



Analiza tkankowa wybranych gatunków dżdżownic jako metoda szacowania stężenia mikroplastiku w glebie

mgr Marek Klimasz

Dyscyplina Naukowa Inżynierii Środowiska, Górnictwa i Energetyki

Promotor rozprawy: dr hab. Anna Grobelak, prof. Politechniki Częstochowskiej

Podziękowania

Nie łatwo było pogodzić kształcenie w szkole doktorskiej z obowiązkami pracy zawodowej, nie łatwo było wyznaczać granicę i decydować o tym, na co należy w danej chwili poświęcić czas i na czym się skupić, ale,

...ale od samego początku wiedziałem, że w tym wszystkim mogę liczyć na Pani pomoc, że wspiera mnie Pani swoją wiedzą i doświadczeniem, więc teraz chciałbym za to wszystko podziękować.

Przychodząc na rozmowę cztery lata temu, nie znałem tutaj nikogo, nie wiedziałem zbyt wiele o strukturze uczelni i absolutnie nic o wyposażeniu, z którego miałem później korzystać. Wprowadziła mnie Pani w świat nauki, otworzyła drzwi do laboratorium zarówno w znaczeniu dosłownym jak i w przenośni, uczyła, jak postępować i na co zwracać uwagę. Nie zawsze miałem na wszystko czas, być może powinienem dać od siebie więcej, ale dzięki Pani czułem się w tym wszystkim spokojny i wiedziałem, co należy robić. Okazała mi Pani wyrozumiałość, cierpliwość, zrozumienie. Bardzo wiele się nauczyłem i pozostaje Pani moim mentorem nauki.

Dziękuje za wspólne cztery lata pracy, dziękuje, że była Pani moim promotorem, dziękuje za wszystko.



Ta praca nie powstałaby również dzięki moim serdecznym kolegom i koleżankom ze szkoły doktorskiej. Dziękuje Wam, Moi Drodzy, za wszystkie spędzone wspólnie chwile, za niezliczone godziny w laboratorium, za Wasze wsparcie, pomoc i dobrą radę. To również dzięki Wam doktorat będę zawsze wspominał z ogromnym sentymentem.



"Nie chodzi o zdobycie góry, lecz o świadomość drogi, która prowadzi na szczyt" Praca została zrealizowana we współpracy z Jagiellońskim Centrum Innowacji, w którym wykonano pomiary mikroplastiku oraz analizę jego zawartości w tkankach dżdżownic.



Spis treści

WY	KAZ SKRÓTÓW	7
STR	ESZCZENIE	8
SUN	/MARY	10
ws	۲ĘР	12
CEL	E I ZAŁOŻENIA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	17
WY	KAZ DOROBKU NAUKOWEGO, NA PODSTAWIE KTÓREGO POWSTAŁA ROZPRAWA	19
1.	PROBLEM BADAWCZY	20
1.1 F	POCHODZENIE I KLASYFIKACJA MIKROPLASTIKU W ŚRODOWISKU	20
1.2 M	MIGRACJA I ROZPRZESTRZENIANIE MIKROPLASTIKU W ŚRODOWISKU	23
1.3 \	NPŁYW MIKROPLASTIKÓW NA ORGANIZMY	25
1.4 N	METODY BADANIA MIKROPLASTIKU W GLEBIE	28
1.5 \	WPŁYW MIKROPLASTIKU NA INŻYNIERIĘ ŚRODOWISKA, EKONOMIĘ ORAZ ROLNICTWO	34
2.PF	RZEWODNIK PO ARTYKUŁACH	36
2.1.	KLASYFIKACJA I RODZAJE MIKROPLASTIKÓW	36
2.2.	MIGRACJA MIKROPLASTIKÓW W ŚRODOWISKU	39
2.3.	OCZYSZCZALNIE ŚCIEKÓW JAKO ŹRÓDŁO MIKROPLASTIKU W ŚRODOWISKU	41
2.4.	MIKROPLASTIK W GLEBACH	45
2.6.	ZASTOSOWANIE MIKROSKOPII RAMANOWSKIEJ W CELU MAPOWANIA MIKROPLASTIKU I NANOPLASTIK	(U W
TKAN	NKACH DŻDŻOWNIC	54
2.7.	MAPOWANIE MIKROPLASTIKU W TKANKACH DŻDŻOWNIC JAKO METODA OCENY ZANIECZYSZCZENIA	
ŚROI	DOWISKA	57
3.	WNIOSKI	69
4.	BIBLIOGRAFIA	73
5.	SPIS TABEL, RYSUNKÓW ORAZ WYKRESÓW ZAWARTYCH W PRZEWODNIKU	84
6.	DOROBEK NAUKOWY I DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO DYDAKTYCZNA	86
7.	ZAŁĄCZNIKI	91



Wykaz skrótów

- PE (ang. polyethylene) polietylen
 PE-LD (ang. low density polyethylene)- polietylen niskiej gęstości
 PE-HD (ang. high density polyethylene) polietylen wysokiej gęstości
- PA (ang. polyamide) poliamid
- PS (ang. polystyrene) polistyren
- **PP** (*ang.* polypropylene) polipropylen
- PES (ang. polyester) poliester
- PC (ang. polycarbonate) poliwęglan
- **PVC** (*ang.* polyvinyl chloride) polichlorek winylu
- PU (ang. poluutherane) poliuretan
- PMMA (ang. poly(methyl methacrylate) poli(metakrylan) metylu
- **EVA** (*ang.* ethylene-vinyl acetate) poli(etylen-co-octan winylu)
- **PET** (*ang.* olyethylene terephthalate) politereftalan etylu
- MP (ang. microplastic) mikroplastik
- L.T Lumbricus terrestris
- **D.V** Dendrobaena veneta
- **GST** S-transferaza glutationowa
- **GSH** glutation
- CAT (catalase) katalaza
- **FTIR** (*ang.* Fourier transform infrared spectroscopy) spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
- GOZ Gospodarka obiegu zamkniętego



Streszczenie

Dynamiczny rozwój przemysłu tworzyw sztucznych, zapoczątkowany w latach 50. XX wieku doprowadził do masowej produkcji oraz globalnego wykorzystywania plastiku w wielu branżach gospodarczych. Niskie koszty ich wytwarzania, wytrzymałość oraz zróżnicowane właściwości sprawiły, że tworzywa te są powszechne, łatwo dostępne oraz często wykorzystywane jednorazowo. Wpływa to bezpośrednio na ilość produkowanych odpadów, które w niewielkim tylko stopniu podlegają recyklingowi i najczęściej trafiają na składowiska, gdzie czynniki biotyczne i abiotyczne sprzyjają ich fragmentacji i uwalnianiu drobnych cząstek zwanych mikroplastikiem (MP).

Praca opisuje nomenklaturę związaną z mikroplastikiem, różnicując go względem wielkości oraz pochodzenia, omawia możliwe drogi migracji, wpływ na ekosystemy wodne i lądowe, a także złożone zależności uwzględniające mobilność cząstek. Dokumentuje przypadki akumulacji tworzyw w organizmach zwierząt, zarówno bezkręgowców środowiska morskiego jak i lądowych, w tym ssaków. Wskazuje również na problem występowania mikroplastiku w glebie, zagrożenia jakie stanowi dla ogółu tego ekosystemu oraz obszerną metodykę umożliwiającą jego skuteczne wykrywanie. W kolejnych fragmentach, praca skupia się na roli dżdżownic jako organizmach zdolnych do koegzystowania w środowisku zanieczyszczonym mikroplastikiem, przez co nasuwa się szereg pytań o możliwość ich wykorzystania w procesach bioindykacji gleby oraz potencjalnych zastosowaniach w inżynierii środowiska.

W części badawczej pracy opisane zostały sposoby różnicowania wybranych gatunków dżdżownic, reprezentujących różne grupy ekologiczne: (*Lumbricus terrestris, Dendrobaena veneta, Aporrectodea caliginosa, Eisenia fetida* oraz *Eisenia andrei*) względem ich wrażliwości na obecność zanieczyszczenia MP w glebie. Na podstawie wyników badań, między innymi pośredniego markeru detoksykacji i reakcji adaptacyjnej organizmów na stresory środowiskowe, w tym mikroplastiki oraz ogólnej przeżywalności osobniczej i gatunkowej wyłonione zostały dwa gatunki, które posłużyły do dalszych analiz poznawczych.

W pracy wykorzystano mikroplastik o zróżnicowanych właściwościach chemicznych, wielkościach oraz kształtach, dla poprawnego odwzorowania naturalnego zanieczyszczenia środowiska, а pilotażową frakcja były fluorescencyjne zielone mikrosfery polietylenowe (PE) o rozmiarach 1-5 µm, 10-20 µm, 32-38 µm, 38-45 µm i 53-63 µm oraz fioletowe mikrosfery polietylenowe o rozmiarach 38-45 µm i 75-90 µm. Zastosowano również politereftalan etylenu (PET) w postaci nieregularnych granulek o rozmiarach 10-5000 µm, poliamid (PA) w postaci włókien o rozmiarach 10-2000 µm oraz polistyren (PS) w postaci nieregularnych strzępków folii o rozmiarach 10-5000 µm.

Praca opisuje sposoby pozyskiwania tkanek dźdżownic oraz metodę detekcji mikroplastiku z zastosowaniem złożonej aparatury takiej jak mikroskopia ramanowska i optyczna, respirometria Echo czy też spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), określające położenie przestrzenne oraz strukturę wiązań chemicznych. Dodatkowo znalazła się dyskusja na temat ogółu przeprowadzanych w podobny sposób badań i różnic wynikających między innymi z dokładności oraz rozdzielczości wykorzystywanych urządzeń pomiarowych w dostępnych publikacjach.

W ostatnich rozdziałach rozprawy podsumowano opisane metody i na tej podstawie określono korelację stężenia mikroplastiku w glebie oraz tkankach dżdżownic. Zawarte w pracy informacje potwierdzają zależności oraz zostały poparte analizami statystycznymi dla pełniejszego zobrazowania kwestii akumulacji. Dodatkowo, praca opisuje oraz potwierdza znaczące różnice stężeń tworzyw w tkankach oraz w ogólnym ujęciu dżdżownic hodowanych w skali laboratoryjnej oraz hodowli zewnętrznej.

Na podstawie przeprowadzonych badań, analiz biochemicznych i mikrobiologicznych ustalono, że *Lumbricus terrestris* oraz *Dendrobaena veneta* to gatunki najlepiej przystosowane do życia w glebie z zawartością mikroplastiku. Wykorzystana w trakcie pracy aparatura pomiarowa pozwoliła na precyzyjną detekcję cząstek zawartych w tkankach, a modelowanie matematyczne umożliwiło określenie korelacji stężenia gleba/ tkanka. Może być to niezwykle istotne w perspektywie inżynierii środowiska dając nowe możliwości w metodyce monitorowania jakościowego gleby.



Summary

The rapid development of the plastics industry, which began in the 1950s, has led to the mass production and global use of plastics in many economic sectors. Low production costs, durability and diverse properties have made these plastics widespread, readily available and often disposable. This has a direct impact on the amount of waste produced, which is only minimally recycled and most often ends up in landfills, where biotic and abiotic factors promote their fragmentation and the release of fine particles called microplastics (MP).

The work describes the nomenclature associated with microplastics differentiating them by size and origin, discusses possible migration routes, effects on aquatic and terrestrial ecosystems, as well as complex relationships considering particle mobility. He discusses cases of plastic accumulation in animal bodies, both marine and terrestrial invertebrates, including mammals. It also points out the problem of the occurrence of microplastics in soils, the threat they pose to this ecosystem in general, and the extensive methodology for their effective detection. In the following sections, the paper focuses on the role of earthworms as organisms capable of coexisting in microplastic-contaminated environments, thus raising a number of questions about their possible use in soil bioindication processes and potential applications in environmental engineering.

The research part of the paper describes the ways in which selected earthworm species, representing different ecological groups, can be differentiated: (*Lumbricus terrestris, Dendrobaena veneta, Apporectoda Caliginosa, Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*) with respect to their sensitivity to the presence of MP contamination in the soil were described. Based on the results of the study, among other indirect markers of detoxification and the adaptive response of organisms to environmental stressors, including microplastics, and overall individual and species survival, two species were selected for further cognitive analyses.

Microplastics of varying chemical properties, sizes and shapes were used in this study, for correct representation of natural environmental pollution, and the pilot



fraction was spherical fluorescent green polyethylene (PE) microspheres in sizes of 1-5 μ m, 10-20 μ m, 32-38 μ m, 38-45 μ m and 53-63 μ m, and purple polyethylene microspheres in sizes of 38-45 μ m and 75-90 μ m. Polyethylene terephthalate (PET) in the form of irregular pellets of 10-5000 μ m, polyamide (PA) in the form of fibres of 10-2000 μ m and polystyrene (PS) in the form of irregular film shreds of 10-5000 μ m were also used.

The paper describes methods of extracting earthworm tissues and the method of microplastic detection using complex apparatus such as Raman and optical microscopy, Echo respirometry or Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to determine the spatial position and structure of chemical bonds. In addition, there was a discussion of the totality of studies carried out in a similar way and the differences resulting, among other things, from the accuracy and resolution of the measuring equipment used in the available publications.

The final chapters of the dissertation summarize the methods described and, on this basis, determine the correlation of microplastic concentrations in soil and earthworm tissues. The information contained in the dissertation confirms the correlations and is supported by statistical analyses to illustrate the accumulation issue more fully. In addition, the work describes and confirms the significant differences in plastic concentrations in the tissues and in general of earthworms reared at the laboratory scale and outdoor culture.

Based on the research, biochemical and microbiological analyses, it was determined that *Lumbricus terrestris* and *Dendrobaena veneta* were the species best adapted to living in soil with microplastic content. The measuring apparatus used during the work allowed precise detection of particles contained in tissues, and mathematical modeling made it possible to determine soil/tissue concentration correlations. This could be extremely important in an environmental engineering perspective providing new opportunities in soil quality monitoring methodology.



Wstęp

Rozprawa doktorska, którą składam na Państwa ręce ma strukturę ciągu ułożonych tematycznie artykułów, z których część została opublikowana, a pozostałe przygotowane do publikacji. Wstęp ten ma na celu przeprowadzenie przez wszystkie te prace, omawiając najważniejsze ich wartości, objaśniając wybór metodyki oraz udział w ogólnym założeniu rozprawy. Dodatkowo, niezwykle istotne jest dla mnie opisanie już na wstępie wszystkich nieścisłości wynikających z dostępnej literatury, a także motywacji, którą kierowałem się dobierając kolejne tematy, a w konsekwencji ostatecznego celu, do którego dążyłem na podstawie zebranych informacji. Mam ogromną nadzieję, że rozprawa ta będzie stanowiła wyczerpujące źródło informacji temat podjetego zagadnienia, na a przedstawione artykuły zostaną odebrane jako naukowe potwierdzenie opisu.

Na podstawie dostępnej literatury, a także doniesień naukowych i danych publicznych, z pewną dozą przekonania chciałbym stwierdzić, że "mikroplastik" jest pojęciem niezwykle medialnym, kontrowersyjnym oraz stanowiącym przedmiot dyskusji na wielu płaszczyznach. To nie wszystko, uważam ponadto, że niewiele jest dyscyplin naukowych, w których nowe badania, przedostając się do środowiska komercyjnego wywołują skrajne emocje oraz usilnie wpływają na wyobraźnie odbiorców. Mikroplastik wciąż cieszy się wysoką popularnością na wielu portalach, często nie mających podłoża naukowego, gdzie brak recenzji oraz swoboda pisma redaktorów nakłada cień i określa ten właśnie mikroplastik w sposób bardzo krytyczny. I chodź najczęściej informacje takie zawierają w sobie ziarno prawdy, manipulacia danymi, odpowiedni dobór słów. czasem а przeplatane niedopowiedzenia sprawiają, że przekaz dedykowany jest pod masowy odbiór i kierowany maksymalnym zasięgiem. Niesie to za sobą szereg konsekwencji takich jak niezrozumienie ogólnego zagrożenia, czasem również bezsilność wobec cząstek tworzywa i niepokój, zwłaszcza gdy czytamy o średniej ilości mikroplastiku, którą spożywamy tygodniowo, o mikroplastiku w naszej krwi, w naszym mózgu czy też wątrobie. Oczywiście należy sprawę przedstawić jasno- zagrożenie jakim jest obecność mikroplastiku jest realne, faktycznie wpływa ono na szereg powikłań na



poziomie biochemicznym, jednak warto fakty te przedstawić w sposób przejrzysty, nawiązując do ogółu sytuacji, a także w odniesieniu do ich rzeczywistego znaczenia. W pewnym stopniu popularność zanieczyszczenia środowiska tworzywami oraz wynikająca z tego dyskusja jest w pełni zrozumiała, i nawet jeśli nie zawsze oddaje rzeczywisty obraz problemu to dobrze jest, abyśmy byli świadomi tego zagrożenia w przypadku gdy nie zgadzamy się w pełni z proponowanymi rozwiązaniami, mającymi na celu ochronę przed mikroplastikiem. Mowa tu o obostrzeniach prawnych, badaniach nad nowymi rodzajami biodegradowalnych tworzyw, finansowaniem już istniejących analiz, a także niesymetrycznym udziale państw świata w ogólnym stopniu produkcji tworzyw i ostatecznie mikroplastiku. Zupełnie inaczej natomiast konflikt ten przejawia się w środowisku naukowym, na płaszczyźnie publikacji oraz wzajemnego cytowania, powoływania się na źródła oraz podważania innych wyników. Kontrowersje wynikające z różnic publikowanych informacji bywają obszerne i najczęściej mają podłoże weryfikacji danych, poboru prób, czy też dokładności aparatury pomiarowej. I w tym przypadku należy sprawę potraktować z pewną dozą dystansu oraz zrozumieniem dla stron, zdaje się bowiem, że niezwykle intensywny rozwój technologii oraz nowoczesne metody badawcze w pewnym stopniu eliminują wiarygodność artykułów opublikowanych kilka lat temu i w pewnym stopniu jest to podstawą nauki- rozwój oraz doskonalenie techniczne. Ilość publikacji dotycząca mikroplastiku na wykresie jest funkcją liniową o silnej tendencji wzrostowej, nowe badania napędzają kolejne, wyniki stanowią podstawę dla dalszych analiz i często otwierają drzwi do szerszego pojmowania sprawy. Początkowo obejmowały one występowanie mikroplastiku w ocenach, jego stężenie oraz wpływ na organizmy morskie, z czasem zaczęły opisywać mikroplastik zawarty w glebach, a dziś- artykuły obejmuja już szeroką gamę migracji cząstek z uwzględnieniem warunków hydrologicznych, geologicznych, wpływ na organizmy na poziomie molekularnym, czy też wektorowanie dla specyficznych związków. Czytając artykuły, a później pisząc swoje i spoglądając na to dziśz pewnej metaforycznej perspektywy widzę, jak bardzo dynamicznym tematem jest mikroplastik i jak bardzo wiele wciąż jest do przebadania, oraz że badania te zdają się mieć zawsze kolejny etap.



Zapraszam do zapoznania się z przewodnikiem po mojej pracy, w którym opisywał będę poszczególne artykuły i omawiał dodatkowo to, co uważam za istotne, aby praca była kompletna i w pełni czytelna.

Motywacja podjęcia tematu

Jako pasjonat biologii, środowiska naturalnego oraz ogromny miłośnik zwierząt, starałem się w najlepszy możliwy sposób wykorzystać okres nauki w szkole doktorskiej, aby poszerzać swoją wiedzę nie tylko pod kątem merytoryki oraz badań laboratoryjnych, ale także z perspektywy dostrzegania zmian środowiska w różnych częściach świata. Uważam bowiem, że pełne zrozumienie tematu jest możliwe tylko i wówczas wtedy, kiedy doświadczymy go osobiście w wielu sytuacjach i nasza pewność siebie, nasze założenia oraz przewidywania zostana zburzone tym, co odkryjemy poza horyzontem poznawczym dla nas samych. Zanieczyszczenie środowiska jest tematem powszechnym, które nie wywiera już wrażenia na ogóle ludności i chodź wszyscy zdają sobie sprawę z istnienia tego problemu, to wciąż wydaje się nam ono zazwyczaj obce, dalekie. Pokazywane obszary o silnym zanieczyszczeniu w krajach bez wydajnego systemu ich zagospodarowania dotyczą najczęściej państw spoza Europy, przez co dodatkowo, prócz częściowej obojętności może kształtować się uczucie bezsilności oraz braku realnego wpływu na politykę tych właśnie państw. Szybko można przejść z takich doniesień do tych dotykających naszego otoczenia; kraju czy regionu, które przypisane mają większą wagę względem wpływu bezpośredniego. To w pełni zrozumiałe. Jednak wszystko zmienia się, kiedy dotkniemy tego świata, który wydaje się być światem równoległym, gdy zobaczymy obszary o trudnej do wyobrażenia powierzchni pokryte odpadami, kiedy zobaczymy wszechobecne reszki toreb plastikowych tuż przy parkach narodowych, czy też porzucony sprzęt elektroniczny przy siedlisku rzadkich gatunków. Perspektywa zmienia się. Teraz, ochrona przyrody przyjmuje wymiar osobisty, kontrast jakim są pradawne lasy deszczowe oraz nielegalne składowiska odpadów sprawia, że dla każdego biologa chwile te zapadają w pamięci. I oto właśnie mój cel, moja motywacja oraz chęć uczestnictwa procesie lepszego poznania tego właśnie zanieczyszczenia.



Mikroplastik występujący w środowisku naturalnym stanowi realne zagrożenie, mechanizmy warunkowane ogromem czynników biotycznych i abiotycznych nie są dokładnie zbadane, nie wiemy tym samym jakie są długoterminowe skutki wpływu cząstek na organizmy, a nawet w jaki sposób wykrywać je w różnych środowiskach. Metodyka opisująca separacje mikroplastiku jest złożona, (opiszę to w kolejnych rozdziałach przewodnika), rodzaje gleby, jej struktura oraz zawartość organiki sprawiają, że nie można posłużyć się jedną uniwersalną metodą pomiarową, zwłaszcza dla prób środowiskowych, dlatego chciałbym zaproponować metodę opartą na analizie tkankowej wybranych gatunków dżdżownic, jako jedno z narzędzi monitorowania mikroplastików w środowisku oraz nowym kierunku badawczym w dyscyplinie inżynieria środowiska.

Uzasadnienie podjęcia tematu

Dżdżownice są organizmami kosmopolitycznymi, szeroko występującymi w wielu obszarach i charakteryzującymi się zmiennym przystosowaniem gatunkowym względem środowiska (Chen i in., 2024). Większość z nich zamieszkuje oraz preferuje gleby rolnicze, gleby żyzne w materie organiczną oraz czasem- gleby leśne, jednak zwierzęta te z powodzeniem odnalazły się na terenach silnie zurbanizowanych, przez co spotykane są w miastach, bliskości zakładów przemysłowych, na obszarach nawożonych osadami ściekowymi oraz ogólnie w miejscach, gdzie nie występuje krytyczne dla nich zanieczyszczenie gleby (Chatelain, 2023). Mając to na uwadze oraz pojawiające się doniesienia o możliwości akumulacji mikroplastiku w tychże organizmach, wysnułem tezę o możliwości określenia korelacji stężenia mikroplastiku w glebie oraz mikroplastiku w tkankach dżdżownic gatunków reprezentujących różne grupy ekologiczne. Metoda ta, pozwoliłaby na oszacowanie zanieczyszczenia gleby i dostarczyła wstępnych informacji na temat jej stanu pod względem obecności mikroplastiku. Uważam, że pozyskanie tych danych może być bardzo przydatne oraz wpłynąć na kwalifikowanie dżdżownic bioindykatorem gleby zanieczyszczonej mikroplastikami oraz organizmem testowym do tego rodzaju zanieczyszczenia.



Aktualne opisywane metody detekcji tworzyw sztucznych w glebach często nie są standaryzowane, dodatkowo są obarczone błędami pomiarowymi oraz różnicami w stosowanych technikach poboru próbek, czy brakiem użycia materiałów referencyjnych (Medyńska-Juraszek, 2023). Dodatkowym Szczepańska, utrudnieniem bywa zawartość materii organicznej (w tym tkanek roślinnych), stopień uwodnienia, a także typ i rodzaj gleby. Często opisywaną metodą jest separacja gęstościowa z wykorzystaniem odpowiednich odczynników, jednak skuteczność tej techniki (podważona w przeprowadzonych badaniach) z założenia sprawdza się w przypadku tworzyw o niskiej gęstości, tym samym wysokiej wyporności. Dla cząsteczek ciężkich bądź związanych z materią organiczną lub agregatem glebowym rozwiązanie to zdaje się być nieuzasadnione (Negrete i in., 2020). mogącym wpływać na ostateczną ocenę Koleinym czynnikiem metod separacyjnych jest podawanie wyników w liczbie cząstek na objętość gleby. We wszystkich cytowanych publikacjach, jednym z etapów przygotowania gleby jest jej homogenizacja oraz w kolejnych – wykorzystanie odczynników o różnych właściwościach. Jak wskazują autorzy (Thomas i in., 2020), (Kononov i in., 2022), (Prosenc i in., 2021) oraz wielu innych, odczynniki mogą wpływać na zmianę struktury tworzyw oraz prowadzić do ich fragmentacji. To z kolei oznacza, że względnie kruchy fragment tworzywa, pod wpływem zarówno homogenizacji jak i obróbki chemicznej może uwalniać znaczną liczbę cząstek bądź całkowicie ulec fragmentacji.

W kwestii ochrony, kształtowania oraz inżynierii środowiska, monitorowanie jakości gleby wydaje się kluczowe i stanowić podstawę dla wyznaczania dalszych obserwacji czy też działania docelowego. W tej perspektywie analiza tkankowa dżdżownic nabiera interesującego znaczenia i staje się alternatywą z kilku głównych powodów. Dżdżownice zamieszkują określony obszar, przemieszczają się po pozostawionych po sobie śladach śluzu oraz aktywnie żerują w obrębie swej niszy. Opisane są dokładnie zachowania poszczególnych gatunków, preferencje żerowania oraz fizjologia rozrodcza (Chatelain i Mathieu, 2017), (Palma i in., 2013), (Sizmur i in., 2011). Opierając się na wszystkich tych danych oraz poznając w skali laboratoryjnej wpływ mikroplastiku różnych frakcji na dżdżownice, można sugerować założenia analizy tkankowej oraz jej wykorzystanie do szacowania zanieczyszczenia gleby i potencjalnego zastosowania w inżynierii środowiska.

Dodatkowym argumentem, przemawiającym na korzyść tej metody jest łatwość w pobieraniu osobników z gleby, powtarzalność eksperymentu, a przy określonych ustawieniach aparatury wyznaczenie prób kontrolnych oraz wzorcowych.

Cele i założenia rozprawy doktorskiej

Celem rozprawy doktorskiej jest określenie możliwości zastosowania analizy tkankowej wybranych gatunków dżdżownic do oszacowania stężenia mikroplastiku w glebie jako wskaźnika oraz metody badawczej inżynierii środowiska. W założeniu znajduje się również wskazanie skutecznej procedury separacji gęstościowej oraz opisanie detekcji wybranych tworzyw sztucznych w tkankach.

Szczegółowe cele biologiczne:

- Różnicowanie wrażliwości gatunkowej na podstawie parametrów biochemicznych dżdżownic poddanych ekspozycji na mikroplastik,
- Określenie gatunków najlepiej przystosowanych do życia w glebie skażonej mikroplastikiem, a tym samym gatunków odpowiednich do dalszych badań i wskaźnikowych dżdżownic do monitorowania mikroplastiku w glebie,
- Określenie różnic w wynikach analizy tkanek dżdżownic pochodzących z hodowli laboratoryjnej oraz z hodowli zewnętrznej.

Szczegółowe cele techniczne:

- Określenie skutecznej metody separacji mikroplastiku w glebie dla uzyskania próby kontrolnej,
- Określenie parametrów analizy tkankowej i doboru odpowiedniej aparatury pomiarowej,
- Określenie możliwych zmian parametrów fizycznych tworzyw po okresie ekspozycji na glebę oraz enzymy trawienne dżdzownic.



Cel utylitarny rozprawy:

- Określenie możliwości zastosowania tkanek dżdżownic jako bioindykatora w testowaniu gleb do oceny zawartości w nich mikroplastiku,
- Zastosowanie specyficznych ustawień mikroskopii ramanowskiej, spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera oraz analiz optycznych do wstępnego szacowania stężenia mikroplastiku w glebie; aplikacja do szacowania tkankowego dżdżownic mikroplastiku,
- Wykorzystanie informacji dostarczonych przez analizę tkankową w dyscyplinie inżynierii środowiska oraz w cyklicznym monitorowaniu zanieczyszczenia gleby tworzywami sztucznymi.

Hipotezy rozprawy doktorskiej

- Istnieje możliwość wykorzystania analizy tkankowej wybranych gatunków dżdżownic jako wskaźnika gleby zanieczyszczonej mikroplastikiem.
- Istnieje możliwość wykorzystania mikroskopii ramanowskiej do precyzyjnego określenia wielkości cząsteczkowej oraz mapowania przestrzennego tworzyw w tkankach dżdżownic.
- Stężenie mikroplastiku w glebie koreluje ze stężeniem mikroplastiku w tkankach dżdżownic, a korelacje tą można wykorzystać w sposób utylitarny.



Wykaz dorobku naukowego, na podstawie którego powstała rozprawa

- 1 Klimasz Marek, Grobelak Anna, "Migration of microplastics in agriculture and marine ecosystem: Biotechnology approaches". Biotechnology of Emerging Microbes, Prospects for Agriculture and Environment, Academic Press, (pp. 127-142), 2024, rozdział w monografii za 200 pkt wg listy ministerialnej, 80 pkt za rozdział (D.1.)
- 2 Marek Klimasz, Anna Grobelak, "Global scale of microplastic occurrence" artykuł przeglądowy, opublikowany w repozytorium cyfrowym Zenodo: https://doi.org/10.5281/zenodo.14953335 (D.2.),
- 3 Marek Klimasz, Anna Grobelak, "Oczyszczanie ścieków jako źródło mikroplastiku w środowisku", w; Nowatorskie rozwiązania w inżynierii środowiska i energetyce - perspektywa zrównoważonego rozwoju, pod redakcją lwony Zawieji, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, 2024, rozdział w monografii za 80 pkt., 20 pkt. za rozdział (D.3.)
- 4 Marek Klimasz, Anna Grobelak, "Methods for separation and classification of microplastics in soil"; artykuł przeglądowy, opublikowany w repozytorium cyfrowym Zenodo: https://doi.org/10.5281/zenodo.14952942 (D.4.)
- 5 Marek Klimasz, Anna Grobelak, "Effects of microplastics on selected earthworm species" Toxics, MDPI, Volume 13, Issue 3, artykuł badawczy w trakcie procesu publikacyjnego za 70 pkt wg listy ministerialnej, 2025. (D.5.)
- 6 Marek Klimasz, Anna Grobelak, "Accumulation of spherical microplastic in earthworm tissues- mapping using Raman microscopy." Applied Science, 2024.14,10117, opublikowany artykuł badawczy za 40 punktów wg listy ministerialnej (D.6.)
- 7 Marek Klimasz, Andrzej Kacprzak Anna Grobelak, "Evaluation of the quantitative concentration of microplastic in Dendrobaena veneta and Lumbricus terrestris tissues from laboratory and environmental culture" Applied Science, 12. applsci-3460617, 2025, opublikowany artykuł badawczy za 40 punktów wg listy ministerialnej (D.7.)

1.Problem badawczy

1.1 Pochodzenie i klasyfikacja mikroplastiku w środowisku

Nieodłącznym pojęciem ściśle związanym z obecnością plastiku w środowisku naturalnym jest pojęcie mikroplastiku, będącego według obecnej nomenklatury cząstką tworzywa sztucznego o średnicy poniżej 5 mm, która w sposób niekontrolowany przedostaje się do wód powierzchniowych, gleby oraz powietrza. Wyróżniono wiele rodzajów mikroplastiku w zależności od jego pochodzenia, kształtu, wielkości oraz właściwości tworzywa, a do najczęściej opisywanych należą mikrogranule, włókna i mikroplastiki różnokształtne, takie jak drobiny opon czy żywic (Phoung i in., 2016), (Barnes i in., 2009).

Po raz pierwszy termin "mikroplastik" wprowadzili autorzy badań dotyczących analizy zanieczyszczeń osadów dennych w okolicy Plymount w Wielkiej Brytanii w 2004 roku. Termin ten odnosił się jednak do ogólnych drobin tworzyw sztucznych i nie precyzował żadnych wielkości mierzalnych. W 2008 roku odbyły się pierwsze międzynarodowe warsztaty związane z zagrożeniem wynikającym z obecności tworzyw sztucznych w środowisku – International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris, zorganizowane przez National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) oraz Uniwersytet Waszyngtoński (Arthur i in., 2008). Jednym z celów warsztatów było ustalenie oficjalnej terminologii oraz definicji drobin plastiku o różnej strukturze, wielkości czy gęstości. W znaczeniu słowa "mikroplastik" znajduje się przedrostek "mikro", sugerujący, że badana frakcja wymaga wykorzystania narzędzi optycznych. Ostatecznie jednak komitet uznał, że nazwa ta będzie standaryzowana jako pojęcie określające tworzywo nieprzekraczające 5 mm. Nie uwzględniono natomiast dolnej granicy mikroplastiku, przez co pyłki oraz kurz miejski również zaliczane są do grupy mikroplastiku. Aby jednak lepiej zrozumieć oraz przekazać informację o wielkości cząstek, Cole i inni w artykule z 2011 roku wprowadzili dodatkowy podział z wyszczególnieniem drobin mniejszych oraz większych od przyjętych 5 mm.

Założenie ma na celu bardziej precyzyjne określanie wielkości drobin i opisuje nanoplastik (<1 mm), mikroplastik (1-5 mm), mezoplastik (5 mm- 2,5 cm), makroplastik (2,5 cm-1 m) oraz megaplastik (powyżej 1 m) (Napper i in., 2015) (Tabela 1).

Kolejnym kryterium podziału mikroplastiku jest jego kształt. W środowisku zurbanizowanym, w ciekach wodnych najczęściej odnajdywane jest włókno pochodzące z ubrań przy procesie prania. Dodatkowo podział ten obejmuje również włókna sieci rybackich (o innych właściwościach oraz strukturze), mikrogranulki, folie, pianki, granulaty i cząstki różnokształtne. Z ostatnią grupą, czyli drobinami różnokształtnymi, wiąże się pewne niebezpieczeństwo, ponieważ autorzy pochodzący z różnych państw mogą używać odmiennej terminologii do opisania tej samej frakcji czy drobin. Skutkiem może być nieprawidłowa interpretacja wyników bądź sprzeczne dane. Klasyfikacja mikroplastiku opiera się również na źródłach pochodzenia i wyróżnia się tu mikroplastiki pierwotne oraz wtórne.



Tabela 1. Klasyfikacja mikroplastiku względem wielkości i pochodzenia

Mikroplastikiem pierwotnym określa się tworzywa sztuczne, które charakteryzują się niewielką wielkością oraz bezpośrednim przedostawaniem się do środowiska naturalnego, często z pominięciem procesów obróbki mechanicznej oraz biologicznej. To cząstki celowo produkowane w tak niewielkich rozmiarach. Do najczęściej opisywanych mikroplastików pierwotnych zalicza się granulaty wykorzystywane w przemyśle przetwórczym, drobiny produktów kosmetycznych, składniki materiałów ściernych, włókna syntetyczne, a także drobiny opon czy też miejski kurz. Źródłem powstawania mikroplastiku jest zarówno pierwotna produkcja



granulatu, jak i proces jego przetwarzania, a średnia wielkość cząstki waha się od 0,1 do 10 mm, twardość 45-95 ShA (Ruiz-Real i in., 2018). Zawartość tworzyw sztucznych w produktach kosmetycznych przyjmuje wartość od 0,05 do 3 %, a ich wielkość wynosi zwykle 450-800 µm. W grupie tej znajdują się produkty do makijażu, pasty do zębów, mydła, żele pod prysznic czy też szampony. Wykorzystuje się w nich zarówno polietylen (PE), polipropylen (PP), polimetakrylan metylu (PMMA), polistyren (PS), jak i politereftalan etylu (PET). Produkcja oraz wykorzystanie cząsteczek tworzyw sztucznych w procesach ścierania czy też wygładzania jest też szeroko stosowane w branży budowlanej. Papiery ścierne, folie oraz płótna pokryte tlenkiem aluminium, węglikiem krzemu czy też cyrkonem glinu stanowią szeroką grupę źródła mikroplastiku ze względu na powszechne zastosowanie oraz częste zużycie. Powstały mikroplastik zwykle ma wielkość poniżej 0,1 mm oraz wysoką gęstość właściwą. Głównym źródłem włókien syntetycznych są pralnie domowe oraz przemysłowe. Badania wykazały, że ilość uwolnionych podczas prania cząsteczek może wynieść kilka tysięcy na każdy gram materiału. Istotny jest tu rodzaj tkaniny i wykorzystanego detergentu oraz parametry prania (temperatura, czas prania, twardość wody). Środki czyszczące oraz detergenty mające charakter alkaliczny powodują wytwarzanie środowiska zasadowego, które prowadzi do uszkodzeń chemicznych materiałów poliestrowych, poprzez hydrolizę grup estrowych budujących strukturę poliestrów (Phuong i in., 2016).

Mikroplastik wtórny powstaje w procesach degradacji większych fragmentów plastiku pod wpływem określonych czynników. Zwykle cząsteczki mikroplastiku wtórego charakteryzują się nieregularnymi kształtami oraz wielkościami pomimo tego samego źródła pochodzenia, np. z butelki PET. Degradacja tworzywa i proces powstawania mikroplastiku warunkowane są czynnikami zewnętrznymi i właściwościami chemicznymi samego materiału. Największy wpływ na rozpad elementów plastikowych mają między innymi promieniowanie słoneczne, tarcie mechaniczne, temperatura oraz woda.

Problem badawczy stanowi złożoność rodzajowa mikroplastiku, różnorodność względem kształtu, barwy, gęstości oraz rozmiaru, a także wciąż rozwijający się przemysł tworzyw i powstawanie nowych materiałów o odmiennych właściwościach.

1.2 Migracja i rozprzestrzenianie mikroplastiku w środowisku

Według analiz, w roku 2016 emisja globalna tworzyw sztucznych do rzek, mórz oraz oceanów wyniosła od 9 do 23 mln ton metrycznych (Lau i in.2020). Według wielu badaczy to właśnie spływy rzekami odpowiadają za znaczny procent sumarycznej ilości tworzyw w oceanach. Według aktualnych badań wśród 10 najbardziej zanieczyszczających rzek na świecie 7 znajduje się na Filipinach, 3 w Indiach oraz 1 w Malezji. Te 10 rzek wspólnie odpowiada za 60%-88% emisji wszystkich rzek do oceanu, a sama rzeka Pasig (Filipiny) generuje 6,4% światowego zanieczyszczenia; Łącznie 4 820 rzek w Filipinach emituje 356,4 tysiące ton plastiku do oceanu, 1 169 rzek w Indiach emituje 126,6 tysiąca ton, Malezja 1070 rzek i emisja na poziomie 73,1 tysiąca ton oraz Chiny z 1309 rzek i emisją na poziomie 70,1 tysiąca ton rocznie (Lebreton i in. 2017). Los tworzyw sztucznych na otwartych wodach jest niezwykle zróżnicowany. Badania wykazały, że około 50% tworzyw tonie na skutek niskiej wyporności, pozostała część może zostać wyrzucona na brzeg bądź dryfować kierowana prądami morskimi i wiatrem (de Frond i in. 2019). Dodatkowym stymulatorem są tak zwane wiry, które nie pozwalają tworzywom oddalać się w kierunku lądu, przez co tworzą się skupiska odpadów, potocznie zwane plamami śmieci.

Globalne zanieczyszczenie gleby tworzywami sztucznymi jest niezwykle istotnym problemem i przekłada się w pewnym stopniu na urodzajność oraz zdrowotność ekosystemu. Aktualnie prowadzi się wiele badań ilościowych i jakościowych, jednak porównując je należy zwrócić uwagę na zgodność metodyki poboru oraz analizy próbek. W Chinach stężenie mikroplastiku na terenach rolniczych, gdzie stosowano szklarnie z tworzyw sztucznych oraz nawożono osadami ściekowymi wynosiło od 13 470 cząstek/kg⁻¹ do 42 960 (średnio 26 070), 7 100 - 26 630 cząstek/kg⁻¹ na terenach zielonych (średnio 14 440 cząstek/kg⁻¹), oraz od 96 000 do 690 000 cząstek/kg⁻¹ w lasach okolic Wuhan. Jak wskazują autorzy, 82% wykrytych cząstek miało wielkość poniżej 250 µm, dominującą frakcją były włókna. Najniższe

zawartości odnotowano we wschodnich rejonach kraju, na obszarach pól ryżowych, gdzie było to około 18 cząstek/kg⁻¹. Uśrednione wartości krajów Europejskich dają średnią na poziomie 2914 cząstek/kg⁻¹ i są wyższe od tych zarejestrowanych w Chinach. W Hiszpani, w rejonach Walencji gdzie regularnie stosowano osady ściekowe, stężenie wzrosło trzykrotnie dając wynik 33 000 cząstek/kg⁻¹ (od 999 cząstek/kg⁻¹ do 80 658 cząstek/kg⁻¹), punkt badawczy w Danii odnotował stężenie na 71 000 cząstek/kg⁻¹, a dominującym tworzywem był PP oraz PS. W Niemczech, w okolicach Kolonii badania opublikowane w jednostce masy wykazały 915±63 mg/kg⁻¹, co daje wynik zbliżony do terenów przemysłowych pozostałych badanych części Europy, jednak pozostałe próby z tego kraju dały bardzo niskie stężenie na poziomie średnio 11 cząstek/kg⁻¹. Jak wynika z badań, największy wpływ stosowania osadów ściekowym na ilość mikroplastiku miało miejsce w Ameryce, gdzie stężenie wzrosło z 4 cząstek/kg⁻¹ aż do 542 cząstek/kg⁻¹ po 2krotnym zastosowaniu osadów w ciągu 5 lat. Pomiary w Australii, jak wskazują autorzy, odbyły się w silnie zanieczyszczonym miejscu, w bliskości obiektów przemysłowych Sydney, gdzie średnie stężenie cząstek wyniosło 24 000 mg/kg⁻¹, a maksymalne wyniosło 67 500 mg/kg⁻¹. Autorzy w zestawieniu globalnym obliczyli, że mediana wynosi 1162 kg/-1 (25% - 89 cząstek/kg-1, 75% - 2870 cząstek/kg-1) oraz masę 0,6 mg/kg⁻¹. Tereny zawierające osady ściekowe średnia to 1998 cząstek /kg⁻¹ (25% - 999 cząstek/kg⁻¹, 75% - 3616 cząstek/kg⁻¹), średnia masa 2,2 mg/kg⁻¹. Badania te przeprowadzone były głównie przy obszarach miejskich (trzykrotnie częściej), a stosunek wartości tworzyw w miasta i terenach zielonych to jeden stopień różnicy w skali dziesiętnej, co potwierdza silną korelację gęstości zaludnienia oraz zanieczyszczenia gleby. Ponadto stężenie mikroplastiku w glebie na terenach przemysłowych było średnio od 2 do 4 razy większe niż na pozostałych terenach (Büks and Kaupenjohann 2020).

Obecność mikroplastiku potwierdzono w atmosferze terenów miejskich, wiejskich, również o niskiej gęstości zaludnienia oraz niezamieszkałych, co wskazuje na potencjalny transport cząstek na duże odległości. Jednakże badanie zawartości oraz przemieszczania się tych zanieczyszczeń w powietrzu jest stosunkowo nową dziedziną zainteresowań i wciąż brakuje informacji na ten temat (Klain i Fischer 2019), a najczęściej wykorzystywaną metodą jest kolektor pasywny (osadzanie



całkowite w określonym czasie) (Allena i in., 2019). Obecnie wykorzystuje się ujednoliconą metodykę opracowaną przez Norweski Instytut Badań Powietrza, stosując kolektory szklano-metalowe nie zawierające tworzyw oraz dające możliwość wiarygodnych pomiarów oraz ich powtarzalności. Mimo to, autorzy w swych badaniach wykorzystywali również pompy ssące (Liu i in. 2019), uznawane za aktywne metody analizy powietrza. Wyniki różniły się znacząco od miejsca pomiaru. W Paryżu było to 118 cząstek na metr kwadratowy na dzień (cz/m²/d), w Hamburgu 275 cz/m²/d (Dris i in, 2016, Klain i Fischer 2017), Dongguan w Chinach od 175 do 313 cz/m²/d, Yantai w Chinach 602 cz/m²/d (Zhou i in. 2017). Nottingham w Wielkiej Brytanii 31 cz/m²/d, Wysoki poziom odnotowano również w odległych rejonach Pirenei na poziomie 33 cz/m²/d, (Allen i in. 2019). Dodatkowo w osadach mokrych śniegu w Helsinkach wykryto niecałe 700 szt. na 1 m². Mikroplastik zawieszony w powietrzu jest podatny na wiry powietrzne, wiatry oraz masy prądów kontynentalnych, przez co jego migracja może zachodzić na znaczne odległości. Zaobserwowano tworzywa sztuczne na lodowcach tybetańskich, w Alpach, oraz na obszarach morskich. Na parametry te ma wpływ głównie masa cząsteczek plastiku, kształt oraz wielkość (Zhang i in., 2019).

Problem badawczy stanowi brak kontroli nad rozprzestrzenienia się mikroplastiku w środowisku naturalnym, jego mobilność hydrologiczna oraz atmosferyczna, a także rosnące stężenie w glebach nawożonych osadami ściekowymi.

1.3 Wpływ mikroplastików na organizmy

Na podstawie 747 publikacji oraz prac podsumowujących zawarte tam dane można określić wpływ tworzyw sztucznych na organizmy żywe. Łącznie 914 gatunków zostało opisanych w kontekście połknięcia tworzyw, zaplątania bądź w obu przypadkach (Provencher i in. 2017). Dokładniej jest to 701 gatunków, które połykają tworzywa oraz 354 narażone za zaplątanie (Kunh i inn., 2015) Spożycie tworzyw związane jest ich różnorodnością kolorów, kształtów, wielkości oraz z zawieszeniem na różnej głębokości słupa wody i może być zabiegiem celowym (jako pokarm) bądź przypadkowym, biernym. Największy współczynnik spożycia cząstek oraz zaplątania odnotowano u ptaków morskich (41% przebadanych



ptaków), przy zawartości 9,9 cząstki na osobnika. Najbardziej narażone gatunkowo byly nury (Gaviiformes) (80%), rybitwy (Sterninae) (62%), pelikany (Pelecanidae) (37%), mewy (Larinae) i wydrzyki (Stercorarius) (około 42%). W badaniu tym wykorzystano 43 525 próbek z czego 27,7% zawierało tworzywa (12 065 sztuk). W przypadku ssaków przebadano 19 484 próbek- 4% zawierały mikroplastik (860), a współczynnik połykania najwyższy odnotowano u foki (71%), manatów (69%), krów morskich (66%) oraz wielorybów (60%) (Deng i in. 2023). Dużym zainteresowaniem cieszą się badania i tym samym ilość publikacji o żółwiach morskich, gdzie u wszystkich 7 gatunków stwierdzono zarówno wysoki wskaźnik zaplątania jak i połykanie cząstek bliskie 100% (3639 przebadanych osobników, 32% próbek zawierało plastik). Generalnie na połykanie tworzyw bądź zaplątanie w sieci narażonych jest 17% z 693 gatunków objętych ochroną i wpisanych na Czerwoną Listę Gatunków Zagrożonych, a dla wielu z nich śmierć spowodowana tworzywami jest drugą najczęstsza przyczyną śmierci zaraz po umyślnym oraz celowym zabijaniu. Osobniki trwale lub czasowo narażone na ekspozycję tworzyw mogą być podatne na zaburzenia odżywiania, reprodukcji oraz uszkodzenia mechaniczne (Kühn and van Franeker 2020). Polipropylen i polietylen 40 µm -100 μm negatywnie wpływał na fitoplankton między innymi okrzemkę morską (Thalassiosira pseudonana), wiciowce morskie (Dunaliella tertiolecta) oraz algi zielone (*Chlorella vulgaris*) hamujac ich wzrost nawet do 45% (Sjolemma i in. 2016). W przypadku Skeletonema costatum, Thalassiosira pseudonana, Phaeodactylum tricornutum aktywność fotosyntetyczna, zniekształcenie tylakoidów, błon komórkowych oraz modyfikację składu chemicznego wydzielanych substanancji została opisana przez Zhanga (Zhang i in, 2017) oraz Shiu (Shiu i in. 2020). W osadach, w których potwierdzono obecność mikro i nano plastiku powyżej 0,5% spadła liczebność bezkręgowców. Wykazano, że polietylen oraz polipropylen średnicy 10-90 μm mogą gromadzić się w jelitach narybku oraz skrzelach dorosłych osobników z gatunku Danio priuris, wpływając na zwyrodnienia wątroby, podwyższenie poziom kortyzolu przy jednoczesnym spadku poziomu glukozy, ponadto tworzywa zakłócają transmisję synaptyczną i hamują ekspresje genów. Wśród przebadanych ryb pospolitych (karp, karaś lin, okoń itp.) obecność mikroplastiku w skrzelach, wątrobie i mózgu wpływała na zmniejszenie prędkości



pływania, wzrost narybku, stres oksydacyjny oraz aktywność enzymów trawiennych.

Obecność mikro i nanoplastiku w glebie może wpływać na rozwój roślin zarówno jako stymulator i i inhibitor. W przypadku pieprzycy siewnej (L. sativum) stężenie mikro i nano plastiku (10³–10⁷ cz/mL⁻¹) po 72 godzinach ekspozycji wpłynęło na nagromadzenie ich w porach nasion, przez co zmniejszyła się absorpcja wody i opóźniło kiełkowanie. U rzeżuchy ogrodowej (L. sativum) takie samo stężenie cząstek opóźniło kiełkowanie od 21% do 56% w zależności od stężenia (Bosker i in. 2019). Podobne wyniki uzyskano dla życicy trwałej (L. perenne) (inhibicja na poziomie od 6% do 7%) (Boots i in. 2019). U pszenicy T. aestivum, cząstki PS od 0,2 µm do 2 µm były transportowane z korzeni do pędu i jak wskazują autorzy mogły być przyczyna stresu oksydacyjnego (Li i in. 2020). U rzodkiewnika (A. thaliana) mikroplastik o ładunku dodatnim po 35 dniach ekspozycji wpłynął na zaburzenie gospodarki mineralnej oraz pobieranie pierwiastków z gleby (Sun i in. 2020). W przypadku krokusa (*C. sativus*) polistyren wielkości 100-700 µm pobierany był przez łodygę oraz transportowany do liści, kwiatów i owoców (Li i in. 2021). W przypadku kukurydzy absorbowany przez liście akumulował się w tkankach oraz przemieszczał w stronę korzeni (Sun i in. 2021). Nie zawsze jednak mikroplastik wykazuje silne działanie hamujące, w przypadku cebuli (A. cepa) obecność tworzyw w niskim stężeniu nie wpłynęła znacząco na kiełkowanie oraz rozwój (0,01, 0,1 i 1 g/ L⁻¹ PS 50 nm) (Giorgetti i in. 2020). Generalnie, najczęściej opisywane negatywne skutki wpływu tworzyw na rośliny dotyczą kiełkowania, masy, przyrostu, średnicy oraz powierzchni korzeni, wzrostu rośliny, zawartości chlorofilu oraz wydajności procesu fotosyntezy (Sun i in. 2020), stresu oksydacyjnego i związanych z nim enzymów (Jiang i in. 2019), procesów metabolicznych, zawartości pierwiastków takich jak magnez, wapń i żelazo (Liana i in, 2021), cytotoksyczności, genotoksyczności, oraz anomalii genetycznych (Giorgettini i in. 2020), zmniejszenia ilości i masy owoców (Meng i in. 2021), zawartość oraz aktywności fitohormonów, skrócenia fazy generatywnej, zmniejszenie plonów oraz pogorszenie ich jakości (Zhou i in., 2021).

