplastike iz vodnega stolpca v povprečju celo večja od mase dodane mikroplastike na začetku eksperimenta. To je lahko posledica odstopanj pri tehtanju, izračunani masi suhih filter papirjev ali pa posledica tega, da so se na površini delcev mikroplastike nabrale alge.

## 5 RAZPRAVA

Čistilna naprava ima ključno vlogo pri odstranjevanju polutantov iz odpadnih voda –tudi mikroplastike. Rezultati analiz sestave izbranih delcev kažejo na veliko kemijsko raznovrstnost zajete mikroplastike. Uporabljena metoda oksidacije z vodikovim peroksidom se je izkazala kot učinkovita, saj smo s FTIR-analizo pridobili zanesljive podatke o kemijski raznovrstnosti zajete mikroplastike. Pomembno je bilo namreč, da med samo reakcijo ni prišlo do oksidacije mikroplastičnih delcev.

Nekatere vrste zajete in nato zbrane mikroplastike so imele višjo gostoto od vode, kar je nenavadno, saj bi se praviloma morale v procesu čiščenja KČN Kočevje sedimentirati iz odpadne vode. Možni razlog, da se vrsta mikroplastike, ki ima večjo gostoto od vode, ni sedimentirala, je lahko v obliki delcev. Takšen primer je zaprtocelična struktura penjenih materialov z zračnimi mehurčki, ki vplivajo na plovnost delcev. Drugi možni razlog pa je lahko majhna dimenzija hidrofobnih delcev, ki lahko plavajo zaradi površinske napetosti vode.

Pri analizi nas je presenetil velik delež posebne vrste mikroplastike, ki običajno ni omenjena v literaturi. Gre za vrsto mikroplastike DPDA 6182 - polietilen etil akrilat, ki je bila oranžne barve in značilne vlaknaste oblike (slika 21). Predvidevamo, da gre za lokalno specifični primer mikroplastike, ki je lahko posledica enkratnega onesnaženja v času zajema mikroplastike na čistilni napravi ali pa posledica lokalne industrijske dejavnosti.

Rezultati potrjujejo zastavljeno hipotezo, da se na izpustu vode iz KČN najpogosteje pojavlja PET. Druga najpogostejša vrsta mikroplastike je PP in na petem mestu PE.



Slika 21: Zajeti delec mikroplastike DPDA 6182 (polietilen etil akrilat).

Pri zajetju zooplanktonskih organizmov na Rudniškem jezeru je bil prvotni cilj zajeti dva glavna taksona zooplanktonskih organizmov, in sicer vodne bolhe in kopepodne rake. Ti so v jezeru najpogostejši zooplanktonski organizmi, poleg tega pa so za razliko od drugih taksonov sposobni zaužiti večje delce hrane in posledično tudi mikroplastike. Vodne bolhe in kopepodne rake smo nameravali ločiti s postopki filtracije skozi sita. Ker pa smo iz jezera pridobili praktično le kopepodne rake (verjetno je prišlo do pogina vodnih bolh med pripravo za poskus), smo v posode dodali še vodne bolhe iz bližnje mlake, za katero smo vedeli, da ima veliko teh organizmov. Med vodnimi bolhami se je pojavilo tudi manjše število dvoklopnikov, ki pa verjetno niso imeli večjega vpliva na poskus.

Eksperiment z zooplanktonom je potekal 3 dni in sicer v steklenih posodah. Steklene posode smo izbrali, ker so nam bile dostopne in ker se takšne posode pogosto uporabljajo za gojenje zooplanktonskih organizmov v laboratoriju. Posode pa so tudi ustrezale potrebam eksperimenta, saj so kljub majhnemu volumnu zadoščale za opazovanje sedimentacije mikroplastike. V vodnih telesih je globina sicer praviloma precej večja, a je tudi čas za tonjenje delcev daljši. Slednje velja še posebej za jezera, kjer se pojavlja stratifikacija in mešanje vodnega stolpca ni intenzivno.

Pri eksperimentu pa je bilo pomembno tudi trajanje treh dneh, saj so v tem času zooplanktonski organizmi v poskusnih posodah večkrat prefiltrirali celoten volumen posode in tako prišli v stik z mikroplastičnimi delci.

Pri eksperimentu smo uporabili relativno majhno količino mikroplastičnih delcev na eno eksperimentalno posodo (0,014 g). V nadaljevanju analiz smo ugotovili, da bi lahko pri eksperimentu uporabili večjo količino mikroplastičnih delcev in tako pridobili bolj reprezentativne rezultate. Ker bi bilo njihovo razmerje v primerjavi z drugimi delci na filtru večje, bi bile napake zaradi obrasti alg in podobno manjše.