Problem badawczy stanowi obecność mikroplastiku w ogranizmach różnych gatunków zwierząt i roślin oraz brak wiedzy na temat długotrwałej ekspozycji na to



zanieczyszczenie, dodatkowo problemem jest wpływ bezpośredni mikroplstiku skutkujący stresem oksydayjnym, zaburzeniem wzrostu oraz reprodukcji, spadkiem masy organizmów oraz uszkodzeniami tkankowymi.

1.4 Metody badania mikroplastiku w glebie

Przygotowanie próbek

Pierwszym etapem przygotowania próbek przed analizą jest zwykle suszenie w celu pozbycia się wody z gleby. Wielu autorów stosuje odmienne metody suszenia odnosząc się do właściwości fizycznych materiału, które mogą ulegać zmianie pod wpływem działania temperatury. Specyfikacja polimerów wskazuje, że etylen-octan winylu (EVA) topi się w temperaturach 30°- 60° C, temperatura zeszklenia polibutylenu oraz polimetakrylanu metylu wynosi 40°-50°C, temperatura degradacji polilaktydu 60°C (Van den Berg i in., 2020). Pomimo tego autorzy w prowadzonych badaniach suszyli próbki w 40° przez 24h lub 72h (Enders i in., 2020), a także w 70° przez 24 godz. (Liu i in., 2018), rzadziej suszenie odbywało się w temperaturze pokojowej do momentu uzyskania odpowiedniego efektu. W każdym z przypadków celem jest uzyskanie jednolitej suchej masy.

Homogenizacja

Istotnym elementem przygotowania próbek jest ich odpowiednia homogenizacja. Ujednolicenie frakcji ułatwia przesiewanie przez sita, których gęstość najczęściej podawana przez autorów mieści się w granicy 5mm, czyli umownej granicy dla mikroplastiku. Jak jednak jednocześnie wskazują, jest to obarczone pewnym błędem, gdyż często większe fragmenty mikroplastiku obklejone są mniejszymi cząstkami co ostatecznie wpływa na niedoszacowanie analizy spektroskopowej (Zhang i in., 2018). Inni autorzy wskazują z kolei, że nadmierne przesiewanie oraz homogenizacja wpływają na dodatkową fragmentację cząstek, zwłaszcza tworzyw silne zużytych bądź kruchych (Huang i in., 2020). Podobne sugestie badaczy wskazują, że mechaniczne mielenie agregatów glebowych prowadzi do fragmentacji również na skutek powstającej podczas tarcia temperatury i zalecają ręczne wstrząsanie próbki (Zhou i in., 2020). Vermaire i in. (2017) zaproponowali zastosowaniem heksametafosforu sodu. wstrząsanie z wykorzystanie



ultradźwięków do gleby zawieszonej w roztworze soli lub wodzie dejonizowanej. Pomimo skuteczności metody, nie potwierdzono jeszcze bezpośredniego wpływu sonifikacji na tworzywa sztuczne, podobnie jak kaskadowego przesiewania dla uzyskania frakcji rzędu 1, 2 oraz 5 mm (Zhou i in., 2020).

Usuwanie materii organicznej z próbek

Gleba charakteryzuje się różnym stopniem zawartości materii organicznej, która, jak wskazują autorzy wpływa na wyniki analizy mikroplastiku. Obecność szczątek roślin na różnym etapie rozkładu, korzeni, odchodów zwierząt bądź organicznych zanieczyszczeń antropogenicznych wymaga zastosowania metody oczyszczania. Badania wykazały, że skuteczność usuwania materii organicznej jest skorelowana ze zwiększoną ilością wykrytego tworzywa (Corradini i in., 2020). Istnieją cztery grupy odczynników wykorzystywanych do usuwania materii organicznej, są to: enzymy, zasady, kwasy oraz utleniacze. Skuteczność poszczególnych odczynników przedstawiono w tabeli nr. 2. Kuhn i inni (2017) wskazują, że stosowanie odczynników alkaicznych skutecznie usuwa poliestry alifatyczne takie jak polilaktydy. Scheurer oraz Bigalke (2018) dowiedli, że stosowanie H₂O₂ znacząco wpływa na fragmentację PET oraz PA. Ten sam odczynnik stosowany w temperaturze pokojowej przy czasie długim czasie trawienia wpłynął na zmianę barwy PC, PCV, PE, PP oraz PU. Konieczny do tego czas wynosił od 4 do 7 dni (Nuelle i in., 2014). Badacze wskazują ponadto, iż stosowanie poszczególnych odczynników w odpowiedniej temperaturze powinno uwzględniać skład chemiczny gleby. Obecność tlenków żelaza oraz manganu wykazują silną reakcję katalityczną, w której H₂O₂ ulega redukcji zanim jeszcze rozpocznie się trawienie. Wykorzystanie enzymów do oczyszczania gleby jest metodą wciąż niepoznaną i istnieje niewielka ilość opisanych analiz. Jedną z nich jest praca Ljung (Ljung i in., 2018), w której autor wykorzystuje lipazę, proteazę, kolorazę, celulazę, chitynazę oraz trypsynę, opisując przy tym dokładną kolejność ich stosowania, w celu uzyskania wydajności na poziomie 90%.



Odczynnik	Rodzaj gleby	Czas trawienia [h]	Temp. (°C)	Szacowana
				skuteczność
NaOH	piasek gliniasty	24	60	35-70%
КОН	piasek gliniasty	24	60	>35
65% HNO ₃	gleba zalewowa	48	60	>90%
96% H ₂ SO ₄	gleba zalewowa	24-72	90	> 95%
30% H ₂ O ₂	ziemia rolnicza	24	60	>90%
H_2O_2	osad	168	60	>60
odczynnik Fentona	piasek gliniasty	24	40	>60

Tabela 2. Szacowana skuteczność wybranych odczynników

Separacja gęstościowa jest jedną z najczęściej stosowanych metod, wykorzystując różnicę gęstości pomiędzy częścią mineralną gleby (p > 2,0 g/cm⁻³) a gęstością tworzyw sztucznych ($\rho = 0.9 - 1.6$ g/cm⁻³). Wyporność tworzyw sztucznych sprawia, że przy skutecznym wymieszaniu gleby z chlorkiem sodu NaCl (p = 1,2 g/cm $^{-3}$), chlorkiem wapnia (CaCl₂ ($\rho = 1,3-1,5$ g/cm $^{-3}$), bromkiem sodu (NaBr ($\rho =$ 1,4–1,6 g/cm⁻³) czy też chlorkiem cynku (ZnCl₂ ρ = 1,5–1,7 g/cm⁻³) unoszą się one na powierzchni i mogą być zebrane do identyfikacji (Liu i in., 2020). Dodatkowo autorzy wskazują na wykorzystanie mrówczanu potasu ($\rho = 1,5-1,6$ g/cm⁻³), roztworu heteropoliwolframianu sodu ($\rho = 1.5$ g/cm⁻³), bezwodnego wolframianu sodu ($\rho = 1,4$ g/cm⁻³), etanolu ($\rho = 0,8$ g/cm⁻³) oraz wody dejonizowanej ($\rho =$ 1,0 g/cm⁻³) (Qyinn i in., 2017). Stosunek wykorzystywanych roztworów do masy gleby nie został ujednolicony i zwykle mieści się w przedziale 1:10 do 1:25. Autorzy badań wskazują, że metody są specyficzne dla poszczególnych rodzajów gleby oraz tworzyw sztucznych i mogą nie być wystarczająco skuteczne w przypadku innych. Jak wskazuje Scheurer i inni (2018) jony wapnia powodują flokulacje substancji organicznych, tym samym nie mogą być wykorzystane w przypadku gleby z dużą zawartością organicznych związków mineralnych, proponując zastosowanie wody dejonizowanej głowie do izolacji PP, PE, PS podkreślając fakt, że dodatkowo metoda jest tania i przyjazna środowisku. Scheurer i Bigalke (2019) wspominają, że zastosowanie Na pozytywnie wpływa na dyspersję agregatów i przyczynia się do wydajności procesu ekstrakcji. Quinn (2017) dostrzegając korelację pomiędzy gęstością tworzywa oraz gęstością roztworu zaproponował ZnCl₂ do wykrywania tworzyw takich jak PET czy PCV, co okazało się wysoce

skuteczne, podkreślając jednocześnie, że odczynniki są drogie oraz nieprzyjazne dla środowiska. Inni autorzy wskazują ponadto, że ZnCl₂ ma właściwości żrące i należy przenalizować jego wpływ na poszczególne tworzywa sztuczne. Wśród negatywnych skutków działania odczynników wymieniane są ponadto zmiana barwy cząsteczek plastiku, silne pienienie roztworu, koagulację cząsteczkową oraz ich rozpuszczanie (Quinn i in., 2017). Procedura całościowa metody separacji gęstościowej w zdecydowanej większości publikacji opisuje kilkukrotne wykorzystanie tego samego odczynnika lub kilku, przy czym pierwszym zwykle była woda dejonizowana (Liu i in., 2018). Najprostszą metodą wykonania jest ręczne wymieszanie gleby z roztworem poprzez wstrząsanie, jednak, jak wskazuje Zobkov (2017), dla ujednolicenia prób oraz powtarzalności procesu istotne jest zastosowanie wstrząsarek magnetycznych zarówno platformowych jak i podwieszanych. Pomimo opracowania metod spiralnych, które w czasie mieszania nieustannie wynoszą glebę w górę pojemnika dla lepszego rozproszenia, metod kolb wysokich dla lepszego zobrazowania frakcji, czy też zastosowania turbulencji powietrznych, podstawową kwestią jest brak wykorzystania elementów tworzywa podczas procesu mieszania. Badania wskazują, że polarność cząstek może powodować obklejanie korka czy też zakrętki przez drobiny mikroplastiku. Kwestią nierozstrzygniętą pozostaje również czas mieszania, autorzy wskazują tu czas minimalny jako 10 sekund a maksymalny 2 godziny, czas opadania osadu od 5 minut do 24 godzin (Imhof, 2012). Zróżnicowanie oraz ilość możliwych kombinacji odczynnika, jego stężenia, rodzaju gleby, rodzaju mikroplastiku, metody mieszania, czasu mieszania oraz osadzania wydają się być skomplikowane i nasuwają pytanie o ujednolicenie procesu. W tabeli 3 ukazano najbardziej obiecujące zestawienia gleby i odczynników.

Odczynnik	Gęstość	Typ tworzywa	Rodzaj gleby
Woda dejonizowana	1,0 g cm ⁻³	PE, PP	piaszczyste, gliniaste lessowe
NaCl	1,2 g cm ⁻³	PP, PS, PA, PE	gleba rolnicza
NaBr	1,4–1,6 g cm ⁻³	PMMA, PE, PP, PET, PCV, PS	gleba rolnicza, gleby osadowe
CaCl ₂	1,3–1,5 g cm ⁻³	PU, PE, PP, PS, PET, PCV, PA	bogata w materie organiczną
ZnCl ₂	1,5–1,7 g cm ⁻³	PS	gleba rolnicza
Mrówczan potasu	1,5–1,6 g cm ⁻³	PET, PP, PE, PS	gleby osadowe
Etanol	0,8 g cm ⁻³		materiał rolniczy

Tabela 3. Skuteczność odczynników w separacji gęstościowej mikroplastiku



Aby pozyskać cząstki mikroplastiku, unoszące się na powierzchni roztworu, autorzy wskazują na dekantację, polegająca na delikatnym przelewaniu wierzchniej warstwy na płytkie szklane szalki oraz ponowne mieszanie gleby z roztworem ekstrakcji oraz zminimalizowania celu dokładniejszej ilości czastek W przylegających do ścian naczynia. Liu i inni. (2017) i inny wykorzystali też metodę, polegającą na ciągłym dolewaniu roztworu i pozyskiwaniu supernatantu przelewającego się przez naczynie, jednak metoda ta budzi wiele zastrzeżeń względem przylegania cząstek również do zewnętrznej strony naczynia oraz podatność na cząsteczki z otoczenia. Scheurer i Bigalke (2018) zaproponowali metodę odsysania z wykorzystaniem pipet, (głownie w stosunku do włókien syntetycznych) oraz pompy próżniowej, jednak podobnie jak pozostałe metody, istnieje ryzyko przylegania cząstek do wewnętrznych stron urządzeń. Cząsteczki mikroplastiku zawarte w supernatancie Enders (2020) oddzielił przy pomocy pompy próżniowej i opisał różnice wykorzystanych membran separacyjnych wykonanych z włókien szklanych (średnica oczka 1,6 µm), kwarcu (średnica oczka 2,2 µm), politetrafluoroetylenu (PTFE) (średnica oczka 2 µm) oraz nylonu o średnicy oczka 20 µm. Autor wskazuje fakt, że wiele cząstek zostało straconych przy membranach z włókna szklanego oraz kwarcu, a hydrofobowość PTFE powodowała trudności w filtracji wody, przez co ostatecznie, w dalszych badaniach autorzy wykorzystali membrany nylonowe.

Identyfikacja mikroplastiku

Identyfikacja większych cząstek mikroplastiku zwykle opiera się na analizie wizualnej, co jest prostą i szybką metodą określenia tworzywa, jednak Eriksen (Eriksen i inni, 2013) dowiedli, że metoda ta jest obciążona błędem na poziomie 20-70%. Dużo skuteczniejsza wydaje się analiza spektralna czy też spektrometria mas, zwłaszcza czy cząstkach poniżej 1 mm.

Często wykorzystywana spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) pozwala na rozpoznanie określonych wiązań chemicznych charakterystycznych dla danej substancji lub tworzywa. Uzyskane dane można zapisać w formie graficznej wykresu, a system porówna otrzymane widna ze standardową bazą danych. Istnieją jednak obawy, że technologia ta nie jest wysoce skuteczna w wykrywaniu obiektów mniejszych niż 1µm. Simon i inni (2018)



potwierdzili, że skalę błędów można zmniejszyć wykorzystując matrycę płaszczyzny ogniskowej, która umożliwia chemiczne mapowanie większych obszarów w filtrze dzięki zastosowaniu siatki elementów detektora. Zapewnia ona kilkukrotne określanie chemiczne tej samej cząstki, jednak całościowy czas analizy znacząco się wydłuża i przy zastosowaniu filtra 47 mm wynosi do 10 godzin.

Analiza ilościowa

Ilościowe określenie tworzyw sztucznych obejmuje głównie ważenie, liczenie i analizę instrumentalną. Ważenie stanowi istotny element głównie przy dużej zawartości mikroplastiku w glebie i jest wyrażany w jednostkach mg/kg⁻¹. Liczenie z wykorzystaniem mikroskopii jest najpopularniejszą metodą opisującą stężenie mikroplastiku, wyrażanego w jednostce N/kg⁻¹ bądź N/m⁻², wymaga jednak sporego nakładu czasu, a często również wykorzystania zaawansowanego oprogramowania do przetwarzania obrazu w czasie rzeczywistym. Dodatkowo, analiza ilościowa pozwala na określenie wielkości, kształtu oraz barwy cząstek oraz może stanowić bazę lub skalę pod dalsze analizy termoaktywne (Zhang i in., 2018).

Termoanaliza

Podgrzewanie próbki do temperatury zbliżonej 500° wiąże się z nieodwracalną utratą możliwości dalszej analizy ilościowej na skutek zachodzącej pirolizy. Niemniej wielu autorów zwraca uwagę, iż analiza masy jest istotniejsza niż analiza ilościowa cząstek, wskazując na nierównomierne rozłożenie różnej wielkości cząstek oraz ich gęstości w próbce. Zwiększeniu czułości aparatury spektroskopu mas opartej na pomiarze czasu przelotu (TOF) pozwala na detekcje w zakresie mg/kg⁻¹ do µg/kg⁻¹. Dodatkowo, nowoczesna aparatura umożliwia jednoczesne wykrywanie wielu związków bez zmian ustawienia aparatury, możliwość wykorzystania wodoru jako gazu nośnikowego czy też kompatybilność z innymi instrumentami pomiarowymi. Badania prowadzone w niezależnych laboratoriach, współpracujących ze sobą w celu ustalenia wiarygodności pomiaru dowiodły, że analiza termoanalityczna oraz chromatografia skutecznie określiły zawartość PET, PS, PP oraz PE, szczególnie w ocenie całkowitej zawartości tworzyw polimerowych. Badacze wskazali na istotny proces homogenizacji oraz przygotowania próbek o wadze poniżej 100 mg, a także na fakt,



że ligniny zawarte w glebie, zakłócają oznaczenie PS oraz PE, prowadząc do dodatkowego wykrycia mikroplastiku

Problem badawczy stanowi złożona matryca jaką jest gleba oraz brak jednolitej metody określającej zawartość w niej tworzyw sztucznych. W przypadku inżynierii środowiska oraz wszystkich założeń mających na celu rekultywację gleb czy ogólnie ich ochronę, skuteczna i wysoce powtarzalna metoda oznaczania jest kluczowa. Przy tak dużej ilości zmiennych, szanse na błędy pomiarowe nawet w obrębie jednego badania są niezerowe, a wręcz spore.

1.5 Wpływ mikroplastiku na inżynierię środowiska, ekonomię oraz rolnictwo

Na podstawie przedstawionych danych oraz w ich sumarycznym podsumowaniu należy wspomnieć, że sam wpływ mikroplastiku na organizmy roślinne i zwierzęce opisywany biologią to tylko częścią złożonego problemu. Niemniej ważnymi kwestiami są łączne konsekwencje wszystkich tych zaburzeń, mające realne odbicie w ekonomii, gospodarce oraz inżynierii środowiska. Osłabienie gleby, jej żyzności oraz dostępności pierwiastkowej przekłada się na mniej urodzajne plony, to z kolei może być podstawą do stosowania dodatków glebowych oraz nawozów co w pewnym stopniu znów zwiększy stężenie tworzyw w glebie. Może to rozpocząć szereg zmian o niepoznanych dotąd skutkach oraz być procesem nieodwracalnym przez bardzo długi czas. W przypadku zwierząt kwestia wygląda podobnie i chodź nie jest to tematem rozprawy, warto wspomnieć o możliwych chorobach zwierząt hodowlanych oraz o produktach odzwierzęcych zanieczyszczonych tworzywami.

Inżynieria środowiska jako dyscyplina mająca za zadanie monitorowanie środowiska oraz objęcie zakresem działania na rzecz utrzymania właściwego jej stanu, ma również w swym opisie informacje dotyczące tego, iż powinna dążyć do zachowania gleby w stanie jej samoregulacji, a także samooczyszczenia. Mowa tu nie tylko o zjawiskach naturalnych, ale przede wszystkim o wpływie rolnictwa, agresywnej gospodarce oraz nadmiernym wykorzystywaniu nawozów. Wszystko jednak wskazuje na to, że rolnictwo wciąż rozwijało się będzie w sposób ciągły,

jednak coraz bardziej zrównoważony i odpowiedzialny, co jednak nie wyklucza zastosowania tworzyw i ich uwalniania do środowiska. Nawet przy założeniach restrykcyjnych norm prawnych oraz regulacji, a także wykorzystaniu w znacznym stopniu tworzyw biodegradowalnych, wyłączenie z obiegu podstawowych produktów polimerowych zdaje się być niewykonalne. Opisując to kolokwialnie-redukcja opakowań plastikowych o 99% pozostawia ten 1%, który wciąż będzie przyczyniał się do powstawania mikroplastiku, gdy ten 1% pomnożymy przez wszystkie wykorzystywane produkty rolnicze uzyskamy wartości mierzalne oraz zaliczane do mikrozanieczyszczeń.

Problemem badawczym jest tu brak realnej oceny widma nadchodzących zmian, mających na celu ograniczenie wykorzystywania tworzyw sztucznych, na przykład w rolnictwie. To nie wszystko, Gospodarka Obiegu Zamkniętego (GOZ) oraz regulacje "Zielonego Ładu" (opisywanego w załączonym artykule) mogą w znacznym stopniu przyczynić się do wykorzystywania osadów ściekowych w rolnictwie nie tylko pod uprawy roślin przeznaczonych dla zwierząt czy pastwiska, ale też pod grunty orne roślin przeznaczonych dla ludzi, co oznacza, że zanieczyszczenie gleb mikroplastikiem i wpływ na organizmy może stanowić w przyszłości ogromne zagrożenie.



2.Przewodnik po artykułach

2.1. Klasyfikacja i rodzaje mikroplastików

(D.1.) "Migration of Microplastic in Agriculture and marine ecosystem: Biotechnology approaches", Biotechnology of Emerging Microbes: Prospects for Agriculture and Environment

Artykuł pierwszy, rozpoczynający zbiór publikacji zatytułowany "Migration of Microplastic in Agriculture and Marine Ecosystem: Biotechnology approaches", ukazał się jako rozdział w monografii "Biotechnology of Emerging Microbes: Prospects for Agriculture and Environment" i przedstawia opis ogólny oraz charakterystykę mikroplastiku. Wyróżniamy w nim między innymi pierwsze zastosowanie tego terminu (rozdział 1), podstawy nomenklatury (rozdział 2), a także ogólne zastosowanie tworzyw sztucznych i charakterystykę poszczególnych polimerów (rozdział 4). Nawiązując do artykułu tego warto podkreślić, że wspomniana nomenklatura przez długi czas pozostawała w sposób niejednolity identyfikowana przez odrębne zespoły badawcze. Głównymi kryteriami oceny były wielkość cząstek, kształt oraz skład chemiczny, jednak zdarzały się opisy, w których autorzy skupiali się na kolorach oraz cechach drugorzędowych jak wyporność (Frias i inn., 2005). Tłumacząc to w publikacjach o zasięgu międzynarodowych zdarzały się niejasności i podwójne nazewnictwo dla cząstek praktycznie oraz teoretycznie takich samych. Z czasem tworzywa nazywane pospolicie jak włókna, folia czy też guma przybierały nazwy określające ich skład chemiczny i dla czytelności stawały się polietylenem, polipropylenem czy też poliamidem, a w drugiej kolejności dopiero sposobem ich wykorzystania. Dzieki temu w obecnych pracach najcześciej spotyka się już precyzyjnie określone polimery, opisane nazwą a często również gęstością. Artykuł opisuje ponadto możliwe drogi degradacji mikroplastiku oraz przedstawia to w formie graficznej, wskazując przy tym zarówno procesy tlenowe, beztlenowe jak i udział organizmów żywych (Rysunek 1.) Kompaktowe zebranie danych na temat właściwości polimerów było istotne z perspektywy lepszego poznania problemu badawczego oraz co niezwykle ważne, stanowiło punkt odniesienia dla dalszych prac, aktualizacji danych oraz porównywania wyników z innymi publikacjami.


Rozprawa doktorska

Biodegradation in aerobic conditions



Rysunek 1. Możliwości degradacji polimerów z uwzględnieniem procesów tlenowych i beztlenowych

Przedstawione na rysunku dane opisujące możliwe drogi rozkładu tworzyw sztucznych okazały się bardzo niejednoznaczne w kolejnych badaniach oraz w dostępnej literaturze. Jak zostało to opisane w (D.5.), zmiana struktury tworzyw nie jest jednoznaczna z jego biodegradacją i powinna być rozpatrywana względem innych procesów które doprowadziły np. do fragmentacji.

W przedostatnim rozdziale (**rozdział 8**) zamieszczona została pierwsza fotografia mikroplastiku wykrytego w tkankach dżdżownic będąca wstępem oraz kierunkiem dla kolejnych prac. Podobne wyniki uzyskali autorzy Guanghui Xu (Guanghui Xu i in, 2021) opisując możliwość akumulacji mikrocząstek oraz Cui (Cui i in., 2022), jednak w obu tych badaniach, dżdżownice pochodziły z hodowli laboratoryjnej, przez co nie miały możliwości selektywnego wyboru pożywienia oraz miejsca żerowania, a jak udało się wykazać (D.7.) jest to kluczowe w przypadku chęci określenia naturalnych zdolności stresowych dżdżownic, opisanych parametrami biochemicznymi

Głównym celem napisania tego artykułu było zebranie i zestawienie podstawowych informacji na temat nazewnictwa mikroplastiku, sposobów jego degradacji oraz przeglądu literatury względem podobieństw i różnic w jego klasyfikacji.



Artykuł składa się z 24 stron monografii, współautorem pracy jest dr hab. Anna Grobelak, prof. Politechniki Częstochowskiej. Udział % w publikacji : Klimasz Marek (80%), Grobelak Anna (20%). Udział merytoryczny doktoranta w przygotowaniu artykułu obejmował: przegląd literatury, zestawienie najważniejszych danych, analiza treści przydatnych w tej publikacji oraz zredagowanie manuskryptu.

2.2. Migracja mikroplastików w środowisku

(D2.) "Global scale of microplastic occurrence"

Pełne zobrazowanie skali występowania mikroplastiku w środowisku naturalnym jest trudne z wielu powodów. Pierwszy i podstawowy to zastosowanie różnych metod pomiarowych (o których wspomnę wkrótce), drugi to różne miejsca pomiaru, nawet w obrebie jednego obszaru jakim jest morze, czy konkretne ujście rzeki oraz trzeci to data poboru próbek. Efektem tego są rozbieżne dane oraz brak pewności co do aktualnego stanu zanieczyszczeń. Praca ta odnosi się do wyników badań z publikacji (Laurent i in, 2018), (Laurent i in., 2017), (Quiping i in., 2017) oraz zawartych tam danych. To istotne, że jeden zespół badawczy przeprowadził obszerne badania w wielu różnych miejscach na świecie, w określonym- krótkim zakresie czasu oraz przy takiej samej metodyce. Nawet jeśli w chwili obecnej dysponujemy metodyką o podwyższonych parametrach detekcji, może ona stanowić podstawę do interpretacji wyników. Zamieszczony w rozprawie artykuł to głównie liczby, ilość wytwarzanych tworzyw (rozdział 1), los mikroplastiku w wodach (morzach, rzekach i oceanach) (rozdział 3), a także, informacje na temat akumulacji mikroplastiku w organizmach żywych, jego migracja z uwzględnieniem nowych doniesień, czy też dane o zawartości mikroplastiku w glebie. Już w tym artykule pojawiają się rozbieżności danych, które mogą sugerować konieczność ujednolicenia metod pomiarowych. Opisane różnice ilości cząstek na wysoką skalę względem dwóch pomiarów tego samego obszaru sugerują, że obie prace są merytorycznie prawdziwe, jednak w obu zastosowana metoda zmieniła diametralnie wyniki (rozdział 3). Dla zobrazowania - opisanie stężenia na podstawie ilości cząstek jest tak samo błędne jak na podstawie samej masy w objętości jednostki wody. Artykuł purusza też kwestię prognoz dotyczących zarówno produkcji tworzyw jak i odpadów tych tworzyw (rozdział 7). Wcześniejsze założenia, z publikacji sprzed 2018 roku bywały w tej kwestii krytyczne i zakładały ciągły wzrost mierzony rozwojem gospodarczym, wzrostem światowej populacji ludzi oraz wszechstronnością tworzyw, jednak sprawa wydaje się mieć również inne możliwe rozwiązanie. Nowe metody recyklingu, wydajne systemy zagospodarowania oraz

Rozprawa doktorska

tworzywa biodegradowalne mogą mieć realny wpływ na dalsze prognozy i zostały opisane w ostatnim rozdziale monografii. Informacje takie można odnaleźć między innymi w pracy Mashood (Mashood i inn., 2021) opisującej politykę krajów mających znaczący wpływ na produkcję tworzyw oraz tendencję względem wykorzystania tworzyw biodegradowalnych. W skali europejskiej sytuacja wygląda na ogół podobnie, w pracy Stasiškienė (Stasiškienė i inn., 2022) odnajdziemy informację na temat regulacji prawnych oraz przyjętych norm dla produkcji tworzyw oraz procesu zastępowania ich tymi biodegradowalnymi, autorka sugeruje, że od roku 2018 do 2021 wykorzystanie bio-tworzyw wzrósło o 17%, jednak nadal stanowi to poniżej 2% wszystkich produkowanych. Niezgodności informacji mogą pojawiać się również względem informacji zawartych w rozdziale 4, jak sugerują autorzy innej publikacji (Raamsdonk i inn., 2020), stopień przeszacowanie lub niedoszacowania stężenia mikroplastiku jest znaczący. Autorzy powołują się głównie na rozmiar cząsteczek oraz dolną granice określoną na 1 mm, przez co mniejsze cząstki były pomijane- na przykład w analizach ryb, dokumentują również mikroplastiki zawarte w wodzie kranowej czy też butelkowanej. Z tej perspektywy dane w artykule (D.2.) stanowią punkt odniesienia dla skali porównawczej.

Głównym celem tego artykułu, było zebranie aktualnych danych na temat występowania mikroplastiku w ujęciu globalnym i zestawienie wszystkich tych danych w sposób czytelny i przejrzysty. Dodatkowo, poszerzenie wiedzy na temat przyczyn przeszacowania lub niedoszacowania wyników oraz skali prowadzonych badań i kierunków ich działania. Dzięki niemu dowiadujemy się w jaki sposób odmienne metody określają stopień zanieczyszczenia mikroplastikiem oraz jak ważny jest stały monitoring ekosystemu. Kwestią drugorzędową jest zwrócenie uwagi na kraje rozwijające się, skalę problemu jakim są zanieczyszczone tam rzeki czy grunty oraz konsekwencje takich działań. Zamieszczona ilustra (Rysunek 2.) przedstawia najbardziej zanieczyszczone rzeki, w których przprowadzone były pomiary mikroplastiku oraz skalę tego zjawiska w odniesieniu globalnym.





Rysunek 2. Kolorem czerwonym zaznaczono najbardziej zanieczyszczone rzeki świata, odpowiedzialne w głównej mierze za obecność mikroplastiku w oceanach

Artykuł składa się z 14 stron monografii, współautorem pracy jest dr hab. Anna Grobelak, prof. Politechniki Częstochowskiej. . Udział % w publikacji : Klimasz Marek (70%), Grobelak Anna (30%). Udział merytoryczny doktoranta w przygotowaniu artykułu obejmował przegląd aktualnych publikacji, zestawienie oraz prównanie dostępnych danych, a także redagowanie artykułu.



2.3. Oczyszczanie ścieków jako źródło mikroplastiku w środowisku

(D.3) "Oczyszczanie ścieków jako źródło mikroplastiku w środowisku"

Artykuł został przyjęty do publikacji w wydawnictwie Politechniki Częstochowskiej i przedstawia oczyszczalnie ścieków jako źródło zanieczyszczenia gleby i środowiska mikroplastikiem. Celem tego artykułu było ukazanie jednej z możliwości rozprzestrzeniania się cząsteczek polimerów za sprawą oczyszczalni ścieków, porównanie wydajności filtracyjnych przy zastosowanie drugiego i trzeciego stopnia oczyszczania, a także wpływ wykorzystania osadów ściekowych w poszczególnych krajach na wzrost stężenia mikroplastiku na tych terenach. To niezwykle istotne, w jaki sposób badania dowiodły korelacji zastosowania osadów i stopniowego wzrostu stężenia, w kontekście regulacji prawnych, które ściśle wytyczają nowe ograniczenia dla surowców naturalnych, przez co właśnie osady stają się cennym produktem gospodarki rolniczej. Założenia mówiące o obniżeniu wykorzystania pestycydów o 50% do roku 2030 (Zawarte w Ustawie o Zielonym Ładzie – "Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady, Europejskiego Komitetu Ekonomiczno -Społecznego i Komitetu Regionów") wywołały poruszenie w gospodarce surowców oraz wpłynęły na szereg badań mających na celu sprawdzenie rzeczywistego zagrożenie ze strony stosowania osadów ściekowych. Sugurbekova (Sugurbekova i inn., 2023) sugeruje, że doświadczenie krajów stosujących na szeroką skalę osady pozwoli na wykorzystanie ich nawet w 60% w rolnictwie, co wydaje się być bardzo wysokim wskaźnikiem, przedstawia ponadto możliwe procesy obróbki osadów, aby stały się bezpieczniejsze dla środowiska. Przedstawiona w artykule tabela (Tabela 4.) ukazuje kierunek zagospodarowania osadów ściekowych w Polsce oraz zmiany zachodzące na przestrzeni ostatni lat względem ich wykorzystania.



Rozprawa doktorska





Wyszczególnia również ustawy normy i regulacje dotyczące zastosowania osadów ściekowych w Polsce oraz powołując się na ustawę (art.3., ust.1 pkt. 28), która jasno przedstawia jakie sposoby zagospodarowania są dostępne w kraju. Aby jednak w sposób generalny zrozumieć problematykę związaną z osadami ściekowymi, w artykule przedstawione zostały informacje na temat zagrożeń płynących z ich stosowania. Pierwszym i kluczowym z punktu widzenia tej pracy to mikroplastik, jednak autorzy wskazują ponadto wysokie stężenia metali ciężkich, zawartość toksyn, jaj pasożytów i innych substancji, które są wysoce niekorzystne dla gleb rolniczych. Udokumentowane ilości mikroplastiku w osadach ściekowych w objętości kilograma przedstawiono w tabeli 5. Pełna tabela opisująca również pozostałe kraje wraz z literaturą znajduje się w załączonym artykule (D.4.).

Tabela 5. Średnia ilość cząsteczek mikroplastiku w osadach ściekowych opisana na podstawie analizy wybranych oczyszczalni ścieków (D.4.)

Kraj	Rozmiar mikroplastiku	Stężenie mikroplastiku	Odniesienie do literatury	
	[µm-mm]	[w cząstkach na kg-1]	ouniesienie do delucity	
Holandia	0,7 µm -5 mm	370 - 950 cz/kg ⁻¹	Lessie i in. 2017, s. 133-142	
Szwecja	300 µm -5 mm	16,7 - 10 cz/kg ⁻¹	Magnusson i Norén 2014	
Niemcy	<5 mm	1 000- 24 000 cz/kg ⁻¹	Mintening i in. 2014	
Norwegia	54 µm - 5 mm	6 077 cz/kg ⁻¹	Lusher i in. 2018	



Irlandia	250 µm - 4 mm	4 196- 15 385 cz/kg ⁻¹	Mahon i in. 2017, s. 810-818	
Wielka	<1 62 mm	2 000 cz/kơ ⁻¹	Murphy i in. 2016, s. 5800-	
Brytania	1,02 1111	2 000 02/16	5808	
Włochy	0,5 µm -1 mm	113 000 cz/kg ⁻¹	Magni i in. 2019, s. 602-610	

Artykuł ma na celu zobrazowanie szerokiej dyskusji, która dotyczy wykorzystania osadów ściekowych w rolnictwie. Przedstawione tam dane oraz argumenty wskazują zarówno na zalety jak i wady ich stosowania poparte konkretnymi przykładami. Dodatkowo dostrzec można różnice wynikające ze skali ich stosowania w różnych krajach i bezpośredniego wpływu na wzrost stężenia mikroplastiku w glebie. W tej perspektywie, nawet wydajny proces filtracyjny oczyszczalni ścieków dysponującej II oraz III stopniem oczyszczania, wydaje się nie być wystarczającym dla powstrzymania ekspansji tworzyw do środowiska.

Praca składa się z 13 stron monografii, współautorem pracy jest dr hab. Anna Grobelak, prof. Politechniki Częstochowskiej, . Udział % w publikacji : Klimasz Marek (60%), Grobelak Anna (40%). Udział merytoryczny doktoranta w przygotowaniu artykułu obejmował: analizę procesów zachodzących w oczyszczalniach ścieków, aktualnych normy prawnych dotyczących skuteczności filtracji, określenie skali występowania mikroplastiku w oczyszczalni ścieków oraz opisanie zebranych informacji w formie publikacji naukowej.



2.4. Mikroplastik w glebach

(D.4.) "Methods for separation and classification of microplastics in soil,

Artykuł nawiązuje do aktualnej problematyki związanej z detekcją mikroplastiku w glebie. W artykule znajdują się informacje o zanieczyszczeniu gleby tworzywami, źródłach tych zanieczyszczeń oraz dane w ujęciu globalnym oszacowane stężenia mikroplastiku w różnych rejonach świata. Poruszone są tematy, które uważam za kluczowe w kwestii wykrywania mikroplastiku- złożoność oraz zmienność gleby i metody pomiarowe. Według cytowanych w pracy autorów, zastosowanie w odpowiedniej konfiguracji odczynników, w przypadku separacji gęstościowej, może okazać się wysoce skuteczną metodą badawczą, jednakże w kontekście ogólnym nasuwa się bardzo wiele pytań. Jak wiele różnych metod zostało zastosowanych i w ilu wariantach, jaka jest dokładność pomiarowa, jaka jest pewność, że oszacowane- przykładowo 90% mikroplastiku jest rzeczywistą miarą, skoro nie uwzględniona została granica wielkości cząsteczkowej. Dodatkowo warto przyjrzeć się też samemu procesowi pobierania próbek z gleby - biorąc pod uwagę areał o powierzchni 1 hektara (ha) należy określić, ile próbek pobrać, z jakiej głębokości, uwzględnić również nachylenie (przenoszenie mikroplastiku przez wody powierzchniowe) oraz porę roku. Badania prowadzone przeze mnie na uczelni - jako dodatkowa kwestia, objęły także analizę roślin, kiełkujących w kontenerach, w których znajdowały się uprzednio dżdżownice w glebie z zawartością mikroplastiku. Siewki (około 8 cm) które poddano analizie mikroskopowej wykazały obecność mikroplastiku w łodydze oraz liściach- polietylen niskiej gęstości, o właściwościach fluorescencyjnych. Tym samym, badanie gleby w okresie intensywnego wzrostu roślin, w tym zbóż - może wiązać się z częściową translokacją tworzywa i zmieniać odczyt i wyniki główne. W tym przypadku należy, dla każdego rodzaju gleby oraz obszaru- zróżnicować metodykę pomiarową oraz wziąć poprawkę na obecną tam roślinność. W przypadku lasów kwestia wydaje się o wiele bardziej złożona, jednak tutaj brak dostatecznej ilości wyników, aby poruszać kwestię skuteczności. W rozdziale dotyczącym separacji gęstościowej (rozdział 3), wymienionych zostało wiele odczynników, dzięki którym możliwe jest zastosowanie metody polegającej na



wyizolowaniu tworzywa z gleby, na zasadzie różnych w ich gęstości i tym samym wyporności. Analizy przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej zakładały wykorzystanie wyłącznie odczynników bezpiecznych dla środowiska, o wysokiej skuteczności opisanej na podstawie większej ilości literatury oraz niskiej cenieprzez co jego komercyjne wykorzystanie byłoby uzasadnione. Roztwory wolframianu sodu, chlorku sodu, etanolu oraz wody dejonizowanej testowane były dla gleby rolniczej w kilku wariantach. Dla gleby czystej, stosowanej w dalszych pracach (D.6.), (D.7.) jako próba kontrolna, oraz dla gleby z mikroplastikiem, ta z kolei zawierała próby świeże- zmieszane na kilka godzin przez próbą separacji, oraz próby kilkumiesięczne, pochodzące z pojemników wykorzystywanych do hodowli dżdżownic w skali mikro (D.5.). Badanie obejmowało proces homogenizacji, wytrząsania oraz zliczania tak, jak sugerują autorzy, jednak wyniki były diametralnie różne, z szeregiem nasuwających się wniosków i obserwacji. Polietylen wykazywał wysoką polarność przez co przylegał do ścian naczyń, zastosowanie tkanin filtracyjnych czy membran obarczone jest wysokim prawdopodobieństwem pominięcia drobnych fragmentów. Etylen o stężeniu (99,7%) przy dłuższej ekspozycji odbarwiał cząstki oraz według autorów- może wpływać na przyspieszenie fragmentacji. Wyniki badań względem separacji gęstościowej, przy zastosowaniu mieszaniny mikroplastików opisanych w (D.5.) - polietylen, polipropylen, poliamid, politereftalanu etylu w formie zmieszanej oraz wielkościach poniżej 1 mm i dolnej granicy wynoszącej 43 mikrometry dały maksymalne wyniki na poziomie około 65% w przypadku świeżo wymieszanej frakcji oraz poniżej 40% w przypadku mikroplastiku zawartego w glebie kilkumiesięcznej. Istotne jest, że próbki gleby po tym badaniu, poddane analizie mikroskopowej wykazały cząsteczki tworzywa (tych, o właściwościach fluorescencyjnych) przez co należy zakładać pewne błędy pomiarowe. Istnieje potwierdzenie dla tych badań, mówiące o łączeniu się tworzyw z materiałem organicznym (Thomas i inn., 2020), o tworzeniu agregatów glebowych oraz o polarności względem innych związków (Reverón i inn., 2022), przez co zwiększa się masa, a separacja gęstościowa przestaje być skuteczną metodą. Część z tych badań zawdzięcza wysoką skuteczność wielkości samych tworzyw, gdzie opisane cząstki mają 1-5 mm (Prosenc i inn., 2021) przez co są o wiele łatwiejsze do wykrycie niż te, wielkości poniżej 1 mm. Kompletny przewodnik usuwania mikroplastiku został opublikowany przez Rani (Rani i in.,



Rozprawa doktorska

2023) w którym autorzy wskazują wiele metod pomiarowych, w tym takie o skuteczności odczynnikowej w przedziale około 50% - 95% (Tabela 6) oraz zastosowanie odpowiedniej ilości filtrów mających za zadanie podniesienie skuteczności.

Odczynnik	Rodzaj gleby	Czas trawienia [h]	Temp (°C)	Szacowana
				skuteczność
NaOH	piasek gliniasty	24	60	35-70%
КОН	piasek gliniasty	24	60	>35
65% HNO₃	gleba zalewowa	48	60	> 90%
96% H ₂ SO ₄	gleba zalewowa	24-72	90	> 95%
30% H ₂ O ₂	ziemia rolnicza	24	60	> 90%
H_2O_2	osad	168	60	> 60
odczynnik Fentona	piasek gliniasty	24	40	> 60

Tabela 6. Skuteczność odczynników w procesie separacji gęstościowej mikroplastiku

Artykuł powstał w celu ukazania jak głębokim wyzwaniem staje się obecność mikroplastiku w glebie. Inżynieria środowiska, która zajmuje się miedzy innymi przywracaniem gleby do jej pierwotnych właściwości oraz rekultywacją, w tym przypadku jest dziedziną bardzo mało poznaną i wciąż nie zna odpowiedzi na wiele pytań. Jak opisano w (D.2.) skala tego zjawiska będzie się powiększała z uwagi na rosnące zainteresowanie wykorzystaniem osadów ściekowych oraz coraz bardziej restrykcyjne normy Zielonego Ładu oraz Gospodarki Obiegu Zamkniętego.

Artykuł składa się z 12 stron monografii. Udział % w publikacji : Klimasz Marek (80%), Grobelak Anna (20%). Udział merytoryczny doktoranta w przygotowaniu artykułu obejmował: zebranie najważniejszych oraz aktualnych informacji dotyczących obecności mikroplastiku w glebie, porównanie dostępnych publikacji naukowych oraz redagowanie tekstu artykułu.



2.5. Wpływ mikro i nanoplastiku na dżdżownice

(D.5.) "Effects of microplastics on selected earthworm species"

W artykule tym wykorzystane zostały gatunki dżdżownic *Lumbricus terrestris, Dendrobaena veneta, Eisenia andrei, Eisenia fetida* oraz *Aporrectodea caliginosea* (Rysunek 3.) w celu określenia parametrów biochemicznych po ekspozycji na mikroplastik. Osobniki do hodowli zachowawczej pochodziły częściowo z hodowli komercyjnej w Polsce jak również zostały pozyskane z Katedry Bezkręgowców Uniwersytetu Jagiellońskiego, z której uzyskano dodatkowo wsparcie w determinacji gatunkowej oraz publikacje dotyczące ich fizjologii na podstawie przeprowadzonych tam badań.



Rysunek 3. Wykorzystane w badaniach gatunki dżdżownic, kolejno od lewej L. terrestris, D. veneta, A. Caliginosa, D. andrei, E. fetida (fot. Marek Klimasz).

Celem badania było natomiast porównanie wszystkich tych gatunków względem wrażliwości wobec różnych rodzajów mikroplastików. Według naszej ówczesnej wiedzy, było to jedno z pierwszych badań, w którym wykorzystano zmieszaną frakcję mikroplastiku, a także zmienne warunki hodowlane dla zobrazowania wynikających z tego różnic, co schematycznie przedstawione zostało na rysunku 4.

Gatunki	Cza	as	Mikroplastiki	\rightarrow	Wpływ na
Eisenia fetida					
Eisenia andrei					stres oksydacyjny
Aporrectodea cliginosea		1 miesiąc	PET PE		respirację
I umbrique tarrostris			PS	PA	przeżywalność
Luntoricus terrestris	(3 miesiące			florę bakteryjną
Dendrobaena veneta	\rightarrow	/			

Rysunek 4. Schemat graficzny artykułu, oznaczonego w załączniku jako D.5

Zastosowany w badaniu pilotażowym mikroplastik o wielkości 1-5 µm, 10-20 µm, 32 -38 µm, 38-45 µm, 53-63 µm pochodził z Cospheric LLC, (dokładne właściwości zostały opisane w rozdziale o materiałach i metodach, (D.5, D.7.), o właściwościach fluorescencyjnych i był testowany jeszcze przed docelowym badaniem w celu prześledzenia drogi migracji cząstek z gleby do ciała dżdżownicy i określenia dokładnego położenia- mapowania przestrzennego. Po uzyskaniu wstępnych wyników, wskazujących, że po około 30 dniach istnieje prawdopodobieństwo wykrycia cząstek w tkankach, nastąpiło badanie główne, zakładające wymieszanie różnych tworzyw, o różnej wielkości w pojemnikach przygotowanych hodowli. Według licznych autorów wpływ bezpośredni na dżdżownice jest negatywny, może być toksyczny i prowadzi do spadku masy oraz zwiększenia stopnia śmiertelności (Baloš i inn., 2024). Wielu badaczy prowadziło ponadto badania w tej przestrzeni, opisując wpływ na reprodukcję czy też stres oksydacyjny (Trakić i in., 2024), jednak w pewnym stopniu chciałbym podważyć te badania, opierając się na wynikach własnej analizy. Trakić wraz z autorami zastosowali pojemniki, w której objętość gleby wynosiła 300g, Baloš 500g, Rodríguez (Rodríguez i in., 2023) zastosowała 400 gram gleby, co z perspektywy przeprowadzonych przez nas badań jest próbą niemiarodajną. Różnice przypadku akumulacji cząstek mikroplastiku W przedstawione w tabeli w (D.7.) wskazują jasno, że objętość pojemników jest kluczowym elementem dla rzeczywistego obrazowania zmian zachodzących w organizmach tych bezkręgowców. Niemniej, przeprowadzone badanie miało na celu wyłonienie dwóch najlepiej przystosowanych gatunków, zatem informacje z hodowli laboratoryjnej traktowano jako wzorzec. W badaniach wykorzystano respirometr Echo, przeznaczony do badania respiracji bezkręgowców dla oszacowania wpływu mikroplastiku na wymienię gazową, co było innowacyjnym badaniem, przykładowe wyniki przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Wyniki badań respiracji *D. Veneta* po okresie jednego miesiąca (z lewej) oraz po 3 miesiącach (z prawej), szczegółowe dane zawarto w (**D.5.**)

Rozprawa doktorska

Biorąc pod uwagę fizjologię dżdżownic oraz sposób wymiany gazowej, uzyskane dane nasuwają wiele pytań o dokładny wpływ mikroplastiku na organizmy oraz o mechanizmy, odpowiedzialne za zaburzenie tych procesów. Są to jednak aspekty biologiczne, które nie stanowiły dalszego kierunku prac. Niemniej w tabeli 7 zobrazowano procentowo różnice w wydajności respiracji dżdżownic, z uwzględnieniem stężenia mikroplastiku, rodzaju, a także czasu ekspozycji.

Gatunek	Stężenie (w/v %)	1 miesiąc	3 miesiące	
E. andrei	0,1%	-19,56%	- 28,25%	
	1%	- 38,69%	- 69,73%	
E. fetida	0,1%	- 22,58%	- 26,18%	
	1%	- 40,13%	- 69,97%	
A. caliginoesa	0,1%	- 37,60%	- 46,00%	
U	1%	- 57,54%	- 60,32%	
L. terrestris	0,1%	- no changes	- 10,26%	
	1%	- 28,57%	- 36,16%	
D. veneta	0,1%	- 13,47%	- 12,88%	
	1%	- 37,82%	- 61,59%	

Tabela 7. Wpływ różnych wariancji mikroplastiku na respirację dżdżownic

Mając na uwadze złożoność tematu jakim może być wpływ poszczególnych czynników na procesy biochemiczne, wykonano również analizy na stężenie pośrednich markerów stresu oksydacyjnego (Rysunek 6.) oraz ogólnej przeżywalności gatunkowej (Rysunek 7). Pomimo faktu, iż literatura wyszczególnia związki takie jak dialdehyd malonowy, czy też grupy wodorotlenkowe jako markery stresu, w tym badaniu zastosowano S-transferazę glutationową, która jest metodą relatywnie szybką oraz skuteczną w ocenie stresorów środowiskowych.



Rysunek 6. Wpływ mikroplastiku na stres oksydacyjny u wybranych gatunków dżdżownic. Dokładne dane wraz z opisem znajdują się w **D.5**.

Rozprawa doktorska

Wyniki badań pozwoliły wskazać gatunek, dla którego obecność tworzyw sztucznych w glebie stanowi największe zagrożenie (*A. caliginosea*) oraz te, dla których nie miało to istotnego znaczenia (L.terrestris, *D. Veneta*). Dodatkowo wyniki te pokrywały się z pozostałymi analizami będąc zgodnymi co do gatunków oraz ich wrażliwości na zanieczyszczenie gleby mikroplastikiem. Dyskusja na temat śmiertelności dżdżownic wystawionych na ekspozycje tworzyw jest szeroka, Liu (Liu i inn., 2022), Lwanga (Lwanga i in., 2019) wskazują na róże przyczyny oraz wskaźniki śmiertelności, ale wciąż pozostaje jeden kluczowy aspekt, w każdym z wymienionych tutaj badań jak i w większości referencji w (D.4.), (D.5.), (D.7.) wykorzystany został jeden rodzaj tworzywa sztucznego. Tym samym, badaniach dotyczących rozprawy doktorskiej przenalizowano wpływ mikroplastiku zarówno w oddzielnych frakcjach jak i w zmieszanych, na wszystkie gatunki, w odpowiednich stężeniach oraz w dwóch zakresach czasu.



Rysunek 7. Wpływ mikroplastiku na przeżywalnośc gatunkową, dokładny opis wszystkich gatunków znajduje się w załączniku nr 5 (D.5.)

ldąc dalej w tym kierunku, przeprowadzono badania flory bakteryjnej dżdżownic w celu sprawdzenia różnic w obfitości bakterii jelitowych. Celem badania było poznanie histopatologicznych zmian jelita oraz w sposób czytelny i jasny zobrazowanie tego pod postacią posiewów bakteryjnych. Dane z badań mikrobiologicznych pozwoliły stwierdzić, że obecność tworzyw w jelitach wpływa na florę bakteryjną i przyczynia się do jej zubożenia w stopniu zależnym od stężenia cząstek (Rysunek 8.). Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (Lia i inn., 2024), opisujący szereg zmian jelitowych wywołanych między innymi polistyrenem, (Fu i in., 2024) opisując zmniejszenie flory bakteryjnej oraz namnożenie bakterii patologicznych, oraz w badaniach Yang (Yang i inn., 2022) opisując nagromadzenie



się jelitach metali ciężkich na skutek obecności mikroplastiku. Istnieją ponadto doniesienia, dokumentujące brak zmiany ilościowej, ale zmianę jakościową bakterii jelit dżdżownic na skutek działania tworzywa (Wang i inn., 2019).



Rysunek 8. Wpływ mikroplastiku na florę bakteryjną dźdżownic po w próbie kontrolnej (z lewej), przy 0,1% stężenia mikroplastiku (zdj. środkowe) oraz 1% stężenia (zdj. z prawej)

Podsumowując, artykuł ukazuje wpływ różnych rodzajów mikroplastiku, w różnym stężeniu oraz w różnym zakresie czasu na wszystkie objęte badaniem gatunki dżdżownic, należących do odmiennych grup ekologicznych. Pomimo faktu, że dostępnych jest wiele publikacji dotyczących podobnego zagadanienia, w tym badaniu osobniki poddane wszystkie były takim samym warunkom eskperymentalnym, а innowacyjnością było zastosowanie mieszaniny mikroplastików. Uzyskane wyniki w wiarygodny sposób potwierdziły dostępne literaturze informacje pozwoliły na wybranie gatunków i nailepiej w przystosowanych do życia w glebie zanieczyszczonej mikroplastikiem. Gatunkami tymi są L. terrestris oraz D. veneta, które w artykułach D.6. oraz D.7. posłużyły do mapowania przestrzennego oraz analiz statystycznych obejmujących korelacje stężeń w glebie i tkankach. Dla wszystkich gatunków stężenie 1% mikroplastiku miało znaczący, negatywny wpływ przejawiający się podwyższonym stężeniem GST, zmniejszonym współczynnikiem przeżywalności osobniczej, a także znacznym zubożeniem obfitości flory bakterynej na podstawie przeprowadzonych posiewów mikrobiologicznych. Szczegółowe informacje dotyczące parametrów uzyskanych w badaniach, specyfikacji wykorzystanej aparatury oraz przebiegu eksperymentu znajdują się w artykule numer 5 (D.5.).

Artykuł składa się z 27 stron opisowo-badawczych, współautorem pracy jest dr hab. Anna Grobelak, prof. Politechniki Częstochowskiej. Udział % w publikacji : Klimasz



Marek (80%), Grobelak Anna (20%). Udział merytoryczny doktoranta w przygotowaniu artykułu obejmował: przygotowanie osobników, przeprowadzenie eksperymentów oraz badań, zbiór wszystkich danych oraz ich opracowanie, a także redagowanie pracy.

2.6. Zastosowanie mikroskopii ramanowskiej w celu mapowania mikroplastiku i nanoplastiku w tkankach dżdżownic

(D.6.) "Accumulation of spherical microplastic in earthworm tissuesmapping using Raman microscopy."

Artykuł został opublikowany w czasopiśmie Applies Science i opisuje zastosowanie mikroskopii ramanowskiej w detekcji mikroplastiku oraz przedstawia szereg ilustracji dla pełniejszego zobrazowania wyników. Akumulacja w tym przypadku oznaczała trwałe haczykowanie cząstek tworzywa w mięśniach, tym samym w tkankach dżdżownic i została potwierdzona z wykorzystaniem niestandardowych ustawień aparatury pomiarowej. Mikroskopia ramanowska opisywana wcześniej w pracy posłużyła jako narzędzie do określenie wielkości cząstek tworzywa oraz widma emisji (Rysunek 9.) dla poszczególnych tworzyw oraz mapowania przestrzennego, co okazało się wyjątkowym wyzwaniem.



Rysunek 9. Widma emisji oraz piki wzbudzenia dla wykorzystanego tworzywa

Tkanka przygotowana do analizy pomimo relatywnie niewielkich rozmiarów, z perspektywy aparatury wydawała się znacząco gruba oraz duża, konieczne więc było jej pocięcie oraz wstępne oznaczenie mikroplastiku mikroskopią optyczną w badaniu pilotażowym. Zdjęcie poniżej (Rysunek 10.) przedstawia przykładowy fragment tkanki *Aporrectoda caliginosea*, przed oznaczaniem mikroskopowym.





Rysunek 10. Tkanka *A.caliginosea* przygotowana pod skaning mikroskopowy dla wstępnego oznaczenia mikroplastiku w badaniu pilotażowym

Dodatkowym wyzwaniem okazały się ustawienia kolejno linii lasera i wzbudzenia fali, wykorzystane obiektywu o konkretnym powiększeniu, dobranie rozdzielczości spektralnej, liczny akumulacji, czasu widma, mocy promieniowania lasera, kroków pomiarowych, rozdzielczości przestrzennej oraz gęstości próbkowania. Należy również wspomnieć, że każdy rodzaj tworzywa charakteryzuje się różnym widmem, a ponadto tkanka dżdżownic również wykazuje właściwości fluorescencyjne (Rysunek 11.), przez co należało określić jego dokładne parametry, aby w kolejnych badaniach mogło ono zostać uznane jako tło pomiarowe i również w tych miejscach lokalizowane tworzywa sztuczne.

Wykonano wielokrotność pomiarów w niskiej gęstości próbkowania oraz szerokim zakresie widma dla uzyskania różnych obrazów fluorescencji tkanki, dzięki czemu zostały one wykorzystane jako tło w kolejnych badaniach.



Rysunek 11. Naturalnej fluorescencja tkankowej tkankowa dźdżownie o obrazie mikroskopii ramanowskiej

Zastosowanie mikroskopii ramanowskiej zdaje się być powszechne i wykorzystywane również w kontekście mikroplastiku. Rytelewska i Dąbrowska (2022) opisały oznaczenie tą metodą różnych tworzyw jednak wszystkie one były wyizolowane, przez co można wykorzystać bazę określającą spektralnie dane tworzywa i dokładnie precyzować jego właściwości. W innych badaniach Jurkowski (Jurkowski i in., 2024) opisuje zastosowanie mikroskopii ramanowskiej wraz



aparaturą FTIR do szacowania właściwości mikroplastiku, a także Miserli (Miserli i in., 2023); jednak autorzy żadnego z powyższych badań nie dostarczyli pełnych ilustracji, dokumentującej zawartość mikroplastiku w tkance, a jedynie udokumentowali z wyizolowanego już materiału, badając najczęściej czyste tworzywo o znanych właściwościach i strukturze. W opublikowanym artkule zostały przedstawione zarówno rysunki przedstawiające tkanki czyste- bez zawartości tworzyw sztucznyczn określane dalej jako kontrola (Rysunek 11), jak i rysunki dokumentujące mikroplastik w tkanke (Rysunek 12).

Wykonanie wielu powtórzeń, w różnych zakresach widma pozwoliło na prezycyjne określenie zawartości tworzywa oraz jego przestrzennej lokalizacji. Kolejny Etap prac obejmował analizę jakościową dla szczegółowego określenia składu chemicznego i tym samym rodzaju mikroplastiku.



Rysunek 12. Fotografie mikroplastiku w tkankach dźdżownic z zaznaczonym obszarem pomiaru

Artykuł składa się z 13 stron opisowo-badawczych, współautorem pracy jest dr hab. Anna Grobelak, prof. Politechniki Częstochowskiej. Udział % w publikacji : Klimasz Marek (65%), Grobelak Anna (35%). Udział merytoryczny doktoranta w przygotowaniu artykułu obejmował: przygotowanie tkanek, ustalenie parametrów aparatury pomiarowej, przeprowadzenie badań, wykonanie fotografii oraz opisanie uzyskanych wyników.



2.7. Mapowanie mikroplastiku w tkankach dżdżownic jako metoda oceny zanieczyszczenia środowiska

(D.7.) "An evaluation of the quantitative concentration of microplastic in Dendrobaena veneta and Lumbricus terrestris tissues from laboratory and environmental culture"

Artykuł został opublikowany w czasopiśmie Science Applied i opisuje metodę oszacowania stężenia mikroplastiku w glebie na podstawie analizy tkankowej dżdżownic oraz modelowanie matematyczne dla potwierdzenia korelacji stężenia mikroplastiku w glebie/tkankach. Podstawowym parametrem, będącym wyjściowym dla wszystkich prac było opisanie oraz udokumentowanie czystości prób kontrolnych- tych, będących w hodowli o takich samych parametrach, lecz w glebie bez mikroplastiku. Jak wynika z artykułu o metodach separacji mikroplastiku w glebie (D.4.), oszacowanie takie jest bardzo trudne, tym samym próby wyizolowania mikroplastiku z gleby, która na pozór jest czysta nie przyniosło zakładanego skutku, przy wartościach zbliżonych do zera. Stwierdzenie, że dżdżownice przebywają w "czystej" glebie zdawało się nie być wystarczające dlatego przeprowadzono szereg analiz optycznych dla potwierdzenia braku tworzyw w tkankach (Rysunek 13.) Wykonano naświetlenia oraz pomiary dla linii wzbudzenia lasera 522 nm, obiektywie 50x, obszarów 1000 µm na 1000 µm, przy gęstości 10 µm, w żadnej z prób nie zidentyfikowano i nie określono widma pasującego do wykorzystywanych w badaniach tworzyw.





Rysunek 13. Fotografie prób kontrolnej dla tkanki D.veneta. (D.6.)



Rysunek 14. Wykorzystanie mikroskopii ramanowskiej dla zobrazowania przesunięcia widma dla wybranych tworzyw (rysunek nie będący częścią publikacji)

Próby kontrolne stanowiły punkt odniesienia dla dalszych analiz, które łącznie mają opisać metodę detekcji mikroplastiku w tkankach. Próby badawcze natomiast w kwestii warunków hodowli, poboru osobników oraz procesu przygotowania opisano szczegółowo w (D.7.), i w pełni zgodne są z ogólnie przyjętymi warunkami hodowli dżdżownic, które opisali również Tourinho (Tourinho i in., 2021), Zhang (Zhang i inn., 2020), Judy (Judy i inn., 2019) zarówno dla badań nad mikroplastikiem jak i w przypadku innych czynników stresowych jak metale ciężkie (Zhou i inn., 2020). W dalszych częściach artykułu opisane zostały specyficzne ustawienia parametrów analitycznych mikroskopu, o zmiennych obiektywach, zakresie widma oraz barwie filtrów. Metoda ta została opracowana na podstawie dostępnych publikacji, w których autorzy sugerują zarówno wykorzystanie ogólne mikroskopui jak i możliwości udoskonalenia metod optycznych; (Kotar i inn., 2022), (Cowgera i inn., 2020), mowa tutaj zarówno o cząstkach plastiku pobranego z próbek wody czy gleby, ale też mikroplastiku "atmosferycznego", coraz częściej pojawiającego się w



publikacjach (Lou i inn., 2022). Badania zakładały wykorzystanie przystawek mikroskopowych, kamer, filtrów oraz oprogramowania, pozwalającego na szybką identyfikację tworzywa (bez określenia struktury) na podstawie emisji barwy widzianej zarówno przez okular jak i przez program komputerowy. Tym samym, analizując wybrane rodzaje mikroplastiku (polietylen, polistyren, poliamid, politereftalan etylu) zostały określone ich właściwości świetlne co zostało przedstawione w (D.7.). Tkanki dżdżownic przygotowane jak w (D.6.), zostały wstępnie przebadane mikroskopowo, następnie zliofilizowane pod aparaturę FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy analysis) gdzie wykonano wszystkie pomiary (Rysunek 15). Analiza ta przeznaczona do oznaczania i wytyczania charakterystycznych pików dla poszczególnych materiałów i kompozytów, w tym badaniu analizowła próbki sproszkowanych tkanek, przez co początkowe widma zawierały silne tło.



Rysunek 15. Charakterystyczne widma FTIR dla polietylenu, którego piki rozpoznawalne to 2914, 2847, 1466, 716, oraz tło w postaci pików nie związanych z tworzywem (D.7.)

Początkowo planowane było usuwanie całości tła, zbędnego w tym badaniu- dla potwierdzenia czystości tworzywa w tkance, jednak ostatecznie zdecydowano o pozostawieniu. Taki wykres w pełni obrazuje obecność tworzywa w materiale biologicznym i nawet jeśli któreś z pasm są niewidoczne poprzez tło tkanki, jest to nadal wiarygodny pomiar, mogący być przydatnym dla tego typu pomiarów. Tworzywa "czyste"- niezwiązane z żadną substancją bądź materią opisywane są szeroko przez literaturę, która potwierdza również uzyskane piki tworzyw, lecz nie obejmuje pozostałych wskazań (tła) na przykład Xu (Xu i inn., 2019), Campanale



(Campanale i inn., 2020) oraz w publikacji tej samej autorki zakres widm dla poszczególnych rodzajów tworzyw, Campanale (Campanale i inn., 2023).

Znając już ogólne założenia metodyczne przeprowadzone zostały badania obu gatunków jednak z dwóch znacznie różniących się prób. Pierwsza próba opisywana również w (D.5.), w skali laboratoryjnej (zwanej dalej- mikroskalą) oraz próba zewnętrzna (zwana makroskalą) dla osobników umieszczonych w kontenerach o wielkości 360 litrów (L), znacznej objętości gleby i swobodzie poruszania się. Mikroplastik w zmieszanej frakcji został dodany w sposób nieregularny względem gleby, aby dać szanse dżdżownicom na selektywne wybieranie miejsca żerowania oraz- omijania miejsc o silniejszym zanieczyszczeniu. Wyniki tych badań znacznie różnią się od często opisywanych i naszym zdaniem, stanowią interesujący przedmiot do dyskusji na temat poprawności badań laboratoryjnych. Analizując tkanki dżdżownic hodowli mikro i porównując je do hodowli makro zaobserwowano różnice w liniowości stężenia, osobniki w małych pojemnikach (3 L) zmuszone nijako do pobierania tworzyw sztucznych wraz z pożywieniem wykazywały wzrost funkcji liniowej, natomiast te z hodowli makro tylko do momentu o podwyższymy stężeniu mikroplastiku w kontenerze. Nasuwają się zatem wnioski, że mikroplastik o relatywnie niewielkim stężeniu może nie być wyryty przez dżdżownice w czasie żerowania, oraz że są one zdolne do celowego omijania obszarów o zwiększonym stężeniu. Dokładne wyniki oraz porównanie zostało przedstawione w (D.5.) oraz na załączonych w artykule wykresach.



Rysunek 16. Porównanie stopnia akumulacji tkankowej dla sumy przebadanych tkanek względem stężenia mikroplastiku w glebie u *D. veneta.*



Rozprawa doktorska

Próby wykazały, że przy średnim stężeniu przekraczającym 0,6% (przelicznik suchej masy), dżdżownice omijają miejsce żerowania co przekłada się na spadek akumulacji większości rodzajów tworzyw. Jednak jeden parametr jakim w tym przypadku było stężenie mikroplastiku w glebie nie jest wystarczający do opisania korelacji. Istotne są również wielkości tychże tworzyw. Jak podają autorzy Pandey (Pandey i inn., 2023), Gautama i Anbumani (2023), Marco (Marco i inn., 2023), dżdżownice odżywiają się selektywnie, co oznacza, że nie zawsze połykają tworzywa będące w glebie oraz, co się z tym wiąże, wielkość samych cząstek może być kluczowa. Podążając w tym kierunku, w artykule (D.7.), przeprowadzone kolejne badanie, które rzuca światło na rozmiar cząsteczkowy akumulowanych w tkankach tworzyw. Badanie to miało na celu zobrazowanie wszystkich wielkości tworzyw wykrytych w tkankach oraz porównanie ich do tworzyw dodanych do gleby.



Rysunek 17. Porównanie wielkości cząstek wykrytych w tkankach, do wielkości cząstek dodanych do gleby (D.7.)

Do gleby dodane zostały tworzywa o różnej wielkości zaliczane według klasyfikacji do mikroplastiku oraz nanoplastiku, jednak żadne z pierwszej klasy nie zostały wykryte, tym samym dla czytelności tabeli, górną granicę umownie określono na 100 µm. Polietylen natomiast został dodany o maksymalnej wielkości 90 µm, co również przedstawiono w tabeli. Wyniki tych badań są obiecujące względem dostarczenia nowych danych dla ogółu analizy, jednak brak w wykrytych tkankach cząstek poniżej 10 µm nasuwa kolejne pytaniao kontynuację analiz przy większej rozdzielczości aparatury oraz mniejszych krokach pomiarowych.



Wykrywanie tak małych cząstek zdaje się być trudne co najmniej z kilku powodów:

- Konieczne byłoby zastosowanie kroku pomiarowego o niezwykle niskiej wartości, przez co przebadanie próbki wymagałoby tysięcy powtórzeń
- Cząstki tej wielkości mogły zostać skutecznie ukryte w mięśniach i być nie widoczne dla lasera
- Cząstki tej wielkości mogły swobodnie przenikać przez błony i podczas procesu szoku termicznego czy też przygotowania tkanki zostać pominięte

Wszystkie pomiary w obrębie jednego tworzywa oraz w większości przypadku w ujęciu gatunkowym wykazywały podobną tendencję przez co możliwe było wysunięcie wniosków na temat akumulacji oraz schematu jego zależności. Aby potwierdzić te dane, wyznaczyć stopień zgodności oraz determinację dla poszczególnych wyników zdecydowano się na przeprowadzenie obliczeń matematycznych. Współczynnik determinacji oraz zależności nieliniowe opisane zostały w artykułach Seidensticker (Seidensticker i inn., 2019), Deng (Deng i in., 2023) oraz między innymi Corradini (Corradini in., 2019) i w przypadku analizy u dźdżownic często pojawia się to jako nowość w statystce. Analiza determinacji początkowo zakładała wykorzystanie funkcji kwadratowej dla każdego osobnika z rodzaju i stężenia. Wykonane pomiary wyglądały następująco:



Rysunek 18. Determinacja (R²) dla funkcji liniowej jako wstęp do opracowania najlepszego rodzaju wielomianu (wykresy nie zawarte w artykule)

Jednak współczynnik bliski wartości 1, dla tak małej ilości danych mógł nie być w pełni wystarczającym, dlatego w kolejnych etapach zastosowano detereminację wielomianu stopnia trzeciego oraz czwartego, w artykule (D.7.), określane skrótowo (R²)³ oraz (R²)⁴. Wyniki poszczególnych pomiarów sumowano na jednym wykresie dla pełnej zgodności, a wszystkie łącznie porównano do danych opracowanych dla gatunków hodowanych w skali makro i w skali mikro.





Rysunek 19. Determinacja (R²)³ oraz (R²)⁴ dla Lumbricus terrestris dla tkanek skali mikro

Do obliczeń zastosowane następujące wzory. Wartość (R²) wynosi od 0 do 1, gdzie wartość bliższa 1 oznacza lepsze dopasowanie modelu do danych.

$$R^2 = 1 - \frac{SS_{res}}{SS_{tot}}$$

Gdzie:

(SS_{res}) to suma kwadratów reszt, czyli suma kwadratów różnic między rzeczywistymi wartościami i wartościami przewidywanymi przez model:

$$SS_{res} = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2$$

(SS_{tot}) to całkowita suma kwadratów czyli suma kwadratów różnic między rzeczywistymi wartościami a średnią wartością rzeczywistych danych:

$$SS_{tot} = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \overline{y}_i)^2$$



Wszystkie szczegóły opisujące metody pomiarowe oraz dyskusję dotyczącą artykuły znajdują się w (D.7.).

Artykuł składa się z 20 stron opisowo-badawczych, współautorem pracy dr inż. Andrzej Kacprzakoraz dr hab. Anna Grobelak, prof. Politechniki Częstochowskiej. Udział % w publikacji : Klimasz Marek (60%), Andrzej Kacprzak (20%), Grobelak Anna (20%). Udział merytoryczny doktoranta w przygotowaniu artykułu obejmował: przygotowanie wszystkich tkanek do analiz, przeprowadzenie badań, zebranie wyników, ich opracowanie oraz redagowanie artykułu.



Podsumowanie założeń rozprawy w odniesieniu do uzyskanych wyników

Obecność mikroplastiku w środowisku naturalnym stanowi poważne zagrożenie dla żyjących tam organizmów, a zarazem jest przedmiotem dyskusji wielu paneli tematycznych. Podstawą działań w kierunku zapobiegania rozprzestrzenianiu się tego zanieczyszczenia jest kompletna wiedza na temat jego powstawania, fragmentacji, migracji i ostatecznie wpływu na ogół ekosystemów. Nieznane są wciąż skuteczne metody separacji mikroplastiku oraz jego biodegradacji, będące równocześnie opłacalne ekonomicznie oraz powszechnie dostępne i stosowane. Asymetryczność produkcji tworzyw sztucznych względem wykorzystania ich powtórnie w procesie recyklingu oraz względem zagospodarowanie w różnych krajach świata sprawiają, że prognozy na przyszłość nie zawsze są obiecujące. Mikroplastiki będące zanieczyszczeniem gleby, coraz częściej opisywane w charakterze toksycznych są ponadto wystawione na mobilność względem wód gruntowych czy też roślinności. Wykorzystanie organizmów żyjących w glebie, a zdolnych do funkcjonowania w obszarach zanieczyszczonych MP, może stanowić rozwiązanie dla wstępnego oszacowania stężenia cząstek w tej właśnie glebie. Tym samym, na podstawie przedstawionych artykułów (D.1.-D.7.) sformułowano następujące wnioski:

Postawione cele rozprawy:

Biologiczne

 Różnicowanie gatunkowe na podstawie parametrów biochemicznych dżdżownic poddanych ekspozycji na mikroplastik

Opisane różnice zawarto w artykule 5 (**D.5**), przedstawiają wrażliwość na mikroplastik określoną analizami stresu oksydacyjnego, wymiany gazowej, śmiertelności osobniczej (oraz całościowo gatunkowej), a także flory bakteryjnej jelit.



- Określenie gatunków najlepiej przystosowanych do życia w glebie skażonej mikroplastikiem, a tym samym gatunków odpowiednich do dalszych badań i wskaźnikowych dżdżownic do monitorowania mikroplastiku w glebie
 Spośród wszystkich analizowanych gatunków wybrane zostały dwa (*L. terrestris* oraz *D.veneta*), które jak potwierdza dodatkowo literatura zdolne są do funkcjonowania w glebie z zawartością mikroplastiku o określonym stężeniu (**D.5**).
- Określenie różnic w wynikach analizy tkanek dżdżownic pochodzących z hodowli laboratoryjnej oraz z hodowli zewnętrznej
 Różnice zostały udokumentowane w artykule numer 7 (D.7.) i dotyczą stopnia akumulacji mikroplastiku u gatunków hodowanych w obu wariantach, przedstawione wykresami oraz tabelami. Wyniki zostały ponadto uzasadnione oraz podparte dostępną literaturą.

Techniczne

 Określenie skutecznej metody separacji mikroplastiku w glebie, dla uzyskania próby kontrolnej
 Przeprowadzone badania w tym przypadku nie dowiodły skuteczności

opisanych w literaturze metod i wynosiły poniżej średniej. Przyczyny tego zjawiska zostały opisane w przewodniku i nie odnoszą się do załączonych publikacji.

 Określenie możliwości analizy tkankowej i doboru odpowiedniej aparatury pomiarowej

Wyniki z przeprowadzonych badań potwierdziły takie zastosowanie i zostały opisane w artykule numer 6 (**D.6**.) oraz 7 (**D.7**.) opisujące metody optyczne, mikroskopowe oraz separacyjne.

 Określenie możliwych zmian struktur fizycznych tworzyw po okresie ekspozycji na glebę oraz enzymy trawienne dżdżownic

W czasie trwania wszystkich eksperymentów nie wykazano zmian strukturalnych, będących skutkiem warunków glebowych oraz wpływem dżdżownic.

Cel utylitarny pracy

- Określenie możliwości zastosowania tkanek dżdżownic jako bioindykatora w testowaniu gleb do oceny zawartości w niej mikroplastiku,
- Zastosowanie specyficznych ustawień mikroskopii ramanowskiej, spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera oraz analiz optycznych do wstępnego szacowania stężenia mikroplastiku w glebie; aplikacja do szacowania tkankowego dżdżownic pod kątem zawartości mikroplastiku
- Wykorzystanie informacji dostarczonych przez analizę tkankową w dyscyplinie inżynierii środowiska oraz w cyklicznym monitorowaniu zanieczyszczenia gleby tworzywami sztucznymi.

Cel utylitarny można potwierdzić na podstawie (**D.6**.) oraz (**D.7**.), w których tkanki poddane analizie dostarczały informacji na temat zawartości tworzyw sztuczny w nich zawartych oraz silnej korelacji ilościowej względem zastosowanego stężenia.

Hipotezy rozprawy doktorskiej

- Istnieje możliwość wykorzystania analizy tkankowej wybranych gatunków dżdżownic jako wskaźnika gleby zanieczyszczonej mikroplastikiem.
 Tak, tkanki dostarczają wstępnych informacji o stanie zanieczyszczenia gleby mikroplastikiem.
- Istnieje możliwość wykorzystania mikroskopii ramanowskiej do precyzyjnego określenia wielkości cząsteczkowej oraz mapowania przestrzennego tworzyw w tkankach dżdżownic.

Tak, odpowiednie ustawienie aparatury pozwalana na detekcję mikro i nanoplastiku, co stanowi nową analizę w skali krajowej dla tkanek dżdżownic

 Stężenie mikroplastiku w glebie koreluje ze stężeniem mikroplastiku w tkankach dżdżownic, a korelacje tą można wykorzystać w sposób utylitarny Tak, dla wybranych tworzyw istnieje silna korelacja stężeń.



Innowacyjność rozprawy doktorskiej

Innowacyjnością w rozporawie doktorskiej było zastosowanie zmieszanej frakcji mikroplastiku złożonej z tworzyw o odmiennych właściwościach takich jak gęstość, kształt oraz rozmiar cząsteczek, wobec różniących się od siebie fizjologicznie gatunków dżdżownic. W kwesti poznawczej innowacyjność obejmowała badanie wykorzystaniem flory bakterynej oraz analizę z respirometru Echo udokumentowanie różnić wynikających z ekspozycji na mikroplastik, i przedstawione zarówno w wersji opisowej jak i graficznej. Natomiast nowością i innowacyjnością w kwestii technicznej było zastosowanie zastosowanie FTIR oraz mikroskopii ramanowskiej o niestandardowych ustawieniach do mapowania przestrzennego zakumulowanych cząsteczek, określenia ich wielkości czy rodzaju oraz przedstawienie wyników w formie modelu determinacji wielomianu.

3. Wnioski

Przedstawiona rozprawa doktorska skupia się wokół obecności mikroplastiku w glebie oraz metodach szacowania ilościowego z wykorzystaniem wybranych gatunków dżdżownic. Na podstawie przeprowadzonych badań oraz analiz, a także zgodności literatury wobec fundamentalnych założeń, sformułowanie zostały następujące wnioski i spostrzeżenia:

Dotyczące wykorzystanych gatunków dżdżownic

- Różnicowanie gatunkowe dżdżownic w obrębie różnych grup ekologicznych jest niewykle istotne pomimo oczywistych podobieństw morfologicznych i anatomicznych. Dżdżownice znacząco różnią się preferowanym siedliskiem, sposobem pozyskiwania pokarmu oraz wrażliwością na zanieczyszczenia. Aporrectodea caliginosa, jako gatunek najczęściej występujący na obszarach odległych od miast, zdecydowanie najgorzej znosił ekspozycję na tworzywa sztuczne. Według literatury, gatunek ten bywa klasyfikowany jako bioindykator, jednak dla ogółu wszystkich zanieczyszczeń, bez klasyfikacji na pestycydy, metale ciężkie czy też drgania. Oznacza to, że jego obecność potwierdza generalnie zdrowe środowisko oraz bogatą w materię organiczną glebę.
- Gatunki Eisenia fetida oraz Eisenia andrei w literaturze najczęściej opisywane są poprzez funkcję wermikompostowania oraz testów toksyczności gleby. Pomimo wykazanego w badaniach, obiecującego wskaźnika odporności na mikroplastik, należy pamiętać, że gatunki te są relatywnie małe tym samym ilość pobieranego pożywienia jest niewielka, co może skutkować zmniejszoną akumulacją tkankową. Dodatkowo, oba blisko spokrewnione gatunki preferują żerowanie nad powierzchnią gleby, w kompostach, składach oborniku czy też rozkładających się liściach i ściółce przez co analiza pod kątem samej gleby może być obarczona poważnym błędem założeniowym. Niemniej, tkanki gatunków tych potwierdziły również obecność tworzywa zaliczanego do nanoplastiku, poniżej 1 mm, co może



otwierać drzwi do kolejnych analiz szacowania stężenia na przykład w kompostownikach bądź w procesach wermikompostowania.

- Lumbricus terrestris oraz Dendrobaena veneta charakteryzują się podobnymi upodobaniami względem gleby, a dodatkowo cechy ich morfologii okazały się w badaniach bardzo przydatne. Są to gatunki duże (w porównaniu do pozostałych), które aktywnie drążą tunele i żerują wgłęb gleby, dodatkowo odporne na wiele czynników i powszechnie występujące w zróżnicowanym środowisku. Badania dowiodły, że ze wszystkich wykorzystanych gatunków te, w zdecydowanie najkorzystniejszy sposób nadają się do roli bioindykacji mikroplastiku.
- Różnice w hodowli mikro oraz hodowli makro są znaczące i należy uwzględniać je opisując naturalne procesy fizjologiczne dżdżownic.
- Wyniki badań mogą wskazywać nowy kierunek prowadzenia badań w obrębie dyscypliny inżynierii środowiska oraz stanowić metodę wstępnego szacowania zawartości mikroplastiku w glebie

Dotyczące stosowanej metodyki:

- Zastosowanie mikroskopii optycznej wraz z filtrami barw oraz dedykowanym oprogramowaniem daje obiecujące wyniki względem rozpoznawania tworzyw sztucznych, wykorzystanie odpowiednich przesłon oraz wykonanie kilku zdjęć pozwala odróżnić tworzywo na tle tkanki. Jest to skuteczna, wstępna metoda szacowania większych cząstek mikroplastiku - jednak została potwierdzona tylko w obrębie stosowanych tworzyw.
- Mikroskopia ramanowska jest zaawansowaną metodą pomiarową, a jako urządzenie charakteryzuje się zróżnicowaniem wyposażenia, mowa tu między innymi różnicach laserów, spektrografów, rodzajach obrazowania, detektorach, a kończąc na oprogramowaniu oraz jego aktualizacjach. Wyniki naszych badań dokumentują wysoką precyzję możliwości wykorzystania opisanej aparatury o bardzo konkretnych ustawieniach do analizy tkanek, czyli materiału, do którego nie jest ta aparatura przeznaczona. Istotne jest tu zatem aby – dla powtarzalności badania, za każdym razem korzystać z tych samych ustawień, opisanych szczegółowo w artykule. Dodatkowym



wnioskiem, nasuwającym się po wykonanych badaniach jest to, że zastosowanie wymienionej wyżej aparatury dla określenia cząstek wielkości poniżej 10 mikrometrów jest możliwe, ale niezwykle trudne oraz czasochłonne, co w przypadku wielu tkanek oraz wielu prób staje się częściowo niewykonalne.

- Aparatura FTIR wykorzystana w badaniu oraz połączona z bazą danych jest skuteczną metodą określenia rodzaju tworzywa. Dodatkowo, jest to metoda szybka, pozwalająca na wykonanie kilkunastu powtórzeń dla jednej próbki w ciągu jednej godziny. Wspomniana baza danych, będąca otwartą na aktualizację systemowe oraz nowo opisane tworzywa pozwala na dokładne dopasowanie uzyskanych wyników do tych, uzyskanych przez innych badaczy bądź do próby kontrolnej czystego materiału. Pomimo faktu, że badane próbki były zmieszane ze sproszkowaną tkanka, CO w konsekwencji wywoływało tło obrazu, pomiary były skuteczne, a wyniki potwierdzone literatura.
- Separacja gęstościowa z wykorzystaniem odczynników nie powidła się i w pracy przedstawiono kilka powodów, które mogą stanowić uzasadnienie. Jest to metoda skuteczna w przypadku tworzyw o niskiej gęstości, niezwiązanych z innymi związkami/ substancjami oraz dla dużych cząstek. Tym samym, szybka, skuteczna oraz powtarzalna metoda określenia stężenia mikroplastiku o zróżnicowanej frakcji w glebie wciąż jest dziedziną niepoznaną i wymaga dalszych prac badawczych.
- Metodą skuteczną w przypadku trawienia materiału organicznego, jakim była zliofilizowana oraz sproszkowana tkanka dżdżownicy było potraktowanie jej stężonym H₂O₂ opisane w artykule, metodę to poleca wielu autorów cytowanych publikacji, tym samym, przetestowane przez nas wybrane pozostałe odczynniki nie zostały opisane w pracy i stanowiły wyłącznie aspekt poznawczy dla próbek. Odczynnik ten nie wpłynął negatywnie na tworzywa sztuczne, jest powszechnie dostępny oraz szeroko wykorzystywany.
- Wybarwianie czerwienią nilu dało zakładane rezultaty, jest to dobrze poznana metoda, opisywana w wielu artykułach, która pozwala na uzyskanie barwy tworzyw i przez to łatwej ich klasyfikacji.



Pozostałe wnioski i uwagi:

- Szacowanie tkankowe powinno opierać się w określonym przedziale wielkości cząsteczkowej, przykładowo 10 mikrometrów – 100 mikrometrów, według badań nie ma podstaw by obrazować cząstki o większym rozmiarze
- Korelacja względem tworzyw nie jest taka sama, wykazano, że w najmniejszym stopniu akumulowany w tkankach był polistyren.

Od autorów:

Wszystkie osobniki, wszystkich gatunków oraz na każdym etapie postępowania były traktowane z należytym szacunkiem jako dla organizmów żywych. Autorzy pragną podkreślić, że w kwestiach pozyskiwania tkanek <u>zawsze</u> zachowywano największy możliwy stopień ostrożności, a wszystkie procedury przeprowadzano w sposób humanitarny. Uważamy ponadto, że w tej kwestii nie ma strony zwycięskiej oraz przegranej; bioindykacja gleby na podstawie analizy tkankowej, oraz określona metoda szacowania mogą w znacznym stopniu przybliżyć nam wiedzę na temat zanieczyszczenia mikroplastikiem oraz próby ich dalszej detekcji. Wykorzystane osobniki przyczyniły się do rozwoju nauki, do opisania w sposób innowacyjny wielu kwestii związanych z metodami inżynierii środowiska.

Dz. U. 1997 Nr 111 poz. 724, Art. 1. 1.

Zwierzę, jako istota żyjąca, zdolna do odczuwania cierpienia, nie jest rzeczą. Człowiek jest mu winien poszanowanie, ochronę i opiekę.


4. Bibliografia

- Baloš, M.; Petrović, A.; Tubić, A.; Zeremski, T.; Gvozdenac, S.; Supić, D.; Bursić, V. Effects of Polyethylene Microplastics in Agricultural Soil on *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) Behavior, Biomass, and Mortality. *Agriculture* 2024, *14*, 578.
- Campanale, C.; Savino, I.; Massarelli, C.; Uricchio, V.F. Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Assess the Degree of Alteration of Artificially Aged and Environmentally Weathered Microplastics. *Polymers* 2023, *15*, 911.
- Campanale, C.; Savino, I.; Pojar, I.; Massarelli, C.; Uricchio, V.F. A Practical Overview of Methodologies for Sampling and Analysis of Microplastics in Riverine Environments. *Sustainability* 2020, *12*, 6755.
- 4. Chatelain, M. Endogeic Earthworms Avoid Soil Mimicking Metal Pollution Levels in Urban Parks. *Sustainability* **2023**, *15*, 11513.
- Chen, J.; Chen, S.; Liu, Z.; Wu, L.; Xiang, H.; Zhang, J.; Wei, H. A Bibliometric Analysis on Research Progress of Earthworms in Soil Ecosystems. *Biology* 2024, *13*, 385.
- Corradini Fabio, Harm Bartholomeus, Esperanza Huerta Lwanga, Hennie Gertsen, Violette Geissen, Predicting soil microplastic concentration using vis-NIR spectroscopy, Science of The Total Environment, Volume 650, Part 1, 2019, Pages 922-932, ISSN 0048-9697.
- Cowger W, Gray A, Christiansen SH, et al. Critical Review of Processing and Classification Techniques for Images and Spectra in Microplastic Research. *Applied Spectroscopy*. 2020;74(9)
- Fu Huimin, Lizhen Zhu, Lang Chen, Lan Zhang, Liangang Mao, Chi Wu, Yiming Chang, Jinhua Jiang, Hongyun Jiang, Xingang Liu, Metabolomics and microbiomics revealed the combined effects of different-sized polystyrene microplastics and imidacloprid on earthworm intestinal health and function, Environmental Pollution, Volume 361, 2024, 124799, ISSN 0269-7491
- Guanghui Xu, Yang Liu, Xue Song, Ming Li, Yong Yu, Size effects of microplastics on accumulation and elimination of phenanthrene in earthworms, Journal of Hazardous Materials, Volume 403, 2021, 123966, ISSN 0304-3894.

- 10. J.P.G.L. Frias, P. Sobral, A.M. Ferreira, Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast, Marine Pollution Bulletin, Volume 60, Issue 11, 2010, Pages 1988-1992.
- 11. Judy Jonathan, Mike Williams, Adrienne Gregg, Danni Oliver, Anu Kumar, Rai Kookana, Jason K. Kirby, Microplastics in municipal mixed-waste organic outputs induce minimal short to long-term toxicity in key terrestrial biota, Environmental Pollution, Volume 252, Part A, 2019, Pages 522-531, ISSN 0269-7491.
- 12. Kononov, A.; Hishida, M.; Suzuki, K.; Harada, N. Microplastic Extraction from Agricultural Soils Using Canola Oil and Unsaturated Sodium Chloride Solution and Evaluation by Incineration Method. *Soil Syst.* **2022**, *6*, 54.
- 13. Kotar Syd, Rae McNeish, Clare Murphy-Hagan, Violet Renick, Chih-Fen T. Lee, Clare Steele, Amy Lusher, Charles Moore, Elizabeth Minor, Joseph Schroeder, Paul Helm, Keith Rickabaugh, Hannah De Frond, Kristine Gesulga, Wenjian Lao, Keenan Munno, Leah M. Thornton Hampton, Stephen B. Weisberg, Charles S. Wong, Gaurav Amarpuri, Robert C. Andrews, Steven M. Barnett, Silke Christiansen, Win Cowger, Kévin Crampond, Fangni Du, Andrew B. Gray, Jeanne Hankett, Kay Ho, Julia Jaeger, Claire Lilley, Lei Mai, Odette Mina, Eunah Lee, Sebastian Primpke, Samiksha Singh, Joakim Skovly, Theresa Slifko, Suja Sukumaran, Bert van Bavel, Jennifer Van Brocklin, Florian Vollnhals, Chenxi Wu, Chelsea M. Rochman, Quantitative assessment of visual microscopy as a tool for microplastic research: Recommendations for improving methods and reporting, Chemosphere, Volume 308, Part 3, 2022, ISSN 0045-6535.
- Krishna Gautam, Sadasivam Anbumani, Recent trends in analytical measures of microplastic in soil and toxicopathological risk assessment in earthworms, TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 168, 2023, 117292, ISSN 0165-9936,
- 15. Li Tongtong, Baohua Xu, Hao Chen, Ying Shi, Jun Li, Mengwei Yu, Shaohui Xia, Shijin Wu, Gut toxicity of polystyrene microplastics and polychlorinated biphenyls to Eisenia fetida: Single and co-exposure effects with a focus on links between gut bacteria and bacterial translocation stemming from gut



barrier damage, Science of The Total Environment, Volume 908, 2024, 168254, ISSN 0048-9697

- 16. Liu, Y., Xu, G., & Yu, Y. (2022). Effects of polystyrene microplastics on accumulation of pyrene by earthworms. *Chemosphere*, *296*, 134059.
- 17. Lwanga E. H. et al. "Incorporation of microplastics from litter into burrows of Lumbricus terrestris." *Environmental Pollution* 220 (2017): 523-531.
- 18.M. Chatelain, J. Mathieu, How good are epigeic earthworms at dispersing? An investigation to compare epigeic to endogeic and anecic groups, Soil Biology and Biochemistry, Volume 111, 2017, Pages 115-123.
- Marco Blesa, J.A. Sáez, A.M. Pedraza Torres, E. Martínez Sabater, L. Orden, F.J. Andreu-Rodríguez, M.A. Bustamante, F.C. Marhuenda-Egea, M.J. López, F. Suárez-Estrella, R. Moral, Effect of agricultural microplastic and mesoplastic in the vermicomposting process: Response of Eisenia fetida and quality of the vermicomposts obtained, Environmental Pollution, Volume 333, 2023, 122027
- 20. Medyńska-Juraszek, A.; Szczepańska, A. Microplastic Pollution in EU Farmland Soils: Preliminary Findings from Agricultural Soils (Southwestern Poland). Agriculture **2023**, *13*, 1733.
- 21. Miserli, K.; Lykos, C.; Kalampounias, AG; Konstantinou, I. Badanie mikroplastików w systemach akwakultury (próbki ryb, małży i wody) metodą FTIR, skaningowa mikroskopia elektronowa–spektroskopia dyspersyjna energii i mikrospektroskopie Ramana. *Appl. Sci.* 2023, *13*, 9705.
- 22. Moshood, T.D.; Nawanir, G.; Mahmud, F.; Mohamad, F.; Ahmad, M.H.; Abdul Ghani, A. Expanding Policy for Biodegradable Plastic Products and Market Dynamics of Bio-Based Plastics: Challenges and Opportunities. *Sustainability* 2021, *13*, 6170.
- Negrete Velasco, A.d.J.; Rard, L.; Blois, W.; Lebrun, D.; Lebrun, F.; Pothe, F.; Stoll, S. Microplastic and Fibre Contamination in a Remote Mountain Lake in Switzerland. *Water* 2020, *12*, 2410. https://doi.org/10.3390/w12092410
- 24. Palma Juliane, , N. Loes M.B. van Schaik, Boris Schröder, Modelling distribution patterns of anecic, epigeic and endogeic earthworms at



catchment-scale in agro-ecosystems, Pedobiologia, Volume 56, Issue 1, 2013, Pages 23-31, ISSN 0031-4056,

- 25. Pandey, B.; Pathak, J.; Singh, P.; Kumar, R.; Kumar, A.; Kaushik, S.; Thakur,
 T.K. Microplastics in the Ecosystem: An Overview on Detection, Removal,
 Toxicity Assessment, and Control Release. *Water* 2023, *15*, 51.
- 26. Pérez-Reverón, R.; Álvarez-Méndez, S.J.; Kropp, R.M.; Perdomo-González, A.; Hernández-Borges, J.; Díaz-Peña, F.J. Microplastics in Agricultural Systems: Analytical Methodologies and Effects on Soil Quality and Crop Yield. *Agriculture* 2022, *12*, 1162.
- 27. Prosenc, F.; Leban, P.; Šunta, U.; Bavcon Kralj, M. Extraction and Identification of a Wide Range of Microplastic Polymers in Soil and Compost. *Polymers* 2021, *13*, 4069.
- 28. Prosenc, F.; Leban, P.; Šunta, U.; Bavcon Kralj, M. Extraction and Identification of a Wide Range of Microplastic Polymers in Soil and Compost. *Polymers* **2021**, *13*, 4069.
- Rani, M.; Ducoli, S.; Depero, L.E.; Prica, M.; Tubić, A.; Ademovic, Z.; Morrison,
 L.; Federici, S. A Complete Guide to Extraction Methods of Microplastics from Complex Environmental Matrices. *Molecules* 2023, *28*, 5710.
- 30. Rodríguez, T.; Represas, D.; Carral, EV Ekotoksyczność tworzyw sztucznych jednorazowego użytku dla dżdżownic. *Environments* 2023, *10*, 41.
- 31. Rytelewska, S.; Dąbrowska, A. Podejście spektroskopii ramanowskiej do różnych mikroplastików słodkowodnych i ilościowa charakterystyka polietylenu starzonego w środowisku. *Mikroplastiki* 2022, 1, 263-281.
- 32. Seidensticker, S., Zarfl, C., Cirpka, OA i Grathwohl, P. (2019), Interakcje mikroplastiku z zanieczyszczeniami: wpływ nieliniowości i sprzężonego transferu masy. Environ Toxicol Chem, 38: 1635-1644.
- 33. Sizmur T. EL Tilston, J. Charnock, B. Palumbo-Roe, MJ Watts i ME Hodson, J. Environ. Monitor., 2011, 13, 266 DOI: 10.1039/C0EM00519C
- 34. Stasiškienė, Ž.; Barbir, J.; Draudvilienė, L.; Chong, Z.K.; Kuchta, K.; Voronova, V.; Leal Filho, W. Challenges and Strategies for Bio-Based and Biodegradable Plastic Waste Management in Europe. *Sustainability* 2022,
- 35. Sugurbekova, G.; Nagyzbekkyzy, E.; Sarsenova, A.; Danlybayeva, G.; Anuarbekova, S.; Kudaibergenova, R.; Frochot, C.; Acherar, S.;

Zhatkanbayev, Y.; Moldagulova, N. Sewage Sludge Management and Application in the Form of Sustainable Fertilizer. *Sustainability* 2023, *15*, 6112.

- 36. Thomas, D.; Schütze, B.; Heinze, W.M.; Steinmetz, Z. Sample Preparation Techniques for the Analysis of Microplastics in Soil—A Review. Sustainability 2020, 12.
- 37. Thomas, D.; Schütze, B.; Heinze, W.M.; Steinmetz, Z. Sample Preparation Techniques for the Analysis of Microplastics in Soil—A Review. Sustainability 2020, 12, 9074.
- 38. Tourinho, PS, Loureiro, S., Talluri, VSSLP *i in.* Włókna mikroplastiku wpływają na toksyczność Ag i bioakumulację w *Eisenia andrei,* ale nie w *Enchytraeus crypticus*. *Ecotoxicology* 30, 1216–1226 (2021).
- Trakić, T.; Popović, F.; Sekulić, J.; Hackenberger, D.K. Ecotoxicological Effects of Commercial Microplastics on Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Clitellata; Lumbricidae). *Agriculture* 2024, *14*, 267.
- 40. Tytła, M. Assessment of Heavy Metal Pollution and Potential Ecological Risk in Sewage Sludge from Municipal Wastewater Treatment Plant Located in the Most Industrialized Region in Poland—Case Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2019, *16*, 2430.
- 41. van Raamsdonk, L.W.D.; van der Zande, M.; Koelmans, A.A.; Hoogenboom, R.L.A.P.; Peters, R.J.B.; Groot, M.J.; Peijnenburg, A.A.C.M.; Weesepoel, Y.J.A. Current Insights into Monitoring, Bioaccumulation, and Potential Health Effects of Microplastics Present in the Food Chain. *Foods* 2020, *9*, 72.
- 42. Wang Hong -Tao, Jing Ding, Chan Xiong, Dong Zhu, Gang Li, Xiao-Yu Jia, Yong-Guan Zhu, Xi-Mei Xue, Exposure to microplastics lowers arsenic accumulation and alters gut bacterial communities of earthworm Metaphire californica, Environmental Pollution, Volume 251, 2019, Pages 110-116, ISSN 0269-7491.
- 43. Xi Luo, Zhaoqing Wang, Ling Yang, Tanguang Gao, Yulan Zhang, A review of analytical methods and models used in atmospheric microplastic research, Science of The Total Environment, Volume 828, 2022, 154487, ISSN 0048-9697.
- 44. Xu Jun-Li, Kevin V. Thomas, Zisheng Luo, Aoife A. Gowen, FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: State of the art, challenges and prospects,



TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 119, 2019, 115629, ISSN 0165-9936.

- 45. Yun Deng, Lin Peng, Zhendong Li, Wang Xu, Gang Ren, Fei Wang, First determination on two kinds of microplastic-air partition coefficients of seven per- and polyfluoroalkyl substances under environmentally relative conditions: Experiment measurement and model prediction, Journal of Hazardous Materials, Volume 459, 2023, 132042, ISSN 0304-3894.
- 46.Zhang Showu, Shan Ren, Lei Pei, Yuhuan Sun, Fayuan Wang, Ecotoxicological effects of polyethylene microplastics and ZnO nanoparticles on earthworm Eisenia fetida, Applied Soil Ecology, Volume 176, 2022, 104469.
- 47. Zhou Yanfei, Xiaoning Liu, Jun Wang, Ecotoxicological effects of microplastics and cadmium on the earthworm Eisenia foetida, Journal of Hazardous Materials, Volume 392, 2020, 122273, ISSN 0304-3894.
- 48. Phuong N.N., Zalouk-Vergnoux A., Poirier L., Kamari A., Châtel A., Mouneyrac C., Lagarde F., Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in labo- ratory experiments? Environment Pollution 2016, 211, 111-123.
- 49.Barnes D.K., Galgani F., Thompson R.C., Barlaz M., Accumulation and fragmentation of plastic debrisin global environments, Philosophical, Transaction of the Royal Society 2009, 364.
- 50. Arthur C., Baker J., Bamford H., NOAA Technical Memorandum NOS-OR&R30, Procee- dings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Micro- plastic Marine Debris, Tacoma, USA, 9-11 September 2008, pp. 9-11.
- 51.Napper I.E., Bakir A., Rowland S.J., Thompson R.C., Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics, Marine Pollution Bulletin 2015, 99.
- 52. Ruiz-Real J.L., Uribe-Toril J., Valenciano J.D.P., Gazqiez-Abad J.C., Worldwide research on circular economy and environment: A bibliometric analysis, International Journal of Environmental Researchand Public Health 2018, 15, 2699.