Statistično analizo rezultatov mase mikroplastike iz vodnega stolpca v poskusnih posodah in kontrolnih posodah smo izvedli s t-testom z uporabo računalniškega programa Excel. Rezultat p-vrednosti znaša 0,1479 in je večji od vrednosti 0,05, kar pomeni, da razlika v masah mikroplastike v poskusnih in kontrolnih posodah ni statistično značilna in je lahko posledica naključja. To pomeni, da postavljeno hipotezo, da se bodo delci mikroplastike po končani prebavi v zooplanktonskih organizmih izločili ujeti v iztrebku, skupaj z njim potonili in se sedimentirali, zavrnamo.

Do bolj zanesljivih ugotovitev bi lahko prišli z večjim številom poskusnih in kontrolnih eksperimentov. Uporabljene metode dela so bile ustrezne, vendar bi s tehtanjem posušenih filtrov, namesto neposušenih, lahko znatno zmanjšali napako pri izračunu mase preostale mikroplastike iz vodnega stolpca.

## **6 ZAKLJUČEK**

Na izpustu Komunalne čistilne naprave Kočevje smo z ATR-FTIR analizo potrdili prisotnost mikroplastičnih delcev. Pri analizi smo ugotovili enajst različnih kemijskih vrst mikroplastičnih delcev: PP, PE, PET, HDPE, PS, PU, DPDA 6182, T-A4, parafin, najlon, kalcijev stearat. Najpogosteje so se pojavljale: PET, PP in DPDA 6182. Na osnovi podatkov smo sprejeli hipotezo, da se na izpustu čistilne naprave najpogosteje pojavlja mikroplastika PET ali PP ali PE. Zastavljene hipoteze, da zooplanktonski organizmi zmanjšujejo količino mikroplastike v vodnem stolpcu, nismo sprejeli, saj rezultati eksperimenta niso bili statistično značilni, kljub temu pa smo ugotovili trend večjega usedanja ob prisotnosti zooplanktona. Pri slednjem je bila količina preostale mikroplastike v vodi v povprečju skoraj dvakrat manjša kot tam, kjer zooplankton ni bil prisoten. Statistično sicer nismo uspeli potrditi, da zooplanktonski organizmi vplivajo na plovnost mikroplastike. Z večjim številom eksperimentov z uporabo zooplanktona na večjem številu poskusnih in kontrolnih posod bi lahko statistično prišli do drugačnih zaključkov. Z večkratnim zajemom mikroplastike na izpustu čistilne naprave bi lahko ugotovili morebitno spreminjanje deležev pojavljanja različnih vrst mikroplastike. Spremljali bi lahko, ali je bilo onesnaženje z mikroplastiko DPDA 6182 enkratno ali je kontinuirano.

Onesnaženje okolja z mikroplastiko je velik okoljski problem, ki pa je rešljiv. Dokazali smo, da lahko z mehansko filtracijo na izpustu čistilne naprave preprečimo vstop mikroplastičnih delcev, manjših od 800  $\mu\text{m}$ , v okolje. Rezultati nakazujejo tudi to, da imajo stoječa vodna telesa, v katerih so prisotni zooplanktonski organizmi, samočistilno sposobnost. Zato je zelo pomembno, da stoječa vodna telesa, kot so mlake, jezera, mokrišča, barja, ribniki in mrtvice, ohranjamo v čim bolj neokrnjenem stanju.