- 53. Lau WWY, Shiran Y, Bailey RM, Cook E, Stuchtey MR, Koskella J, et al.
 Evaluating scenarios toward zero plastic pollution. Science.
 2020;369(6510):1455–61 Available from: https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.aba9475.
- 54. LebretonL, vander Zwet J, Damsteeg JW, Slat B, Andrady A, ReisserJ(2017) River plastic emissions to the world's oceans. Nat Commun 8:15611
- 55. De Frond HL, van Sebille E, Parnis JM, Diamond ML, Mallos N, Kingsbury T, et al. Estimating the mass of chemicals associated with ocean plastic pollution to inform mitigation efforts. Integr Environ Assess Manag. 2019;15(4):596– 606.
- 56. Büks and Martin Kaupenjohann Global concentrations of microplastics in soils – a review SOIL, 6, 649–662, https://doi.org/10.5194/soil-6-649-2020, 2020
- 57. Allen, S., Allen, D., Phoenix, V. R., Le Roux, G., Jiménez, P. D., Simonneau, A., Binet, S., and Galop, D.: Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment, Nat. Geosci., 12, 339–344, 2019.
- 58.C. Liu, J. Li, Y. Zhang, L. Wang, J. Deng, Y. Gao, L. Yu, J. Zhang, H. Sun, Widespread distribution of PET and PC microplastics in dust in urban China and their estimated human exposure. Environ. Int., 128 (2019), pp. 116-124, 10.1016/j.envint.2019.04.024
- 59.ZhangC,ChenX,WangJ,TanL(2017)Toxiceffectsofmicroplasticonmarinemicro algae Skeletonema costatum: interactions between microplastic and algae. Environ Pollut 220:1282–1288
- 60. Provencher JF, Bond AL, Avery-Gomm S, Borrelle SB, Bravo Rebolledo EL, Hammer S i in. 2017. Ilościowe oznaczanie połkniętych śmieci w megafaunie morskiej: przegląd i zalecenia dotyczące standaryzacji. Metody analityczne, **9** (9): 1454–1469.
- 61. Kühn S, Bravo Rebolledo EL i van Franeker JA. 2015. Szkodliwy wpływ śmieci na życie morskie. W morskich śmieciach antropogenicznych. Pod redakcją M. Bergmanna, L. Gutowa i M. Klagesa. Springer Open w Bremerhaven, Niemcy. s. 75–116.



- 62. Kühn S, van Franeker J. Quantitative overview of marine debris ingested by marine megafauna Marine Pollution Bulletin .Volume 151, February 2020, 110858
- 63. Deng, Y., Wu, J., Chen, J., & Kang, K. (2023). Overview of microplastic pollution and its influence on the health of organisms. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 58(4), 412–422
- 64.35. Shiu RF, Vazquez CI, Chiang CY, Chiu MH, Chen CS, Ni CW, Chin WC (2020) Nano- and microplastics induce secretion of protein-rich extracellular polymeric substances from phytoplankton. Sci Total Environ 748:141469
- 65. Bosker, T.; Bouwman, L.J.; Brun, N.R.; Behrens, P.; Vijver, M.G. Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant Lepidium sativum. Chemosphere 2019, 226, 774–781.
- 66.Boots, B.; Russell, C.W.; Green, D.S. Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground. Environ. Sci. Technol. 2019, 53, 11496–11506.
- 67.Li, Z.; Li, Q.; Li, R.; Zhou, J.; Wang, G. The distribution and impact of polystyrene nanoplastics on cucumber plants. Environ. Sci. Pollut. Res. 2021, 28, 16042–16053.
- 68. Giorgetti, L.; Spanò, C.; Muccifora, S.; Bottega, S.; Barbieri, F.; Bellani, L.; Castiglione, M.R. Exploring the interaction between polystyrene nanoplastics and Allium cepa during germination: Internalization in root cells, induction of toxicity and oxidative stress. Plant Physiol. Biochem. 2020, 149, 170–177.
- Jiang, X.; Chen, H.; Liao, Y.; Ye, Z.; Li, M.; Klobučar, G. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant Vicia faba. Environ. Pollut. 2019, 250, 831–838.
- 70. Liana, J., Liu, W., Meng, L., Wu, J., Chao, L., Zeb, A., & Sun, Y. (2021a). Foliar-applied polystyrene nanoplastics (PSNPs) reduce the growth and nutritional quality of lettuce (Lactuca sativa L.). *Environmental Pollution, 280*, 116978.
- 71. Meng, F., Yang, X., Riksen, M., Xu, M., & Geissen, V. (2021). Response of common bean (Phaseolus vulgaris L.) growth to soil contaminated with microplastics. *Science of the Total Environment*, 755, 142516.



- 72. Zhou, B., Wang, J., Zhang, H., Shi, H., Fei, Y., Huang, S., Tong, Y., Wen, D., Luo, Y., and Barceló, D.: Microplastics in agricultural soils on the coastal plain of Hangzhou Bay, east China: Multiple sources other than plastic mulching film, J. Hazard. Mater., 388, 121814, 2020.
- 73. Zhou, C. Q., Lu, C. H., Mai, L., Bao, L. J., Liu, L. Y., & Zeng, E. Y. (2021a). Response of rice (Oryza sativa L.) roots to nanoplastic treatment at seedling stage. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123412.
- 74. Enders, K.; Lenz, R.; Ivar do Sul, J.A.; Tagg, A.S.; Labrenz, M. When every particle matters: A QuEChERS approach to extract microplastics from environmental samples. MethodsX 2020, 7, 100784.
- 75. Liu, M.; Lu, S.; Chen, Y.; Cao, C.; Bigalke, M.; He, D. Analytical Methods for Microplastics in Environments: Current Advances and Challenges. In The Handbook of Environmental Chemistry; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; pp. 3–24.
- 76. Zhang, S.; Yang, X.; Gertsen, H.; Peters, P.; Salánki, T.; Geissen, V. A simple method for the extraction and identification of light density microplastics from soil. Sci. Total. Environ. **2018**, 616–617, 1056–1065.
- 77. Huang, Y.; Liu, Q.; Jia, W.; Yan, C.; Wang, J. Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment. Environ. Pollut. 2020, 260, 114096.
- 78. Vermaire, J.C.; Pomeroy, C.; Herczegh, S.M.; Haggart, O.; Murphy, M. Microplastic abundance and distribution in the open water and sediment of the Ottawa River, Canada, and its tributaries. FACETS **2017**, 2, 301–314.
- Huang, Y.; Liu, Q.; Jia, W.; Yan, C.; Wang, J. Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment. Environ. Pollut. 2020, 260, 114096.
- 80.Zhou, B.; Wang, J.; Zhang, H.; Shi, H.; Fei, Y.; Huang, S.; Tong, Y.; Wen, D.; Luo, Y.; Barceló, D. Microplastics in agricultural soils on the coastal plain of Hangzhou Bay, east China: Multiple sources other than plastic mulching film. J. Hazard. Mater. **2020**, 388, 121814.
- Corradini, F.; Meza, P.; Eguiluz, R.; Casado, F.; Huerta-Lwanga, E.; Geissen,
 V. Evidence of microplastic accumulation in agricultural soils from sewage sludge disposal. Sci. Total Environ. 2019, 671, 411–420.

- 82. Kühn, S.; van Werven, B.; van Oyen, A.; Meijboom, A.; Bravo Rebolledo, E.L.; van Franeker, J.A. The use of potassium hydroxide (KOH) solution as a suitable approach to isolate plastics ingested by marine organisms. Mar. Pollut. Bull. **2017**, 115, 86–90.
- 83.Kühn, S.; van Werven, B.; van Oyen, A.; Meijboom, A.; Bravo Rebolledo, E.L.; van Franeker, J.A. The use of potassium hydroxide (KOH) solution as a suitable approach to isolate plastics ingested by marine organisms. Mar. Pollut. Bull. **2017**, 115, 86–90
- 84. Nuelle, M.T.; Dekiff, J.H.; Remy, D.; Fries, E. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. Environ. Pollut. 2014, 184, 161–169.
- 85. Ljung, E.; Olesen, K.B.; Andersson, P.G.; Fältström, E.; Vollertsen, J.; Wittgren, H.B.; Hagman, M. Microplastics in the Water and Nutrient-Cycle; Technical Report 2018–13; Sweden Water Research: Bromma, Sweden, 2018.
- 86. Quinn, B.; Murphy, F.; Ewins, C. Validation of density separation for the rapid recovery of microplastics from sediment. Anal. Methods **2017**, 9, 1491–1498.
- 87.Zobkov, M.B.; Esiukova, E.E. Evaluation of the Munich Plastic Sediment Separator efficiency in extraction of microplastics from natural marine bottom sediments. Limnol. Oceanogr. Methods **2017**, 15, 967–978.
- 88. Imhof, H.K.; Schmid, J.; Niessner, R.; Ivleva, N.P.; Laforsch, C. A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. Limnol. Oceanogr. Methods **2012**, 10, 524–537.
- Simon, M.; van Alst, N.; Vollertsen, J. Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)- based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging. Water Res. 2018,142, 1–9.
- 90.Scheurer, M.; Bigalke, M. Microplastics in Swiss Floodplain Soils. Environ. Sci. Technol. 2018, 52, 3591–3598.
- 91. Laurent C. M. Lebreton, et al., "Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic," Scientific Reports 8, no. 4666 (March 2018),

- 92. Laurent C. M. Lebreton, et al., "River plastic emissions to the world's oceans," Nature Communications 8, no. 15611 (June 2017)
- 93. Qiqing Chen, et al., "Pollutants in Plastics within the North Pacific Subtropical Gyre," Environmental Science and Technology 52, no. 2 (November 2017): 446-456,

5. Spis tabel oraz rysunków zawartych w przewodniku

- 1. Tabela 1. Klasyfikacja mikroplastiku względem wielkości i pochodzenia, str.21
- 2. Tabela 2. Szacowana skuteczność wybranych odczynników, str. 30
- Tabela 3. Skuteczność odczynników w separacji gęstościowej mikroplastiku, str. 31
- Tabela 4. Kierunki zagospodarowania osadów ściekowych w Polsce w latach 2017-2021; Szczegółowy opis w (D.3.), str.43
- 5. Tabela 5. Średnia ilość cząsteczek mikroplastiku w osadach ściekowych opisana na podstawie analizy wybranych oczyszczalni ścieków (D.4.), str.43
- Tabela 6. Wpływ różnych wariancji mikroplastiku na respirację dżdżownic, str.
 50
- Tabela 7. Skuteczność odczynników w procesie separacji gęstościowej mikroplastiku, str. 47
- Tabela 8. Wpływ różnych wariancji mikroplastiku na respirację dżdżownic, str. 50
- 9. Rysunek 1. Możliwości degradacji polimerów z uwzględnieniem procesów tlenowych i beztlenowych, str. 37
- Rysunek 2. Kolorem czerwonym zaznaczono najbardziej zanieczyszczone rzeki świata, odpowiedzialne w głównej mierze za obecność mikroplastiku w oceanach, str. 41
- 11. Rysunek 3. Wykorzystane w badaniach gatunki dżdżownic, kolejno od lewej L. terrestris, D. veneta, A. Caliginosa, D. andrei, E. fetida (fot. Marek Klimasz), str.48
- Rysunek 4. Schemat graficzny artykułu, oznaczonego w załączniku jako D.5, str. 48
- Rysunek 5. Wyniki badań respiracji *D. Veneta* po okresie jednego miesiąca (z lewej) oraz po 3 miesiącach (z prawej), szczegółowe dane zawarto w (D.5.), str. 49



- 14. Rysunek 6. Wpływ mikroplastiku na stres oksydacyjny u wybranych gatunków dżdżownic. Dane wraz z opisem znajduja się w (D.5.), str. 50
- 15. Rysunek 7. Wpływ mikroplastiku na przeżywalnośc gatunkową, dokładny opis wszystkich gatunków znajduje się w załączniku nr 5 (D.5.) str. 50
- 16. Rysunek 8. Wpływ mikroplastiku na florę bakteryjną dżdżownic po w próbie kontrolnej (z lewej), przy 0,1% stężenia mikroplastiku (zdj. środkowe) oraz 1% stężenia (zdj. z prawej) str. 52
- Rysunek 9. Widma emisji oraz piki wzbudzenia dla wykorzystanego tworzywa , str. 54
- 18. Rysunek 10. Tkanka *A.caliginosea* przygotowana pod skaning mikroskopowy dla wstępnego oznaczenia mikroplastiku w badaniu pilotażowym, str. 55
- 19. Rysunek 11. Naturalnej fluorescencja tkankowej tkankowa dżdżownic o obrazie mikroskopii ramanowskiej, str. 55
- 20. Rysunek 12. Fotografie mikroplastiku w tkankach dżdżownic z zaznaczonym obszarem pomiaru, str. 56
- 21. Rysunek 13. Fotografie prób kontrolnej dla tkanki D. veneta. (D.6.), str. 58
- 22. Rysunek 14. Wykorzystanie mikroskopii ramanowskiej dla zobrazowania przesunięcia widma dla wybranych tworzyw (rysunek nie będący częścią publikacji), str. 58
- 23. Rysunek 15. Charakterystyczne widma FTIR dla polietylenu, którego piki rozpoznawalne to 2914, 2847, 1466, 716, oraz tło w postaci pików nie związanych z tworzywem (D.7.), str. 59
- 24. Rysunek 16. Porównanie stopnia akumulacji tkankowej dla sumy przebadanych tkanek względem stężenia mikroplastiku w glebie u *D. veneta,* str. 56
- 25. Rysunek 17. Porównanie wielkości cząstek wykrytych w tkankach, do wielkości cząstek dodanych do gleby (D.7.), str. 61
- 26. Rysunek 18. Determinacja (R²) dla funkcji liniowej jako wstęp do opracowania najlepszego rodzaju wielomianu (wykresy nie zawarte w artykule), str. 62
- 27. Rysunek 19. Determinacja (R²)³ oraz (R²)⁴ dla *Lumbricus terrestris* dla tkanek skali mikro, str. 63



6. Dorobek naukowy i działalność naukowo dydaktyczna

Kariera naukowa:

- Studia licencjackie Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska w latach 2015-2018. Temat pracy licencjackiej: "Różnorodność gatunkowa węży z rodzaju *Morelia* sp."
- Studia magisterskie Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, specjalizacja: biologia stosowana i molekularna. Temat pracy magisterskiej "Wpływ kadmu na aktywność S-transferazy glutationowej i peroksydację lipidów w siewkach pszenicy (*Triticum aestivum*), w latach 2019-2021.
- Studia podyplomowe Przygotowanie Pedagogiczne, Uczelnia Nauk Społecznych, filia Warszawska w latach 2018-2019.
- Szkoła Doktorska Politechniki Częstochowskiej, rok rozpoczęcia 2021, kształcenie w trakcie.



Konferencje:

- Environmental Protection & Energy Conference (EPAE) Silesian University of Technology – uczestnictwo, 10.12.2021
- VI Konferencja Naukowa "Społeczna odpowiedzialność zarządcy nieruchomości w koncepcji Smart City – Science for Buisnes", temat wystąpienia "Mikroplastik – globalne zagrożenie cywilizacyjne", członek komitetu organizacyjnego, 27-27.05.2022.
- Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego 2.0., temat wystąpienia: "Wykorzystanie wybranych gatunków skąposzczetów w technologii detekcji mikroplastiku w glebie", sesja online, Szczecin, 24.06.2022.
- Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców, temat wystąpienia "Mapowanie mikroplastiku w tkankach dżdżownic z wykorzystaniem polietylenu niskiej gęstości" – Sesja online, Kraków, 03.11.2022.
- 3rd International Conference, Strategies toward Green Deal Implementation, Water, Raw Materials & Energy, temat wystąpienia: "Wastewater treatment plant as a source of soil contamination with microplastic" – sesja online, 7.12.2022.
- Environmental Protection & Energy Conference (EPAE) Silesian University of Technology, temat wystąpienia "Permanent accumulation of microplastics in the tissues of earthworms" – 09.12.2022.
- Konferencja Przyszłość uzdatniania wody w Europie: wyzwania i perspektywy, temat wystąpienia "Mikroplastik w środowisku wodnym", Częstochowa, 11.03.2023.
- Environmental Protection & Energy Conference (EPAE) Silesian University of Technology (Gliwice) – uczestnictwo, 8.12.2023.
- Environmental Protection & Energy Conference (EPAE) Silesian University of Technology – uczestnictwo, 06.12.2024.



Warsztaty naukowe:

- Współorganizator warsztatów naukowych dla uczniów II LO im. Romualda Traugutta w Częstochowie z zakresu mikrobiologii – 17.01.2022
- Pomysłodawca oraz współorganizator konkursu " 4 Minuty dla Ziemi", organizowanego w ramach działalności Koła Naukowego Gene In Use., 22.04.2022.
- Współorganizator warsztatów naukowych dla uczniów II LO im. Romualda Traugutta w Częstochowie z zakresu izolowania DNA oraz technik detekcji mikroplastiku – 17.04.2023.
- 4. Współorganizator imprezy z okazji Światowego Dnia Ziemi "Inwestujmy w naszą planetę", Częstochowa , 22.04.2023.
- 5. Warsztaty naukowe, pokazy oraz prelekcja dla uczniów Zespołu Szkół im. Jana Kochanowskiego w Częstochowie, 16.11.2023.
- 6. Współorganizator konkursu " 3 Minuty dla Ziemi", organizowanego w ramach działalności Koła Naukowego Gene In Use., 19.01.2024.
- Współorganizator warsztatów naukowych dla uczniów Jasnogórskiej Niepublicznej Ogólnokształcącej Szkoły Muzycznej w Częstochowie z zakresu mikrobiologii oraz technik molekularnych – 18.11.2024 rok.
- 8. Współorganizator konkursu " 3 Minuty dla Ziemi", organizowanego w ramach działalności Koła Naukowego Gene In Use., 10.02.2025.

Uczestnictwo w szkoleniach:

- 1. Szkolenie ABC Gospodarki Obiegu Zamkniętego, Polska Fundacja Przedsiębiorczości. Sesja online, 05.10.2023.
- Warsztaty dla młodych naukowców "Problematyka zanieczyszczenia wód w Polsce i UE", Instytut Gospodarki Surowcami Mineralnymi i Energią PAN, sesja online, 06.10.2023.



Aktywność dodatkowa:

- Pełnienie funkcji przewodniczącego koła naukowego GeneInUse w latach 2021-2023 i wynikająca z funkcji realizacja zadań koła naukowego.
- Udział w projekcie "Odpady to też zasoby", w ramach programu "Koła naukowe tworzą innowacje" finansowanego ze środków Ministra Edukacji i Nauki na podstawie umowy nr SKN/SP/496788/2021.
- Aktywny udział w wydarzeniach promujących Wydział Infrastruktury i Środowiska oraz Politechnikę Częstochowską, targi i festiwale nauki potwierdzone oficjalnym zaświadczeniem od Pełnomocnika Rektora do spraw Promocji.

Artykuły opublikowane:

- Klimasz, M.; Grobelak, A. "Accumulation of Spherical Microplastics in Earthworms Tissues-Mapping Using Raman Microscopy". *Appl. Sci.* 2024, *14*, 10117.
- Marek Klimasz, Anna Grobelak, Chapter 8 "Migration of microplastics in agriculture and marine ecosystem: Biotechnology approaches", Editor(s): Hemen Sarma, Sanket J. Joshi, In Progress in Biochemistry and Biotechnology, Biotechnology of Emerging Microbes, Academic Press, 2024, Pages 127-142, ISBN 9780443153976,
- Grobelak, A.; Całus-Makowska, K.; Jasińska, A.; Klimasz, M.; Wypart-Pawul, A.; Augustajtys, D.; Baor, E.; Sławczyk, D.; Kowalska, A. "Environmental Impacts and Contaminants Management in Sewage Sludge-to-Energy and Fertilizer Technologies: Current Trends and Future Directions". *Energies* 2024, *17*, 4983
- Klimasz Marek, Grobelak Anna, Mikroplastik w środowisku- jego pochodzenie, klasyfikacja, drogi migracji i wpływ na organizmy, 2022. 23, 151-164, ISBN 978-83-7193-900-6
- 5. Marek Klimasz, Anna Grobelak, "Oczyszczanie ścieków jako źródło mikroplastiku w środowisku", w; Nowatorskie rozwiązania w inżynierii



środowiska i energetyce - perspektywa zrównoważonego rozwoju, pod redakcją lwony Zawieji, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa, 2024,

- Marek Klimasz, Anna Grobelak, "Evaluation of the quantitative concentration of microplastic in Dendrobaena veneta and Lumbricus terrestris tissues from laboratory and environmental culture" Applied Science, 12. applsci-3460617, 2025,
- 7. Grobelak A., Kowalska A., Sławczyk D., Klimasz M., Rybak W., Augustajtys D., Makarenko D., Włóka J., "Enzymy w procesach biologicznego przetwarzania odpadów", publikacja Wydawnictwa Politechniki Częstochowskiej, monografia naukowa "Nowatorskie rozwiązania w inżynierii środowiska i energetyce perspektywa zrównoważonego rozwoju

Materiały pokonferencyjne:

- Grobelak Anna, Suchecki Michał, Klimasz Marek Mikroplastik w przetwarzaniu osadów ściekowych, Politechnika Białostocka, Katedra Inżynierii Rolno-Spożywczej i Kształtowania Środowiska Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii Konferencja: Innowacje w inżynierii ekologicznej 2024
- Klimasz Marek, Mapowanie mikroplastiku z wykorzystaniem Mikroskopii Ramanowskiej, Nowe wyzwania dla młodych naukowców. Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców 2022.



7. Załączniki

D.1.

Klimasz Marek, Grobelak Anna, "Migration of microplastics in agriculture and marine ecosystem: Biotechnology approaches". Biotechnology of Emerging Microbes, Prospects for Agriculture and Environment, Academic Press, (pp. 127-142), 2024.

BIOTECHNOLOGY OF EMERGING MICROBES

Copyright © 2024 Elsevier Inc.

Progress in Biochemistry and Biotechnology BIOTECHNOLOGY OF EMERGING MICROBES Prospects for Agriculture and Environment

Edited by

HEMEN SARMA

Department of Botany, Bodoland University, Rangalikhata, Deborgaon, Kokrajhar (BTR), Assam, India

SANKET J. JOSHI

Amity Institute of Microbial Technology, Amity University Rajasthan, Kant Kalwar, Jaipur, Rajasthan, India



Copyright © 2024 Elsevier Inc.

CHAPTER 8

Migration of microplastics in agriculture and marine ecosystem: Biotechnology approaches

Marek Klimasz and Anna Grobelak

Department of Environmental Engineering and Biotechnology, Faculty of Infrastructure and Environment, Czestochowa University of Technology, Czestochowa, Poland

1 Classification of microplastics and degradation pathways in water

The classification of microplastics is closely related to the biophysical properties of the material they come from, the size of the particles themselves, and the method of their formation. The plastic particles present in the aquatic environment constitute a highly heterogeneous group, and new research methods have become the main cause of frequent changes in the classification of microplastics. Plastics are complex chemical structures in which the configuration of the arrangement of atoms determines the final properties of the material, such as strength, resistance to environmental conditions, or degradation (Crawford and Quinn, 2017).

The term "microplastic" was first introduced by the authors of a 2004 study of sediment contamination in the Plymouth area of the United Kingdom (Thomson, 2004). However, this term referred to general plastic particles and did not specify any measurable values. In 2008, the first international workshop related to the risk of plastics in the environment took place: the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris, organized by NOAA and the University of Washington. One of the goals of this meeting was to establish the official terminology and definition of plastic particles of different structures, sizes, and densities. Within the meaning of the word "microplastic" there is a prefix "micro" suggesting that the tested fraction

requires the use of optical tools. Ultimately, however, the committee decided that this name would be standardized as a term for a material not exceeding 5mm. The lower limit of microplastics was not taken into account, so pollen and dust are also included in the microplastic group (Frias and Nash, 2019). However, in order to better understand and convey information about the particle size, Cole et al. (2011) introduced an additional division with details of particles smaller and larger than the adopted 5mm. This classification is aimed at more precise determination of the particle size and uses the terms nanoplastic ($<1\mu$ m), microplastic (1mm to 5mm), mesoplastic (5mm to 2.5cm), macroplastic (2.5cm to 1m), and megaplastic (over 1m) (Frias and Nash, 2019).

Another criterion for the division of microplastics is their shape. In an urban environment, in polluted waterways, the most commonly found fibers are those shed by clothes during the washing process (De Falco et al., 2018). In addition, this section also covers fishing net fibers (with different properties and structures), microgranules, films, foams, granules, and particles of various shapes. There is some risk associated with the last group, i.e., particles of different shapes, as authors from different countries may use different terminology to describe the same fraction; the result of which may be a misinterpretation of the results or conflicting data (Boucher and Friot, 2017). The classification of microplastics also results from the sources of origin, we distinguish here primary and secondary microplastics (Zeng, 2018).

2 Primary and secondary microplastics

Primary microplastics are plastics that are characterized by small size and are directly exposed to the environment, often bypassing mechanical and biological processing. These are particles that are deliberately produced at these small sizes. The most frequently described primary microplastics include granules used in the processing industry, particles of cosmetic products, components of abrasive materials, synthetic fibers, as well as tire particles or urban dust. The source of microplastic formation includes both the primary production of granules and its processing, and the average particle size ranges from 0.1 to 10mm, with hardness of 45–95ShA (Boucher and Friot, 2017). The content of

plastics in cosmetic products ranges from 0.05% to 12%, and their size is usually 450–800μm. This group includes makeup products, toothpaste, soaps, shower gels, and shampoos, which can contain PE, PP, PMMA, PS, and PET. The highest concentration of artificial particles is contained in face scrubs and often exceeds 17%. The production and use of plastic particles in abrasion or smoothing processes occurs widely in the construction industry (Boucher and Friot, 2017). Abrasive papers, foils, and canvases coated with aluminum oxide, silicon carbide, or aluminum zircon are a common group of microplastic sources due to their widespread use and frequent wear. The resulting microplastic usually has a size of less than 0.1mm and a high specific density. The main sources of synthetic fibers are domestic and industrial laundries. Research has shown that the amount of particles released during washing can reach several thousand for every gram of material. The type of fabric and detergent used as well as the washing parameters (temperature, washing time, water hardness) are important here. Alkaline cleaning agents and detergents cause the production of an alkaline environment that leads to chemical damage to polyester materials through the hydrolysis of ester groups that build the structure of polyesters (Lechner et al., 2015).

The last of the discussed exemplary groups of microplastics are fragments of tires and particles formed during their production. Both the process of abrasion of the tire tread and the production cause particles of synthetic rubber, that is, Styrofoam, natural rubber, and their mixtures, with many additives (Thevenon et al., 2011). The most heterogeneous group is made of microplastics contained in urban dust. The composition of the dust is diverse and we distinguish plastic particles resulting from renovation works (drilling, grinding), the use of artificial pitches or sidewalks, and particles of varnish or facade elements (Crawford and Quinn, 2017).

Secondary microplastics are formed in the processes of degradation of larger pieces of plastic under the influence of certain factors. Typically, the secondary microplastic particles have irregular shapes and sizes despite the same source, e.g., from a PET bottle. The degradation of the material and the process of microplastic formation are conditioned by external factors and the chemical properties of the material itself. Solar radiation, mechanical friction, temperature, and water have the greatest influence on the decomposition of plastic elements (De Falco et al., 2018).

For many researchers, the shape of microplastics is the basic criterion for classifying these pollutants. Here, too, the source of microplastic is extremely important: the foil particles will have a different shape than those from tires or personal care products (Koelmans et al., 2014).

Microspheres are plastic particles less than 1mm in diameter; often, these are 0.01mm particles, made of polyethylene, polystyrene, and polypropylene. Microbeads are often the basic ingredients added to personal care products such as soaps, shower gels, scrubs, and toothpaste. Their size allows them to easily get into the aquatic environment, passing through filtration systems. Research shows that a single use of facial scrub may result in the release of over 94,000 microgranules of plastic into the sewage system (Crawford and Quinn, 2017).

Synthetic fibers, the source of which are thermal and chemical treatment of materials, enter the water system mainly through sewage, and to a lesser extent, through air movement and transport with the wind. The main source is commercial and industrial washing of clothes and diapers; in addition, these fibers may come from cigarette butts. It is estimated that up to 350 fibers from 1g of fabric can be released in one wash. Subsequent tests showed that washing fleece frees more than 2000 fibers, which reduces the weight of the washed fleece by 0.7–1.3g. In the marine environment, fishing nets are the main source of fiber and they account for the largest proportion of all fiber present there. However, they differ from the fibers from clothing in terms of structure and size, which is why they are described as a separate group. The high concentration of synthetic fibers in an area is often considered a marker of population density in a terrestrial environment. As the population increases, so does the amount of fiber in the aquatic environment. Synthetic fibers mainly belong to secondary microplastics and consist of, inter alia, PET, PS, or PA, and their diameter is less than 20µm (Boucher and Friot, 2017).

Fibers of the fishing industry are characterized by a larger diameter and transparency, and are often made of nylon monofilaments, which makes them significantly different from fibers from clothes, carpets, or curtains. These fibers are an excellent example of secondary microplastics and the degradation of plastic structures by the water environment. Their degradation to the aquatic environment takes place during the physical use of nets and sea ropes during the abrasion process (Frias and Nash, 2019).

Pellets consist of particles from 1 to 5mm, the source of which can be PVC, PC, or PE. Such pellets represent one of the most common pollutants in freshwater, as they are widely distributed due to industrial production processes and use. The shape resembles a disk or egg-shaped granules.

Foil is widespread due to the short period of use of the source material, such as plastic bags or packaging. It is most often a secondary microplastic with a size of 1–10mm with the composition of, among others, PE and LDPE (Lechner et al., 2015).

Soft granules, the sources of which are, among others, car tires, include rubber or caoutchouc, and their size ranges from 0.10 to $100\mu m$.

Foams are classified as lightweight microplastics, and are commonly used in food containers and thermal packaging. The main ingredient is polystyrene. Its production uses styrene, a carcinogen for laboratory animals. It is classified as both primary and secondary microplastics (degradation of fishing containers). Its size is usually from 1 to 10 mm.

Fragments of epoxy resins, granules of paint coatings, adhesives, and materials used for repairing ships in shipyards, seas, and oceans. They are usually of simple composition, brittleness and a size of 0.1 to a few millimeters (De Falco et al., 2018).

3 Degradation paths of microplastics

Microplastics can enter the aquatic environment in various ways, e.g., through sewage, from soil to water courses, and also due to wind. In the marine environment, it can also be direct, e.g., due to deteriorating nets and the release of fibers into the ocean (Besseling et al., 2013). As shown by many studies, the presence of microplastics in water is a very common phenomenon, and its accumulation degree is related, among others, to the hydrodynamics of water, the proximity of large cities, or the development of a maritime economy and activities. In the case of inland waters, it is mainly related to the degree of urbanization of the area and the number of inhabitants (Thevenon et al., 2011). The microplastics detected in water contains both primary and secondary particles formed in the processes of physical abrasion, and almost 80% of all water pollution ends up in the ocean, where it creates "garbage patches" and directly and indirectly threatens the entire marine environment. Thus, up to 90% of all microplastics present in the assessments may be of land-based origin.

The greatest threat is from large industrial plants and households, where countless amounts of microplastics are produced on a daily basis, e.g., in the form of synthetic fibers, released in the washing process, which, together with water, get into the sewage system and then to sewage treatment plants (Koelmans et al., 2014). Not all wastewater treatment plants have filters that are effective enough to retain such small particles, and some of them end up in rivers or drinking water reservoirs (Murphy, 2016). The situation is similar in landfills, which are not always adapted to isolating waste from the environment. The process of slow degradation and the fragmentation caused by physical friction mean that a large part of the particles travel with the wind over long distances and can directly enter rivers. In a similar way, small particles of rubber from car tires get into the environment. Research confirms that tire particles or city dust can travel up to 12km in the air as a result of wind or turbulence (Thevenon et al., 2011).

The cases described above concern the penetration of microplastics directly into the water system, but it is worth mentioning that the influence of agriculture is also important. In the case of compost contamination with microplastics (foil, fertilizer additives, dust), agricultural machines are able to move materials over long distances, from where they can be washed away with rain or end up in groundwater. A small part of the total marine microplastics pollution is represented by fragments from the maritime industry, which are introduced directly. Fishing, maritime transport, and, to a small extent, tourism, are involved in this. Physicochemical properties, and particle size and density determine whether this microplastic will sink to the bottom or will be affected by sea currents and will drift gradually, merging with other pollutants and creating garbage patches (De Falco et al., 2018).

4 Classification of plastic

The physicochemical properties of plastics determine their application in various industries. Strength, resistance to mechanical damage, and effective mechanical forming are important factors (selection of appropriate physical/thermal parameters to achieve desired chemical properties) (Fig. 1, Table 1).



Fig. 1 Aerobic and anaerobic degradation of microplastics.

Abbreviations	Full name	Chemical formula	Density	Application
PET	Polyethylene terephthalate	$(C_{10}H_8O_4)_n$	1.38–1.41	BottlesPackaging
PE-HD	High-density-polyethylene	$(C_2H_4)_n$	0.94–0.98	 Pressure pipes Stretch
PE-LD	Low-density-polyethylene	$(C_2H_4)_n$	0.89-0.93	- Food foils
PVC	Polyvinylchloride	$(C_2H_3Cl)_n$	1.38–1.41	 Window frames Wire insulation
РР	Polypropylene	$(C_{3}H_{6})_{n}$	0.85-0.92	 Product packing
PS	Polystyrene	$(C_8H_8)_n$	1.04-1.08	- Polystyrene pipes

Table 1	Classification	of plastics.

Copyright © 2024 Elsevier Inc.

4.1 Polyethylene terephthalate

Polyethylene terephthalate (PET) belongs to the class of thermoplastic polymers that are easy to form by processing methods such as pressure injection or extrusion. It is formed in the process of polycondensation of ethylene glycol and terephthalic acid and is semicrystalline. The process of thermal shaping at a temperature of 140°C gives the plastic crystallinity and resistance to abrasion. Additionally, in order to obtain better physicochemical properties, an admixture of glass fibers and carbon fibers is often used. PET materials are characterized by lightness, resistance to high temperatures and mechanical damage, a cheap production process, and a very wide range of uses in the food industry. They are most often used in the production of plastic bottles, packaging for medicines and food, or in the production of foil. The use of appropriate technology allows PET products to be reused via a recycling process; usually, this is based on the mechanical grinding of the material to a granulate fraction and its reprocessing. Clothes are made from recycled PET (sweatshirts, fleece), as are backpacks, tents, and tarpaulins. Sanitary requirements prohibit the reuse of packaging materials.

4.2 Polyethylene

Polyethylene (PE) is produced by the process of polymerization of hydrocarbons, and its physical properties are similar to that of PET (thermoplasticity, semicrystalline structure). The world production of PE for 2020 was over 110 million tons and is constantly grow- ing. Depending on the molecular weight, there are five PE homopolymers: low-density polyethylene (PE-LD), linear low-density polyethylene (PE-LLD), high-density polyethylene (PE-HD), high-molecular-weight polyethylene (PE-HMW), and very high molecular weight (PE-UHMW). Higher molecular weight is associated with the improvement of the properties of the plastic, and such materials are characterized by increased resistance to friction, stiffness, and strength. Additionally, the molecular weight affects the electrical and dielectric properties. PE is considered a reusable material, most often used in heat-shrinkable films, as a lining for milk cartons, as well as in plastic bottles and food packaging. Additionally, it is waterproof, and resistant to petrol, alcohol, salt solutions, and acids. The most common forms of PE in mass production are PE-LD (0.910–0.925g/cm³, Da 40,000) and PE-HD (0.959–0.965g/cm³, Da 100,000–250,000). In order to improve its properties in the production of PE, glass fibers, stabilizers, and dyes are additionally used, which increases strength and resistance to UV.

4.3 Polyvinylchloride

The world production of polyvinylchloride (PVC) is in third place behind PET and PE. PVC is produced in the polymerization of vinyl chloride and its structure is amorphous. The process itself can be based on various methods, including emulsion, suspension, or mass, and the resulting products are E-PVC, S-PVC, and M-PVC, respectively. Additionally, it is classified based on density, as hard PVC and soft PVC. Products made of PVC are highly resistant to acids (including sulfuric and nitric acids), gasoline, alcohols, and oils. In addition, they are durable, and resistant to temperature changes and mechanical damage. The enrichment of the mixture with stabilizers improves the electrical properties. Many manufacturers prefer PVC because of its high fire resistance, which makes it possible to use it as a cover for cables or voltage wires. PVC is used for car gaskets, toys, bumpers, pipes, and building fittings (Crawford and Quinn, 2017).

4.4 Polypropylene

Polypropylene (PP) is a thermoplastic polymer of the polylefin family that is formed by the polymerization of propylene. Compared to PE, it is characterized by greater strength, stiffness and chemical resistance. PP can assume a semicrystalline or amorphous structure (depending on the spatial order of the CH3 groups), and it is considered one of the most versatile polymers. At a temperature of not more than 120°C, it is not affected by acids, salt solutions, or bases. PP has good electrical and dielectric properties, low absorption, and low permeability. To increase its resistance to weather conditions, it uses stabilizers to reduce oxygen degradation. In addition, spore agents, fillers (e.g., talc) and carbon black are used in the production of PP to improve its elastic properties. The use of PP is related to the properties of its individual types and is mainly based on injection, extrusion, and blow molding methods. This polymer is used to make elements of ventilation systems, food packaging, elements for washing machines, dishwashers, food processors, tar paper, sealing compounds, and sportswear. PP is a highly recyclable material; the process of its processing is similar to the recycling of other polymers.

4.5 Polystyrene

Polystyrene (PS) is a material with an amorphous structure, resulting from the polymerization of styrene, which belongs to the group of thermoplastic materials. Used and produced on a global scale in quantities exceeding 15 million tons per year in 2018, it is characterized by high hardness and stiffness, and resistance to abrasion, moisture and weather conditions. Additionally, PS has good electrical and dielectric properties. PS is relatively vulnerable to mechanical damage, cracks under mechanical loads, and is both brittle and flammable. To improve its physicochemical properties, PS copolymers and vinylcarbazole are often used in the production of PS; the enriched material shows high thermal resistance and increased toxicity. The production of PS is cheap; therefore, the scope of use of the material is very wide, including food pouches, containers for medicines, toys, plumbing fittings, elements of calculators, televisions, and many electric tools.

5 Physical and chemical factors influencing the fragmentation of microplastics

Abiotic degradation of plastic is related to the processes of hydrolysis, and photo- and thermo-oxidation, UV radiation, or mechanical stress. These processes change the properties of the material, making it more brittle or susceptible to damage. This leads to the material's airing, i.e., an increase in the surface sensitive to degradation. This is often associated with an increase in the toxicity of microplastics due to the accumulation of contaminants in fractures. In addition, the accumulation of substances can increase the specific mass of the microplastic particle, so that it sinks to the bottom, becoming more stable with regards to degradation due to the anaerobic environment, low temperature, and lack of sunlight (Rovira and Escudero, 2018).

The fragmentation of microplastics, i.e., the degradation process, takes place as a result of environmental factors such as temperature, light, water, or air, and is based on the processes of photo-oxidation, hydrolysis, mechanical friction, or oxidation. The degradability is considered to be the weakness of the material; therefore, modification of the polymers has led to the formation of a plastic with a low degradation index (Wagner et al., 2014).

Atmospheric oxidation is related to the process of oxygen catalyzing the decomposition of some polymers, including the removal of hydrogen chloride and the formation of double bonds in the structures of PVC chains. This process is limited only to surfaces exposed to atmospheric oxygen and, under favorable conditions, it can reach a depth of 1mm into the polymer. Water currents, waves, and factors influencing the physical abrasion of the material are also important here, thanks to which the oxidation process takes place to a greater extent.

Thermal degradation is the process of degradation of plastic due to the action of temperature and consists of three successive stages: initiation, propagation, and termination. Initiation is the process of breaking down polymer chains as a result of providing a specific thermal energy and the formation of radicals (reactive molecules). In the next stage, the radicals react with the atmospheric oxygen to form peroxy radicals, which, when decomposing, generate peroxide and alkoxy radicals. This process continues uninterrupted until it is completed, in which case, either thermal energy or oxygen is lost. The temperature at which the process of thermal degradation begins is specific for each type of material (Wagner et al., 2014).

Photo-oxidative degradation is an extremely important factor influencing the decomposition of microplastics in the aquatic environment under the influence of ultraviolet radiation. The presence of chromophore groups susceptible to UV radiation in the structures of photoreactive materials leads to the breaking of chemical bonds inside these polymers, especially in the UV-B wavelength range of 280–315nm. This significantly affects the deterioration of the mechanical

properties of the material and manifests itself in increased brittleness and cracking. One can observe yellowing of the materials and their tarnishing. High resistance to UV radiation is demonstrated mainly by PVC and PTFE, as is the sensitivity of PS and PA.

The vast majority of plastics show negligible water absorption, which prevents the hydrolysis process from taking place. In the case of PA, the water absorption is higher and can result in diffusion of water into amorphous regions of the polymers where its molecules can attach to the chain, thereby breaking the chemical bonds and weakening the material (Vezzulli et al., 2013). Plastics in the environment are constantly subjected to various mechanical stresses caused by sea currents, waves, and collisions with other materials or elements of the natural environment. These stresses are most often crushing, shearing, twisting, and abrasion. All these factors contribute to the weakening of plastic structures and their physical degradation. The material strength can be determined on the basis of the tensile at break parameter in the percentage range and, in the case of brittle materials, it is usually from 4% to 8%, while linear PE obtained over 900%, which means extremely high resistance to physical tearing and deformation (Wagner et al., 2014).

6 Biodegradation in microplastics fragmentation

Plastic biodegradation is a process that occurs as a result of the action of many environmental factors with the participation of microorganisms, including bacteria and fungi. These organisms are able to derive their food and energy from nitrogen and carbon contained in polymer structures. The degree of microplastics degradation depends on the type of polymer or its size and can be up to 1000 years (Vezzulli et al., 2013). This process takes place both in aerobic and anaerobic environments, usually has a two-stage form, and its course is additionally influenced by factors such as ambient temperature, pH, and access to oxygen or sunlight. In the first stage of microplastics degradation under the influence of oxygen, moisture, light, or enzymes of microorganisms, the bonds between carbon atoms are broken, which results in fragmentation of the polymer chain. The depolymerization of the material leads to the formation of, inter alia, environmentally friendly monomers. In the second stage of biodegradation, the resulting particles can be absorbed by microorganisms and broken down to generate energy. The end products can be water, carbon dioxide, biomass, or methane (Henderson and Green, 2020).

The knowledge about the degradability of plastics is still not very large, which demonstrates the need to conduct research in this field. Currently, research is being carried out on strains of Ideonella sakaiensis, which show the biodegradability of PET (polyterephthalene), and Galleria mollonella caterpillars, which show the ability to digest PE (polyethylene) (Henderson and Green, 2020).

7 The role and fate of microplastics in water biota

The presence of microplastics has been confirmed in many places around the world, including those uninhabited by humans and having the status of national parks. In addition, research has shown the participation of microplastics in the Arctic ice caps and in the circumpolar zones. This is due to the mobility of microplastic particles in the aquatic environment and in the atmosphere, where pollution can be transferred several hundred kilometers (Tanaka et al., 2013). Huge amounts of plastic of various sizes (from millimetersized particles to waste more than a meter in diameter) make up the Great Pacific Garbage Patch, discovered and described by Charles Moore in 1997. Located between California and Hawaii, it has an estimated size of 1.6 million km² and contains approximately 129,000 tons of plastic (Zettler et al., 2013). Studies have shown that the vast majority of this waste is photodegradable plastic, which over time decomposes into dust less than 1mm in diameter, which increases its transmission many times. Despite its origin and properties, this garbage has become a refuge and home for a large number of sea creatures, including fish, small invertebrates and flying birds. Although the concentration of microplastics in this area is very high, the negative effects of the presence of particles in the aquatic environment have also been documented elsewhere, which is becoming the subject of debate about effective methods of removing microplastics from the marine environment (Tanaka et al., 2013). The presence of rubbish clusters of various sizes and the influence of abiotic factors increase the possibility of ingestion of fragmented particles by marine organisms. In addition, these particles are characterized by a variety of shapes, colors, and sizes, which makes them attractive as food. It is also important that microplastic dust, due to the different density and buoyancy, is at different depths; surface, near-surface, and deep-sea particles have all been described. Due to the way microplastics are absorbed by marine organisms, we distinguish between accidental and deliberate consumption (Zettler et al., 2013).

Accidental ingestion most commonly affects organisms that feed through water filtration (filterers) and those that ingest microplastics present on plant parts or in other organisms, also known as passive microplastic ingestion. In the group of these animals, we distinguish mollusks, crustaceans, seabirds, and cetaceans, including whales. For some of the organisms mentioned, the microplastics contained in the intestines pose a risk related to mechanical damage and the possibility of permanent accumulation of microplastics (Collignon et al., 2012). There have been documented cases of predatory fish containing microplastics in their meat coming directly from the bodies of their victims, which indicates that humans are also at risk of being adversely affected by microplastics when consuming fish and seafood. So far, the studies have neither confirmed nor disproved such a possibility, however, this may be related to examining too small a group of individuals. Microplastic fragments have most often been found in ocean herring (Clupea haregus), horse mackerel (Trachurus trachurus), and also inside blue mussels (Mytilus edulis).

The deliberate consumption of microplastics is mainly related to the similarity of particles to natural food, especially in the case of omnivorous organisms. Identifying a natural prey can be very difficult in the presence of a variety of microplastic particles that shelter a potential prey (Boland and Donohue, 2003). Research has shown that for animals that are mainly driven by their eyesight during hunting, bright colors seem to be an encouragement to attack or try what an object is, due to natural evolutionary curiosity. Species with confirmed misdiagnosis of prey include Phalaropus fulicarius or Puffinus gravis. There was also a correlation between the concentration of microplastics and age in shearwaters. It turned out that higher consumption of microplastics occurs in chicks, which may be related to the regurgitation process, i.e., feeding
the offspring with content transferred from the stomach to the esophagus. Additionally, it may be associated with less experience of feeding in chicks and efficiency in removing larger contaminants by the young bird (Zettler et al., 2013).

8 The effect of microplastics on living organisms

The effect of microplastics on living organisms is an extremely problematic and complex issue that must take into account the natural physiology of organisms, the effects of microplastic toxicity, mechanical damage, and the role of microplastics in organisms exposed over the long term. It is extremely difficult to determine which of the factors is the most harmful, due to the possibility of accumulation and different concentrations in specific studied regions (Le Roux et al., 2015).

Analyses so far have focused mostly on mechanical damage caused by the ingestion of microplastics, weight loss, and reduced fertility, but more and more attention is being drawn to the chemical risk associated with the high toxicity of the primary microplastic material.

The constant modification of plastics and the production of new ones means that more than 40,000 different chemical pollutants resulting from the degradation and biodegradation of plastics have been distinguished, and the pool is being increased by another six to seven substances every day. Desired material properties, such as abrasion resistance, UV resistance, or increased strength, make these particles extremely durable, which is why they are called persistent organic pollutants (POPs), and in combination with their toxicity, they have become a real threat to individual species and entire populations This led to the signing of the Stockholm Convention in 2001 and attempts to impress an enduring legislation on pollution. At that time, the division of substances into three groups was distinguished. The first annex contains substances that are strictly prohibited, the second annex, those whose use will be restricted, and the third annex includes regulations concerning direct releases into the aquatic environment. The most documented threats to organisms are phthalates, polycyclic aromatic hydrocarbons, organochlorine pesticides, bisphenols A, and brominated combustion retardants (Thevenon et al., 2011). They are often used

as pesticides, insecticides, cooling liquids, pigments, or resin components (Collignon et al., 2012).

These compounds cause, inter alia, increased cracking of bird eggs, liver damage in mammals, cancer, and hormonal disorders. Microplastics act as carriers (vectors) of toxic compounds, which is favored by their high ratio of surface area to volume. Studies have shown that microplastic particles can carry several different toxins capable of causing histopathological disturbances and glycogen depletion in the tested aquatic organisms (Hirai et al., 2011).

Damage resulting from ingestion of microplastics by aquatic organisms is directly related to the species, type, and amount and size of the ingested particles. These injuries may be a temporary disturbance of physiology, longterm, chronic and increasing symptoms related, inter alia, with accumulation and, in special cases, indirectly lead to the death of the individual (Hirai et al., 2011).

One of the first reported parameters related to the swallowing of plastic particles is weight loss and the reduction in growth rate. This is due to the apparent feeling of fullness and reduced absorption of nutrients. In addition, studies conducted on invertebrates have shown that the growth rate can be reduced by 4% –20% (Le Roux et al., 2015).

Microplastic present in the digestive tract deteriorates the general condition of the body, causes ulceration, and by covering the intestinal walls, it also affects digestion. In the case of mussels, Japanese turmeric and copepods, reproductive disorders and a reduction in the number of offspring have been documented (Rochman et al., 2020).

Another disturbing effect of swallowing microplastic is its ability to remain in the tested organisms and accumulate in tissues like worms (Fig. 2). In this case, the influence of the microplastic of the finest fraction, often called nanoplastic, is considered. It has been confirmed that such fine dust has the ability to penetrate biological membranes; therefore, its transmission can take place throughout the body (Zettler et al., 2013).



Fig. 2 Microplastic particle size 45–63um in the muscle tissue of an earthworm (Dendrobaena veneta) after 30 days of exposure.

Many studies document the presence of fine microplastics in organs such as the eyes, brain, kidneys, liver, and also in muscle tissue (Thevenon et al., 2011). The correlation between the time necessary for the accumulation of microplastics, its concentration, type, and the species tested is not known so far, however, studies of soil organisms indicate that it may occur after about 21 days of exposure to a 1% contamination (Le Roux et al., 2015).

9 Summary

Global plastic production in 2019 exceeded 368 million tonnes, and the demand for plastics continues to grow. Low production costs and wide use of plastic mean that it is used in almost all industries. Despite the increasing number of appeals to limit the use of plastic and to produce biodegradable plastics, plastic is still the basic production material. Additional modifications aimed at improving the properties of the material are often associated with a longer period of degradation (Hirai et al., 2011).

Copyright © 2024 Elsevier Inc.

A lot of polymer products have a very short period of use and then become useless, such as plastic cups, food packaging, foil, cutlery, or bottles. Some of them are reused, but most end up in landfills (Frias and Nash, 2019).

As a result of biotic and abiotic factors, plastics are subject to degradation, which is a direct cause of the formation of secondary microplastics. An additional threat to the natural environment are also primary microplastics, the source of which are, among others, the cosmetic industries, using polymer microgranules in toothpaste, abrasives, or soaps.

The concentration of microplastics, both on land and in the aquatic environment, increases every year, and in a highly urbanized environment its concentration may exceed the permissible standard many times. Research on the presence of microplastics most often focuses on the marine environment, where these particles pose a much greater threat to the diversity of organisms. It has been confirmed that microplastics are ingested by small organisms, due to being mistaken for food (Tanaka et al., 2013). Additionally, plastics often exhibit toxic properties, which contribute to their lethality to organisms (Rochman et al., 2020).

At least eight different types of microplastics have been classified, based on their shape, chemical composition, or morphology, including microspheres, synthetic fibers, marine net fibers, pellets, films, soft granules, or resins. In addition, the division according to the size of the particles themselves has been described, distinguishing nanoplastic, microplastic, mesoplastic, and megaplastic. This definition applies to both microplastics present in the aquatic and terrestrial environments (Frias, 2019).

The degradation of microplastics in an aqueous environment is a long-term process and depends on many factors such as temperature, light, mechanical stress, or the presence of microorganisms (Rochman et al., 2020). In addition, the efficiency of degradation is influenced by the type of polymer of which the material is composed, its size, and shape. Studies have shown that the degradation of larger plastic particles leads to the formation of a significant amount of microplastic, which can be transported by sea currents or wind over very long distances. Additionally, airing of microparticles creates fissures in which substances such as biomass and other contaminants can collect, causing the microplastic to sink to the bottom, often in silt or clay soil. The conditions there are not conducive to complete degradation; therefore, microplastics on the bottom are a real threat (Hirai et al., 2011). Most relevant to the development of research on the presence of this type of pollutant in ecosystems is the fact of the slow degradation and biodegradation of plastic in the environment and the increase in its concentration. Methods of quick detection of microplastics from soil or water and its removal are still unknown. It is recommended to conduct laboratory tests using a higher concentration of microplastics in water or soil to better visualize the effects on plant and animal organisms (Tanaka et al., 2013).

The resilient development of the economy, constant modifications of the chemical composition of waste plastics, and the lack of awareness of rational waste management are undoubtedly a global problem that may turn out to be an ecological disaster on an unprecedented scale in the future. The amount of waste deposited in uncontrolled landfills may become a problem in terms of many years of soil contamination with many microplastic fractions at the same time. The exact influence of the smallest fraction not exceeding 500µm on plants or animals is not known, however, it has been confirmed that it is often ingested by animals inhabiting the soil, absorbed by plants, and accumulated in tissues (Hirai et al., 2011). This constitutes an additional threat panel and surely research should be directed for faster detection and removal of microplastics from both soil and aquatic environments (Collignon et al., 2012).

Acknowledgments

The research has been funded by university grant BS/PB-400/301/22. The research was financed as part of the GeneInUse Student Scientific Association project and student project No. SKN/SP/496788/2021 financed by the Minister of Education and Science from the state budget under the program "Student scientific associations create innovations."

References

- Besseling, E., Wegner, A., Foekema, E.M., van den Heu, H., Greve, M.J., Koelmans, A.A., 2013. Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm Arenicola marina (L.). Environmental. Sci. Technol. 47 (1), 593–600.
- Boland, R.C., Donohue, M.J., 2003. Marine debris accumulation in the nearshore marine habitat of the endangered Hawaiian monk seal, Monachus schauinslandi 1999–2001. Mar. Pollut. Bull. 46, 1385–1394.
- Boucher, J., Friot, D., 2017. Primary Microplastics in the Oceans: A Global Evaluation of Sources. IUNC, Gland, p. 234. In press.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Mar. Pollut. Bull. 62 (12), 2588–2597.
- Collignon, A., Hecq, J.H., Galgani, F., Voisin, P., Collard, F., Goffart, A., 2012. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. Mar. Pollut. Bull. 64, 861–864. Crawford, C.B., Quinn, B., 2017. Microplastic Pollutants. Elsevier.
- De Falco, F., Gullo, P.M., Gentile, G., Di Pace, M., Cocca, M., Gelabert, L., Brouta-Agnesa, M., Rovira, M., Escudero, A., 2018. Evaluation of microplastic release caused by textile washing processes of synthetic fabrics. Environ. Pollut. 236, 916.
- Frias, J.P.G.L., Nash, R., 2019. Microplastic: finding a consensus on the definition. Mar. Pollut. Bull. 138, 145–147.
- Henderson, L., Green, C., 2020. Making sense of microplastics? Public understandings of plastic pollution. Mar. Pollut. Bull. 152, 110908.
- Hirai, H., Takada, H., Ogata, Y., Yamashita, R., Mizukawa, K., Saha, M., Kwan, C., Moore, C., Gray, H., Laursen, D., Zettler, E.R., Farrington, J.W., Reddy, C.M., Peacock, E.E., Ward, M.W., 2011.
 Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. Mar. Pollut. Bull. 62 (8), 1683–1692.
- Koelmans, A.A., Besseling, E., Foekema, E.M., 2014. Leaching of plastic additives to marine organisms. Environ. Pollut. 187, 49–54.
- Le Roux, F., Wegner, K.M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C.R., Amaro, C., Ritchie, J.M., Defoirdt, T., Destoumieux-Garzo'n, D., Blokesch, M., Mazel, D., Jacq, A., Cava, F., Gram, L., Wendling, C.C., Strauch, E., Kirschner, A., Huehn, S., 2015. The emergence of Vibrio pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). Front. Microbiol. 6, 830.
- Lechner, A., Keckeis, H., Lumesberger-Loisl, F., Zens, B., Krusch, R., Tritthart, M., Glas, M., Schludermann, E., 2015. The Danube so colourful: a potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. Environ. Pollut. 188, 177–181.
- Murphy, 2016. Wastewater treatment works (WwTW) as a source of microplastics in the aquatic environment. Environ. Sci. Technol. 11.
- Rochman, C.M., Hoh, E., Kurobe, T., Teh, S.J., 2020. Ingested plastic transfers contaminants to fish and induces hepatic stress. Sci. Rep., 3263.
- Rovira, A., Escudero, R., 2018. Evaluation of microplastic release caused by textile washing processes of synthetic fabrics. Environ. Pollut. 236, 916–925.

- Tanaka, K., Takada, H., Yamashita, R., Mizukawa, K., Fukuwaka, M.-A., Watanuki, Y., 2013. Accumulation of plastic-derived chemicals in tissues of seabirds ingesting marine plastics. Mar. Pollut. Bull. 69, 219–222.
- Thevenon, F., Graham, N.D., Chiaradia, M., Arpagaus, P., Wildi, W., Pote, J., 2011. Local to regional scale industrial heavy metal pollution recorded in sediments of large freshwater lakes in Central Europe (lakes Geneva and Lucerne) over the last centuries. Sci. Total Environ. 412–413, 239–247. Thomson, R.C., 2004. Lost at sea: where is all the plastic? Science 5672. In press.
- Vezzulli, L., Colwell, R.R., Pruzzo, C., 2013. Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment. Microb. Ecol. 65, 817–825.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Mun^oz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A.D., WintherNielsen, M., Reifferscheid, G., 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. Environ. Sci. Eur. 26, 16.

Zeng, E.Y., 2018. Microplastic Contamination in Aquatic Environments. Elsevier, pp. 102–104.

Zettler, E.R., Mincer, T.J., Amaral-Zettler, L.A., 2013. Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. Environ. Sci. Technol. 47 (13), 7137–7146.

D.2.

Klimasz, Anna Grobelak, *"Global scale of microplastic occurrence"* artykuł przeglądowy, opublikowany w repozytorium cyfrowym Zenodo: https://doi.org/10.5281/zenodo.14953335

Global scale of microplastic occurrence

Klimasz Marek, Anna Grobelak

Faculty of Infrastructure and Environment, Czestochowa University of Technology; marek.klimasz@pcz.pl; anna.grobelak@pcz.pl

Abstract: The mass production of plastics due to their low production costs and versatile use has resulted in the generation of a significant amount of waste. Between 1950 and 2015, a total of approximately 6,300 million tonnes (Gray et al., 2017) of plastic waste was produced, with production accelerating significantly in recent years. It is estimated that by 2060, an additional 270 million tons will be generated (Lebreton et al., 2018). Despite the fact that modern plastics are often recyclable, their recycling rate is still low and, globally, is less than 10% (Avio et al., 2017). Depending on regulations, international relations and environmental awareness, plastic waste is exported, landfilled, incinerated and less frequently recovered. This article collects information on the global production of plastics, projections for demand in the coming years, the scale of occurrence in the environment and the threat they pose to flora and fauna.

Keywords: microplastics; plastics; environmental pollution

1. Production of plastics

Global plastics production in 1950 was just 2 million tonnes, 359 million tonnes in 2018, 449 million tonnes in 2020 and 475 million tonnes in 2022 (plasticeurope.org). Preliminary projections for 2024 oscillate between 500 and 502 million tonnes (Huang et al., 2021). By 2022, 9.4 billion tons of plastics were produced in total. The trend in the types of plastics produced since 2000 generally remains unchanged, with minor fluctuations. Partial production of primary plastics in 2019 included polypropylene at 72.8 million tons, polyethylene at 60.5 million tons, polyvinyl chloride at 51.3 million tons, LDPE at 21.1 million tons, and rubber at 7.7 million tons (Geyer et al., 2017). China remains the main producer of plastics (32%), followed by the USA (17%) and Europe at 14% (year 2022), with Asia accounting for approximately 54% of global production on a continental scale. Considering Europe alone, total production in 2022 was 58.7 million tonnes, with Germany accounting for 21.6%, Belgium 14.6%, the Netherlands 11.7% and France 9.5% (plasticeurope.org). There is also data confirming the improper disposal of waste, which has been incinerated uncontrollably, dumped into seas and oceans, or ended up in so-called illegal dumpsite (Geyer et al., 2017). In terms of kilograms per capita, the 2019 statistics highlight Suriname (39 kg/person), the Philippines (37 kg/person), Malaysia (25 kg/person), and Venezuela (24 kg/person). Continentally, it is Africa (10 kg/person), Asia (8 kg/person), North America (5 kg/person) and Europe (2 kg/person) (Waste Atlas, 2019). Considering the statistics, it is easy to see that countries with low environmental awareness, with underdeveloped collection and waste management, have the biggest problem with plastics management. The production of plastics is not closely linked to its total local use or to neighbouring countries, and exports and imports of plastics are entirely natural phenomena, despite low production costs. Analysing this migration in terms of the value of the material, the top destinations in 2022 are — in the case of imports — the USA (19.3%), South Korea (12.3%), China (11.8%) and the UK (9.4%), while exports in the same year are the UK (15.1%), USA (12.5%), Turkey (11.6%) and China (11.4%). Exports totalled €37.2 billion, imports €31.8 million, the value of the surplus of imports and exports in a downward trend from 2020 was €5.4 million in 2022 (United Nations, 2023). The growing demand for plastics in key industries is also unchanged. In 2021, demand in Europe alone was close to 50.5 million tonnes, with Germany (23.2%), Italy (14.3%), France (9.4%), Spain (7.5%) and Poland (7.5) having the most demand, followed by Sweden (2%), Romania (1.7%) and Hungary (1.7%) (plasticeurope.org).

2. Recycling

Studies show that a much higher recycling rate is achieved for separated waste than for mixed waste, due to segregation costs and separation methodologies. In Europe, a total of more than 29 million tonnes of waste was collected in 2020, of which more than 65% was recycled from separate waste and only 5% from mixed waste, thus reducing landfill to 8% for separate waste compared to 38% for mixed waste. Countries with high recycling rates, with an annual average of more than 40%, are the Netherlands (45%), Norway (44%), Spain (43%) and Denmark (40%), while in the 30%-40% recycling range are, among others, Sweden (39%), Slovenia (35%) and Slovakia (30%). Poland, with a recycling rate of 27%, falls within the range of 20% to 30%, along with Croatia (28%), France (25%), and Bulgaria (23%). (Geyer et al., 2017).

3. Microplastics in water bodies

According to analyses, global emissions of plastics into rivers, seas and oceans ranged from 9 to 23 million metric tonnes in 2016 (Lau et al., 2020). According to many researchers, river run-off accounts for a significant percentage of the total amount of plastics in the oceans. However, subsequent analyses have shown a relatively large potential for computational error explaining the estimation rules based on the correlation of population density and river basin size. Modern modelling is much more complex and takes into account the magnitude of the river flow, the potential for particle transport e.g. by wind, precipitation and the geology of the area. On this basis, the authors of a study published in 2021 showed that plastic emissions to rivers do not comprise 56%–91% of the total plastic in the oceans as previously thought, but only 18% (Gonzalez et al., 2023). Asian countries, led by the Philippines, are the largest contributors. According to a current study, among the 10 most polluting rivers in the world, 7 are in the Philippines, 3 in India and 1 in Malaysia. These 10 rivers collectively account for 60%-88% of the emissions of all rivers into the ocean, and the Pasig River (Philippines) alone generates 6.4% of the world's pollution; the extent of its pollution is so high that the river has become a money-making place for people who look to it for recyclables, building materials and valuables. A total of 4,820 rivers in the Philippines contribute 356,400 tonnes of plastic waste into the ocean annually, while 1,169 rivers in India contribute 126,600 tonnes. In Malaysia, 1,070 rivers are responsible for emissions of 73,100 tonnes, and in China, 1,309 rivers emit 70,100 tonnes per year (Lebreton et al., 2017). The study covered the global scale and the most polluting rivers in the world are highlighted in bright colour.



Figure 1. https://theoceancleanup.com/sources/

The fate of plastics in open waters varies enormously. Studies have shown that around 50% of plastics sink due to low buoyancy, the remainder may be washed ashore or drift guided by sea currents and wind (de Frond et al., 2019). An additional stimulus is the so-called eddies, which do not allow the plastics to move away towards land, thus forming clusters of waste, commonly referred to as rubbish patches. There are currently five such patches known to occur at different ocean latitudes, with the largest, the Great Pacific Garbage Patch, located between Hawaii and California. The size of the Pacific Great Garbage Patch has been determined to be 1.6 million km² and includes a fraction that does not form a compact whole or is composed of smaller particles. Its mass is estimated at 100,000 tonnes, with the number of particles ranging from 1.1 to 3.6 trillion pieces larger than 5 mm in size, while pieces smaller than 5 mm comprise only 8% of the total (Lebreton et al., 2018). Globally, this represents 268,940 tonnes of plastic and 5.25 trillion fragments in the oceans, with 55.6% of the particles and 56.8% of the total mass of plastic found in the Northern Hemisphere. In the Southern Hemisphere, the vast majority of the mass is in the Southern Indian Ocean (Wright

et al., 2020). Surveys in the Mediterranean Sea, towing nets and recovering plastics in a welldefined manner showed results indicating that more than 92% of individual catches resulted in plastics being found, with an average density of 100–100,000 pieces per square kilometre (70% of measurements) and to a lesser extent (16% of measurements) 890,000 pieces per square kilometre. Observation of plastics and more advanced surveys found that polystyrene, and whole or fragmented fishing buoys were the most commonly fished out. Taking into account the particle nomenclature, 75.4% of all plastics are macroplastics, 11.4% are mesoplastics, and approximately 13% are microplastics. The authors also point out that there are many discrepancies in the data published in earlier years (due to erroneous modeling and calibrations, as well as increasing pollution). For example, data collected in 2014 in a certain area of the North Pacific indicated a mass of floating plastics of 21,000 tons, while newer studies showed 12,000 tons, and the total mass ranged from 7,000 to 35,000 tons, whereas current research reports at least 35,000 tons in the same area. Additionally, the authors of this study point out that in some cases, the differences reach even a hundredfold of the result. The justification for the discrepancies over time seems to have high substantive value and points to a cascading degradation process, updating modelling algorithms, the use of different mesh densities, and the range of the lower limit of plastic sizes (Chen et al., 2017)

4. Microplastics in organisms

Based on 747 publications and papers summarising the data therein, the effects of plastics on living organisms can be determined. A total of 914 species have been described in the context of plastic ingestion, entanglement or both (Provencher et al., 2017). Specifically, there are 701 species that ingest plastics and 354 exposed for entanglement (Kunh et al., 2015). Ingestion of plastics is associated with their variety of colours, shapes, sizes and with suspension at different depths in the water column and can be either intentional (as food) or accidental, passive. The highest rate of particle ingestion and entanglement was recorded in seabirds (41% of birds surveyed), with 9.9 particles per individual. The most vulnerable species were divers (*Gaviiformes*) (80%), terns (*Sterninae*) (62%), pelicans (*Pelecanidae*) (37%), gulls (*Larinae*) and jaegers (*Stercorarius*) (about 42%). In this study, 43,525 samples were utilised, of which 27.7% contained plastics (12,065 pieces). In the case of mammals, 19,484 samples were examined, with 4% containing microplastics (860). The highest ingestion rates were recorded in seals (71%), manatees (69%), walruses (66%), and whales (60%) (Deng et al., 2023). Of great interest is the study and thus the number of publications on sea turtles, where both high entanglement rates and particle ingestion close to 100% were

found in all 7 species (3,639 individuals tested, 32% of samples contained plastic). Overall, 17% of the 693 protected and Red Listed endangered species are exposed to plastic ingestion or entanglement in nets, and for many of them plastic-related death is the second most common cause of death after intentional and deliberate killing. Individuals permanently or temporarily exposed to plastics may be susceptible to disturbances in nutrition, reproduction, and mechanical damage (Kühn and van Franeker, 2020). Polypropylene and polyethylene 40 µm -100 µm negatively affected phytoplankton including the marine diatom (Thalassiosira pseudonana), marine dinoflagellates (Dunaliella tertiolecta) and green algae (Chlorella vulgaris) by inhibiting their growth up to 45% (Sjolemma et al., 2016). In the case of Skeletonema costatum, Thalassiosira pseudonana, Phaeodactylum tricornutum, the photosynthetic activity, distortion of thylakoids, cell membranes and modification of the chemical composition of secreted substrates has been described by Zhang (Zhang et al., 2017) and Shiu (Shiu et al., 2020). In sediments where the presence of micro and nano plastics above 0.5 per cent was confirmed, invertebrate abundance decreased. It has been shown that polyethylene and polypropylene 10-90 µm in diameter can accumulate in the intestines of fry and gills of adult Danio priuris species, affecting liver degeneration, increasing cortisol levels while decreasing glucose levels. In addition, plastics interfere with synaptic transmission and inhibit gene expression. Among the common fish studied (carp, crucian, tench, perch, etc.), microplastics in the gills, liver and brain affected reduced swimming speed, fry growth, oxidative stress and digestive enzyme activity.

The presence of microplastics and nanoplastics in the soil can affect plant growth as both a stimulator and an inhibitor. In the case of cress (*L. sativum*), the concentration of micro- and nano-plastics ($10^{3} - 10^{7}$ P mL⁻¹) after 72 hours of exposure influenced their accumulation in the seed pores, thereby reducing water absorption and delaying germination. In garden cress (*Lepidium sativum*), the same concentration of particles delayed germination from 21% to 56% depending on the concentration (Bosker et al., 2019). Similar results were obtained for perennial ryegrass (*Lolium perenne*) (6% to 7% inhibition) (Boots et al., 2019). In wheat (*T. aestivum*), PS particles from 0.2 µm to 2 µm were transported from the roots to the shoot and, as indicated by the authors, could be the cause of oxidative stress (Li et al., 2020). In thale cress (*A. thaliana*) the positively charged microplastic after 35 days of exposure affected mineral metabolism and uptake of elements from the soil (Sun et al., 2020). In the case of crocus (*C. sativus*), polystyrene of 100-700 µm was taken up by the stem and transported to leaves, flowers and fruit (Li et al., 2021). In maize, the polystyrene

absorbed by the leaves accumulated in the tissues and moved towards the roots (Sun et al., 2021). However, microplastics do not always show strong inhibitory effects; in onion (*Allium cepa*), the presence of plastics at low concentrations did not significantly affect germination and development (0.01, 0.1 and 1 g/ L⁻¹ PS 50 nm) (Giorgetti et al., 2020). In general, the most commonly described negative effects of plastics on plants concern germination, weight, growth, diameter and root area, plant growth, chlorophyll content and photosynthetic efficiency (Sun et al., 2020), oxidative stress and related enzymes (Jiang et al., 2019), metabolic processes, content of elements such as magnesium, calcium and iron (Liana et al., 2021), cytotoxicity, genotoxicity, and genetic anomalies (Giorgettini et al., 2020), reduction in fruit quantity and weight (Meng et al., 2021), content and activity of phytohormones, shortening of the generative phase, reduction of yield and deterioration of yield quality (Zhou et al., 2021).

5. Microplastics in soil

Global soil contamination by plastics is an extremely important problem and translates to some extent into fertility and ecosystem health. Many quantitative and qualitative studies are currently being conducted, but when comparing them, attention should be paid to the compatibility of sampling methodology and analysis. In this article, data from studies conducted by a single research unit were collected, resulting in high trial repeatability and low methodological divergence. The data comes from 155 locations in Germany, Austria, Slovakia, Spain, Russia, China, South America, North America and Australia, among others. In China, microplastic concentrations in agricultural areas where plastic greenhouses were used, and sewage sludge was fertilised were 13,470 pcs/kg⁻¹ to 42,960 (average 26,070), 7,100-26,630 pcs/kg⁻¹ in green areas (average 14,440 pcs/kg⁻¹), and 96,000 to 690,000 pcs/kg⁻¹ in forests around Wuhan. As the authors point out, 82% of the particles detected were below 250 µm, with fibres being the dominant fraction. The lowest concentrations were found in the eastern areas of the country, in rice fields, where it was about 18pcs/kg⁻¹. The averaged values of the European countries give an average of 2914 pcs/kg⁻¹ and are higher than those recorded in China. In Spain, in areas of Valencia where sewage sludge was regularly applied, concentrations tripled to 33,000 sh/kg⁻¹ (from 999 pcs/kg⁻¹ to 80,658 pcs/kg⁻¹), while a test point in Denmark recorded concentrations of 71,000 pcs/kg⁻¹, with pp and ps being the dominant materials. In Germany, around Cologne, studies published in mass units showed 915±63 mg/kg⁻¹, which gives a result similar to industrial areas in other parts of Europe. However, other samples from this country yielded very low concentrations,

averaging 11 pcs/kg⁻¹. According to the study, the greatest impact of sewage sludge application on the amount of microplastic was in America, with concentrations increasing from 4 pcs/kg^{-1} all the way up to 542 pcs/kg^{-1} after 2 applications of sludge over 5 years. In the New York area, soil concentrations ranged from 370 pcs/kg⁻¹ to2,060 pcs/kg⁻¹, with an average of 1,235 pcs/kg⁻¹. In Chile, in areas where sewage sludge was applied, results yielded from 1 000 pcs/ kg⁻¹ to 10 200 pcs/ kg⁻¹, in areas without sludge 0 pcs/ kg⁻¹ -2 200 pcs/ kg⁻¹. In Mexico, concentrations ranged from 870 pcs/kg⁻¹to 1,900 pcs/kg⁻¹, with 95% being below 50 µm. In Iran, five samples from the Fars province yielded a total of 17 pcs/kg⁻ ¹ to 38 pcs/kg⁻¹, with a mass of 0.1 mg/kg⁻¹. In Australia, studies were conducted in heavily polluted areas near industrial sites in Sydney, where the average particle concentration was 24,000 mg/kg⁻¹ and the maximum reached 67,500 mg/kg⁻¹. In a global comparison, the median was calculated at 1,162 pcs/kg⁻¹ (25% - 89 pieces/kg⁻¹, 75% - 2,870 pieces/kg⁻¹), with a mass of 0.6 mg/kg⁻¹. Areas containing sewage sludge had an average of 1,998 pcs/kg⁻¹ 1 (25% - 999 pcs/kg⁻¹, 75% - 3,616 pcs/kg⁻¹), with an average mass of 2.2 mg/kg⁻¹. The studies were mainly conducted in urban areas (three times more often), with the plastic values ratio in cities and green areas differing by one order of magnitude, confirming a strong correlation between population density and soil pollution. Moreover, the concentration of microplastics in soil in industrial areas was on average 2 to 4 times higher than in other areas (Büks and Kaupenjohann, 2020).

6. Atmospheric microplastics

The presence of microplastics has been confirmed in the atmosphere of urban, rural, and even sparsely populated and uninhabited areas, indicating potential long-distance transport of particles. However, the study of the content and movement of these pollutants in the air is a relatively new field of interest and there is still a lack of information on the subject (Klain and Fischer, 2019), and the most commonly used method is the passive collector (total deposition over a specified time) (Allena et al., 2019). Currently, a standardised methodology developed by the Norwegian Institute for Air Research is used, using plastic-free glass-metal collectors and giving reliable measurements and repeatability. Nevertheless, the authors also used suction pumps in their study (Liu et al., 2019), considered active methods for air analysis. The results varied significantly from one measurement site to another. In Paris, it was 118 particles per square meter per day (particles/m²/day), in Hamburg 275 particles/m²/day (Dris et al., 2016; Klain and Fischer, 2017), Dongguan in China ranged from 175 to 313 particles/m²/day, Yantai in China 602 particles/m²/day (Zhou

et al., 2017). Nottingham in the United Kingdom reported 31 particles/m²/day, while a high level was also observed in remote Pyrenean regions at 33 particles/m²/day (Allen et al., 2019). Additionally, in wet snow deposits in Helsinki, just under 700 particles per 1 m² were detected. The concentration of microplastics indoors is usually higher than in open spaces. For example, in China, indoor concentrations ranged from 1 to 60 pcs/m³, compared to 0.3 to 1.5 pcs/m³ outdoors, indicating that microplastics indoors are a significant source of atmospheric pollution (Dris et al., 2017) In China and Iran, fibres were the predominant type of plastic (60% and 35%, respectively), while in Germany, microgranules were dominant (fibers accounted for only 5%). In the Pyrenees, films also made a significant contribution (28%) (Abbasi et al., 2019). Microplastics suspended in the air are susceptible to air vortexes, winds, and continental air masses, leading to their migration over considerable distances. Plastic has been observed on Tibetan glaciers, in the Alps, and in marine areas. The main factors influencing these parameters are the mass, shape, and size of plastic particles (Zhang et al., 2019).

7. Forecasts for the future

Considering the assumptions of the researchers described in the 2019 publication about the future of plastics, based on current data, population growth rates and GDP, the following conclusions can be drawn. In 2020, plastic waste production may amount to 200 million tons, increasing to 230 million tons by 2025, 300 million tons by 2040, and 380 million tons by 2060. According to one of the scenarios outlined in the publication, the demand for plastics in Asia will increase from 99 million tons annually in 2020 to 151 million tons in 2024 and 193 million tons by 2060. India is projected to become the country with the highest level of mismanaged waste and waste production, generating between 38-52 million tons of waste annually. Cities such as Manila (Philippines), Cairo (Egypt), and Kolkata (India) will exceed the threshold of producing 1 million tons of waste per year. A more optimistic scenario assumes infrastructure improvement and a reduction in poorly managed waste to 10%, resulting in waste production around 50-90 million tons in 2060, instead of the projected 193 million tons for Asia. According to the authors, global demand for plastics would then focus on Africa, increasing from 23 million tons in 2010 to 72 million tons by 2060. Forecasts for Africa show a strong growth trend, with an overall increase of 210%, representing a 375% increase compared to the last 10 years. The correlation is expected to strengthen, considering the population, which is projected to reach 2.9 billion by 2060, indicating a 245% increase from 2015 (UN 2015).

8. Transport of plastic waste

The export and import of plastic waste are subjects of discussion in many countries and often provoke controversy. In 2016 alone, approximately half of the recyclable waste (14.1 million tons) was exported by 123 countries, with nearly half of this waste originating from China. Since the early 1990s, China has imported nearly 106 million tons of waste, accounting for 45% of the world's total imports. Export of waste typically occurs from high-income countries to poorer countries, but significant changes occurred since 2013 when China implemented strict policies regarding plastic waste imports. While changes in the Chinese market began in 2010, three years later, the country strengthened restrictions, leading to what was colloquially termed the "green fence" or "green wall." Due to the ongoing flow of waste, which was difficult to estimate, China eventually announced a permanent ban on the import of non-industrial plastic waste in 2017. Prior to the reform, the average import was around 8.8 million tons annually, with most of it being buried or stored improperly, leading to severe environmental pollution. The legal regulations in China's economy caused turmoil in waste import and export, with country rankings changing annually. In 2019, the top exporters included Japan (55 thousand tons), Hong Kong (17.5 thousand tons), Canada (8.35 thousand tons), and Poland (6.41 thousand tons). In 2020, Japan (818 thousand tons), USA (206 thousand tons), France (189 thousand tons), Belgium (152 thousand tons), and Sweden (20 thousand tons) were the top exporters. The top importers are Turkey (742 thousand tons), Malaysia (459 thousand tons), Vietnam (291 thousand tons), Indonesia (138 thousand tons), and Thailand (65 thousand tons). Turkey also leads in the import of waste overall, with a diverse composition. In 2022, Turkey received a total of 12.4 million tons from Europe, followed by India with 3.5 million tons, and the United Kingdom with 2 million tons.

9. Discussion

There is no doubt that the plastics industry is a thriving sector of the economy with an everincreasing demand. Ease of moulding, strength and relatively low weight make plastic an integral part of everyone's daily life in almost every aspect. However, the low production costs contribute to a low recycling rate, leading to the vast majority of plastic waste being either landfilled, incinerated, or ending up in the environment. Complementing this with countries characterised by low environmental consciousness or inefficient waste management systems, we confront a significant challenge posed by plastic pollution in oceans, lakes, forests, and agricultural fields. The current classification defines plastics by size, origin, density or colour, and microplastics are among the most commonly described in terms of threat to the ecosystem. Although these microplastics have been described for many years, their fate in the soil or the atmosphere is still unknown. Studies document the extraordinary sensitivity and fragility of ecosystems and their potential degradation by plastics. The effects are often cascading, where the weakening or elimination of one species immediately impacts the dominance of another. Globally, this is an exceedingly complex issue to describe, and it is heartening to know that analyses are increasingly being conducted simultaneously in many locations to achieve consistent results. Currently, marine ecosystems are most vulnerable to the effects of plastics, both directly and indirectly, such as through the presence of toxins on the surface of plastics (Gallo et al., 2018). 2018). The fragmentation of microplastics, their settling on the seabed, and coagulation result in more plastics becoming permanently trapped on the ocean floor. Similarly, microplastics present in soil should be considered, as they have been detected in many agricultural, forest, and urban areas. There is evidence of the absorption of the smallest particles by plants, which affects their electrolyte balance and can subsequently influence yield. Negative impacts on organisms, including earthworms, and ongoing soil erosion have been documented. The use of sewage sludge, mulching, and agricultural practices introduce plastics of various sizes into soils, which remain uncontrolled and are often extremely difficult to detect. The final aspect is plastics suspended in the air, which can be inhaled by organisms, settle on objects and food, and migrate with the wind. Despite studies describing the physics of air currents and the possibilities of transport, there are few documented cases of long-distance migration, such as reaching ice caps. Most often, these are local migrations within cities or countries, although there is a lack of a sufficiently large number of publications on this topic.

10. Conclusions

This article aimed to summarise the most important and current reports on the prevalence of microplastics and their impact on ecosystems. In many of the studies whose results were included, the methodology, calibration, and analysis systems were chosen experimentally, indicating a lack of uniform analytical procedures. Considering the counters that continuously show the amount of plastics entering the environment every second, this article will serve as a retrospective review at the time of its publication. It is also essential to highlight and commend the efforts of organisations involved in removing plastics from the environment, their commitment, and their ongoing research. As noted by many authors, failing to take environmental protection measures could have catastrophic consequences and lead to severe ecosystem disruptions. From an economic development perspective, this is an

exceedingly difficult task to accomplish; all available statistics indicate a continued demand for plastics, correlated with the growing human population and improving living conditions. Emerging biodegradable and recyclable bioplastics still represent only a small fraction of the total, and legal regulations often conflict with environmental protection policies, imposing norms on the entire recycling sector. Solving the problem on a global scale requires solutions at every stage of a plastic's "life," from production, transport, and use to recycling, and remains financially out of reach for many impoverished regions.

References

- Allen, S., Allen, D., Phoenix, V. R., Le Roux, G., Jiménez, P. D., Simonneau, A., Binet, S., and Galop, D.: Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment, Nat. Geosci., 12, 339–344, 2019.
- Avio C, Gorbi S, Regoli F (2017) Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat. Mar Env Res 128:2–11
- Boots, B.; Russell, C.W.; Green, D.S. Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground. *Environ. Sci. Technol.* 2019, 53, 11496–11506. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
- Bosker, T.; Bouwman, L.J.; Brun, N.R.; Behrens, P.; Vijver, M.G. Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant *Lepidium sativum*. *Chemosphere* 2019, *226*, 774–781. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]
- Brooks, A. L., Wang, S. & Jambeck, J. R. The Chinese import ban and its impact on global plastic waste trade. *Sci. Adv.* 4, https://doi.org/10.1126/sciadv.aat0131 (2018).
- Büks and Martin Kaupenjohann Global concentrations of microplastics in soils a review SOIL, 6, 649–662, https://doi.org/10.5194/soil-6-649-2020, 2020
- C. Liu, J. Li, Y. Zhang, L. Wang, J. Deng, Y. Gao, L. Yu, J. Zhang, H. Sun, Widespread distribution of PET and PC microplastics in dust in urban China and their estimated human exposure. Environ. Int., 128 (2019), pp. 116-124, 10.1016/j.envint.2019.04.024
- Chen Q, Reisser J, Cunsolo S, Kwadijk C, Kotterman M, Proietti M, Slat B, Ferrari FF, Schwarz A, Levivier A, Yin D, Hollert H, Koelmans AA (2017) Pollutants in plastics within the North Pacific subtropical gyre. Environ Sci Technol 52(2):446–456
- De Frond HL, van Sebille E, Parnis JM, Diamond ML, Mallos N, Kingsbury T, et al. Estimating the mass of chemicals associated with ocean plastic pollution to inform mitigation efforts. Integr Environ Assess Manag. 2019;15(4):596–606.
- Deng, Y., Wu, J., Chen, J., & Kang, K. (2023). Overview of microplastic pollution and its influence on the health of organisms. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 58(4), 412–422. https://doi.org/10.1080/10934529.2023.2190715
- Gallo F, Fossi C, Weber R, Santillo D, Sousa J, Ingram I, et al. Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemicals components: the need for urgent preventive measures. Environ Sci Eur. 2018;30(1). https://doi.org/10.1186/s12302-018-0139-z.

- Geyer R, Jambeck J, Law KL (2017) Production, use, and fate of all plastics ever made. Sci Adv 3(7):e1700782
- Geyer R., Jambeck J. R., and Law K. L.: Production, use, and fate of all plastics ever made, Sci. Adv., 3, e1700782, 2017.
- Giorgetti, L.; Spanò, C.; Muccifora, S.; Bottega, S.; Barbieri, F.; Bellani, L.; Castiglione, M.R. Exploring the interaction between polystyrene nanoplastics and Allium cepa during germination: Internalization in root cells, induction of toxicity and oxidative stress. *Plant Physiol. Biochem.* 2020, *149*, 170–177. [Google Scholar] [CrossRef]
- Gonzalez FD, Hanke G, Tweehuysen G, Bellert B, Holzhauer M, Palatinus A, Hohenblum P, Oosterbaan L (2016) Riverine litter monitoring—options and recommendations. MSFD GES TG Marine Litter Thematic Report, JRC Technical Report, EUR 28307. https://doi.org/10.2788/461233. Accessed 10 Oct 2018
- 16. Huang Z et al (2021b) Microplastic: a potential threat to human and animal health by interfering with the intestinal barrier function and changing the intestinal microenvironment. Sci Total Environ 785:147365. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147365
- Jiang, X.; Chen, H.; Liao, Y.; Ye, Z.; Li, M.; Klobučar, G. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant Vicia faba. *Environ. Pollut.* 2019, *250*, 831–838.
 [Google Scholar] [CrossRef
- Kühn S, Bravo Rebolledo EL i van Franeker JA. 2015. Szkodliwy wpływ śmieci na życie morskie. W morskich śmieciach antropogenicznych. Pod redakcją M. Bergmanna, L. Gutowa i M. Klagesa. Springer Open w Bremerhaven, Niemcy. s. 75–116.
- 19. Kühn S, van Franeker J. Quantitative overview of marine debris ingested by marine megafauna Marine Pollution Bulletin .Volume 151, February 2020, 110858
- Lau WWY, Shiran Y, Bailey RM, Cook E, Stuchtey MR, Koskella J, et al. Evaluating scenarios toward zero plastic pollution. Science. 2020;369(6510):1455–61 Available from: https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.aba9475.
- 21. Lebreton L, Slat B, Ferrari F, Sainte-Rose B, Aitken J, Marthouse R, et al. Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. Sci Rep. 2018;8(1):1–15.
- 22. Lebreton L, van der Zwet J, Damsteeg JW, Slat B, Andrady A, Reisser J (2017) River plastic emissions to the world's oceans. Nat Commun 8:15611
- 23. Li, L.; Luo, Y.; Li, R.; Zhou, Q.; Peijnenburg, W.J.G.M.; Yin, N.; Yang, J.; Tu, C.; Zhang, Y. Effective uptake of submicrometre plastics by crop plants via a crack-entry mode. *Nat. Sustain.* 2020, *3*, 929–937.

- 24. Li, Z.; Li, Q.; Li, R.; Zhou, J.; Wang, G. The distribution and impact of polystyrene nanoplastics on cucumber plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021, *28*, 16042–16053.
- Liana, J., Liu, W., Meng, L., Wu, J., Chao, L., Zeb, A., & Sun, Y. (2021a). Foliar-applied polystyrene nanoplastics (PSNPs) reduce the growth and nutritional quality of lettuce (Lactuca sativa L.). *Environmental Pollution*, 280, 116978.
- M. Klein, EK Fischer Obfitość mikroplastiku w depozycji atmosferycznej na obszarze metropolitalnym Hamburga w Niemczech Nauka. Całkowite środowisko., 685 (2019), s. 96 - 103 ,10.1016/j.scitotenv.2019.05.405
- Meng, F., Yang, X., Riksen, M., Xu, M., & Geissen, V. (2021). Response of common bean (Phaseolus vulgaris L.) growth to soil contaminated with microplastics. *Science of the Total Environment*, 755, 142516.
- 28. PlasticsEurope, *Plastics—The Facts 2016: An Analysis of European Plastics Production,* Demand and Waste Data (PlasticsEurope, 2016)
- Provencher JF, Bond AL, Avery-Gomm S, Borrelle SB, Bravo Rebolledo EL, Hammer S i in. 2017. Ilościowe oznaczanie połkniętych śmieci w megafaunie morskiej: przegląd i zalecenia dotyczące standaryzacji. Metody analityczne, 9 (9): 1454–1469.
- Q. Zhou, C. Tian, Y. Luo Various forms and deposition fluxes of microplastics identified in the coastal urban atmosphere Chin. Sci. Bull., 62 (2017), pp. 3902-3909, 10.1360/n972017-00956
- R. Dris, J. Gasperi, C. Mirande, C. Mandin, M. Guerrouache, V. Langlois, B. Tassin A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments Environ. Pollut., 221 (2017), pp. 453-458,
- R. Dris, J. Gasperi, M. Saad, C. Mirande, B. Tassin Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment? Mar. Pollut. Bull., 104 (2016), pp. 290-293, 10.1016/j.marpolbul.2016.01.006
- 33. S. Abbasi, B. Keshavarzi, F. Moore, A. Turner, F.J. Kelly, A.O. Dominguez, N. Jaafarzadeh Distribution and potential health impacts of microplastics and microrubbers in air and street dusts from Asaluyeh County Iran. Environ. Pollut., 244 (2019).
- S. Allen, D. Allen, V.R. Phoenix, G. Le Roux, P. Duranteza, A. Simonneau, B. Stéphane, D. Galop Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment, Nat. Geosci., 12 (2019), pp. 339-344, 10.1038/s41561-019-0335-5
- 35. Shiu RF, Vazquez CI, Chiang CY, Chiu MH, Chen CS, Ni CW, Chin WC (2020) Nano- i mikroplastiki powodują wydzielanie bogatych w białko zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych z fitoplanktonu. Sci Total Environ 748:141469

- 36. Sun, H.; Lei, C.; Xu, J.; Li, R. Foliar uptake and leaf-to-root translocation of nanoplastics with different coating charge in maize plants. *J. Hazard. Mater.* 2021, *416*, 125854.
- Sun, X.-D.; Yuan, X.-Z.; Jia, Y.; Feng, L.-J.; Zhu, F.-P.; Dong, S.-S.; Liu, J.; Kong, X.; Tian, H.; Duan, J.-L.; et al. Differentially charged nanoplastics demonstrate distinct accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Nanotechnol.* 2020, *15*, 755–760.
- United Nations (2015) Probabilistic population projections based on the world population prospects: the 2015 revision. United Nations Department of Economic and Social Affairs. https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/Files/WPP2015_Volume-I_Comprehensive-Tables.pdf. Accessed 28 Nov 2016
- Waste Atlas (2019) D-waste. Waste Atlas. http://www.atlas.d-waste.com/. Accessed 4 Aug 2016
- 40. Wright RJ, Erni-Cassola G, Zadjelovic V, Latva M, Christie-Oleza JA. Marine plastic debris: a new surface for microbial colonization. Environ Sci Technol. 2020;54(19):11657–72.
- Zhang C, Chen X, Wang J, Tan L (2017) Toxic effects of microplastic on marine microalgae Skeletonema costatum: interactions between microplastic and algae. Environ Pollut 220:1282–1288
- 42. Zhou, B., Wang, J., Zhang, H., Shi, H., Fei, Y., Huang, S., Tong, Y., Wen, D., Luo, Y., and Barceló, D.: Microplastics in agricultural soils on the coastal plain of Hangzhou Bay, east China: Multiple sources other than plastic mulching film, J. Hazard. Mater., 388, 121814, 2020.
- Zhou, C. Q., Lu, C. H., Mai, L., Bao, L. J., Liu, L. Y., & Zeng, E. Y. (2021a). Response of rice (Oryza sativa L.) roots to nanoplastic treatment at seedling stage. *Journal of Hazardous Materials, 401*, 123412.

Webside:

- https://plasticseurope.org/pl/wp-content/uploads/sites/7/2023/04/Tworzywa-Fakty-2022.pdf (25.05.2024)
- 2. United Nations, 2022 Revision of World Population Prospects (United Nations, 2022)
- 3. https://theoceancleanup.com/sources/

D.3.

Marek Klimasz, Anna Grobelak, "Oczyszczanie ścieków jako źródło mikroplastiku w środowisku w; Nowatorskie rozwiązania w inżynierii środowiska i energetyce perspektywa zrównoważonego rozwoju, pod redakcją Iwony Zawieji, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa, 2024,

Oczyszczanie ścieków jako źródło mikroplastiku w środowisku

Marek Klimasz¹, Anna Grobelak¹

Politechnika Częstochowska Wydział Infrastruktury i Środowiska; <u>marek.klimasz@pcz.pl</u>; anna.grobelak@pcz.pl

Streszczenie: Oczyszczalnie pełnią kluczową rolę w każdej aglomeracji, zapewniając bezpieczny ośrodek odbioru i oczyszczania ścieków. System filtracji oparty na etapowym przepływie umożliwia skuteczna separację zanieczyszczeń oraz neutralizację toksyn czego efektem jest woda zdatna do spływu i bezpieczna dla organizmów wodnych. Produktem ubocznym pracy oczyszczalni komunalnych są osady ściekowe, które poddane odpowiedniemu przetworzeniu stają się cennym źródłem pierwiastków biogennych takich jak fosfor czy azot, przy jednocześnie niskim poziomie patogenów oraz metali ciężkich. Istnieje wiele sposobów zagospodarowania osadów takich jak wykorzystanie ich w rolnictwie, kompostowaniu, rekultywacji gleb czy też ich spalanie, a wszystkie one są ściśle normowane prawem. W związku z wejściem w życie Europejskiego Zielonego Ładu, który zakłada radykalne obniżenie stosowania nawozów i pestycydów, a także zrównoważone wykorzystywanie surowców naturalnych, przyrodnicze stosowanie osadów ściekowych może być alternatywą dla nawozów nieorganicznych. Uwagę badaczy przykuwa natomiast fakt zawartości w osadach ściekowych drobin tworzyw sztucznych, czyli mikroplastiku, których los w środowisku wciąż nie jest do końca znany. W artykule tym zostały podsumowane najważniejsze informacje dotyczące skali wytwarzania osadów ściekowych, kierunki ich zagospodarowania, a także zawartości mikroplastiku na podstawie analiz niezależnych jednostek. Artykuł podkreśla ponadto, że pomimo niewielkich stężeń oraz rozmiarów cząsteczkowych tworzyw sztucznych, sumaryczna ich ilość staje się znacząca, a biorąc pod uwagę niemal zerową biodegradowalność, stężenie na obszarach wykorzystujących osady ściekowe będzie rosła. Dodatkowo autorzy opisali średnią wydajność wybranych oczyszczalni ścieków w różnych krajach na podstawie aktualnych publikacji.

Slowa kluczowe: mikroplastik, tworzywa sztuczne, oczyszczalnia ścieków, źródło mikroplastiku

Wprowadzenie

Obecność tworzyw sztucznych w środowisku naturalnym stała się przedmiotem badań wielu jednostek naukowych, opisujących ich strukturę, migrację oraz wpływ na organizmy. Skala problemu oraz rosnące zainteresowanie tematem sprawiły, że występowanie tych tworzyw w ekosystemie uznawane jest za kwestię globalną (Zhang i in. 2019, s. 23-34). Początkowo zdecydowana większość analiz skupiała się na środowisku morskim, gdzie odnajdywano cząsteczki plastiku na różnej głębokości, a także w strefach przybrzeżnych oraz osadach, jednak z czasem badania te objęły zarówno wody śródlądowe jak i glebę (Dris 2018, s. 539-550). Wkrótce zaczęto klasyfikować drobiny tworzyw nadając nazwę mikroplastiku przy wielkości poniżej 5 mm, grupując je przy tym względem pochodzenia, kształtu, koloru oraz składu chemicznego. Obecna wiedza na temat mikroplastiku pozwala na szczegółową analizę w zakresie badań cząsteczkowych, oddziaływań środowiskowych oraz metod separacji czy też degradacji. Znacząco wzrosła również świadomość dotycząca losu tworzyw sztucznych, wydajności procesów recyklingowych, norm prawnych oraz technologii zagospodarowania. Dzięki temu możliwe jest określenie aktualnego stanu wiedzy na temat produkcji globalnej, przybliżonej ilości tworzyw na składowiskach oraz w środowisku naturalnym.

Skala występowania mikroplastiku

Według badań ponad 80% wszystkich tworzyw sztucznych w oceanach pochodzi z lądu, a w Europie szacuje się, że z ponad 64 mln ton tworzyw wprowadzonych na rynek w roku 2016 zaledwie 13% poddano recyklingowi. Dla przykładu w Niemczech w 2011 recyklingowi poddano około 60%, co stawia ten kraj na pierwszym miejscu (Zmak 2017, s. 138-142). Badacze wskazują ponadto na fakt, że fragmentacja tworzyw zachodząca pod wpływem promieni UV, tarcia czy też środków chemicznych prowadzi do uwolnienia drobin mikroplastiku znacznie mniejszych niż 5 mm, przez co zwiększa się ich mobilność w glebie oraz powietrzu. Niezwykle istotnym nośnikiem dla tworzyw są szeroko rozumiane wody, w ujęciu akwenów, rzek, a także zjawisk atmosferycznych. Szacuje się, że każdego roku do mórz i oceanów trafia od 1,14 mln do 2,41 mln ton plastiku przenoszonego właśnie przez rzeki. Woda w czasie deszcz w największej mierze spłukuje zanieczyszczenia z elewacji czy też dróg i przenosi wraz z kanalizacją do oczyszczalni ścieków czy na pola uprawne (Corradini i in. 2016, s.411-420). Do najczęściej występujących mikroplastików w aglomeracji zaliczane są włókna z ubrań, mikrogranule z kosmetyków, kawałki gumy bieżnika samochodowego oraz tak zwany pył miejski, natomiast na terenach zielonych dodatkowo opisywana jest folia służąca do ściółkowania oraz fragmenty materiałów rolniczych (Verschoor i in. 2016, s. 17-28) Jak wskazują badania, występowanie mikroplastiku w glebie czy wodzie pozostaje w ścisłej korelacji z bliskością miast oraz przemysłu tekstylnego. Istnieją również analizy opisujące starty przedprodukcyjne cząsteczek uwalnianych do środowiska, przeprowadzone w Szwecji na podstawie współczynnika Sund'a (Sundt i Schulze 2015), których poziom wynosi 0,04%. Norwescy badacze na tej podstawie określili roczną emisję granulatu na 298 ton. Do sumy tej można dodać współczynnik Lassena, który opisał straty przy szeroko pojętej obsłudze granulatu (w tym transporcie) na poziomie od 0,0005 do 0,01% co daje roczny wynik na poziomie 12-235 ton. Oba współczynniki zastosowano dla duńskiego przemysły tekstylnego, przy czym autorzy wskazują, że nie możliwości rzeczywistego pomiaru strat produkcyjnych (Corbanie 2006, s. 475-485). W przypadku włókien ubrań badania mają charakter poglądowy, gdyż ich ilość uzależniona jest od sposobu prania, użytego detergentu, temperatury oraz rodzaju pozostałej zawartości prania. Autorzy zgodni są, że uśredniając dane można założyć, że wykonana z poliestru koszula traci podczas każdego prania 0,4% swojej wagi, idąc dalej, jeden gram jest w stanie uwolnić od kilkudziesięciu do kilkuset włókien, 6 kg tekstyliów podczas jednego prania uwalnia około 800 000 fragmentów (Magnusson 2016, s.11).

Mikroplastik w procesie oczyszczania ścieków

Oczyszczalnie ścieków stanowią nieodłączny element wydajnego systemu kanalizacji miasta, a ich przepływowość oraz skuteczność filtracji znacznie wzrosły na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci. Głównym powodem są zmieniające się przepisy prawne względem jakości wody oraz skuteczności procesu oczyszczania. Nie zawsze jednak oczyszczalnie dostosowane są do odzysku mikroplastiku, który trafia tam wraz ze ściekami, tym samym uważa się, że obecnie są one punktowym źródłem mikroplastiku w systemie wody słodkiej oraz gleby. Każdego roku w samej tylko Europie ścieki z oczyszczalni poprzez systemy rzeczne (lub bezpośrednio) uwalniają do mórz i oceanów około 520 000 ton tworzyw sztucznych (Horton 2017, s.127-141), nie uwzględniając masy cząsteczek poniżej 5 µm, które według autorów są nierejestrowane. Analiza włókien nylonowych, poliesterowych oraz mikrogranulatów obecnych w osadach morskich dowiodła, że są one powiązane ze ściekami (Browne 2011, s. 5026-5031). Inni badacze wskazali ponadto na rolę oczyszczalni ścieków jako dystrybutora mikrogranul pochodzących z produktów higieny osobistej, opisując ich nieregularny kształt oraz szacując ilość na 8 bilionów cząstek każdego dnia uwalnianych do środowiska wodnego (Lessie i in. 2017, s. 155-157).

Dla precyzyjnego oszacowania skuteczności oczyszczalni ścieków niezbędne są procedury określenia ilościowego w ściekach dopływających i wypływających z oczyszczalni metodami o wysokim wskaźniku powtarzalności, co już na tym etapie wydaje się trudne biorąc pod uwagę niskie stężenie niektórych frakcji tworzyw (Carr i in. 2016, s.174-186). Tym samym część autorów wskazuje na konieczność ujednolicenia metod badawczych, nawet jeśli obarczone są pewnym błędem statystycznym, dla porównywalnie podobnych wyników uzyskanych przez niezależne jednostki. Na chwilę obecną badania wykazują, że stężenie mikroplastiku za oczyszczalnią może być wyższe niż przed nią, jak w przypadku rzeki Ottawy (Kanada północna, główny dopływ Rzeki Świętego Wawrzyńca) gdzie w górnym biegu wynosiło 0,71 szt/m³, a w dolnym za oczyszczalnią 1,99 szt/m³ (Vermaire 2017, s. 301-314). Autorzy wskazują przy tym, że przeprojektowanie

oczyszczalni tak, aby zwiększyła się wydajność filtracji makro i mikroplastiku jest procesem długotrwałym, niezwykle kosztownym, a często niemożliwym do zrealizowania (Talvitie 2017, s. 164-172). W pracy tej przedstawiono schemat oczyszczania najczęściej występujący w Europie, a także często w Stanach Zjednoczonych oraz Azji Wschodniej.