## 7 VIRI IN LITERATURA

- Arndt, H. (1993). Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) — a review. *Hydrobiologia*, 231-246.
- Batič, F. Č. (1983). *Biološko, laboratorijsko, eksperimentalno in terensko delo*. Ljubljana: Državna založba Slovenije.
- Bodzek, M. (2024). Microplastics in Wastewater Treatment Plants: Characteristics, Occurrence and Removal Technologies. *Water*.
- Bruker. (27. februar 2025). *Guide to Infrared Spectroscopy*. Pridobljeno iz <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>
- Cole, M. (21. maj 2013). Microplastic Ingestion by Zooplankton. *Environmental Science & Technology*, str. 6646-6655.
- Dieter, E. (7. april 2005). *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia*. Pridobljeno iz National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2036/>
- Duca, G., & Travin, S. (2020). Reactions' Mechanisms and Applications of Hydrogen. *American Journal of Physical Chemistry*, 36-44.
- Duiker, J., & Wefer, D. (1994). Das CO<sub>2</sub>-Problem und die Rolle des Ozeans. Fragestellung der internationalen Joint Global Ocean Flux Study. *The science of nature*, str. 237-242.
- Eunju, J., Jin-Yong, L., & Mostafa, R. (december 2024). Animal exposure to microplastics and health effects: A review. *Emerging Contaminants*.
- European chemical agency. (24. februar 2025). *European chemical agency*. Pridobljeno iz Mikroplastiko: <https://echa.europa.eu/sl/hot-topics/microplastics>
- Evropska komisija. (2023). *UREDBA KOMISIJE (EU) 2023/2055*.
- Forró, L., Korovchinsky, N., A. Kotov, A., & Petrusek, A. (april 2008). *ResearchGate*. Pridobljeno iz Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater: [https://www.researchgate.net/publication/225556334\\_Global\\_diversity\\_of\\_cladocerans\\_Cladocera\\_Crustacea\\_in\\_freshwater](https://www.researchgate.net/publication/225556334_Global_diversity_of_cladocerans_Cladocera_Crustacea_in_freshwater)
- Geller, W. (1989). The energy budget of two sympatric *Daphnia* species in Lake Constance: productivity and energy residence times. *Oecologia*, 242-250.
- Georg, R., & Bernhard, L. (marec 2013). Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
- Hribar, B. (2004). *COBISS+*. Pridobljeno iz Biološko čiščenje in fentonova oksidacija farmacevtske odpadne vode : diplomsko delo: <https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/26401029>
- J.P.G.L., F., & Nash, R. (januar 2019). Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*, str. 145-147.
- Kjørboe, T. (17. december 2010). What makes pelagic copepods so successful? *What makes pelagic copepods so successful?*, str. 677-685.

- Koehl, M. A., & Strickier, R. J. (november 1981). Copepod feeding currents: Food capture at low Reynolds number1. *Copepod feeding currents: Food capture at low Reynolds number1*, str. 1062-1073.
- Lalli, C., & Parsons, T. (1993). *Biological Oceanography: An Introduction*. Ljubljana: Pergamon.
- Lampert, W. (julij 1978). Release of dissolved organic carbon by grazing zooplankton. *Limnology and Oceanography*, str. 831-834.
- Leszek A. Bledzki, J. I. (2016). *Freshwater Crustacean Zooplankton of Europe*. Springer Nature Link.
- Manh, V. D., Thao, X. T., Ngo, D. V., & Thom, T. D. (maj 2022). Distribution and occurrence of microplastics in wastewater treatment plants. *Environmental Technology & Innovation*.
- Marvalin, O., & Lazarek, S. (1988). Improved Method for Determining Bacterial Filtration Rates in Zooplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 2149-2151.
- Matjašič, T. M. (1. februar 2023). Microplastic pollution in small rivers along rural–urban gradients: Variations across catchments and between water column and sediments. *Microplastic pollution in small rivers along rural–urban gradients: Variations across catchments and between water column and sediments*.
- Matoničkin, I. (1981). *Beskralješnjaci, Biologija viših avvertebra*. Zagreb: Šolska knjiga Zagreb.
- Nihart, A. G. (2025). Bioaccumulation of microplastics in decedent human brains. *Nature medicine*.
- Parker, L. (8. maj 2023). *National Geographic*. Pridobljeno iz Microplastics are in our bodies. How much do they harm us?: <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/microplastics-are-in-our-bodies-how-much-do-they-harm-us>
- Podobnik, A., & Devetak, D. (2008). *Raznolikost živih bitij*. Ljubljana: DZS, založništvo in trgovina, d. d.
- Ricci, C., & Fontaneto, D. (17. januar 2009). The importance of being a bdelloid: Ecological and evolutionary consequences of dormancy. *Italian Journal of Zoology*, str. 240-249.
- Roth, J. Z. (24. februar 2025). *European Comission JRC*. Pridobljeno iz [https://eippcb.jrc.ec.europa.eu/sites/default/files/2023-01/TXT\\_BREF\\_2023\\_for\\_publishing%20ISSN%201831-9424\\_final\\_1\\_revised.pdf](https://eippcb.jrc.ec.europa.eu/sites/default/files/2023-01/TXT_BREF_2023_for_publishing%20ISSN%201831-9424_final_1_revised.pdf)
- Statista Research Department. (3. Februar 2025). *Statista*. Pridobljeno iz Annual production of plastics worldwide from 1950 to 2023: <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>
- Tarman, K. (1992). *Osnove ekologije in ekologija živali*. Ljubljana: Državna založba Slovenije.
- Virant-Doberlet, M. (1997). *Živalstvo*. Ljubljana: Cankarjeva založba d. d.
- Virant-Dobleter, M. (1997). *Živalstvo*. Cankarjeva založba.
- Wakayama, N. (2007). Embryonic development clarifies polyphyly in ostracod crustaceans. *Journal of Zoology*, 406-413.