Pomimo miejsca występowania, zdolności filtracyjnych czy też samej wielkości, można przyjąć, że oczyszczalnie mają podobną konstrukcje oraz zachodzące tam procesy napowietrzania, flokulacji i sedymentacji (Burns 2018, s. 2776-2796). Sita o rozmiarze oczka 6 mm (lub większe) stanowiące pierwszy etap filtracji mechanicznej według badaczy zdolne są do wychwycenia 65% mikroplastiku, również mniejszych niż średnica oczka, które gromadza się w warstwie tłuszczu np. polietylen niskiej gestości (Murphy 2016, s. 5800-5808). Kolejne etapy oczyszczania wykorzystują mikroorganizmy bakteryjne w zbiornikach z napowietrzaniem oraz oddzielenie osadów ściekowych (filtrację kolumnowa z wykorzystaniem węgla aktywnego lub piasku uznaje za etap trzeciego stopnia oczyszczania ścieków). Podział na oczyszczalnie dysponujące dwustopniowym oraz trzystopniowym systemem jest powszechny, a jego skuteczność względem tworzyw sztucznych wynosi odpowiednio 90% - 99% oraz 96% - 99,9% (Carr 2016, s.174-182). Według wielu badaczy udział całkowity włókien wynosi od 70% (Vermaire 2017, s. 301-314) do 80 % (Mason i in. 2016, s.1045-1054). Względem wody pitnej analizy ilościowe wykazały obecność 0,0009 do 0,009 cząsteczek na litr przy oczyszczaniu dwustopniowym i 0,0002 cząstki na litr przy trzystopniowym (Carr 2016, s.174-182). Ilość mikroplastiku w ściekach doprowadzanych do oczyszczalni jest niezwykle zróżnicowana względem dni tygodnia oraz pory roku (Primpke 2017, s. 402-412) a autorzy wskazuja na pobieranie próbek przez dłuższy okres lub określanie średniej wzgledem tego okresu. W tabeli (Tabela 1) przedstawiono średnia skuteczność oczyszczalni ścieków z zebranych publikacji naukowych.

Kraj	Typ oczyszczania	Dolna granica wielkości cząstek [µm]	Stężenie mikroplastiku [cząsteczki na litr]	Ogólna wydajność oczyszczania [%]	Odniesienie do literatury
Polska	I, II, III	-	0,028-0,96 cz/l	95%-99%	Wiśniowska i in. 2018, s. 316-323
Niemcy	II, III	20 µm	0,1-10,1 cz/l	97%	Mintenig i in.2017
Francja	I, II, III	100 µm	14-50 cz/l	83%-95%	Dries i in. 2015 s. 539-550
Holandia	I, II, III	0,7 μm	9-91 cz/l	72%	Leslie i in. 2017, s. 133-142

Tabela 1. Przykłady skuteczności oczyszczalni ścieków pod względem usuwania mikroplastiku

Wielka Brytania	III	29 µm	1-3 cz/l	96%	Blairi in. 2019
Słowenia	Ι	19 µm	0,021 cz/l	87%	Kalcíková i in. 2017, s. 25-31
Dania	-	20 µm	54 cz/l	98,3%	Simon i in. 2018, s. 1-9
Hiszpania	Ι	-	0,25 cz/l	90,3%	Bayo i in. 2019
Włochy	I, II, III	42 µm	0,4 cz/l	84%	Magni i in. 2019, s. 602-610
Finlandia	IiII	250 µm	1,05 cz/l	99%	Lares i in. 2018, s. 236-246
USA	I, II	20 µm	5,9 cz/l	93,8%	Sutton i in. 2016, s. 230-235
Turcja	I, II	-	7,02 cz/l	73%	Gündogdu i in. 218, s. 626-632
Kanada	I, II	64 µm	0,5 cz/l	98,3%	Gies i in. 2018, s. 553-561
Chiny	I, II	28 µm	0,20 cz/l	97,8%	Long i in. 2019, s. 255-265
Australia	I, II, III	25 µm	0,28 cz/l	92%-99%	Ziarahromi i in. 2017, s. 93-99

Mikroplastik w osadach ściekowych

Osady ściekowe są nieodłącznym elementem funkcjonowania oczyszczalni i definiowane jako organiczno-mineralna stała frakcja powstającą zwykle w komorach osadu czynnego, czy fermentacyjnych oraz pozostałych instalacjach służących oczyszczaniu ścieków komunalnych, a ich skład oraz właściwości zależne są od rodzaju ścieków oraz metod ich oczyszczania. W ogólny skład osadów ściekowych wchodzą osady wstępne wydzielane w wyniku sedymentacji zawiesin w osadnikach wstępnych oraz te powstające w osadnikach wtórnych poprzez procesy biologiczne-osady wtórne. Dalsze ich zagospodarowanie wymaga zastosowania kilkuetapowego procesu, dzięki którym nabiorą one pożądanych właściwości fizyko-chemicznych przy jednoczesnej redukcji zawartości metali ciężkich, zanieczyszczeń organicznych (pestycydy, dioksyny, furany) oraz organizmów patogennych w tym wirusów, grzybów, bakterii, pierwotniaków oraz jaj pasożytów. Przykładowy ciąg technologiczny przetwarzania osadów na oczyszczalni ścieków prowadzącej proces fermentacji metanowej na terenie Polski przebiega kolejno procesami zagęszczenia, stabilizacji, odwadniania oraz suszenia i postępuje etapami:

- a) osad wstępny kierowany jest do studni zbiorczej osadu surowego,
- b) osad wtórny kierowany do przepompowni, gdzie tak zwany osad nadmierny tłoczony jest do stacji zagęszczenia, a osad recyrkulowany do bloku biologicznego,
- c) osad nadmierny podlega procesowi zagęszczenia mechanicznego, wspomaganego przez koagulację polielektrolityczną,
- d) powstały osad pompowany jest do studni zbiorczej skąd trafia do komór fermentacyjnych,

- e) w zamkniętych komorach fermentacyjnych, przy temp. 35°C- 37°C zachodzi proces stabilizacji, czyli biologicznej redukcji substancji organicznych do związków prostych (fermentacji metanowej), trwającej od 26-30 dni; proces ten pozwala na odzysk metanu jako biopaliwa, dodatkowo powstaje wodór, siarkowodór i azot,
- f) uzyskany osad trafia do zbiornika osadu przefermentowanego, a następnie na prasę w celu odwodnienia właściwego; w procesie tym stosowane są również koagulanty,
- g) odwodniony osad trafia do suszarni, w której masa jest napowietrzana oraz przewracana co zapewnia skuteczne i szybsze suszenie. (https://pwik.olkusz.pl/Aktualnosci/Biezace_informacje/Ustabilizowane_komunalne_osady sciekowe o kodzie odpadu 190805 odpa).

W Polsce normy wykorzystania osadów ściekowych reguluje art. 3, ust. 1 pkt. 28 ustawy o odpadach określający możliwość wykorzystania w szeroko rozumianym rolnictwie, do upraw roślin przeznaczonych na produkcje pasz i kompostu, do roślin nie przeznaczonych do spożycia, rekultywacji gruntów czy też wykorzystania dla potrzeb zagospodarowania przestrzennego terenu wynikającego z decyzji o warunkach zabudowy (https://www.gov.pl/web/wios-rzeszow/wymagania-dotyczace-stosowania-komunalnych-osadow-sciekowych-w-rolnictwie2).

Wytyczne o jakości samych osadów wskazują na konieczność stosowania obróbki mechanicznej, biologicznej oraz termicznej, a także maksymalne obniżenie jego uciążliwego zapachu podczas stosowania w pobliżu siedlisk ludzkich. Rozporządzenie Ministra Środowiska oraz Rozporządzenie Ministra Środowiska i Klimatu wskazują dodatkowo szczegółowe wytyczne względem pozostałych warunków wykorzystania w rolnictwie takich jak ilości wykorzystywanych osadów, częstotliwości, a także dopuszczalnych zawartości metali cieżkich (chromu, rtęci, niklu, kadmu czy ołowiu). Artykuł 96 ust. 12 ustawy o odpadach określa całkowity zakaz stosowania odpadów bez względu na ich skład na obszarach rezerwatów oraz parków narodowych, na terenach zmarzniętych lub pokrytych śniegiem, gruntach rolnych o nachyleniu co najmniej 10%, na gruntach sadowniczych oraz uprawy warzyw, także na pastwiskach, łąkach, terenach W pobliżu ujęć wody а (https://www.gov.pl/web/wymagania-dotyczace-stosowania-komunalnych-osadow-sciekowych-wrolnictwie2).

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem osadów ściekowych oraz ich ogólnym losem w gospodarce (*Rysunek 1*). Z pewnością jest to związane z ich rosnącą roczną produkcja, ale też z możliwościami zastosowania w wielu gałęziach gospodarki. Dla wielu badaczy najlepszym kierunkiem ich zagospodarowania jest rolnictwo, ze względu na obecność w osadach wielu cennych pierwiastków, dla przykładu, osad wykorzystywany rolniczo po kompostowaniu według analizy Smoll i Szołdrowskiej (2022) zwierał między innymi fosfor ogólny na poziomie 2,10% s.m., wapń 1,78% s.m., azot amonowy 0,85% s.m. oraz magnez 0,44% s.m., przy zerowej ilości jaj pasożytów (sz/kg) oraz negatywnych testach na bakterie z rodzaju *Salmonella*. Niestety osady ściekowe o takich parametrach to rzadkość. Na korzyść wykorzystywania osadów w rolnictwie wpływają też regulacje

prawne, w tym Europejski Zielony Ład, który zakłada obniżenie wykorzystywania pestycydów oraz nawozów sztucznych o 50% do roku 2030, celem odpowiedzialnego zarządzania zasobami nieodnawialnymi oraz dbaniem o lepszej jakości, ekologiczną żywność (Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady Europejskiej, Rady, Komitetu Ekonomiczno-Społecznego i Komitetu Regionów, Europejski Zielony Ład, Com Nr 640, 2019). W odpowiedzi na restrykcje autorzy wskazują na poszerzenie możliwości wykorzystania osadów ściekowych, rekompensowane ich odpowiednim przygotowaniem (przetworzeniem) na przykład w procesach fermentacji beztlenowej czy wermikompostowaniu.



Rysunek 1. Kierunki zagospodarowania osadów ściekowych w latach 2017-2021 w tonach (Smol i Szołdrowska 2022, s.1-3)

Badania wykazały, że spora część mikroplastiku trafiająca do oczyszczalni ścieków zostaje zatrzymana w osadzie ściekowym. Rozmiar opisywanych cząstek uzależniony jest od zdolności aparatury pomiarowej i mieście się w przedziale 0,5 μm do kilku mm, a stężenie od 16 (Magnusson i Norén 2014, s-22-25) do ponad 56 000 cząstek na kg⁻¹ (Li 2018, s. 77.82), jednak nie udało się zidentyfikować mikroplastików poniżej 0,4 μm, które zostały wykryte w późniejszych analizach osadów ściekowych (Lusher 2018, s. 111-112). Ta sama publikacja potwierdza wcześniejsze doniesienia o najczęściej występujących mikroplastikach w osadach ściekowych i podaje udział włókien na poziomie 70% (*Tabela 2*).

Kraj	Rozmiar mikroplastiku [µm-mm]	Stężenie mikroplastiku [w cząstkach na kg ⁻¹]	Odniesienie do literatury
Holandia	0,7 μm -5 mm	370 - 950 cz/kg ⁻¹	Lessie i in. 2017, s. 133-142
Szwecja	300 µm -5 mm	16,7 - 10 cz/kg ⁻¹	Magnusson i Norén 2014
Niemcy	<5 mm	1 000- 24 000 cz/kg ⁻¹	Mintening i in. 2014
Norwegia	54 µm - 5 mm	6 077 cz/kg ⁻¹	Lusher i in. 2018
Irlandia	250 µm - 4 mm	4 196- 15 385 cz/kg ⁻¹	Mahon i in. 2017, s. 810-818
Wielka Brytania	<1,62 mm	2 000 cz/kg ⁻¹	Murphy i in. 2016, s. 5800-5808
Włochy	0,5 μm -1 mm	113 000 cz/kg ⁻¹	Magni i in. 2019, s. 602-610
USA	<5 mm	5 000 cz/kg ⁻¹	Carr i in. 2016, s. 174-182
Chiny	$37 \ \mu m - 5 \ mm$	1565- 56 386 cz/kg ⁻¹	Li i in. 2018, s. 75-85
Kanada	<64 µm	4 400 cz/kg ⁻¹	Gies i in., 2018, s. 553-561

Tabela 2. Zawartość mikroplastiku w osadach ściekowych na podstawie dostępnych publikacji

Badania wykazały, że nawożenie gleby osadami ściekowymi prowadzi do jej zanieczyszczenia mikroplastikiem oraz w konsekwencji stopniowej akumulacji cząstek tworzyw (Iqbael i in. 2023, s.55-57). Autorzy porównują proces ten do ściółkowania, podczas którego drobiny folii uwalniane sa do ziemi rolnej (Huang i in. 2020, s.9). Ogółem mikroplastiki w glebie moga stanowić zagrożenie dla roślin i zwierząt, wpływając na strukturę gleby, dostępność pierwiastków czy też stopień parowania wody. Dodatkowo tworzywa ograniczają liczebność mikroorganizmów glebowych, a z kolei te regulują obieg makro i mikroelementów zwanych składnikami odżywczymi (Liu i in 2023, s.23-24). Nadmierna utrata wody związana z obecnością polimerów prowadzi do wysychania i pękania gleby, zmiany w obiegu tlenu i fizjologii bakterii tlenowych i beztlenowych (Lozano 2023, s 988-996). Niewielkie cząstki są też połykane przez organizmy glebowe takie jak dżdżownice, powodując zaburzenia wzrostu czy też możliwości reprodukcji (Wan i in 2019, s. 576-582). Badania prowadzone na nicieniach (Caenorhabditis elegans) wykazały skrócenie długości ciała, obniżenie ekspresji genów oraz uszkodzenia neuronów cholinergicznych (Lei i in. 2018, s. 2009-2020). Dla niektórych skąposzczetów obecność tworzyw w niskim stężeniu jest obojętna bądź pozytywna, jednak jak w przypadku Enchytraeus crypticus wyższa dawka wywołuje zmiany w mikroflorze jelitowej i ma działanie silnie hamujące wzrost osobniczy, podobnie jak u skoczogonków Folsomia candida, u których inhibicja wzrostu wyniosła od 16% a reprodukcja 30% (Zhu 2018, s. 408-415). Obecność mikroplastiku może wywoływać stres oksydacyjny u roślin, którego efektem jest zaburzenie kiełkowania poprzez zatykanie porów w torebce nasiennej, zmniejszając zdolność pobierania wody i ogólny proces wchłaniania (Bosker i in. 2019). W przypadku koniczyny białej (Trifolium repens L.) czy niecierpka balsamina (Impatiens balsamina L.) opisano również obniżenie

wskaźnika kiełkowania oraz szybkości kiełkowania (Guo i in. 2022, s. 88). Mechaniczne

uszkodzenia korzeni, ograniczenia ich wzrostu oraz stres oksydacyjny wywołany mikroplastikiem opisano w przypadku pszenicy (*Triticum* L.), bobu (*Vicia faba* L.) czy też cebuli (*Allium cepa* L.) (Jiang i in. 2019, s.831-838). Transport mikroplastiku przez ksylem, akumulacja w tkankach oraz blaszkach listnych często prowadzi do hamowania fotosyntezy, poprzez redukcję karotenoidów oraz chlorofilu *a* i *b* od 8 do 12% w przypadku badań prowadzonych na sałacie (*Lactuca sativa* L.) ogórku (*Cucumis sativus* L.) czy kapuście (*Brassica oleracea* L.) (Ahammed i in. 2012, s. 132-139), (Liu 2021, s. 99-102). Dodatkowo negatywne zmiany u różnych gatunków dotyczą homeostazy jonowej (Khan i in. 2020, s.74-75), ekspresji genów (Xu i in, 2020, s. 223-245), gospodarki hormonalnej (Huang i in. 2022, s. 5886-5902) oraz biomasy (Kumar i in. 2022, s. 121-124).

Podsumowanie

Regulacje prawne majace na celu zrównoważone zarzadzanie zasobami mineralnymi skłaniaja do szerszego wykorzystywania osadów ściekowych w rolnictwie oraz sektorach powiązanych. Bogate w pierwiastki biogenne osady o odpowiednio niskiej zawartości metali ciężkich oraz patogenów stanowią odpowiednie rozwiązanie jednak skala ich zagospodarowania zachęca do analizy również względem obecności mikroplastiku. Na chwilę obecną nie istnieją regulacje europejskie określające dozwoloną ilość cząsteczek tworzyw w jednostce masy, aby osad mógł zostać wykorzystany w wyżej wymienionych sektorach. Los mikroplastiku w glebie, a w szczególności dynamika przemieszczania pionowego i poziomego wciąż nie są do końca poznane, a zdecydowana większość przeprowadzanych badań odbywa się w warunkach laboratoryjnych, gdzie nie mają znaczenia zjawiska pogodowe, hydrologia, ukształtowanie terenu czy warstwowość podłoża. Każdego roku zwiększa się ilość publikacji dotyczących wpływu różnych mikroplastików na strukturę gleby, stopień nawodnienia, przepływ minerałów i ich dostępność dla roślin, a także wpływu na zwierzęta. Część z tych publikacji opisuje negatywne, czasem toksyczne skutki działania tworzyw również ze względu na udokumentowaną absorpcję np. metali ciężkich na ich powierzchni. W tym przypadku odnalezienie równowagi pomiędzy stosowaniem osadów ściekowych oraz utrzymaniem gleb relatywnie wolnych od zanieczyszczeń mikroplastikiem okazuje się niezwykle trudne. Na korzyść osadów ściekowych przemawiają jednak surowe normy określające ich przetwarzanie oraz ich zawartość związków mineralnych, przez co bezpieczeństwo ich wykorzystania jest wysokie. Dodatkowo ekonomiczne kwestie składowania osadów przy tak wysokiej skali ich powstawania narzucają w pewien sposób rygor ich odpowiedniej utylizacji bądź zagospodarowania.

Literatura

- Ahammed, G. J., Wang, M.-M., Zhou, Y.-H., Xia, X.-J., Mao, W.-H., Shi, K., et al. (2012). The growth, photosynthesis and antioxidant defense responses of five vegetable crops to phenanthrene stress. Ecotoxicol. Environ. Saf. 80, 132–139. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.02.015
- Bayo, J., Olmos, S. and Castellanos Lopez, J. (2019) Microplastics in an Urban Wastewater Treatment Plant: The Influence of Physicochemical Parameters and Environmental Factors. Chemosphere, 238, 124593.
- Blair, R.M., Waldron, S. and Gauchotte-L, C. (2019) Average Daily Flow of Microplastics through a Tertiary Wastewater Treatment Plant over a Ten-Month Period. Water Research, 163, Article ID: 114909.
- Bosker, T., Bouwman, L. J., Brun, N. R., Behrens, P., Vijver, M. G. (2019). Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant Lepidium sativum. Chemosphere 226, 774–781. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.03.163
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M. and Thompson, R.C. (2011) Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, Mytilus edulis (L). Environmental Science & Technology, 42, 5026-5031.
- Carr, S.A., Liu, J. and Tesoro, A.G. (2016) Transport and Fate of Microplastic Particles in Wastewater Treatment Plants. Water Research, 91, 174-182.
- Corbanie, E.A., Matthijs, M.G.R., van Eck, J.H.H., Remon, J.P., Landman, W.J.M. and Vervaet, C. (2006) Deposition of Differently Sized Airborne Microspheres in the Respiratory Tract of Chickens. Avian Pathology, 35, 475-485.
- Corradini F, Meza P, Eguiluz R, Casado F, Huerta-Lwanga E, Geissen V (2019) Evidence of microplastic accumulation in agricultural soils from sewage sludge disposal. Sci Total Environ 671:411–420
- Dris, R., Imhof, H., Sanchez, W., Gasperi, J., Galgani, F., Tassin, B. and Laforsch, C. (2018) Beyond the Ocean: Contamination of Freshwater Ecosystems with (Micro-) Plastic Particles. Environmental Chemistry, 12, 539-550.
- Gies, E.A., LeNoble, J.L., Noel, M., Etemadifar, A., Bishay, F., Hall, E.R. and Ross, P.S. (2018) Retention of Microplastics in a Major Secondary Wastewater Treatment Plant in Vancouver, Canada. Marine Pollution Bulletin, 133, 553-561.
- Gündogdu, S., Cevik, C., Güzel, E. and Kilercioglu, S. (2018) Microplastics in Municipal Wastewater Treatment Plants in Turkey: A Comparison of the Influent and Secondary Effluent Concentrations. Environmental Monitoring and Assessment, 190, 626-632.
- Guo, M., Zhao, F., Tian, L., Ni, K., Lu, Y., Borah, P. (2022). Effects of polystyrene microplastics on the seed germination of herbaceous ornamental plants. Sci. Total Environ. 809, 151100. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151100
- Horton, A.A., Walton, A., Spurgeon, D.J., Lahive, E. and Svendsen, C. (2017) Microplastics in Freshwater and Terrestrial Environments: Evaluating the Current Understanding to Identify the Knowledge Gaps and Future Research Priorities. Science of the Total Environment, 586, 127-141.
- Huang, X., Tanveer, M., Min, Y., Shabala, S. (2022). Melatonin as a regulator of plant ionic homeostasis: implications for abiotic stress tolerance. J. Exp. Bot. 73, 5886–5902. doi: 10.1093/jxb/erac224
- 15. Iqbal B, Zhao T, Yin W, Zhao X, Xie Q, Khan KY, Du D (2023c) Wpływ mikroplastików gleby na uprawy: przegląd. Appl Soil Ecol 181:104680
- Jiang, X., Chen, H., Liao, Y., Ye, Z., Li, M., Klobučar, G. (2019). Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant Vicia faba. Environ. Pollut. 250, 831–838. doi: 10.1016/j.envpol.2019.04.055

- Kalcíková, G., Alic, B., Skalar, T., Bundschuh, M. and Zgajnar Gotvajn, A. (2017) Wastewater Treatment Plant Effluents as Source of Cosmetic Microbeads to Freshwater. Chemosphere, 188, 25-31.
- Khan, WuD., Tanveer, M., Shaukat, R., Ali, M., Pirdad, F. (2020). "An overview of salinity tolerance mechanism in plants," in Hasanuzzaman, M., Tanveer, M. Salt and Drought Stress Tolerance in Plants. Signaling and Communication in Plants (Cham: Springer). doi: 10.1007/978-3-030-40277-8_1
- Kumar, A., Mishra, S., Pandey, R., Yu, Z. G., Kumar, M., Khoo, K. S., et al. (2022). Microplastics in terrestrial ecosystems: Un-ignorable impacts on soil characterizes, nutrient storage and its cycling. TrAC Trends Analytical Chem. 158, 116869. doi: 10.1016/j.trac.2022.116869
- 20. Lei L, Liu M, Song Y, Lu S, Hu J, Cao C, Xie B, Shi H, He D (2018) Polystyrene (nano) microplastics cause size-dependent neurotoxicity, oxidative damage and other adverse effects in *Caenorhabditis elegans*. Environ Sci 5:2009–2020
- 21. Leslie, H.A., Brandsma, S.H., van Velzen, M.J.M. and Vethaak, A.D. (2017) Microplastics En Route: Field Measurements in the Dutch River Delta and Amsterdam Canals, Wastewater Treatment Plants, North Sea Sediments and Biota. Environment International, 101, 133-142.
- 22. Liu Y, Xu F, Ding L, Zhang G, Bai B, Han Y, Li G (2023) Mikroplastiki zmniejszają pobór azotu przez rośliny orzeszków ziemnych, uszkadzając komórki korzeni i zaburzając obieg azotu w glebie. J. Hazard Mater 443:130384
- Lozano YM, Aguilar-Trigueros CA, Onandia G, Maaß S, Zhao T, Rillig MC (2021) Wpływ mikroplastików i suszy na funkcje ekosystemu gleby i wielofunkcyjność. J Appl Ecol 58(5):988–996
- Lusher, A.L., Hurley, R., Vogelsang, C., Nizzetto, L. and Olsen, M. (2018) Mapping Microplastics in Sludge. Technical Report L.NR. 7215-2017 (NIVA).
- Magnusson, K. and Norén, F. (2014) Screening of Microplastic Particles in and Down-Stream a Wastewater Treatment Plant. Report C55, Swedish Environmental Research Institute, Stockholm.
- 26. Magnusson, K., Eliasson, K., Frane, A., Haikonen, K., Hultén, J., Olshammar, M., Stadmark, J. and Voisin, A. (2016) Swedish Sources and Pathways for Microplastics to the Marine Environment. Report C183, Swedish Environmental Research Institute, Stockholm (Revised 2017).
- 27. Mason, S.A., Garneau, D., Sutton, R., Chu, Y., Ehmann, K., Barnes, J., Fink, P., Papazissimos, D. and Rogers, D.L. (2016) Microplastic Pollution Is Widely Detected in US Municipal Wastewater Treatment Plants Effluent. Environmental Pollution, 218, 1045-1054.
- Mintenig, S.M., Int-Veen, I., Loder, M.G.J., Primpke, S. and Gerdts, G. (2017) Identification of Microplastic in Effluents of Waste Water Treatment Plants Using Focal Plane Array-Based Micro-Fourier-Transform Infrared Imaging. Water Research, 108, 365-372.
- 29. Murphy, F., Ewins, C., Carbonnier, F. and Quinn, B. (2016) Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. Environmental Science & Technology, 50, 5800-5808.
- Sundt, P., Schulze, P.-E. and Syversen, F. (2014/2015) Sources of Microplastic Pollution to the Marine Environment. Report No M-321/2015, Mepex for the Norwegian Environment Agency
- Sutton, R., Mason, S.A., Stanek, S.K., Willis-Norton, E., Wren, I.F. and Box, C. (2016) Microplastic Contamination in the San Francisco Bay, California, USA. Marine Pollution Bulletin, 109, 230-235.
- 32. Talvitie, J., Mikola, A., Setala, O., Heinonen, M. and Koistinen, A. (2017) How Well Is Microlitter Purified from Wastewater? A Detailed Study on the Stepwise Removal of Microlitter in a Tertiary Level Wastewater Treatment Plant. Water Research, 109, 164-172.
- Wan Y, Wu C, Xue Q, Hui X (2019) Wpływ skażenia tworzywami sztucznymi na parowanie wody i pękanie spowodowane wysuszeniem w glebie. Sci Total Environ 654:576–582.
- Wiśniowska, E., Moraczewska-Majkut, K. and Nocon, W. (2018) Efficiency of Microplastics Removal in Selected Wastewater Treatment Plants: Preliminary Studies. Desalination and Water Treatment, 134, 316-323.
- 35. Xu, Z., Zhang, Y., Lin, L., Wang, L., Sun, W., Liu, C., et al. (2022). Toxic effects of microplastics in plants depend more by their surface functional groups than just accumulation contents. Sci. Total Environ. 833, 155097. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.15509
- 36. https://www.gov.pl/web/wios-rzeszow/wymagania-dotyczace-stosowania-komunalnych-osadow-sciekowychw-rolnictwie2
- 37. Xu, Z., Zhang, Y., Lin, L., Wang, L., Sun, W., Liu, C., et al. (2022). Toxic effects of microplastics in plants depend more by their surface functional groups than just accumulation contents. Sci. Total Environ. 833, 155097. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.15509
- Zhu B-K, Fang Y-M, Zhu D, Christie P, Ke X, Zhu Y-G (2018) Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*. Environ Pollut 239:408–415
- 39. Zhuang H, Liu X, Ma H, Li R, Liu B, Lin Z, Li Z (2023) Growth and physiological–biochemical characteristics of cucumber (*Cucumis sativus* L.) in the presence of different microplastics. Arab J Geosci 16(3):194
- 40. Zmak, I. and Hartmann, C. (2017) Current State of the Plastic Waste Recycling System in the European Union and in Germany. Tehnicki Glasnik, 11, 138-142.
- 41. https://pwik.olkusz.pl/Aktualnosci/Biezace_informacje/Ustabilizowane_komunalne_osady_sciekowe_o_kodzie _odpadu_190805_odpad (dostęp 03.05.2024)
- 42. https://www.researchgate.net/publication/366491879_Rolnicze_wykorzystanie_komunalnych_osadow_scieko wych_w_obliczu_wyzwan_Europejskiego_Zielonego_Ladu (dostęp 03.05.2024).
- 43. https://eurlex.europa.eu/legalcontent/PL/TXT/?uri=COM%3A2019%3A640%3AFIN Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady Europejskiej, Rady, Komitetu Ekonomiczno-Społecznego i Komitetu Regionów, Europejski Zielony Ład, Com Nr 640, 2019 (dostęp 03.05.2024).

Podziękowania

Badania naukowe sfinansowano z dotacji statutowej Politechniki Częstochowskiej (Wydział Infrastruktury i Środowiska).

WASTEWATER TREATMENT PLANTS AS A SOURCE OF MICROPLASTICS IN THE ENVIRONMENT

Abstract: Wastewater treatment plants (WWTPs) play a crucial role in every urban area, providing a safe facility for the reception and treatment of sewage. The multi-stage filtration system enables effective separation of contaminants and neutralization of toxins, resulting in water that is suitable for discharge and safe for aquatic organisms. A byproduct of municipal WWTP operations is sewage sludge, which, when properly processed, becomes a valuable source of biogenic elements such as phosphorus and nitrogen, while maintaining low levels of pathogens and heavy metals. There are various methods for managing sludge, including its use in agriculture, composting, soil reclamation, or incineration, all of which are strictly regulated by law. With the implementation of the European Green Deal, which aims to drastically reduce the use of fertilizers and pesticides and promote the sustainable use of natural resources, the agricultural application of sewage sludge may serve as an alternative to inorganic fertilizers. However, researchers are increasingly focused on the presence of microplastic particles in sewage sludge, whose fate in the environment remains largely unknown. This article summarizes the key information regarding the production scale of sewage sludge, its management directions, and the microplastic content based on analyses by independent entities. The article emphasizes that despite the small concentrations and particle sizes of plastics, their cumulative amount becomes significant, and considering their nearly zero biodegradability, the concentration in areas utilizing sewage sludge is expected to rise. Additionally, the authors have described the average efficiency of selected WWTPs in various countries based on current publications.

Keywords: microplastics, plastics, wastewater treatment plant, source of microplastics

D.4.

Marek Klimasz, Anna Grobelak, "Methods for separation and classification of microplastics in soil"; artykuł przeglądowy, opublikowany w repozytorium cyfrowym Zenodo: https://doi.org/10.5281/zenodo.14952942

Methods for separation and classification of microplastics in soil

Marek Klimasz¹, Anna Grobelak¹

Faculty of Infrastructure and Environment, Czestochowa University of Technology; <u>marek.klimasz@pcz.pl</u>; anna.grobelak@pcz.pl

Abstract

The presence of plastics in the natural environment is widely acknowledged, and despite the efforts of numerous institutions and ecological organizations, the scale of pollution remains high. In recent years, research has primarily focused on aquatic areas, including both coastal and oceanic zones, with less emphasis on freshwater and inland waters. Analyses of soil contamination are still insufficient to provide a comprehensive picture of the current situation. Soil is a highly heterogeneous and dynamic structure, characterized by varying contents of organic matter, mineral salts, and water, making the determination of microplastic content in it a challenge. Additionally, known thermal or reagent-based methods are not always effective, often altering the color, structure, or properties of plastics, resulting in unreliable outcomes. In this article, the authors describe contemporary methods for the separation and identification of microplastics in soil, as well as sample preparation techniques used by various researchers. By compiling many significant facts, it becomes apparent how challenging the study of soil contaminated with microplastics is and how crucial it is to develop uniform analytical procedures.

Keywords: microplastics, plastics, separation methods, microplastics in soil

Introduction

Plastics are an integral part of everyday life and their versatile use is due to the persistence of synthetic polymeric materials, chemical stability, formability and low production costs (Kawecki and Nowak, 2019). Commonly referred to as "plastics," these materials are used in various industries, including food, textile, automotive, pharmaceutical, and construction. Statistically, the most frequently produced plastics are polyethylene (36%), polypropylene (21%), polyvinyl chloride (12%), and polyethylene terephthalate (10%) (Geyer et al., 2017). Global plastic production increases every year; however, accurately estimating the total quantity produced is challenging due to the lack of detailed data from Asian countries, which are often omitted from statistics or deliberately underreport figures to avoid accountability for pollution. Estimates indicate that global production was 348 million tons in 2017 and 391 million tons in 2021. Europe produced 57.2 million tons in 2021, reflecting a 10.5% increase from the previous year (An Analysis of European Plastics Production, Demand and *Waste Data*, 2019). The rapidly growing plastic production industry generates a substantial amount of post-production waste, as well as used, worn-out, or defective plastics. Plastic components, often thermally bonded to other materials, are rarely recycled, especially when the process exceeds the profitability threshold. Recycling regulations vary between countries; for instance, pharmaceutical packaging cannot be reused regardless of the material's condition. Only 7% to 25% of all plastics are actively recycled (Horton et al., 2017). According to Liu et al. (2020), the overall global recycling rate in 2015 was just 9%, with an estimated 63 million tons of waste, while over 79% was landfilled. Further reports indicate that more than 5 gigatons of plastic have ended up in the natural environment, representing nearly 60% of all produced plastics, with 10% found in aquatic environments (Horton, 2017). These figures from 2017 are likely to change due to ongoing production and increasingly modern methods of cleaning open waters. Of all the plastics found in the oceans, an estimated 70% end up on the seabed due to molecular binding, contamination, and indirectly through marine organisms. Current knowledge suggests that 12% of produced plastics end up on land and in cultivated soils (Bianco et al., 2020). Information on the precise scale of contamination is incomplete due to the complex nature of soil and the lack of standardised measurement equipment.

The impact of microplastics on living organisms is currently the subject of extensive research across various fields such as molecular biology, entomology, ichthyology, medicine, and

botany, thus also linking to geology and economics, particularly in cases of reduced crop yields or livestock profitability (Boots et al., 2019). The molecular diversity of plastics means that research in this area seems endless. This is due to the fact that microplastics serve as excellent vectors for heavy metals, toxins, and hydrophobic organic compounds. They are often accidentally ingested by animals or intentionally mistaken for natural food, and they can also be absorbed along with water and mineral salts by plants (Rillig et al., 2019). The most frequently described complications include gastrointestinal damage, inflammation, reduced nutrient absorption, and consequent individual weakening. The presence of microplastics often leads to death, as studies have shown, particularly in young individuals such as juvenile fish or chicks during rapid growth periods. Microplastics in soil can negatively affect soil texture, bacterial development, water flow dynamics (including evaporation), which directly and indirectly impacts soil-dwelling organisms like nematodes and earthworms. These organisms, in turn, affect the cycling of organic compounds in the soil, the formation of aggregates, and the availability of nitrogen compounds for plants, ultimately influencing the entire soil ecosystem. Despite the obvious negative impact of microplastics on terrestrial environments, only 4% of publications in 2021 focused on microplastics in the context of soil. This highlights the scale of pollution and the predominant interest in plastics in aquatic environments (De Souza Machado et al., 2020).

Plastics form an extremely diverse group of materials, varying in chemical composition and the resulting properties. This group includes thermoplastic and thermosetting polymers, homopolymers and heteropolymers, elastomers, as well as types of glassy, crystalline, and highly elastic polymers (Geyer et al., 2017). Despite their durability, resistance to biotic and abiotic factors, water resistance, and stress mechanics, all plastics undergo gradual degradation, primarily due to friction, intense radiation, or chemical agents. In uncontrolled conditions, such as landfills, this process is continuous. This leads to the formation of small fragments of these plastics, called microplastics, and in this case secondary plastics. Primary microplastics, on the other hand, are intentionally produced in small sizes for use as abrasive materials, cosmetic ingredients, or paint components. The size scale is conventionally set at 5 mm, with all smaller particles referred to as microplastics; the lower limit has not been specified, although particles smaller than 1 mm are usually called nanoplastics (Hurley et al., 2018). Many authors emphasise the need to develop a uniform classification system regarding the size, colour, and chemical composition of particles for better identification and mutual understanding among collaborating research units. The topic of microplastics has

become the most widely discussed scientific field in recent years, encompassing both biological and exact sciences, including mathematics, material physics, and chemistry. Microplastics have also become a subject of political debates, including climate summits, and the number of publications addressing this issue is significantly increasing each year (Braun et al., 2018).

Microplastics in soil

Soil is a highly heterogeneous mixture containing mineral substances, gravel, organic compounds, humic substances, plant roots, and their fragments. The granulometric division of soil includes sand, clay, silt, and loam, and the general soil profile further distinguishes (uniform composition within a 1.5-metre column) between complete soils and incomplete soils (containing at least two layers) (Miller et al., 2020). The composition and physical parameters of soil vary with geographic regions, environmental conditions, and changing seasons, making the mobility of plastic particles difficult to control. Additional factors affecting the distribution of plastics in soil include wind and human agricultural activities. The most common pathways for microplastics to enter the soil are the use of sewage sludge, irrigation with untreated wastewater, mulching with plastic films for thermal protection, and wind-borne plastics (Piehl et al., 2018). Literature clearly indicates that soil contamination by plastics is not a new topic. The so-called "white pollution," associated with the presence of white plastic films or bags in the soil, was documented as early as 2004, with a clear emphasis on the further consequences of the fragmentation of these materials (Liu et al., 2014). Research conducted in 2018 indicates that the concentration of plastic particles can range from tens to tens of thousands of particles per kilogram of soil, and the discrepancy may result from sample contamination or the extraction method used. Zhou et al. (2018) estimated that 700,000 tons of plastic enter the soil annually in America and Europe. Fuller and Gautman (2016) found that samples taken from industrial areas in Australia contained between 300 and 67,500 mg/kg⁻¹, in Switzerland an average of 55 mg/kg⁻¹, in Chile between 0.57 and 12.9 mg/kg⁻¹, and in China between 18,700 and 42,900 mg/kg⁻¹ (Liu et al., 2018). Other studies show that the content of microplastics in agricultural, industrial, and floodplain soils in China significantly exceeds initial estimates. These studies also highlight typical sources of contamination, such as the proximity of mulched soils or textile and garment companies. When analyzing soil contaminated with microplastics, the sampling process is crucial to obtaining results specific to the location. Several factors must be considered,

including soil texture, aggregate stability, pH, organic matter content, organic and inorganic carbon content, moisture level, and cation exchange capacity. Additionally, microscopic analysis results can be influenced by the presence of carbonates and lipids. According to guidelines described by Huert et al. (2017), the effectiveness of measurements depends on the spatial distribution of sample collection. As Piehl et al. (2018) suggest, the sampling area should be divided into three sections, with each section providing a sample composed of 15 to 50 subsamples. However, many publications typically describe single analysed samples. Similarly, the mass of the collected sample is important, with a recommended minimum of 500 grams in relation to the maximum grain size (>2mm).

Sample preparation

The first step in preparing samples for analysis is usually drying to remove water from the soil. Authors employ different drying methods based on the physical properties of the material, which can change under temperature influence. Polymer specifications indicate that ethylene-vinyl acetate (EVA) melts at 30°-60°C, the glass transition temperature of polybutylene and polymethyl methacrylate is 40°-50°C, and the degradation temperature of polylactide is 60°C (Van den Berg et al., 2020). Despite this, researchers dried samples at 40°C for 24 or 72 hours (Enders et al., 2020), and at 70°C for 24 hours (Liu et al., 2018), with less frequent drying at room temperature until the desired effect is achieved. In each case, the goal is to obtain a uniform dry mass.

Homogenisation

An important element of sample preparation is appropriate homogenisation. The uniformity of the fraction facilitates sieving through sieves whose density is most often reported by the authors to be within 5mm, the conventional limit for microplastics. However, this process is prone to error since larger microplastic fragments are often coated with smaller particles, leading to underestimation in spectroscopic analysis (Zhang et al., 2018). Other authors indicate that excessive sieving and homogenisation can cause additional fragmentation of particles, especially those that are heavily degraded or brittle (Huang et al., 2020). Researchers suggest that mechanical grinding of soil aggregates also leads to fragmentation due to the heat generated during friction, recommending manual shaking of the sample instead (Zhou et al., 2020). Vermaire et al. (2017) proposed shaking with sodium

hexametaphosphate and using ultrasound on soil suspended in a salt solution or deionised water. Despite the effectiveness of the method, the direct impact of sonication on plastics and cascading sieving for obtaining 1, 2, and 5 mm fractions has yet to be confirmed (Zhou et al., 2020).

Removal of organic matter from samples

Soil contains varying amounts of organic matter, which can affect microplastic analysis results. The presence of plant debris at different decomposition stages, roots, animal excrement, or anthropogenic organic contaminants necessitates a cleaning method. Studies have shown that the effectiveness of organic matter removal correlates with an increased amount of detected plastics (Corradini et al., 2020). There are four groups of reagents used for removing organic matter: enzymes, bases, acids, and oxidants. The effectiveness of these reagents is summarised in Table 1. Kuhn et al. (2017) indicate that using alkaline reagents effectively removes aliphatic polyesters such as polylactides. Scheurer and Bigalke (2018) showed that H₂O₂ significantly affects the fragmentation of PET and PA. When used at room temperature with prolonged digestion times, the same reagent also altered the colour of PC, PVC, PE, PP, and PU, requiring 4 to 7 days (Nuelle et al., 2014). Researchers suggest that the use of specific reagents at appropriate temperatures should consider the soil's chemical composition. The presence of iron and manganese oxides shows a strong catalytic reaction where H₂O₂ is reduced before digestion begins. The use of enzymes for soil cleaning is still not well understood, with few described analyses. One such study is by Ljung et al. (2018), where the author utilised lipase, protease, cellulase, chitinase, and trypsin, detailing the sequence of their application to achieve an efficiency of 90%.

Reagent	Soil type	Digestion time [h]	Temp. [°C]	Estimated effectiveness
NaOH	clay sand	24	60	35-70%
КОН	clay sand	24	60	>35
65% HNO3	floodplain soil	48	60	>90%
96% H ₂ SO ₄	floodplain soil	24-72	90	> 95%
30% H ₂ O ₂	agricultural soil	24	60	>90%
H ₂ O ₂	sediment	168	60	>60
Fenton reagent	alay sand	24	40	>60

Table 1. Efficiency of organic matter removal by selected reagents

Density separation is one of the most commonly used methods, leveraging the difference in density between the mineral part of the soil ($\rho > 2.0$ g/cm⁻³) and the density of plastics ($\rho =$ $0.9-1.6 \text{ g/cm}^{-3}$). The buoyancy of plastics ensures that when soil is effectively mixed with sodium chloride (NaCl, $\rho = 1,2$ g cm⁻³), calcium chloride (CaCl₂, $\rho = 1,3-1,5$ g cm⁻³), sodium bromide (NaBr, $\rho = 1,4-1,6$ g cm⁻³), or zinc chloride (ZnCl₂, ($\rho = 1,5-1,7$ g cm⁻³), they float to the surface and can be collected for identification (Liu et al., 2020). Additionally, authors have noted the use of potassium formate ($\rho = 1.5-1.6$ g/cm⁻³), sodium heteropolytungstate solution ($\rho = 1.5 \text{ g/cm}^{-3}$), anhydrous sodium tungstate ($\rho = 1.4 \text{ g/cm}^{-3}$), ethanol ($\rho = 0.8 \text{ g/cm}^{-3}$), and deionised water ($\rho = 1.0 \text{ g/cm}^{-3}$) (Qyinn et al., 2017). The ratio of solutions to soil mass is not standardised and typically ranges from 1:10 to 1:25. Researchers indicate that methods are specific to certain soil types and plastics and may not be effective for others. As Scheurer et al. (2018) point out, calcium ions cause flocculation of organic substances, making calcium chloride unsuitable for soils with high organic content. They recommend using deionised water primarily for isolating PP, PE, and PS, emphasising that the method is also cost-effective and environmentally friendly. Scheurer and Bigalke (2019) note that using sodium positively affects the dispersion of aggregates and enhances the extraction process efficiency. Quinn (2017), observing the correlation between the density of the plastic and the solution, proposed using ZnCl₂ for detecting plastics like PET and PVC, which proved highly effective. However, they also noted that reagents are expensive and environmentally unfriendly. Other researchers mention that ZnCl₂ is corrosive and its impact on individual plastics should be analysed. Negative effects of reagents also include changes in plastic particle colour, strong foaming of the solution, particle coagulation, and their dissolution (Quinn et al., 2017). The overall procedure for density separation methods in most publications describes multiple uses of the same reagent or several, usually starting with deionised water (Liu et al., 2018). The simplest method is manually mixing the soil with the solution by shaking. However, as Zobkov (2017) points out, to standardise samples and ensure process repeatability, it is essential to use magnetic shakers, both platform and overhead types. Despite the development of spiral methods that continuously lift soil to the top of the container for better dispersion during mixing, high flask methods for better visualisation of fractions, or the use of air turbulence, the fundamental issue is the lack of use of plastic elements during the mixing process. Studies indicate that particle polarity can cause cork or cap adhesion by microplastic particles. The unresolved issue also remains the mixing time, with authors indicating a minimum time of 10 seconds and a maximum of 2 hours, with sediment settling time from 5 minutes to 24 hours (Imhof, 2012). The diversity and number of possible combinations of reagents, their concentration, soil type, microplastic type, mixing method, mixing time, and settling time seem complicated and raise the question of process standardisation. The table shows the most promising combinations of soil and reagent.

Reagent	Density	Plastic type	Soil type
Deionized water	1,0 g cm ⁻³	PE, PP	clay sand, sandy loams
NaCl	1,2 g cm ⁻³	PP, PS, PA, PE	agricultural soil
NaBr	1,4–1,6 g cm ⁻³	PMMA, PE, PP, PET, PCV, PS	agricultural soil, sedimental
CaCl ₂	1,3–1,5 g cm $^{-3}$	PU, PE, PP, PS, PET, PCV, PA	abundant in organic matter
ZnCl ₂	1,5–1,7 g cm $^{-3}$	PS	biololidy, agricultural soil
Potassium formate	1,5–1,6 g cm ⁻³	PET, PP, PE, PS	sediment soil
Ehtanol	0,8 g cm ⁻³	PE, PET, PES	agricultural soil

Table.2. Reagents used for separation of microplastics and estimated efficiency relative to the material in question

To collect microplastic particles floating on the surface of the solution, authors indicate decantation, involving gently pouring the upper layer onto shallow glass dishes and remixing the soil with the solution for more thorough extraction and minimising the number of particles adhering to the container walls. Liu et al. (2017) also used a method involving continuously adding solution and collecting the supernatant overflowing from the container. However, this method raises many concerns regarding particle adhesion to the outer side of the container and susceptibility to particles from the environment. Scheurer and Bigalke (2018) proposed suctioning using pipettes (mainly for synthetic fibres) and a vacuum pump. However, like other methods, there is a risk of particles adhering to the internal sides of devices. Enders (2020) separated microplastic particles in the supernatant using a vacuum pump and described the differences in the separation membranes used, made of glass fibres (pore size 1.6 μ m), quartz (pore size 2.2 μ m), polytetrafluoroethylene (PTFE) (pore size 2 μ m), and nylon with a pore size of 20 μ m. The author points out that many particles were lost with glass fibre and quartz membranes, and the hydrophobicity of PTFE caused difficulties in water filtration, so ultimately, nylon membranes were used in further studies.

Identification of microplastics

The identification of larger microplastic particles is usually based on visual analysis, which is a simple and quick method to determine the plastic, but Eriksen (Eriksen et al., 2013) has shown that this method has an error of 20-70%. Spectral analysis or mass spectrometry seems to be much more effective, especially if the particles are smaller than 1 mm. Frequently used Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) enables the recognition of specific adaption of a given substance or plastic. The obtained data can

specific chemical bonds characteristic of a given substance or plastic. The obtained data can be graphically represented, and the system compares the obtained spectra with a standard database. However, there are concerns that this technology is not highly effective in detecting objects smaller than 10 μ m. Simon et al. (2018) confirmed that the error scale can be reduced by using a focal plane array detector, which enables chemical mapping of larger areas on the filter by applying a grid of detector elements. It provides multiple chemical determinations of the same particle, but the overall analysis time significantly increases, reaching up to 10 hours when using a 47 mm filter.

Quantitative analysis

Quantitative analysis of plastics mainly involves weighing, counting, and instrumental analysis. Weighing is a crucial element, especially for high concentrations of microplastics in soil, expressed in units of mg/kg⁻¹. Counting using microscopy is the most popular method for describing microplastic concentrations, expressed in units of N/kg⁻¹ or N/m⁻², but it requires considerable time and often advanced image processing software. Additionally, quantitative analysis allows the determination of particle size, shape, and colour and can serve as a basis or scale for further thermoanalytical analyses (Zhang et al., 2018).

Thermoanalysis

Heating a sample to a temperature close to 500°C involves irreversible loss of the possibility of further quantitative analysis due to pyrolysis. Nevertheless, many authors point out that mass analysis is more important than quantitative particle analysis, citing uneven distribution of particles of various sizes and densities in the sample. Increasing the sensitivity of mass spectrometer apparatus based on time-of-flight (TOF) measurement allows detection in the

range of mg/kg⁻¹ to µg/kg⁻¹. Additionally, modern equipment enables simultaneous detection of multiple compounds without changing the instrument settings, the use of hydrogen as a carrier gas, and compatibility with other measurement instruments. Research conducted in independent laboratories collaborating to establish measurement reliability demonstrated that thermoanalytical analysis and chromatography effectively determined the content of PET, PS, PP, and PE, especially in assessing the total content of polymeric materials. Researchers emphasised the significant process of sample homogenisation and preparation, requiring cryomilling and precise scales for preparing samples weighing less than 100 mg, as well as the fact that lignins in soil interfere with the determination of PS and PE, leading to additional detection of microplastics.

Conclusions

Considering the impact of plastic particles on soil and organisms, as well as the possibility of their leaching into groundwater, conducting research and collaboration between laboratories seems highly justified. The challenge lies in developing uniform and standardised methods for the entire process of quantitative and qualitative analysis, enabling the generation of highly similar repeatable results. Many authors also point out gaps in information in various areas, which necessitates further analysis and attempts to answer all questions posed. These gaps mainly concern the precise estimation of the influence of sample preparation methods on the final microplastic content, quantitative analyses in highly heterogeneous soils, and the direct impact of microplastics on soil organisms and soil itself. Understanding the mechanism of particle transport in soil, both horizontally and vertically, is also important. It is worth emphasising that laboratory research often does not align with environmental research results. Abiotic and biotic factors in the environment, including human activities, stimulate transport conditions for plastics in unique ways. Therefore, it is recommended to conduct research directly in the field.

Bibliography:

- Anger, P.M.; von der Esch, E.; Baumann, T.; Elsner, M.; Niessner, R.; Ivleva, N.P. Raman microspectroscopy as a tool for microplastic particle analysis. TrAC Trends Anal. Chem. 2018, 109, 214–226.
- Bianco, A.; Passananti, M. Atmospheric Micro and Nanoplastics: An Enormous Microscopic Problem. Sustainability 2020, 12, 7327.
- Boots, B.; Russell, C.W.; Green, D.S. Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground. Environ. Sci. Technol. 2019, 53, 11496–11506.
- Braun, U.; Jekel, M.; Gerdts, G.; Ivleva, N.P.; Reiber, J. Microplastics Analytics— Sampling, Preparation and Detection Methods; Bundesministerium f
 ür Bildung und Forschung: Berlin, Germany, 2018.
- Corradini, F.; Bartholomeus, H.; Huerta Lwanga, E.; Gertsen, H.; Geissen, V. Predicting soil microplastic concentration using vis-NIR spectroscopy. Sci. Total Environ. 2019, 650, 922–932.
- Corradini, F.; Meza, P.; Eguiluz, R.; Casado, F.; Huerta-Lwanga, E.; Geissen, V. Evidence of microplastic accumulation in agricultural soils from sewage sludge disposal. Sci. Total Environ. 2019, 671, 411–420.
- David, J.; Steinmetz, Z.; Kučerík, J.; Schaumann, G.E. Quantitative Analysis of Poly(ethylene terephthalate) Microplastics in Soil via Thermogravimetry-Mass Spectrometry. Anal. Chem. 2018, 90, 8793–8799.
- De Souza Machado, A.A.; Horton, A.A.; Davis, T.; Maaß, S. Microplastics and Their Effects on Soil Function as a Life-Supporting System. In Microplastics in Terrestrial Environments: Emerging Contaminants and Major Challenges; He, D., Luo, Y., Eds.; The Handbook of Environmental Chemistry, Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; pp. 199–222.
- Enders, K.; Lenz, R.; Ivar do Sul, J.A.; Tagg, A.S.; Labrenz, M. When every particle matters: A QuEChERS approach to extract microplastics from environmental samples. MethodsX 2020, 7, 100784.
- Fuller, S.; Gautam, A. A Procedure for Measuring Microplastics using Pressurized Fluid Extraction. Environ. Sci. Technol. 2016, 50, 5774–5780.
- Geyer, R.; Jambeck, J.R.; Law, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. Sci. Adv. 2017, 3, e1700782.

- Herrera, A.; Garrido-Amador, P.; Martínez, I.; Samper, M.D.; López-Martínez, J.; Gómez, M.; Packard, T.T. Novel methodology to isolate microplastics from vegetalrich samples. Mar. Pollut. Bull. 2018, 129, 61–69
- Horton, A.A.; Svendsen, C.; Williams, R.J.; Spurgeon, D.J.; Lahive, E. Large microplastic particles in sediments of tributaries of the River Thames UK– Abundance, sources and methods for effective quantification. Mar. Pollut. Bull. 2017, 114, 218–226.
- Huang, Y.; Liu, Q.; Jia, W.; Yan, C.; Wang, J. Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment. Environ. Pollut. 2020, 260, 114096.
- Huerta Lwanga, E.; Gertsen, H.; Gooren, H.; Peters, P.; Salánki, T.; van der Ploeg, M.; Besseling, E.; Koelmans, A.A.; Geissen, V. Incorporation of microplastics from litter into burrows of Lumbricus terrestris. Environ. Pollut. 2017, 220, 523–531.
- Hurley, R.R.; Nizzetto, L. Fate and occurrence of micro(nano)plastics in soils: Knowledge gaps and possible risks. Curr. Opin. Environ. Sci. Health 2018, 1, 6–11.
- 17. Imhof, H.K.; Schmid, J.; Niessner, R.; Ivleva, N.P.; Laforsch, C. A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. Limnol. Oceanogr. Methods **2012**, 10, 524–537.
- Kawecki, D.; Nowack, B. Polymer-Specific Modeling of the Environmental Emissions of Seven Commodity Plastics As Macro- and Microplastics. Environ. Sci. Technol. 2019, 53, 9664–9676
- Kühn, S.; van Werven, B.; van Oyen, A.; Meijboom, A.; Bravo Rebolledo, E.L.; van Franeker, J.A. The use of potassium hydroxide (KOH) solution as a suitable approach to isolate plastics ingested by marine organisms. Mar. Pollut. Bull. 2017, 115, 86– 90.
- 20. Kühn, S.; van Werven, B.; van Oyen, A.; Meijboom, A.; Bravo Rebolledo, E.L.; van Franeker, J.A. The use of potassium hydroxide (KOH) solution as a suitable approach to isolate plastics ingested by marine organisms. Mar. Pollut. Bull. 2017, 115, 86–90
- 21. Liu, M.; Lu, S.; Chen, Y.; Cao, C.; Bigalke, M.; He, D. Analytical Methods for Microplastics in Environments: Current Advances and Challenges. In The Handbook of Environmental Chemistry; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2020; pp. 3–24.

- Liu, M.; Lu, S.; Song, Y.; Lei, L.; Hu, J.; Lv, W.; Zhou, W.; Cao, C.; Shi, H.; Yang, X.; et al. Microplastic and mesoplastic pollution in farmland soils in suburbs of Shanghai, China. Environ. Pollut. 2018, 242, 855–862.
- Ljung, E.; Olesen, K.B.; Andersson, P.G.; Fältström, E.; Vollertsen, J.; Wittgren, H.B.; Hagman, M. Microplastics in the Water and Nutrient-Cycle; Technical Report 2018–13; Sweden Water Research: Bromma, Sweden, 2018.
- 24. M. Eriksen, S. Mason, S. Wilson, C. Box, A. Zellers, W. Edwards, *et al.*Microplastic pollution in the surface waters of the laurentian great lakes Mar. Pollut.
 Bull., 77 (2013), pp. 177-182
- 25. Miller, M.T.; Katsiamides, A.; Abbass, M.; Sturzenbaum, S.R.; Thorpe, K.L.; Hodson, M.E. Polyester-derived microfibre impacts on the soil-dwelling earthworm Lumbricus terrestris. Environ. Pollut. 2020, 251, 453–459.
- Möller, J.N.; Löder, M.G.J.; Laforsch, C. Finding Microplastics in Soils: A Review of Analytical Methods. Environ. Sci. Technol. 2020, 54, 2078–2090.
- 27. Nuelle, M.T.; Dekiff, J.H.; Remy, D.; Fries, E. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. Environ. Pollut. **2014**, 184, 161–169.
- Piehl, S.; Leibner, A.; Löder, M.G.J.; Dris, R.; Bogner, C.; Laforsch, C. Identification and quantification of macro- and microplastics on an agricultural farmland. Sci. Rep. 2018, 8, 1–9.
- 29. Plastics Europe. Plastics—The Facts 2019: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data; PlasticsEurope: Brussels, Belgium, 2019.
- 30. Quinn, B.; Murphy, F.; Ewins, C. Validation of density separation for the rapid recovery of microplastics from sediment. Anal. Methods **2017**, *9*, 1491–1498.
- Rillig, M.C.; Lehmann, A.; Machado, A.A.d.S.; Yang, G. Microplastic Effects on Plants. New Phytol. 2019, 223, 1066–1070.
- Scheurer, M.; Bigalke, M. Microplastics in Swiss Floodplain Soils. Environ. Sci. Technol. 2018, 52, 3591–3598.
- 33. Simon, M.; van Alst, N.; Vollertsen, J. Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging. Water Res. 2018, 142, 1–9.
- 34. Steinmetz, Z.; Wollmann, C.; Schaefer, M.; Buchmann, C.; David, J.; Tröger, J.; Muñoz, K.; Frör, O.; Schaumann, G.E. Plastic mulching in agriculture. Trading short-term agronomic benefits for long-term soil degradation? Sci. Total Environ. 2016, 550, 690–705.

- 35. Van den Berg, P.; Huerta-Lwanga, E.; Corradini, F.; Geissen, V. Sewage sludge application as a vehicle for microplastics in eastern Spanish agricultural soils. Environ. Pollut. 2020, 261, 114198.
- 36. Vermaire, J.C.; Pomeroy, C.; Herczegh, S.M.; Haggart, O.; Murphy, M. Microplastic abundance and distribution in the open water and sediment of the Ottawa River, Canada, and its tributaries. FACETS 2017, 2, 301–314.
- 37. Zhang, S.; Yang, X.; Gertsen, H.; Peters, P.; Salánki, T.; Geissen, V. A simple method for the extraction and identification of light density microplastics from soil. Sci. Total. Environ. 2018, 616–617, 1056–1065.
- Zhou, B.; Wang, J.; Zhang, H.; Shi, H.; Fei, Y.; Huang, S.; Tong, Y.; Wen, D.; Luo, Y.; Barceló, D. Microplastics in agricultural soils on the coastal plain of Hangzhou Bay, east China: Multiple sources other than plastic mulching film. J. Hazard. Mater. 2020, 388, 121814.
- 39. Zobkov, M.B.; Esiukova, E.E. Evaluation of the Munich Plastic Sediment Separator efficiency in extraction of microplastics from natural marine bottom sediments. Limnol. Oceanogr. Methods 2017, 15, 967–978.

D.5.

Marek Klimasz, Anna Grobelak, "Effects of microplastics on selected earthworm species"



Article



Effects of microplastics on selected earthworm species

Marek Klimasz 1*, Anna Grobelak

¹ Faculty of Infrastructure and Environment, Czestochowa University of Technology; 42-201 Czestochowa Correspondence: <u>marek.klimasz@pcz.pl</u>; anna.grobelak@pcz.pl

Abstract: Microplastics currently pose a serious threat to aquatic and terrestrial ecosystems. The high mobility of particles, the diversity of size, material and shape make their spread out of. Further complicating matters is the ever-expanding plastics industry and modifications to their manufacturing process. To date, many cases of negative, often toxic effects of microplastics on various species such as fish, birds and mammals have been documented. The methodology for measuring and determining the effects of microplastics on soil organisms is still an area of little understanding and certainly requires further study. In conducted experiment, we reported the effects of selected microplastics in soil (polyethylene, polyethylene terephthalate, polystyrene, polyamide and a mixture of these plastics) at concentrations of 0.1% w/v and 1% w/v, at two time intervals, one and three months on five different earthworms species, indicating the species-related microplastic response. This reseach investigated the effects of different microplastics on biological parameters, such as survival or respiration, and biochemical parameters such as effects on glutathione s-transferase (GST), a marker of detoxification and the adaptive response in earthworm species Eisenia andrei, Eisenia fetida, Lumbricus terrestris, Apporectoda caliginosa, Dendrobena veneta. The choice of species and the type of microplastic selected are intended to map the occurrence of microplastic contamination in the soil and determine the adaptation of earthworms to changing environmental conditions, based on their ecological significance and functional diversity in soil ecosystems.

Keywords: microplastic, high density polyethylene, adaptive response, earthworms

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date Revised: date Accepted: date Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/license s/by/4.0/).

1. Introduction

Earthworms are a widespread group of animals inhabiting almost all continents; the Holoarctic area extending through Europe, the northern part of Africa, North America and most of Asia; species adapted to prolonged frosts can also be found in areas of present-day Siberia [1]. Because of their widespread environmental adaptation, some of them are referred to as cosmopolitan, that is, commonly found in large areas spanning different countries and often continents [2]. Their natural habitat is nutrient-rich and organic matter-rich soils with a pH in the range of 5-8, but species are known to prefer forested areas with a much lower pH, as well as sandy and calcareous areas with values at pH 8. Soil is the natural habitat and breeding ground for the vast majority of earthworm species, and their presence is extremely important from a soil ecosystem perspective [3].

Their species diversity and preferred food make it possible for us to classify them in many categories of ecosystem usefulness such as bioindication, composting, or assessment of particular soil contaminants [4]. Under favorable conditions, their reproduction rate is high, and factors categorized as growth inhibitors include heavy metals, pesticides and prolonged drought. The presence of earthworms in the soil, the tunnels they dig and the mucus they secrete affect both the amount of oxygen in the soil, its structure and the chemical composition of soil aggregates [5]. In addition, earthworms' activity lead to changes in the microbial environment, which is associated with an increase in the metabolic productivity of the soil. It is also necessary to mention the function associated with the decomposition of organic matter both directly (use as food) and indirectly (use by soil microorganisms of compounds excreted by earthworms in the form of feces or mucus). This phenomenon is commonly used in vermicomposting, a process of valorizing organic matter, the product of which is humus that is valuable to plants [6].

Plastics, most commonly polymers, are widely used in everyday life due to their strength, ease of molding, resistance to physical factors and low production costs [7], [8]. Globally, the amount of microplastics (MPs) in soils is estimated to be between 1.5 and 6.6 million tonnes, with the heaviest contamination reported in China, where approximately 660 kilotonnes were released into the soil [9]. The nomenclature of microplastics is still a debatable topic, due to the methods of sampling and measuring apparatus [10]. There is a pervasive concern that MPs origin from bigger items or can be produced as primary MPs and finish into ecosystems affecting biota, their functioning and also posing a risk to humans. Plastic production has been increasing exponentially since the 1950s, with an expected annual production rate estimated at 1,100 tonnes by 2050. [11].

Research on microplastics (MPs) has mainly focused on aquatic ecosystems, while studies on their impact on terrestrial environments remain relatively scarce. Recent reviews, such as Kallenbach et al. [12], emphasize that although MPs are well documented in marine and freshwater systems, their fate, transport and impact on soils and terrestrial organisms are still under-researched. Similarly, the recent review by[9] emphasizes the critical knowledge gaps in understanding MPs' impact on soil ecosystems, particularly their effects on microbial communities, nutrient cycling, and soil structure. The review by Kallenbach et al. [12] emphasizes that MPs in terrestrial systems may pose unique risks due to their interactions with soil biota, aggregation in the soil matrix and potential for long-term accumulation.

Microplastics (MPs) can affect various aspects of terrestrial ecosystems, altering soil properties, microbiome composition, and influencing the motility, growth rate, and reproductive capacity of soil animals. The impact of MPs on plants depends on their size, shape, and polymer type, as well as on exposure time and concentration, and they can both impair growth and modify soil properties, which indirectly affect MPs toxicity. In the case of soil organisms such as earthworms, MPs are transported and incorporated into the soil through processes such as bioturbation, which can increase their toxicity. In particular, nanoplastics (NPs) exhibit higher levels of toxicity than MPs, and their concentrations above 1 g/kg can lead to growth inhibition and reduced survival of earthworms [9]. The plastics produced so far undergo physical and chemical fragmentation processes, during which mechanical friction, UV radiation or water

affect the release of microparticles, the concentration of which increases every year [13]. Estimating the actual concentration of these particles in soil is difficult for several reasons; the geological variation of the soil (pH, density, amount of water, etc.) the accuracy of the apparatus, which is not always capable of detecting all plastic particles, and the reproducibility of the samples. Studies conducted in many parts of the world describe the concentration of microplastics in relation to dry matter at the level of 0.001 to 0.025 mg/kg. The results of studies conducted in both East Asian countries indicate that highly urbanized cities, often without adequate sewage infrastructure, are characterized by the presence of microplastic in the soil at levels of 0.25-0.55 mg/kg which seems to be extreme results [14]. It should be noted that plastics are classified as micropollutants, that is, substances and compounds whose trace amounts are measurable and have a negative impact on the ecosystem.

Studies have shown that microplastics can negatively affect organisms at both the individual and population levels. Its presence in the gastrointestinal tract can cause physical damage to soft tissues, lead to allergic reactions and poisoning by heterogeneous toxic compounds [15]. In addition, microplastic content in the intestines and stomach can affect digestion disruption, a sense of false satiety and reduce the amount of substances absorbed by the body [16], [17]. Consequently, this translates into slower growth of the body [18].

The purpose of the study was to determine the effects of different microplastics at two different concentrations on selected earthworm species. The study had the nature of biological cognition of natural immune responses and morphological changes to contamination contained in the soil. For this purpose, the species used were *Eisenia fetida, Eisenia andrei, Lumbricus terrestris, Dendrobaena veneta* and *Apporectoda coliginosa*. These species represent different ecological groups: epigeic (*E. andrei, E. fetida*), anecic (*L. terrestris*), and endogeic (*A. caliginosa, D. veneta*), each contributing to organic matter decomposition, soil aeration, and structure formation. Their presence influences nutrient cycling, microbial activity, and soil stability, making them essential indicators of soil health. Including these species allows for a comprehensive assessment of microplastic impacts across various soil ecological niches. The results show the effects of microplastics on individual survival, mass correlation over time, effects on oxidative stress and respiration.

2. Materials and Methods

2.1 MPs preparation for experiment

The study used microplastics with different chemical structure and fraction size for maximum reproduction of natural urban environmental pollution: polyethylene (PE) fluorescent green microspheres size 1-5 μ m, 10-20 μ m, 32 -38 μ m, 38-45 μ m, 53-63 μ m, purple polyethylene microspheres 1.00 g/cm3 38-45 μ m and 75-90 μ m, polyethylene terephthalate (PET) in the form of irregular granules 10 μ m - 100 μ m in size, polyamide (PA) in the form of fibers 10 μ m - 2000 μ m in length, polystyrene (PS) in the form of irregular film shreds 20-100 μ m in size (Cospheric). Considering the current levels of pollution and the continuous yearly increase of microplastic concentrations in the soil, it was decided to use two concentrations at a decimal

interval, i.e. 0.1% w/v and 1% w/v. 30 g of microplastic was used for 3 L of soil at 1% (w/v) concentration and 3 g of microplastic for 3 L of soil mixture at 0.1% (w/v) concentration, soil density 1.3 kg/L. The 1% w/v value is intended to show both the impact of extreme contamination on organisms and the possible prevention of the effects, as well as the possibility of detecting microplastic through calibration of the measurement apparatus.

2.2 Experiment design and settings

Despite obvious similarities related to the appearance of earthworms, differences within species are significant and include individual size, body pigmentation, preferred environment, foraging mode and sensitivity to individual stresses. Thus for this expiriment we used five earthworm species *Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, *Lumbricus terrestris*, *Apporectoda caliginosa*, *Dendrobaena veneta*.

For biochemical tests, natural agricultural soil was used, mixed with horse manure at a ratio of 1/5 and microplastic in dry matter conversion. The earthworms used in the laboratory test were self-cultured, from a strictly controlled culture (temperature 20 ± 2 °C; photoperiod 16 h L :8 h D) and had a similar weight of 0.3 g (+/ - 0.02) when placed in the experimental containers. Containers of 3 liters contained 10 earthworms, in the case of *L. terrestris* 5 per container. For each species, 2 experimental and one control containers were prepared. After a period of 1 month, the earthworms were taken from the soil, washed thoroughly with deionized water and transferred to sterile agar medium to remove the gut contents. For this experiment 5 earthworms from each sample were subjected to deep-freezing heat shock at - 80 ° C, and then the tissue fragments were homogenized. The remainder was used to map microplastic particles in the tissues. Measurement results for each sample were averaged.

2.3 Biotic response to MPs by earthworms

Glutathione s-transferase (GST) is included in an extensive group of proteins commonly found in both animals and plants, prominent in processes related to stress tolerance responses induced by biotic and abiotic factors such as; in the case of animals, lack of food, temperature or the presence of toxins. They are located in both the intercellular space and the cytosol and are integral to the assessment of environmental stress. The main function of s-transferase is the coupling (catalytic) of electrophilic synthetic compounds or those of natural origin to glutathione, and the course of the reaction can be illustrated by the equation:

$GSH+RX \rightarrow GSR+HX$

Many classes of transferases have been described taking into account specific amino acid similarity, as well as the position and number of introns. These classes include Phi, Zeta, Omega, Tau and Lambda, but the literature reports that more can be added.

The method relies on the coupling reaction of reduced glutathione (GSH) with 1-chloro-2,4dinitrobenzene (CDNB) catalyzed by glutathione S-transferase, contained in animal cells. The activity of the enzyme was expressed by measuring the concentration of the resulting complex, i.e., 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione. Among the markers of oxidative stress, we additionally distinguish catalase (CAT) and lipid peroxidation determined by quantification in the thiobarbituric acid reaction (TBARS). The methodology has been described in detail by Habig [19], Aebi [20]. Determination of the change in protein concentrations as a consequence of oxidative stress furthermore was described by [21].

Individuals of the control and test groups, after being separated from the soil, were washed thoroughly with distilled water and placed on sterile agar medium to expel the intestinal contents. Ten specimens of similar weights were placed in each chamber for a period of 24 hours at a CO_2 zero starting point. The study used an Echo respirometer, with a 12-channel chamber for 2.8 L cylindrical solid fraction tanks, O_2 sensors range 0-25%, accuracy: 0.2%, CO_2 sensor: range 0-2000ppm, accuracy: 0.2% (sensors combined). Air pump and controlled measurements from the sealing of the circulation for the value of 10 pieces of species in a 24-hour period of bulk measurement, flow measurement. Indicator CO_2 concentration, data compiled in Excel synchronized with measuring chambers. Analysis for mixed microplastic fraction. The respiromtric tests were prepared under standard methods: ISO 16072:2002 – Soil quality — Laboratory methods for determination of microbial soil respiration and ISO 17155:2012 – Soil quality — Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves.

This study compared the effectiveness of bacterial flora growth on selected media for each type of microplastic and selected earthworm species. LB agar for total bacteria number estimation (Luria broth; ISO 4833-1:2013) and selective MacConkey medium differentiating (purple) lac + *Escherichia coli, Klebsiella* and (white) lac - *Salmonella* and *Shigella* were used 9 ISO 21528-2:2017). The bacterial flora was collected from the cleaned fresh intestine of the test species and incubated at 37° for 48 hours using spraeding plate method.

2.4 Data analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Tukey's test as a post-hoc analysis. The asterisks in the figures indicate groups for which a statistically significant difference in GSTU activity was found compared to other groups. The differences may concern both the effect of different types of microplastics (PE, PET, PS, PA, Blend) and the effect of concentration (0.1% vs. 1%).

3. Results

3.1. Effect of microplastic on glutathione s-transferase

The effect of microplastics on the adaptive biomarker, as indicated by the increase in glutathione S-transferase (GST) concentration, was evident in all studied species. Both after a one-month period, as shown in Fig. 1, and after three months, as observed in the same individuals in Fig. 2, the changes were evident.











Figure 1. Effect of microplastic on GST activity after 1 month exposure of tested earthworms, statistically significant differences marked with "*".

All tested earthworm species showed increased GST activity after exposure to microplastics, which confirms the oxidative stress caused by them (Fig. 1). The applied MPs Blend induced the strongest effect in *E. fetida*, and slightly less in other species, which suggests differences in detoxification. PA (polyamide) and PS (polystyrene) are the most toxic, causing a significant increase in GST in *E. andrei*, *A. caliginosa*, *L. terrestris* and *D. veneta*. In the conducted test, the species *E. fetida* and *L. terrestris* showed the greatest susceptibility to oxidative stress, which means that they may be better bioindicators of MPs contamination. Additionally, the species *D. veneta* shows the smallest change in GST after exposure to the MP blend, which may suggest a different detoxification strategy or lower MPs absorption.









Figure 2. Effect of microplastic on GST activity after 3 months exposure of tested earthworms; statistically significant differences marked with "*".

In the studies conducted after 3 months of exposure (Fig. 2), compared to 1 month for *E. fetida*, the strongest effect is maintained for PET and PS, which suggests that long-term exposure to these polymers causes persistent oxidative stress. For *E. andrei* compared to the results from 1 month, PS and PA show even greater GST activity, which suggests the accumulation of toxic effects of these polymers over a longer period. For the species *A. caliginosa* compared to 1 month, most polymers show even stronger effects, especially the blend of MPs and polyamide, which suggests the accumulation of toxic effects. In the studies of *L. terrestris* it was shown that compared to the results after 1 month, most GST values increased, which suggests a gradual accumulation of toxicity and stress. For *D. veneta* compared to 1 month, the effect of microplastics on GST in this species is more pronounced, especially for PA and Blend, which indicates a gradual increase in stress.

3.1 Effect of microplastic on respiration

This is one of the first documented research of the effects of microplastic of different fractions on the respiration of earthworms exposed to microplastic. Previously described studies included the effects of heavy metals or other types of pollutants, and respiration results were reported in μ m /L O₂/g⁻¹/h⁻¹. Gas exchange in earthworms occurs through the richly vascularized body shells, and diffusion involving the intraepithelial capillary network.

Celomatic fluid and mucus further facilitate respiration and intracellular distribution of oxygen, which, after entering the blood, is distributed throughout the body. An adaptation to soil life is also dissolved hemoglobin in the blood, allowing it to survive periodic oxygen shortages. Considering the distribution of microplastic and its hooking in the pores of the body, a question was raised regarding the effect of microplastic on the respiration of individuals.









Figure 3. Effect of microplastics on respiration after 1 month exposure of tested earthworms; mg CO₂ emitted per g of live worms and per hour

The higher the MPs concentration in *E. fetida*, the greater the reduction in CO_2 mg emitted per g of live worms production, suggesting a decrease in metabolic activity (Fig. 3). Additionally, the respiration rate is significantly lower in the 1% MPs group, which may indicate a negative impact of microplastics on the metabolic capacity and health of earthworms. In E. andrei a trend similar to E. fetida was observed, although the decrease in respiration is somewhat less dramatic, and additionally lower CO₂ emission at higher MPs concentrations suggests a reduction in metabolic activity. In tests for L. terrestris, no effect of MPs on respiration was noted at 0.1%, suggesting a greater resistance of this species to MPs. 1% MP causes a decrease in respiration, but the effect is less pronounced than in other species, probably due to the fact that L. terrestris as an anechoic species (deep burrowing) may have a better ability to avoid microplastics in the soil, which explains the smaller impact of MPs on its metabolism. For D. veneta, a clear decrease in respiration was observed at 1% MP, which indicates a toxic effect, while 0.1% MP caused only minor changes, suggesting moderate resistance of this species. The strongest decrease in respiration among all species was observed for A. caliginosa. 1% MPs reduced respiration of this species by more than half, suggesting a very strong toxic effect. A probable explanation is that A. caliginosa as an endogenous species (living in mineral soil) may have greater contact with microplastics, which may increase the negative impact of MPs.





Figure. 4: Effect of microplastics on respiration in tested earthworms after 3 months exposure; mg CO₂ emitted per g of live worms and per hour

After 3 months of exposure (Fig. 4) for *E.fetida*, a significant decrease in respiration was noted at 1% MPs, suggesting a strong inhibition of metabolism, while at 0.1% MP the effect was less pronounced but still present. For *E. andrei*, a similar trend was observed as for *E. fetida* – a strong decrease in respiration at 1% MPs, while 0.1% MPs reduced CO₂ emission, but not as drastically, which suggests lower toxicity of this concentration. The smallest effect of MPs at 0.1% was noted for *L. terrestris*, which suggests greater resistance of this species. On the other hand, 1% MPs causes a decrease in respiration, but less drastically than in *E. fetida* or *E. andrei*. For the species *D. veneta*, a high decrease in respiration was noted at 1% MPs, which indicates a toxic effect. Aditionally, a dose of 0.1% MPs causes only minor changes, which may suggest moderate resistance to low concentrations of MPs. In the study, *A. caliginosa* showed the strongest decrease in respiration among all species. Even at 0.1% MPs, there was a significant reduction in respiration, which indicates high susceptibility to microplastics.

The results after one month (Fig. 3) and 3 (Fig. 4) show a similar trend. As the authors suggest, the MPs used in this study during tissue analysis were found in the septa and respiratory canals of the exoderm, indicating the likelihood of gas exchange disruption at early stages. The most vulnerable are smaller individuals and smaller species, in which a fraction of the size 36-52 μ m may have completely blocked gas flow. In the case of *L*.

terrestris, no significant changes were observed and measurements were similar to those obtained from control samples. As with the other studies, the strongest effect was observed in *A. caliginosa* and this probably correlates with the other negative scutes of the presence of plastic in the soil such as oxidative stress and disruption of the bacterial flora. On a percentage scale, the relationships in respiration are shown in the table (Tab. 1), where the percentage difference in respiration was determined for individuals exposed to particular concentrations of MPs.

Species	Concentration	1 month	3 months
	(w/v %)		
E. andrei	0,1%	-19,56%	- 28,25%
	1%	- 38,69%	- 69,73%
E. fetida	0,1%	- 22,58%	- 26,18%
	1%	- 40,13%	- 69,97%
A. caliginosa	0,1%	- 37,60%	- 46,00%
	1%	- 57,54%	- 60,32%
L. terrestris	0,1%	- no changes	- 10,26%
	1%	- 28,57%	- 36,16%
D. veneta	0,1%	- 13,47%	- 12,88%
	1%	- 37,82%	- 61,59%

Table 1. Decrease in gas exchange efficiency after one and three months compared to the control sample

The results presented in the table 1 in a percentage manner illustrate the scale of influence of MPs on gas exchange, large changes are visible in the case of *A. caliginosa*, which is characterized by high sensitivity to both oxidative stresses as described by markers and gas exchange.

3.2 Effects on individual survival

Species sensitivity is usually defined as the ability to adapt to changing environmental or living conditions. This sensitivity can be expressed in the amount of individual weight lost, concentration, amount of immune proteins, and species survival rate. Survival, in turn, along with other parameters, can indicate species bioindication and suggest a foundation for further work aimed at comparing the results obtained with stresses such as those associated with the presence of heavy metals or varying soil temperatures. The results of the tests conducted to determine survival rates are shown in the graphs below for each species after a period of 3 months. The posted graphs (Fig.5) show species survival rates after a period of 3 months in earthworms exposed to microplastic contained in the soil.











Figure 5. Effect of microplastic on individual survival in tested earthworms

For all individuals, a small negative effect of high MP concentration on species survival was observed, but for dose 1% the effect was significant, with individual losses being highest in *A. caliginosa*, for all tested microplastics materials. Exposition of *E. fetida* to PS, PA, Blend casused significant decrease in survival rate (Fig. 5). Also for Blend, the microplastics mixture the effect of survival decrease was also noted for *E. andrei* (Fig. 5). The species in which survival was the highest remain *D. veneta* and *L. terrestris* where over 95% individual survival was recorded at a concentration of 0.1%. The general trend among the publications is similar, MPs with low concentration have little effect on individual death and only high concentrations contribute to an increase in the rate.

3.3 Effect of microplastics on bacterial flora

The bacterial flora of the earthworm gut diversifies with respect to its functions and actively supports both digestive processes and the transformation of mineral particles in the soil. This study compared the effectiveness of bacterial flora growth on selected media for each type of plastic and selected earthworm species (Tab. 2, 3).

	Control	1 month 0,1%	3 months 1%
E. fetida			
E. andrei			
A. caliginosa			
D. veneta			
L. terrestris			a de la constance de la consta

Table 2. Differences in bacterial flora cultures on MacConkey medium after one and three months of exposure to MPs

	Control	1 month 0,1%	3 months 1%
E. fetida			
E. andrei			
A. caliginosa			
D. veneta			0
L. terrestris			

Table 3. Differences in bacterial flora cultures on LB agar medium after one and three months of exposure MPs

Our study did not examine the mechanical damage caused by plastic particles, the detailed impact on the abundance of specific bacterial groups and gene sequences. Here, the goal
was to illustrate the overall effect of MP on the growth of the collected bacterial flora in optical and quantitative terms. This study showed that individuals of the species *A*. *caliginosa* were most affected by the sterility of the bacterial flora (Tab. 2, MacConkey agar and Tab. 3 LB agar), in which the number of bacteria on both media decreased significantly. For *E. fetida* and *E. andrei* the number of bacteria grown on MacConkey medium in microplastic treatments was also lower, compared to control. Species in which the changes have not been observed were *D. veneta* and *L. terestris* on MacConkey medium, indicating the lack of correlation of microplastic with this specific bacterial flora. When using LB medium the decrease in total bacteria was observed for all studied earthworm species (Tab. 3). Especially this decrease has been fond for 1% microplastics dosage.

4. Discussion

Earthworms are a widespread group of organisms used in many tests and studies, and issues of biomass and tissue chemical constituents [22], the impact of heavy metals [23] or their importance in vermicomposting [24], among others, have been described. They are an extremely important part of the soil ecosystem and bioindication against many contaminants [25]. Increasingly, earthworms are also becoming the subject of studies for microplastics and total plastic contaminants in soil [26]. A number of cases of negative effects have been described, manifested by, among other things, a decrease in earthworm weight [27], oxidative stress or increased individual and species mortality [28]. In these studies, *E. fetida* and *E.andrei* are the most commonly described species, less frequently the species found in forested areas.

4.1 Biotic response to MPs by earthworms

In our study, we used 4 different species (*L.terrestris*, *D. veneta*, *A. calliginosa*, *E. fetida*, *E. andrei*) which were subjected to studies of the effect of microplastic on selected biochemical parameters under laboratory conditions. Oxidative stress, the effect of microplastic on gas exchange, species survival, and the effect of microplastic on the bacterial flora were examined, and all studies were carried out at two time intervals (one and three months) and at 2 concentrations of microplastic. In addition, this study used a mixture of microplastic fractions in addition to individual fractions, for a better representation of natural contamination, a novel approach.

In the case of stress and toxicity level, all specimens tested and all species showed symptoms of stress at varying levels, which is consistent with many publications [29] [30], with *A.calliginosa* and *E.fetida* being most affected by oxidative stress after one month of exposure. The effects of MPs are species, polymer and concentration dependent, suggesting that different MPs may have different mechanisms of action in soil. The high GST values for 1% MPs show that the effects of microplastics may be dose dependent, highlighting the need for further research into toxicity thresholds for soil organisms. Polystyrene (PS) and polyamide (PA) showed the highest GST activity in the pre-tested studies after 3 months in most species, which indicates their stronger effect on oxidative stress in the long term. Microplastic blend (Blend) was more toxic to *A. caliginosa* and *D. veneta*, but its effect was reduced for *E. fetida*.

The study showed that the mixed microplastic fraction had the greatest effect on adaptative biomarker, and was highest in A. calliginosa. The MPs concentration was of key importance, and in each case, it short-circuited the level of stress markers. Similar results were obtained by Rodrogez et al. [18], describing the effects of microplastic on the species E. fetida, confirming that only high concentrations of microplastic in the soil influenced significant changes, Baloš [31] and references to the effects of microplastic on earthworms can also be found in articles by Lackman [32], Baeza, [33], Huerta [34], and Dąbrowska [35]. These results were similar to those described after three months of exposure, and in both cases both L.terrestris and D. veneta exhibited higher stress resistance. This is likely related to the size of the individuals themselves; the L.terrestris used in the study was several times larger than the Eisenia species. When it comes to determining the effect of microplastics on respiration, this is one of the first studies documenting the effect of microplastics on gas exchange. Our research has shown that microplastic present in soil significantly reduces gas exchange, despite the fact that the exact mechanisms of this effect are not known. This may be related to plastic particles adhering to the body and those taken up by earthworms, which, by piercing tissue barriers, blocked gas exchange in body septa. In all species and combinations studied, the effect of 1% microplastic drastically affected gas exchange, but in the case of 0.1% the differences were not as significant, especially in the case of L. terrestris and D. veneta. There is ample evidence of close links between gas exchange and other metabolic systems in earthworms, such as decreased gas exchange during aestivation, effect of temperature on metabolism and gas exchange, interspecies differences in metabolism and gas exchange [3, 24]. However, these factors are not obvious in the present study. A significant effect on decreased respiration was observed in earthworms exposed to microplastics. There is currently a lack of direct scientific studies examining the effects of microplastics on earthworm respiratory processes. Since there are reports indicating a general negative impact of microplastics on the health of these organisms, which may affect their general condition and metabolic functions. Although, another [9] study does not directly address respiratory processes, it suggests that the presence of microplastics may affect the general health and metabolism of earthworms, which in turn may affect their respiratory functions. However, further, targeted studies are needed to precisely determine the effects of microplastics on the respiratory processes of these organisms.

The authors of the study suggest that more detailed studies describing tissue histopathology and the exact sites of microplastic content should be conducted, as demonstrated by the authors in another publication [36]. Additionally, in the case of the mixed fraction, the exact type of plastic that may have flowed into the disorders should be determined. Studies [17] indicate the impact of microplastics on the skin of earthworms. This study observed that exposure to microplastics leads to damage of the skin surface of earthworms, which may affect their health and physiological functions. Although this study does not directly examine anatomical differences by habitat, the results suggest the need for further research on the impact of microplastics on different species of earthworms, which may have different skin adaptations depending on their habitat. The study

conducted by [10] does not directly focus on skin changes or anatomical differences, but it does provide context for potential research on the interactions between microplastics and earthworm anatomy in different habitats. The impact of microplastics on earthworm tissue surfaces is an under-researched area.

Another studies [28] were also conducted on the effect of polystyrene microplastics (PS-MPs) on earthworms of the species *E. fetida*. Histopathological analysis showed damage to intestinal cells in earthworms exposed to PS-MPs, indicating a toxic effect of these particles on the gastrointestinal tissues. Exposure to PS-MPs caused significant changes in the levels of glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) activity in earthworm tissues. These changes suggest that PS-MPs induce oxidative stress, which may lead to further cellular damage. Our research also confirmed the oxidative stress presence in earthworms tissues exposed to microplastic, especially in dose 1%. Some toxic effects can be also the result of the additions to microplastics production like PCB, phthalates, bisphenol A.

The gut bacterial flora of earthworms is diverse, and studies to determine bacterial clusters or their growth include acid bacteria (*Acidobacteria, Coribacteraceae*) archaea (*Crenarchaeota*), gram-negative bacteria (*Errucomicrobia*), aerobic bacteria (*Chitinophagaceae*), as well as *Hyphomicrobiaceae* and environmental bacteria (ubiquitous) *Flavobacteriaceae* [37].

The study of the bacterial flora of earthworms was mainly aimed at visually illustrating the changes occurring in the gut of earthworms in the perspective of basic microbiological media and comparing the results for all species. In this way, it was possible to make a preliminary determination of the differences in the bacterial flora, without describing the colonies in detail and characterizing them in relation to their generic affiliation. This provided results that were clear and readable from the perspective of researchers not involved in microbiology, but in the area of interest of earthworm physiology and changes in intestinal flora. In the case of Gram negative lac + and lac - bacteria for E.fetida and E.andrei, documented intestinal sterility increase was evident, but not as critical as in the case of A.calliginosa; in the case of this species, a strong bacterial reduction was observed, which certainly translated into the disguise of individual weight, oxidative stress markers and other biochemical parameters. In the case of L.terresrris and D.veneta, no changes were observed, which may suggest the indifference of the microplastic to the bacterial flora. For total number of bacteria (LB medium), the chamges were much more intensive, indicationg the neative effect of applied micrplasic, especially dose 1% on bacterial flora of tested earthworms. Lear et al., indicated that microplastic ingestion may lead to dysbiosis of the gut microbiota, which may differ between worm species. Differences in microbiome composition may affect the mechanisms of microplastic uptake and metabolism, suggesting the need for further research into species-specific responses, what was confirmed partly in conducted study [11]. A snapshot of available data shows that microplastic can affect heavy metal accumulation by reducing carbohydrate and amino acid metabolism needed for bacterial growth [38].

4.2 Ecological effects

The results of the effect of microplastics on survival described in the study provide a basis for analysis relative to adaptation, but some limitation here may be the small size of the containers and the lack of mobility of earthworms. Considering their ability to actively move and move in tunnels, the 3 L containers seem not large here, and the study only aimed to show interspecies differences and confirm for the available literature. Many publications describe a decrease in earthworm weight, a decrease in cocoons and increased mortality [39], [13], but there is not much information on the effect of the mixed microplastic fraction and a comparison of data for several different species with variable environmental adaptations. Our study showed very high survival rates for species exposed to 0.1% microplastics in soil, but at 1%, the changes occurring were significant. The species most susceptible to microplastics were *E. andrei* and *E. fetida*, but especially, the highest impact on decreasing surviwal rate was noticed for *A. calliginosa*, where the negative changes occurred the most and the mortality rate was significant. Similar results and descriptions were shown in their studies by Cao [40], Zhang [41],Wang [42], and among others.

A study by Boots et al. [9] found, that the presence of microplastics in soil negatively impacts earthworm health, leading to weight loss and reduced growth. These observations suggest that microplastics may cause irritation and blockages in the earthworm's digestive tract, which limits nutrient absorption and affects their fitness. In addition, changes in soil pH caused by microplastics may affect different species of earthworms differently, affecting their ability to assimilate these particles. The mechanisms of response to microplastics may be similar to those observed in aquatic worms studied previously. The effects of plastics include irritation and obstruction of the gastrointestinal tract, reduced nutrient absorption, and reduced growth [9]. Judy et al. [43] found no evidence of any effect of microplastics on wheat seedling emergence and production, or on mortality or population performance of earthworms and nematodes, which is inconsistent with the results obtained in this study. In the conducted studies, all studied species showed a decrease in CO₂ emissions after exposure to MPs, which means reduced metabolic activity and potential weakening of vital functions. The species most susceptible to microplastics, such as A. caliginosa and E. fetida, showed the strongest decrease in respiration, which suggests their high susceptibility to the toxic effects of MPs. On the other hand, L. terrestris showed the least effect of MPs on metabolism, which suggests a greater resistance of this species to this contamination. The decrease in CO₂ emissions is strongly dependent on the concentration of microplastics – the effect is more pronounced at 1% MP than at 0.1% MPs. Epigeic species (E. fetida, E. andrei) and endogeic species (A. caliginosa) are most susceptible to microplastics, while anecic species (L. terrestris) are more resistant. Reduced earthworm activity may have a negative impact on soil ecosystems, as these organisms play a key role in matter cycling and soil aeration.

4.4 Microplastic parameters and pollution in the terrestrial site

The conductacted study does not give the direct information, how the size of microplastics improve the earthworms, since the microplastics ranged in a quite similar size particles; PE 1-63 μ m, PET 10-100 μ m, PA 10-200 μ m, PS 20- 100 μ m. Authors [18] examined the

effects of exposure of earthworms (*E. fetida*) to low-density polyethylene (LDPE) microplastics with sizes ranging between 250 and 1000 μ m, but at different doses. There are few studies that report effects in relation to different sizes of a specific single microplastic. In the study [44] the diameters of the PE microplastics were 180–212 μ m and 250–300 μ m, respectively. It was found that both negligibly affected female earthworm reproductive organs but damaged male reproductive organs. The size-dependent toxicity of microplastics was not observed, due to similar size of used MPs, as well with limitations to apply MPs not in the range but in specific size. This effect could be caused by small differences in size, but researchers have proven the formation of plastic nanoparticles and its presence in tissues. The polymers selected for the study – polyethylene (PE), polyethylene terephthalate (PET), polystyrene (PS) and polyamide (PA) – are commonly found in terrestrial ecosystems. Their presence results from the wide use of these materials in everyday products and from improper disposal of plastic waste [45].

Quality assurance and sample quality control (QA/QC) in microplastic testing are key to minimizing sample contamination and obtaining reliable and repeatable results. The use of rigorous QA/QC procedures, such as the use of clean reagents, blank controls, and avoidance of cross-contamination, allows for the accurate identification and quantification of microplastics in environmental samples [46].

5. Conclusions

While there are many specialized reports on the effects of plastic on earthworms, this article is one of the few to compare both different species and a mixed fraction of microplastics, which is new to published articles. The results of this study provide a better understanding of interspecies differences and their adaptation to changing habitat conditions.

Full agreement remains, however, on the species best adapted to plastic exposure. According to the authors' assumptions, D. veneta, as a species often found in urban areas, urbanized spaces and contaminated areas, tolerated the presence of plastic in the soil very well, showing no morphological-chemical changes at a concentration of 0.1%. L. terrestris, as a species that reacts similarly to microplastics, probably owes its resistance to individual size, so that plastic fragments that would cause damage in other species remained inert for this species. For each species, the 1% concentration proved toxic and definitely affected individuals, an important clue, as well as information that in heavily polluted industrial areas and near illegal landfills, the soil may be devoid of earthworms. The study of the impact of microplastics (MPs) on earthworms has shown significant differences in their responses among species, which is likely due to different ecological niches, foraging patterns, and tunneling strategies. Epigeic species, such as E. andrei and E. fetida, are more exposed to direct MPs ingestion, leading to increased oxidative stress and changes in the gut microbiome. Endogenous and anecic species, such as A. caliginosa and L. terrestris, show longer exposure to MPs, which may result in chronic effects on their metabolism and survival. Variability in the response to MPs may be due to differences in metabolism and detoxification capacity of individual species. Identifying species most susceptible to MPs contamination can help to better monitor the environmental status and assess the effects of plastic pollution. The conducted studies confirm that earthworms are exposed to oxidative stress caused by microplastics, which may affect their health and ecosystem functions. The study examined the impact of MPs on different species and suggests that soil ecosystems may be changed by the long-term accumulation of microplastics. Therefore, identifying species more susceptible to microplastics may help to define bioindicator organisms for assessing environmental contamination. Microplastics can disrupt earthworm metabolism through oxidative stress, changes in the microbiome, and reduced nutrient absorption. In conducted study it was found that earthworms exposed to microplastics show reduced respiration, which means reduced metabolic activity.

Author Contributions: Conceptualization, M.K. and A.G.; methodology, M.K.; software, M.K.; validation, M.K. and A.G.; formal analysis, A.G.; investigation, M.K.; resources, M.K.; data curation, M.K.; writing—original draft preparation, M.K.; writing—review and editing, A.G.; visualization, M.K.; supervision, A.G.; project administration, A.G.; funding acquisition, A.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by internal grant of Faculty of Infrastructure and Environment; Czestochowa University of Technology.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results".

Reference:

- Briones, M. J. I., Moran, P. & Posada, D. (2009): Are the sexual, somatic and genetic characters enough to solve nomenclatural problems in lumbricid taxonomy? *Soil Biology & Biochemistry*, 41: 2257–2271.
- [2] Csuzdi, C., & Zicsi, A. (2003). *Earthworms of Hungary (Annelida: Oligochaeta, Lumbricidae)* (p. 271). Budapest: Hungarian Natural History Museum.
- [3] Kaushik Adhikari, Anton F. Astner, Jennifer M. DeBruyn, Yingxue Yu, Douglas G. Hayes, Brian T. O'Callahan, Markus Flury. Earthworms Exposed to Polyethylene and Biodegradable Microplastics in Soil: Microplastic Characterization and Microbial Community Analysis. ACS Agricultural Science & Technology 2023, 3 (4), 340-349
- [4] Song, J., Chen, X., Li, S., Tang, H., Dong, S., Wang, M., & Xu, H. (2024). The environmental impact of mask-derived microplastics on soil ecosystems. *Science of the Total Environment*, 912, 169182.
- [5] Suleiman, H., Rorat, A., Grobelak, A., Grosser, A., Milczarek, M., Płytycz, B., ... & Vandenbulcke, F. (2017). Determination of the performance of vermicomposting process applied to sewage sludge by monitoring of the compost quality and immune responses in three earthworm species: Eisenia fetida, Eisenia andrei and Dendrobaena veneta. *Bioresource Technology*, 241, 103-112.
- [6] Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C. & Galloway, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* **62**, 2588–2597.
- [7] Ivar do Sul, J. A. & Costa, M. F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environ. Pollut.* **185**, 352–364, doi:

- [8] Zubris, K. A. V. & Richards, B. K. Synthetic fibers as an indicator of land application of sludge. *Environ. Pollut.* 138, 201–211, doi:10.1016/j.envpol.2005.04.013 (2005).
- Barceló, D. (2024). Microplastics in the environment: analytical chemistry methods, sorption materials, risks and sustainable solutions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 416(15), 3479-3485
- [10] de Souza Machado, Anderson Abel, et al. "Impacts of microplastics on the soil biophysical environment." *Environmental science & technology* 52.17 (2018): 9656-9665.
- [11] Lear, G., Kingsbury, J. M., Franchini, S., Gambarini, V., Maday, S. D. M., Wallbank,
 J. A., ... & Pantos, O. (2021). Plastics and the microbiome: impacts and solutions. *Environmental Microbiome*, *16*, 1-19
- [12] Kallenbach, E. M., Rødland, E. S., Buenaventura, N. T., & Hurley, R. (2022). Microplastics in terrestrial and freshwater environments. Microplastic in the environment: Pattern and process, 87-130.
- [13] Liu, Y., Xu, G., & Yu, Y. (2022). Effects of polystyrene microplastics on accumulation of pyrene by earthworms. *Chemosphere*, 296, 134059.
- [14] Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S. & Swan, S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. T. R.Soc. B* 364, 2153–2166, doi:10.1098/rstb.2009.0053 (2009).
- [15] Wang, J.; Coffin, S.; Sun, C.; Schlenk, D.; Gan, J. Negligible Effects of Microplastics on Animal Fitness and HOC Bioaccumulation in Earthworm Eisenia Fetida in Soil. *Environ. Pollut.* 2019, 249, 776–784.
- [16] Huerta Lwanga, E. *et al.* Incorporation of microplastics from litter into burrows of Lumbricus terrestris. *Environ. Pollut.* 220, 523–531, doi:<u>10.1016/j.en-vpol.2016.09.096</u> (2017).
- [17] Trakić, T.; Popović, F.; Sekulić, J.; Hackenberger, D.K. Ecotoxicological Effects of Commercial Microplastics on Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Clitellata; Lumbricidae). *Agriculture* 2024, 14, 267.
- [18] Rodríguez-Seijo, Andrés, et al. "Oxidative stress, energy metabolism and molecular responses of earthworms (Eisenia fetida) exposed to low-density polyethylene microplastics." *Environmental Science and Pollution Research* 25 (2018): 33599-33610.
- [19] W.H. Habig, M.J. Pabst, G. Fleischner, Z. Gatmaitan, I.M. Arias, W.B. Jakoby, The Identity of Glutathione S-Transferase B with Ligandin, a Major Binding Protein of Liver, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 (10) 3879-3882, (1974).
- [20] Aebi Hugo, Catalase in vitro, Methods in Enzymology, Academic Press, Volume 105, 1984, Pages 121-126, ISSN 0076-6879, ISBN 9780121820053,
- [21]Bradford Marion, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, Volume 72, Issues 1–2, 1976, Pages 248-254,
- [22] Kostecka, J., Garczyńska, M., Pączka, G., & Mazur-Pączka, A. (2022). Chemical composition of earthworm (Eisenia fetida Sav.) biomass and selected determinants for its production. *Journal of Ecological Engineering*, 23(7).

- [23] Kowald, G.R.; Stürzenbaum, S.R.; Blindauer, C.A. Earthworm *Lumbricus rubellus* MT-2: Metal Binding and Protein Folding of a True Cadmium-MT. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 65.
- [24] Dominguez, J.; Gomez-Brandon, M. The influence of earthworms on nutrient dynamics during the process of vermicomposting. *Waste Manag. Res.* 2013, 31, 859–868.
- [25] Stürzenbaum, S.R.; Kille, P.; Morgan, A.J. The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Lett.* **1998**, 431, 437– 442
- [26] Khalid, N.; Aqeel, M.; Noman, A. Microplastics could be a threat to plants in terrestrial systems directly or indirectly. *Environ. Pollut.* 2020, 267, 115653
- [27] Huang, Y.; Liu, Q.; Jia, W.; Yan, C.; Wang, J. Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment. *Environ. Pollut.* 2020, 260, 114096
- [28] Jiang, X.; Chang, Y.; Zhang, T.; Qiao, Y.; Klobučar, G.; Li, M. Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (Eisenia fetida). *Environ. Pollut.* 2020, 259, 113896.
- [29] Yali Cheng, Lusheng Zhu, Wenhui Song, Chunying Jiang, Bing Li, Zhongkun Du, Jinhua Wang, Jun Wang, Dengtan Li, Kaihua Zhang, Combined effects of mulch film-derived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (Eisenia fetida), *Science* of *The Total Environment*, Volume 746, 2020, 141280, ISSN 0048-9697,
- [30] Cheng Y, Zhu L, Song W, Jiang C, Li B, Du Z, Wang J, Wang J, Li D, Zhang K. Combined effects of mulch film-derived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (Eisenia fetida). Sci Total Environ. 2020 Dec 1;746:141280. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141280. Epub 2020 Jul 28. PMID: 32745867.
- [31] Baloš, M.; Petrović, A.; Tubić, A.; Zeremski, T.; Gvozdenac, S.; Supić, D.; Bursić, V. Effects of Polyethylene Microplastics in Agricultural Soil on *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) Behavior, Biomass, and Mortality. *Agriculture* 2024, 14, 578.
- [32] Lackmann, C.; Velki, M.; Šimić, A.; Müller, A.; Braun, U.; Ečimović, S.; Hollert, H. Two types of microplastics (polystyrene-HBCD and car tire abrasion) affect oxidative stress-related biomarkers in earthworm *Eisenia andrei* in a timedependent manner. *Environ. Int.* 2022, 163, 107190.
- [33] Baeza, C., Cifuentes, C., Gonzalez, P., Araneda, A., and Barra, R. (2020). Experimental exposure of Lumbricus terrestristo microplastics. Water Air Soil Poll. 231
- [34] Huerta Lwanga, E. et al. Microplastics in the Terrestrial Ecosystem: Implications for Lumbricus terrestris (Oligochaeta, Lumbricidae). Environ. Sci. Technol. 50, 2685– 2691, doi:10.1021/acs.est.5b05478 (2016).

- [36] Klimasz, M.; Grobelak, A. Accumulation of Spherical Microplastics in Earthworms Tissues-Mapping Using Raman Microscopy. Appl. Sci. 2024, 14, 10117.
- [37] Wang Li, Bo Zu, Lei Li, Jian Li, Jiawen Li, Xueyu Mei. Desorption of bisphenol A from microplastics under simulated gastrointestinal conditions. Frontiers in Marine Science 2023, 10 https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1195964
- [38] Yang a b,Guanghui Xu a b,Yong Yu. Microplastics impact the accumulation of metals in earthworms by changing the gut bacterial communities. Science of The Total Environment Volume 831, 20 July 2022, 154848
- [39] Zaller, J.G.; Saxler, N. Selective vertical seed transport by earthworms: Implications for the diversity of grassland ecosystems. Eur. J. Soil Biol. 2007, 43, S86–S91
- [40] Cao, D.; Wang, X.; Luo, X.; Liu, G.; Zheng, H. Effects of Polystyrene Microplastics on the Fitness of Earthworms in an Agricultural Soil. IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci. 2017, 61, 012148.
- [41] Zhang, L.; Sintim, H.Y.; Bary, A.I.; Hayes, D.G.; Wadsworth, L.C.; Anunciado, M.B.; Flury, M. Interaction of Lumbricus Terrestris with Macroscopic Polyethylene and Biodegradable Plastic Mulch. Sci. Total Environ. 2018, 635, 1600–1608
- [42] Wang Li, Bo Zu, Lei Li, Jian Li, Jiawen Li, Xueyu Mei. Desorption of bisphenol A from microplastics under simulated gastrointestinal conditions. Frontiers in Marine Science 2023, 10 https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1195964
 - [43] Judy JD, Williams M, Gregg A, Oliver D, Kumar A, Kookana R, et al. Microplastics in municipal mixed-waste organic outputs induce minimal short to long-term toxicity in key terrestrial biota. Environ Pollut. 2019;252:522–31
 - [44] Kwak, Jin Il, and Youn-Joo An. "Microplastic digestion generates fragmented nanoplastics in soils and damages earthworm spermatogenesis and coelomocyte viability." *Journal of Hazardous Materials* 402 (2021): 124034.
- [45] Schell, T., Rico, A., & Vighi, M. (2020). Occurrence, fate and fluxes of plastics and microplastics in terrestrial and freshwater ecosystems. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 250, 1-43.
- [46] Taurozzi, D., Gallitelli, L., Cesarini, G., Romano, S., Orsini, M., & Scalici, M. (2024). Passive biomonitoring of airborne microplastics using lichens: A comparison between urban, natural and protected environments. Environment International, 187, 108707

D.6.

Marek Klimasz, Anna Grobelak, *"Accumulation of spherical microplastic in earthworm tissues- mapping using Raman microscopy."* Applied Science, 2024.14,10117





Article Accumulation of Spherical Microplastics in Earthworms Tissues-Mapping Using Raman Microscopy

Marek Klimasz 🗅 and Anna Grobelak *🗅

Faculty of Infrastructure and Environment, Częstochowa University of Technology, 42-201 Częstochowa, Poland; marek.klimasz@pcz.pl

* Correspondence: anna.grobelak@pcz.pl

Abstract: The presence of microplastics in the environment is now becoming a challenge for many scientific disciplines. Molecular diversity and spatial migration make it difficult to find plastic-free areas. Their negative, often toxic, effects affect plants and animals to varying degrees, causing many biochemical disorders, species degradation, and population changes. This study aimed to determine the possibility of accumulation of spherical low-density polyethylene particles of 38–63 μ m (38–45 μ m 1.00 g/cm³, and 53–63 μ m 1.00 g/cm³) with fluorescent properties in muscle tissues of the cosmopolitan earthworm species *Lumbricus terrestris*, exposed to plastic contained in the soil at a concentration of 0.1% dry weight for 3 months. Analysis of the tissues by Raman microscopy included the estimation of mapping area size, sampling density, accumulation time, spectra, laser line, and laser power to detect plastic in the samples effectively. Our results demonstrate the ability of low-density polyethylene microparticles to accumulate in earthworm tissues and are presented graphically for the mapping area and images with plastic detection sites marked. In addition, this article highlights the potential of using Raman microscopy for research in the field of tissue analysis.

Keywords: microplastics; microplastic accumulation; earthworms; raman microscopy



Citation: Klimasz, M.; Grobelak, A. Accumulation of Spherical Microplastics in Earthworms Tissues-Mapping Using Raman Microscopy. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 10117. https://doi.org/10.3390/ app142210117

Academic Editors: Iván Sciscenko and Ana María Amat

Received: 8 September 2024 Revised: 1 October 2024 Accepted: 4 October 2024 Published: 5 November 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https:// creativecommons.org/licenses/by/ 4.0/).

1. Introduction

Economic development and the constant demand for new materials have made plastics production one of the main branches of the manufacturing industry [1] Modifications and enrichment with stabilizers and dyes create many new types of plastics every day, more resistant to mechanical and biotic factors. According to various sources, a small part of used or damaged polymers is recycled (6–14%), and the rest goes to landfills or directly to ecosystems in the form of illegal dumps [2]. Despite their strength and resistance, plastics—as they are commonly called—gradually degrade, creating smaller and smaller particles [3]. According to the current nomenclature, these particles are called microplastics. There are many different types of microplastics, according to their chemical composition, origin, size, shape, and even color, but they all have a common denominator, which is the threat to the environment when left uncontrolled [4].

Numerous studies have documented the negative, often toxic, effects of microplastics on organisms. In the case of plants, germination, i.e., metabolic processes related to germination [5], adventitious root development, a decrease in biomass or the efficiency of the photosynthetic process [6], at the biochemical level, exposure to microplastics may be associated with increased levels of oxidative stress markers such as glutathione transferase (GST) and catalase (CAT), disruption of water-electrolyte and endocrine balance, which is associated with generative plant development [7]. There are reports of positive effects of plastic particles on plants, such as the longitudinal growth of roots or the stimulation of carotenoid synthesis [8], but these should be considered undesirable effects due to the presence of contamination. In the case of animals, the scale of research conducted appears extremely extensive, covering marine and terrestrial organisms of mammals, birds, fish, and invertebrates, with the smallest number of publications on reptiles. Relevant data are contained in an article by Porcino et al. [9], in which the authors emphasize the significant differences between studies of organisms in laboratory conditions and animals in the wild, with the implication that studies conducted using a single material under control conditions do not reflect both the variability of contaminants in the environment and the complexity of processes and mechanisms in an aquatic ecosystem, for example. Thus, some results may be overestimated relative to their actual values. Plastic particles can induce several changes once they enter the body, especially when they carry contaminants and toxins on their surface. In most species, the presence of microplastics can cause similar effects, such as decreased individual weight, gastrointestinal damage, accumulation in the liver or intestines, and effects on enzymatic activity and oxidative stress. In addition, many detailed and specific studies have been published on muscle dysplasia in birds, gill inflammation in fishes, impaired homeostasis in cephalopods, or basophilic cell volume in mollusks [10].

The greatest scientific challenge related to plastics is the possibility of their safe biodegradation, quick detection in various environments, and unification of analytical methodology. From the point of view of industrial development and the need for cheap materials, these challenges turn out to be extremely difficult to implement.

Currently, equipment is used that, based on the introduced database, can determine the plastic content in the sample with high accuracy, such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Raman Spectroscopy, Attenuated Total Reflection FTIR (ATR FTIR), Pyrolysis-gas Chromatography-Mass Spectrometry (Pyro-GC MS), Thermoextraction and Desorption Coupled With Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (TED-GC-MS). Additionally, there are many methods of collecting, separating, cleaning, and coloring materials, but all these methods are not validated, usually require a specialist in their use, and describe a small and therefore unreliable sample, and the marking itself requires advanced equipment and specialists, making these markings not often available for commercial use [11].

Microplastics are present not only in marine ecosystems but also in the land, forests, and agricultural areas, and although many studies focus on their impact in the places mentioned above, it should be remembered that the main source of microplastics is cities [12]. Building renovation works, urban dust, degradation of paint particles, tread rubber particles, and clothing fibers constitute most of the fractions described. Additionally, particles of plastics intentionally produced in small sizes, such as those for abrasive materials or cosmetics, have been detected. Plastics of various sizes and shapes generated in this way are carried by wind, rain, or artificially generated gusts over considerable distances, often reaching rural areas.

Detecting plastics in agricultural soils is complicated for many reasons, ranging from the diversity of the plastics themselves to the diversity of the soil and the variety of terrain and natural barriers to particles. Therefore, a precise estimation of the concentration in a specific site is difficult [13].

Earthworms belong to the subclass *Oligochaeta* and are widely distributed mainly in Central, Western, and partly Eastern Europe. Often called cosmopolitan organisms, they have adapted well to live in various ecosystems, including those that are subject to strong urbanization by humans. Species diversity allows us to identify typical soil-dwelling species that dig tunnels up to 3 m deep into the ground, species that prefer to feed above the soil surface, mainly in composts, and species that prefer a mixed environment. Importantly, earthworms are also common in large urban agglomerations despite theoretically unfavorable conditions such as vibrations and large surfaces covered with asphalt or paving stones [14].

There are many ways for microplastics to enter the soil, as well as many opportunities for further degradation. As Hou et al. [15] points out, one of the main sources is foil used for mulching, giving the example of China, where the areas covered with foil in 2015 amounted to 18 million hectares; the scale in Europe and the USA is similar, although China is still a leader in both the production and use of plastics [15]. Foil residues contribute to increased

water evaporation, reduced biomass, and the overall condition of plants [16]. Another source is groundwater purified from sewage treatment plants and rainwater runoff. Water is an excellent carrier of microplastic particles, and, as research shows, it significantly contributes to the pollution of agricultural and forest soils by rinsing plastic particles from facades, roads, sidewalks, and road signs [13]. Sewage treatment plants, despite being well adapted to the absorption of plastics reaching a level of 99%, also contribute to the spread mainly of clothing fibers and cosmetic items containing plastic particles. The scale of soil pollution is significantly influenced by uncontrolled waste dumps, which are often located close to green areas, forests, or water reservoirs [17]. In this case, susceptibility to UV radiation, changes in temperature and humidity, and wind-promoting friction between plastics cause the release of significant amounts of microplastics, the concentration of which can range from 0.01 to 0.7% in the surface soil. It can also be assumed that wind plays a role in the migration of plastics in most cases, mainly by spreading urban particles outside the city zone, as in the case of car tread rubber particles, which are easily carried over up to 8 km. On a global scale, it has been observed that wind currents from sub-Saharan Africa carrying heated air over Europe contribute to the intercontinental drift of particles, which results in plastic reaching ice caps and areas uninhabited by humans [18].

The accumulation is related to the permanent presence of plastics in the tissues of living organisms, documented based on microscopic analysis [19] or molecular staining [20]. So far, accumulation has been described in many species of saltwater fish, birds, and humans. In the case of fish, as many as 47.8% of the tested individuals showed the presence of plastics at a concentration of 4.11-2.85 pcs/individual, and the particle size ranged from 0.054 µm to 0.765 µm. The presence of plastics has many negative effects, such as a sense of false satiety, internal injuries to the intestines and digestive tract, physiological stress, reduced fertility and survival of offspring, growth inhibition, and the dominance of organisms better adapted to the plastic-laden environment. Scientists indicate that, in addition, particles are often vectors of toxins that lead to the inflammation and death of organisms [12]. The problem of accumulation seems to be extremely difficult to combat because the multitude of colors, shapes, and particles increases the chances of mistaken consumption of plastics as natural food. Additionally, microplastics float at different depths in the water, which also favors their accidental ingestion by fish or crustaceans.

The aim of this study was to determine the molecular accumulation of low-density spherical polyethylene in a selected species of earthworms (*Lumbricus terrestris*). Taking into account the individual anatomy, previous publications, and the nature of this research, the precise determination of the route of accumulation, the impact on biochemical processes, and the amount of the material turn out to be extremely important. Earthworms play a key role in the soil ecosystem, regardless of whether we are discussing cosmopolitan species adapted to urban soils or bioindicators of clean, rural soil [18]. Earthworms, often called soil engineers, contribute to the better circulation of organic matter, increase the absorption of mineral compounds by plants, produce soil aggregates, and increase carbon circulation in the soil.

There are many reports documenting the ingestion of microplastic particles by earthworms and their ability to forage and recognize contaminants selectively, but there are few publications describing the subsequent fate of the particles in the digestive tract. The purpose of this study was to determine the potential for permanent microplastic accumulation in *L. terrestris* muscle tissues exposed to 38–63 µm low-density polyethylene (38–45 µm 1.00 g/cm³ and 53–63 µm 1.00 g/cm³) contained in the soil at a concentration of 0.1% dry weight for an incubation period of 3 months. An additional goal was to use Raman microscopy as an innovative method for measuring plastics of very small sizes.

2. Materials and Methods

2.1. Research Materials Used

All earthworms were tested for species purity and reproduced under controlled conditions. Adult specimens were used for this study and placed in containers with soil

and horse manure in a 3/1 ratio. The manure was frozen for 48 h before mixing to avoid the presence of other individuals. Microplastics were used in the form of spherical particles with sizes of 38–45 μ m (GreenPEM 38–45 μ m 1.00 g/cc, Fluorescent Green Response: Peak emission of 515 nm when excited at 414 nm), (Figure 1A) and VioletPEM 53–63 μ m 1.00 g/cc, Fluorescent Violet Response: Peak emission 584 of nm when excited at 636 nm) (Figure 1B), originated from Cospheric LLC, Somis, CA, USA, with fluorescent properties which, on a dry weight basis, constituted 0.1% of the total mixture. The exposure took place in a controlled room with a temperature of 18 °C and lighting 12/12 h for 3 months. After this time, the individuals collected for testing were placed on an agar medium for 12 h and then into containers with clean soil that did not contain any plastic. After 21 days, the individuals were transferred back to the agar medium for 24 h, washed with distilled water, and frozen by thermal shock at -80 °C. Then, the individuals were deprived of their intestines and digestive tract. After thorough washing again, they were subjected to microscopic analysis using a fluorescence microscope and Raman microscopy.



Figure 1. (A,B) Emission and excitation peak of the polyethylene used.

2.2. Study of Microplastics in Earthworm Tissues

Raman spectroscopy was performed on WITec Alpha 300R and WITec Alpha 300RSA+ spectrometers. Both spectrometers are equipped with a confocal microscope and a TrueSurface attachment. In order to detect the analyzed microplastics in earthworm tissues, three excitation lines were tested: 532, 633, and 785 nm. Due to the strong fluorescence of microplastics during measurement using the 532 nm line, it was not possible to record Raman spectra. In the case of the 785 nm line, a spectrum was obtained for GreenPEM microplastics, while for VioletPEM, mainly fluorescence was observed, which was difficult to distinguish from the fluorescence of the own tissue. Therefore, the measurements were performed using a laser excited at a wavelength of 633 nm.

Using this laser line, it was possible to obtain a spectrum for GreenPEM microplastics. For the VioletPEM microplastics, strong fluorescence with a characteristic spectral profile was observed, allowing the spectra to be distinguished from the intrinsic fluorescence of the examined tissues with high efficiency. In the first stage, single spectra of microplastic samples were made with the following parameters: accumulation number of 10, single spectrum accumulation time of 0.5 s, objective lens with $20 \times$ magnification. In the case of GreenPEM microplastics, the radiation power was 12 mW, while for VioletPEM, it was set to 1 mW. Raman mapping involved the sequential collection of individual spectra from a specific surface. Each time, the spectrum was measured over the entire spectral range, i.e., $0-2800 \text{ cm}^{-1}$. Images were obtained using a $10 \times$ (NA 0.25) or $20 \times$ (NA 0.5) objective.

Measurements were carried out with the following settings:

(a) Mapping large tissue fragments: sampling density of 40–10 μ m, map size depending on the tissue size, spectrum accumulation time of 0.1 s, radiation power on the sample of 9–12 mW.

(b) Mapping of smaller tissue fragments: sampling density of 5 μ m, map size of 500 \times 500 μ m, spectrum accumulation time of 0.1 s, radiation power of 9–12 mW. The sampling density was experimentally adjusted to the size of the microplastics in the tissues. Raman images were prepared based on the True Component Analysis (TCA). This analysis makes it possible to identify different components in the sample based on Raman spectra and create an average spectrum for them. The result also includes images showing the distribution of the accumulation of components identified in the sample. The TCA image is constructed in such a way that intense yellow pixels indicate high spectral intensity for the identified component. TCA analysis made it possible to isolate classes containing spectra corresponding to the spectral profile of microplastic standards (control samples).

The GreenPEM spectrum has a set of characteristic bands at 687, 1215, 1296, 1446, and 1538 cm⁻¹ (Figure 2A). In turn, for the VioletPEM microplastics, very strong but characteristic fluorescence is observed, present even at low laser powers (1 mW) (Figure 2B). It is important that the fluorescence spectrum profile is different and more intense than the fluorescence of the tissue itself, making it possible to distinguish this microplastic from the tissue.



Figure 2. (A,B) Raman shift for the GreenPEM and VioletPEM microplastics used.

3. Results

The Raman microscopy analysis takes into account natural tissue fluorescence, which is not related to the presence of plastics. The characteristic discolorations are clearly visible under the UV matrix and in the Raman microscopy laser spectrum. Determining the band for individual spectra makes it possible to distinguish individual parts in terms of chemical composition and density.

3.1. Results of Microscopic Analysis of the Spectrum, Control Sample

A comparison of the visible image of the entire tissue with the measurement site marked is shown in Figure 3A, and the Raman image, created based on Raman mapping using the 785 nm excitation line and a $20 \times$ objective, is shown in Figure 3B. The measured area is $20,400 \times 4800 \mu$ m, with a sampling density of 40μ m. No areas containing spectra were identified in the tissue whose spectral profile could correspond to the spectra of microplastics.



Figure 3. (**A**,**B**) Image A excitation line 785 nm magnification $20\times$, image B area size $20,400 \times 4800 \ \mu\text{m}$, sampling density $40 \ \mu\text{m}$.

Figures 4B and 5A,B show the absence of bands characteristic of microplastic samples; only fluorescence coming from the tissue itself is visible. The area size is $23,000 \times 4200 \mu m$, the sampling density is 40 μm , the accumulation time is 0.2 s, the laser line is 532 nm, and the laser power is 10 mW.



Figure 4. (A,B). Area $23,000 \times 4200 \mu$ m, natural strong tissue fluorescence. The red color indicates the location of the exact scan.

Despite a higher sampling density (10 μ m) and, therefore, better spatial resolution, it was not possible to obtain a signal indicating the presence of microplastics (Figure 6A–E).



Figure 5. (A-C). Natural tissue fluorescence and spectral bands for individual classes.



Figure 6. (A–E). Measurement areas for control trials. The red color indicates the location of the exact scan.

3.2. Test Results of Research Trials

Detecting microplastics when measuring the entire tissue was difficult due to its thickness (several tens to several hundred micrometers) compared to the laser beam penetration depth of approximately several micrometers, which is why the signal was collected only from a selected focusing plane. Another limitation turned out to be the small size of the tested microplastics. The use of a sampling density of $40 \ \mu m$ (spatial resolution $80-120 \ \mu m$) enabled the detection of VioletPEM microplastic particles in tissues (sizes up to $63 \ \mu m$); however, it turned out to be insufficient to detect GreenPEM microplastics, which are characterized to be smaller (up to $45 \ \mu m$). Figure 7A shows the result of Raman mapping of the tissue in which VioletPEM was identified based on TCA (marked with a red circle) (Figure 7B).



Figure 7. (**A**,**B**) Preliminary mapping results with VioletPEM identification. The red color indicates the location of the exact scan.

A summary of the visible image with the measurement area marked is shown in Figure 8A, and the Raman image created based on Raman mapping using the 633 nm excitation line and a $10 \times$ objective for the tissue is shown in Figure 8B. The place where the spectrum corresponding to the spectral profile of the VioletPEM microplastic particle was identified is marked. The size of the measured area is $20,000 \times 4600 \mu$ m, with a sampling density of 40μ m.



Figure 8. (**A**,**B**) Size of the measured area of $20,000 \times 4600 \ \mu\text{m}$, sampling of density $40 \ \mu\text{m}$ (**A**) and more precise measurement of $9700 \times 3880 \ \mu\text{m}$, sampling density of $10 \ \mu\text{m}$ (**B**). The red color indicates the location of the exact scan.

Mapping carried out for this tissue, performed with a higher sampling density—10 μ m—enabled the detection of a VioletPEM particle at a given focal plane. The microplastic particle found is marked with a red arrow (Figure 8B). The measurement area size is 9700 × 3880 μ m, with a sampling density of 10 μ m.

In the next step, smaller areas of $500 \times 500 \,\mu\text{m}$ were measured for the tissue in selected places with a step of 5 μm (spatial resolution of approx. 15 μm). Visible images with the measurement area were marked, and the results of the TCA analysis were collected. Better resolution enabled the detection of both VioletPEM (Figure 9A–C) and GreenPEM (Figure 9D–F) microplastics. In turn, the areas shown in Figure 9G–I did not observe spectra corresponding to the spectral profiles of the tested microplastics.



Figure 9. (A–I) Summary of the results obtained, excitation line of 633 nm and an objective lens with a $10 \times$ magnification. The size of measured areas is $500 \times 500 \mu$ m, with a sampling density of 5 μ m. The red color indicates the location of the exact scan.

Similar results were obtained for another tissue; the analysis results are presented in Figure 10. VioletPEM microplastics were detected in the areas marked in Figure 10A,B,E, while GreenPEM microplastics were detected in the areas marked in Figure 10C,D. The places where no microplastics were detected are included in Figure 10F–H. All tissue areas for which Raman measurements were performed are presented.



Figure 10. (A–H) Summary of the results obtained for the tissue, visible image with the measurement area marked (on the left), and Raman images created using the 633 nm excitation line and a $10 \times$ objective (**B**). The size of measured areas is $500 \times 500 \mu$ m, with a sampling density of 5 μ m. The red color indicates the location of the exact scan.

The results of the microscopic observations and Raman analyses confirmed the presence of plastic particles in all tested individuals, which may suggest the ability of the particles to break through tissue barriers. Microparticles were found in transverse muscles, coelomic fluid channels, and sepia constrictions. It is also possible that coelomic cells moving freely in the coelomic sac contributed to intratissue transmission. Observations in various light spectra also demonstrated natural tissue fluorescence, which is not related to the presence of plastic. This study highlighted the potential of Raman spectroscopy for the detection of microplastics in earthworm tissues but indicated significant limitations and requirements as to how samples should be prepared. Accumulated microplastics, both VioletPEM and GreenPEM, were detected and identified in the measured earthworm tissues. Detection of both types of microplastics was only possible when Raman imaging was performed with good spatial resolution, i.e., a sampling density of 5 μ m. In the case of measurements with lower resolution, only VioletPEM particles, which had a larger diameter, were detected.

3.3. An Image of Microplastics Under UV Light

The image of tissues under UV light containing fluorescent plastic particles with a characteristic band is not a method that is sufficiently effective due to the previously mentioned strong intrinsic fluorescence of the tissue. An effective solution seems to be confirming the presence and type of material based on Raman analysis. If the chemical composition of the material is known and the bands visible during analysis are described, testing with a specific density gives highly effective results. Figure 11 shows microscopic photos of GreenPEM 38–45 μ m against the background of tissue structures with a similar range of colors seen. Figure 11A,B contain a plastic particle at different depths.



Figure 11. (A–D) Plastic particles and natural tissue color under UV light.

4. Discussion

The use of Raman microscopy to identify microparticles contained in tissues, despite many difficulties related to the appropriate setting of the laser power, turned out to be extremely effective. The mapped areas in various ranges of accumulation time and number of measurements were examined with a detection accuracy of up to 0.1 µm, which gives high quantitative reliability. Raman spectroscopy's potential in detecting microplastics within biological tissues was also studied by Liu et al. [19]. Liu et al. [19] demonstrated the technique's capability to identify various types of microplastics in complex environmental samples through visual pseudo-color imaging, underlining the importance of precise detection methods for assessing ecological risks. Their approach, which combines cloudpoint extraction with membrane filtration, highlights the advanced potential of Raman spectroscopy for accurately analyzing the category, quantity, location, and differentiation of microplastics [19]. Our detection of both VioletPEM and GreenPEM particles with high spatial resolution sampling corroborates the necessity for precise detection methods highlighted by Liu et al. [21]) for assessing ecological risks associated with microplastics. Moreover, the specificity of Raman spectroscopy in differentiating microplastic types within biological matrices, as demonstrated in our study, is pivotal for environmental monitoring. This specificity aids in understanding the distribution and fate of different microplastics, as outlined by Tian et al. [13], who explored the transformation and environmental risks of microplastics under UV irradiation. This specificity aids in understanding the distribution and fate of different microplastics, as outlined by Cheng et al. [22], who explored the transformation and environmental risks of microplastics under UV irradiation. The challenge of detecting smaller microplastics, such as GreenPEM, due to their size and the technique's spatial resolution limitations, underscores the need for advancements in sampling and analytical techniques. This challenge is consistent with the observations of Prata et al. (2019) [11], who critiqued current methodologies for their limited reliability in capturing the full spectrum of microplastic pollution. The observed ease of polyethylene absorption and accumulation in earthworm tissues at a concentration of 0.1% dry mass basis raises concerns about environmental and physiological impacts, resonating with Huerta Lwanga et al. [12], who documented microplastic incorporation into Lumbricus *terrestris* burrows. The presence in the soil and muscle accumulation may be related to disturbances in biochemical (enzymatic) processes, including the activity of glutathione s-transferase or lipid peroxidase, general oxidative stress, growth inhibition, or external and internal injuries resulting from contact with sharp edges of materials. It has been proven that particles are often catalysts for many pollutants and heavy metals, which affects their toxicity to living organisms. According to Kwak and An [23], polyethylene damages male reproductive organs, which may contribute to population disorders within a microplastic-contaminated habitat. Rodríguez-Seijo et al. [24] also describe immunological stress and the general weakening of individual immunity among Eisenia fetida; on the other hand, the authors of the article suggest that there is a chance to use the ability to accumulate microplastics in tissues for bioindication purposes. Our study's suggestion to leverage the accumulation capability of microplastics within earthworm tissues for bioindication

purposes finds a parallel in the work of Zaller and Saxler [18], who explored the role of earthworms in ecosystem functions and their potential as bioindicators.

5. Conclusions

The application of Raman microscopy for identifying microparticles in earthworm tissues, despite the challenges associated with properly adjusting the laser power, proved to be highly effective. This innovative study is the first to use this technique for the parameters being investigated. The method has shown great promise and can be integrated into research on the accumulation of microplastics in animals. In conclusion, while our findings affirm the potential of Raman spectroscopy in microplastic detection within earthworm tissues, they also highlight the complexities and challenges inherent in accurately assessing and mitigating the ecological impacts of microplastics. Our study's proposal to utilize the accumulation of microplastics in earthworm tissues for bioindication purposes underscores the potential of earthworms as important bioindicators in monitoring environmental contamination. Their role in ecosystem functions, combined with their ability to accumulate pollutants, makes them valuable for assessing the presence and impact of microplastics in terrestrial environments. This approach could enhance our understanding of how microplastics affect biodiversity and ecosystem health, offering a novel method for tracking pollution in natural systems. Future research should focus on refining detection methodologies and exploring the ecological roles of bioindicator species in monitoring environmental health.

Author Contributions: Conceptualization, A.G.; Validation, A.G.; Investigation, M.K.; Resources, M.K.; Data curation, M.K.; Writing—original draft, M.K.; Writing—review & editing, A.G.; Visualization, M.K.; Supervision, A.G.; Project administration, A.G.; Funding acquisition, A.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The scientific research was funded by the statute subvention of the Czestochowa University of Technology (Faculty of Infrastructure and Environment). The authors would like to thank Barbara Płytycz for providing pure species worm material.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T.S. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar. Pollut. Bull.* 2011, *62*, 2588–2597. [CrossRef] [PubMed]
- 2. Bläsing, M.; Amelung, W. Plastics in soil: Analytical methods and possible sources. *Sci. Total Environ.* **2018**, *612*, 422–435. [CrossRef]
- 3. Belioka, M.-P.; Achilias, D.S. Microplastic Pollution and Monitoring in Seawater and Harbor Environments: A Meta-Analysis and Review. *Sustainability* **2023**, *15*, 9079. [CrossRef]
- Xing, Y.; Meng, X.; Wang, L.; Zhang, J.; Wu, Z.; Gong, X.; Wang, C.; Sun, H. Effects of benzotriazole on copper accumulation and toxicity in earthworm (*Eisenia fetida*). J. Hazard. Mater. 2018, 351, 330–336. [CrossRef]
- Kumari, A.; Rajput, V.D.; Mandzhieva, S.S.; Rajput, S.; Minkina, T.; Kaur, R.; Sushkova, S.; Kumari, P.; Ranjan, A.; Kalinitchenko, V.P.; et al. Microplastic Pollution: An Emerging Threat to Terrestrial Plants and Insights into Its Remediation Strategies. *Plants* 2022, 11, 340. [CrossRef] [PubMed]
- de Souza Machado, A.A.; Lau, C.W.; Kloas, W.; Bergmann, J.; Bachelier, J.B.; Faltin, E.; Becker, R.; Görlich, A.S.; Rillig, M.C. Microplastics Can Change Soil Properties and Affect Plant Performance. *Environ. Sci. Technol.* 2019, *53*, 6044–6052. [CrossRef]
- Giorgetti, L.; Spanò, C.; Muccifora, S.; Bottega, S.; Barbieri, F.; Bellani, L.; Castiglione, M.R. Exploring the interaction between polystyrene nanoplastics and Allium cepa during germination: Internalization in root cells, induction of toxicity and oxidative stress. *Plant Physiol. Biochem.* 2020, 149, 170–177. [CrossRef]
- 8. Li, S.; Wang, T.; Guo, J.; Dong, Y.; Wang, Z.; Gong, L.; Li, X. Polystyrene microplastics disturb the redox homeostasis, carbohydrate metabolism and phytohormone regulatory network in barley. *J. Hazard. Mater* **2021**, *415*, 125614. [CrossRef]

- 9. Porcino, N.; Bottari, T.; Mancuso, M. Is Wild Marine Biota Affected by Microplastics? Animals 2023, 13, 147. [CrossRef]
- 10. Sarkar, S.; Diab, H.; Thompson, J. Microplastic Pollution: Chemical Characterization and Impact on Wildlife. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2023**, *20*, 1745. [CrossRef]
- 11. Prata, J.C.; da Costa, J.P.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T. Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: A critical review. *TrAC–Trends Anal. Chem.* **2019**, *110*, 150–159. [CrossRef]
- 12. Huerta Lwanga, E.; Gertsen, H.; Gooren, H.; Peters, P.; Salánki, T.; van der Ploeg, M.; Besseling, E.; Koelmans, A.A.; Geissen, V. Incorporation of microplastics from litter into burrows of *Lumbricus terrestris*. *Environ. Pollut.* **2017**, *220*, 523–531. [CrossRef]
- 13. Tian, L.; Jinjin, C.; Ji, R.; Ma, Y.; Yu, X. Microplastics in agricultural soils: Sources, effects, and their fate. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* **2022**, *25*, 100311. [CrossRef]
- 14. Baeza, C.; Cifuentes, C.; González, P.; Araneda, A.; Barra, R. Experimental Exposure of *Lumbricus terrestris* to Microplastics. *Water Air Soil Pollut.* **2020**, 231, 308. [CrossRef]
- 15. Hou, Y.; Zhao, Q.; Guo, Y.; Ren, X.; Lai, T.; Chen, S. Application of Gas Foil Bearings in China. Appl. Sci. 2021, 11, 6210. [CrossRef]
- Zhang, Y.; Cai, C.; Gu, Y.; Shi, Y.; Gao, X. Microplastics in plant-soil ecosystems: A meta-analysis. *Environ. Pollut.* 2022, 308, 119718. [CrossRef]
- 17. Cheng, F.; Zhang, T.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Qu, J. Non-negligible effects of uv irradiation on transformation and environmental risks of microplastics in the water environment. *J. Xenobiot.* **2022**, *12*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
- 18. Zaller, J.G.; Saxler, N. Selective vertical seed transport by earthworms: Implications for the diversity of grassland ecosystems. *Eur. J. Soil Biol.* **2007**, *43*, S86–S91. [CrossRef]
- 19. Liu, K.; Pang, X.; Chen, H.; Jiang, L. Visual detection of microplastics using Raman spectroscopic imaging. *Analyst* **2024**, *149*, 161–168. [CrossRef]
- 20. Khosrovyan, A.; Gabrielyan, B.; Kahru, A. Ingestion and effects of virgin polyamide microplastics on Chironomus riparius adult larvae and adult zebrafish *Danio rerio*. *Chemosphere* **2020**, 259, 127456. [CrossRef]
- Liu, Y.; Xu, G.; Yu, Y. Effects of polystyrene microplastics on accumulation of pyrene by earthworms. *Chemosphere* 2022, 296, 134059. [CrossRef] [PubMed]
- 22. Cheng, W.; Li, X.; Zhou, Y.; Yu, H.; Xie, Y.; Guo, H.; Wang, H.; Li, Y.; Feng, Y.; Wang, Y. Polystyrene microplastics induce hepatotoxicity and disrupt lipid metabolism in the liver organoids. *Sci. Total Environ.* **2022**, *806*, 150328. [CrossRef] [PubMed]
- 23. Kwak, J.I.; An, Y.J. Microplastic digestion generates fragmented nanoplastics in soils and damages earthworm spermatogenesis and coelomocyte viability. *J. Hazard. Mater.* 2021, 402, 124034. [CrossRef] [PubMed]
- Rodríguez-Seijo, A.; da Costa, J.P.; Rocha-Santos, T.; Duarte, A.C.; Pereira, R. Oxidative stress, energy metabolism and molecular responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018, 25, 33599–33610. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

D.7.

Marek Klimasz, Andrzej Kacprzak Anna Grobelak, *"Evaluation of the quantitative concentration of microplastic in Dendrobaena veneta and Lumbricus terrestris tissues from laboratory and environmental culture*" Applied Science, 12. applsci-3460617, 2025



Article

An Evaluation of the Quantitative Concentration of Microplastic in *Dendrobaena veneta* and *Lumbricus terrestris* Tissues from Laboratory and Environmental Cultures

Marek Klimasz * D, Andrzej Kacprzak and Anna Grobelak D

Academic Editors: Marco Carnevale

check for

updates

Received: 19 January 2025 Revised: 9 February 2025 Accepted: 13 February 2025 Published: 14 February 2025

Citation: Klimasz, M.; Kacprzak, A.; Grobelak, A. An Evaluation of the Quantitative Concentration of Microplastic in *Dendrobaena veneta* and *Lumbricus terrestris* Tissues from Laboratory and Environmental Cultures. *Appl. Sci.* 2025, *15*, 2027. https://doi.org/10.3390/ app15042027

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/ licenses/by/4.0/).

Faculty of Infrastructure and Environment, Cze_stochowa University of Technology, 42-201 Czestochowa, Poland; andrzej.kacprzak@pcz.pl (A.G.) * Correspondence: marek.klimasz@pcz.pl

Abstract: Earthworms play a key role in maintaining a healthy soil ecosystem by providing organic matter cycling and influencing the

Appl. Sci. 2025, 15, 2027

soil's structure and physicochemical properties. In addition, they have also become the subject of research in the context of soil contamination by plastic particles or microplastics. In this article, two species of earthworms, *Dendrobaena veneta* and *Lumbricus terrestris*, were subjected to the influence of a mixed fraction of microplastics at different concentrations and studied to determine the possible correlation in tissue accumulation and to illustrate the possible structural changes in plastics under the influence of earthworm digestive enzymes. Using FTIR spectrometry and plastic fluorescence, the polymer content of the earthworm tissues was determined, and significant differences in the accumulation of plastic particles in the cultured earthworm tissues at the micro-and macroscales were documented.

Keywords: microplastic; earthworms; microplastic accumulation; microplastic detection

1. Introduction

Extensive research describes the effects of earthworms on soil properties, but increasingly, these animals are classified as being part of a much more complex environmental relationship, stimulating soil's fertility and microbial biomass, which consequently affects the productivity of the ecosystem. Some of the most common activities of earthworms include changes in soil porosity, infiltration, compaction, hydraulic conductivity, water cycling, and oxygen availability [1]; increasing the availability of organic compounds for plants [2]; influencing the bacterial and fungal flora of the soil [3]; and participating in vermicomposting [4]. However, this does not mean that all the described species have the same impact on the environment, as there are described cases of negative effects on the soil, such as through soil erosion and reductions in nematode abundance and nutrient translocation and availability [5]. The classification of earthworms distinguishes more than 670 species of the family Lumbricidae and about 5000 species of the family Moniligastrida [6]. In addition, the ecological division into epigeic, endogeic, and anecic earthworms is described. Epigeic species are often found in mulches and composts, living above the soil surface in close proximity to areas with high mineral contents. They consume little or no soil and are usually small and darkly colored. Endogeic species are found in shallow soil layers, in the rhizosphere of plants, where they tunnel horizontally. They feed on soil that is more or less rich in mineral nutrients, reach a medium size, and are usually paler than epigenic ones. The largest representatives of the groups described in the ecological category are anecic, including L. terrestris. These earthworms are saprophages that dig vertical burrows up to a

https://doi.org/10.3390/app15042027

depth of 3 m. In addition, they show a strong attachment to their corridors, often returning to their cavities after leaving a trail of slime. These earthworms pull leaves and nutrients underground, thus significantly increasing the soil's fertility and microbial abundance [7].

The presence of microplastics in soil is well documented, and despite the lack of a uniform analytical methodology, the effects on plants and animals are considered negative and often toxic. Studies conducted on earthworms have proven a decrease in their weight and fertility or an increase in stress markers, but increasingly, the discussion is directly about the fate of microplastic particles and the possibility of their degradation. To date, no study has confirmed the enzymatic decomposition of plastic into its elemental form [8], and those describing chemical degradation or structural change are subject to uncertainty regarding the apparatus used. Given the selective feeding of earthworms and their ability to discern (and avoid) certain foods, the determination of plastic content can only be achieved by tissue analysis. Microplastics that remain in the soil and are exposed to chemicals such as pesticides or herbicides, as well as water, wind, and friction, can change their properties without earthworm interference, which is erroneously described as earthworm aggregate. Many authors describe a controversy surrounding microplastic degradation in scientific articles, noting that the definition suggests any change in physical or chemical properties due to environmental (light, wind, water) and biological factors [9-11]. These authors also point out that for some polymers, their effect on earthworms is stimulatory and may not cause adverse side effects, and that the decrease in polymer mass may have been related to tissue accumulation [11]. A 2018 [12] study described fragmentation of plastic particles by L. terrestris, but as the author points out, there was no degradation, only a change in the size of low-density polyethylene particles. Lwagna further describes the role of microorganisms as one of the key steps in polyethylene fragmentation. An important factor is the species' sensitivity to the presence of microplastic in the soil; under laboratory conditions, the post-exposure mortality can be easily determined, thereby excluding species that are unsuitable for testing [13]. Earthworm adaptations and their natural resistance have been described in detail by Lwanga [14], Alauzet [15], Wang [16], Chen [17], and Lithner [18]. In addition, Ding describes an individual mortality of 6–28% when feeding on polystyrene and polyethylene at higher concentrations reaching 2% [19]. The digestive system of earthworms is relatively simple and consists of the pharynx, esophagus, stomach, foregut, and hindgut. Digestive enzymes mix with the ingested soil and lead to the acquisition of nutrients, which is further aided by the intestinal membranes [20].

According to this study, earthworms freely swallow particles of the smallest size, effectively avoiding areas with increased plastic contents. Similarly, larger particles around 1 mm were absent from all tested intestinal contents, whereas particles from 1 to 44 μ m were most commonly detected. These data are in accordance with numeral findings in the available literature, describing selective food intake by earthworms [21,22].

2. Purpose of the Study

In this study, the authors investigated the extent of plastic accumulation for the two best adapted species, *D. veneta* and *L. terrestris*, under outdoor environmental conditions (macroscale) and compared them to the results obtained under laboratory culture conditions (microscale). Exposing specimens to a mixed fraction of plastic polyethylene (PE) fluorescent green microspheres with sizes of 1–5 μ m, 10–20 μ m, 32–38 μ m, 38–45 μ m, and 53–63 μ m and purple polyethylene microspheres with sizes of 38–45 μ m and 75–90 μ m. Polyethylene terephthalate (PET) in the form of irregular granule sizes of 10–5000 μ m, polyamide (PA) in the form of fibers with sizes of 10–2000 μ m, and polystyrene (PS) in the form of irregular film shreds with sizes of 10–5000 μ m were also used. The plastics were supplied by Cospheric LLC Somis, CA 93066, USA.

3. Materials and Methods

3.1. Environmental Culture (Macro)

Juveniles of *L. terrestris* and *D. veneta* from in-house conservation breeding were transferred into 360 L containers, 665 mm × 880 mm × 1100 mm in size, made using high-density polyethylene (PE-HD) injection technology at a rate of 50 per container. The containers had a drainage system and ventilation holes in the underside. The feed was horse manure mixed with the topsoil at a ratio

of 1/3 of the soil volume and was frozen for 48 h to avoid the presence of non-desirable individuals. Both the soil and manure were unevenly mixed with microplastic fractions. We used 0.2%, 0.4%, 0.6, 0.8%, and 1% fractions of the plastic mixture to the dry weight of the soil and manure, and the exposure time was 3 months. The containers were outdoors in a shady place during spring, with a daily temperature range of 5–25 °C.

After this period, 20 adult specimens from each sample were thoroughly cleaned with soil with running water and left for 2 min in distilled water to remove all soil particles from the body sepia. Individuals that were prepared in this way were transferred to dishes with a small amount of sterile agar for 24 h so that the earthworms would excrete the soil that had accumulated in their intestines and digestive system. The earthworms were then washed again with distilled water, placed in glass dishes, and treated with heat shock at -80 °C. In the next step, the earthworms were carefully stripped of all intestines, and the tissue was washed and left to dry at room temperature.

3.2. Laboratory Culture

In the laboratory culture, exactly the same culture conditions were used; however, the culture was carried out in 3 L containers, and the microplastic was evenly mixed with the entire volume of soil and manure.

3.3. Optical Analysis

The illustrations shown below were taken using an Olimpus BX 51 microscope, an Olimpus a300 objective (U-CMAD3), and an Olipmus U-TV1X converter (3701 Welsh Rd, Unit C, Willow Grove, Pennsylvania 19090, 1-866-570-3046) on Light (1) and UV (4) settings and then subjected to noise autocorrection without interfering with the color intensity and exposure. The method allows for the preliminary identification of these plastics in earthworm tissue, the determination of the exact location, and the use of the tissue for further FTIR analysis. In addition, it allows for a preliminary estimate of the amount of microplastics in the tissue. The obtained illustrations depict polyamide (Figure 1) and polyethylene terephthalate (Figure 2) and were taken as standards, with large fragments of the polymer and a clear fluorescence color (Figure 3).



Figure 1. (A–D) Images of PA fiber under visible and UV light (4).



Figure 2. (A,B) Images of PET molecule and (C,D) images of PS molecule under UV (4) light.



Figure 3. Images (A–D) of the PA molecule under UV (3) light.

3.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR Analysis)

To prepare the samples for FTIR analysis, a freeze-dryer with a vacuum pump, MRC AB Chem SM-450, was used, in which the earthworm tissues were placed in a tray and subjected to a drying process according to the manufacturer's instructions for a period of 24 h. After this time, the tissues were placed in a mortar, crushed gently to a fine, uniform dust, and transferred to glass cuvettes.

The FTIR apparatus used in this study was a Jasco FTIR Model 6200, operating in the nearinfrared (15,000 cm⁻¹) and far-infrared (50 cm⁻¹) regions. The resolution of the apparatus is 0.25 cm⁻¹. Each complete, powdered tissue from one individual was divided into four smaller sections, each of which was subjected to FTIR analysis in 5 measurements; the results were summed, giving a total qualitative image for one individual. In this way, all tissues from both species were examined, identifying the plastics that were present. The characteristic peak values and polymer patterns are shown in Table 1.

Chemical Compound	Structural Pattern	Absorption Band					
polypropylene		842 cm ⁻¹	998 cm ⁻¹	1167 cm ⁻¹	1377 cm ⁻¹	1460 cm ⁻¹	
polyethylene		720 cm ⁻¹	1460 cm ⁻¹	2850 cm ⁻¹	2920 cm ⁻¹		
polyester		845 cm ⁻¹	970 cm ⁻¹	1126 cm ⁻¹	1340 cm ⁻¹	1718 cm ⁻¹	
poliyamid		745 cm ⁻¹	1077 cm ⁻¹	1125 cm ⁻¹	1285 cm ⁻¹	1726 cm ⁻¹	
polyethylene terephthalate		1050 cm ⁻¹	1237 cm ⁻¹	1370 cm ⁻¹	1744 cm ⁻¹	3400 cm ⁻¹	

Table 1. Characteristic peak values of polymeric materials for FTIR analysis.

3.5. Hydrogen Peroxide Digestion

The digestion of organic matter is a key step in the preparation of samples for the identification of plastic molecules, regardless of the original matrix, which may be soil, sediment, or tissue. The literature describes many protocols, taking into account both the type of reagent, digestion time, reaction temperature, and possible complications. Increasingly, one also encounters a division of reagents with respect to the hardness of the dissolved fraction into soft (delicate plant and animal tissues, among others) and hard (like muck, bone, and compacted soil) fractions [23]. In addition, the direct and indirect effects of the reagent on the contained microplastic (changes in its color, structure, and degradation) and the availability and harmfulness of reagents are important. The density and quantitative separation have been described in detail by Cole [24], Roch [25], Dehaut [26], Munno [27], and Lusher [28]. Among the most commonly

used reagents, characterized by optimal efficiency and performance characteristics, are nitric acid, hydrochloric acid, potassium hydroxide, hydrogen peroxide, sodium hypochlorite, and sodium hydroxide. Recombinations of the temperature concentration and efficiency variants were described by Foekema [29], Karami [30], and Herrera [31].

In our study, a 30% H_2O_2 solution was used for tissues that were already highly fragmented and homogeneous and did not form aggregates, so it was possible to use it in smaller amounts and for a shorter period of 36 h. For digestion, glass cuvettes were used, in which the tissue material and H_2O_2 were placed. After this time, the hydrogen peroxide was removed from the vessel, and the remaining fraction was prepared for staining.

3.6. Microplastic Staining

Microplastic identification using dyes has become a popular method to quickly and efficiently identify plastic particles by providing specific complexes with which to differentiate them from organic and mineral matter. Individual dyes differ in their affinity for the plastic, fluorescence intensity, incubation time, and the type of polymers that they react with, and the most commonly described include oil red (Sudan-nitrogen dye), eosin (acid dye), Bengal pink, hostasol yellow, Nile Red (lipid dye) [32], alkali blue (bromothymol dye), crystal violet (aniline dye), neutral red (neutral red), and trifan blue [33]. The current literature indicates that the most widely used and effective dye is Nile Red, which provides high fluorescence in plastics, with a wide range of microplastics; therefore, it has found applications in translocation of microplastics in soil and living organisms (no toxicity to living cells, including human), in field monitoring of microplastics, and in many laboratory techniques [34]. According to the current knowledge, there is still no uniform methodology for dealing with all the stages of staining, and as the authors point out, this gap needs to be filled, especially with environmental studies [35].

Nile Red is a very stable photochemical dye, classified as a hydrophobic, heterocyclic, and metachromatic compound, and is almost insoluble in water [36]. Both its emission and quantum properties depend on the type of solvent used, and an increase in polarity most often leads to a red shift in fluorescence. The wide solvatochromic range and the effect of the environment on the color was described in detail by Martinez and Henary [37].

This study used acetone as a solvent at a concentration of 1 mg/mL, a volume ratio of 0.1–0.5 mL of dye solution per 100 mL of water sample, and an exposure time of 30 min.

3.7. Determination of Molecular Size

The plastics that were added to the soil were characterized by varying sizes and spatial shapes, making it important to determine the minimum and maximum particle sizes. For PE and PET, the authors relied on descriptions from the manufacturer (Cospheric LLS, Somis, CA, USA), while for the others, they used an Olimpus BX 51 microscope and Olimpus a300 objective (U-CMAD3) with CellB software with a scale function and variable microscope ruler, as well as a WITec ALPHA 300R and 300RSA spectrometers with a confocal microscope and True Surface attachment, and the image was taken at the 633 nm excitation line and 20× magnification (Figure 4).



Figure 4. One method of measuring molecular size using Raman microscopy and confocal microscopy.

4. Results

4.1. Results of Microscopic Examination Analysis

The images below show tissue arranged on a basic slide and analyzed microscopically under UV (4) and green (3) light for the initial identification of microplastics and the estimation of their amount and position for further analysis (Figure 5). Scanning in the high resolution of the eyepiece makes it possible to identify fractions; however, the resolution of the objective lens does not allow for photography at this scale. In the figures below, PE (A, B), PS (O, P), PA (I, J), and PET (K, L) are confirmed.



Figure 5. Microplastics in optical microscope images using UV light and deep green to image microplastics in different color ranges. (**A**–**R**) are areas of the same fragment in different color ranges. The arrow indicates the location of the visible microplastic particle.

We also analyzed the results of the quantitative laboratory culture tests. Tables 2–5 show the minimum and maximum number of particles that were detected in the tissues of one individual, averaged from 10 individual measurements. Tables 2 and 3 show the results of the analysis of earthworm tissues that were cultured at the microscale. Tables 4 and 5 show the results of the analysis of the analysis of earthworm tissues that were cultured at the macroscale. Table 2. Plastic particles under visible, UV, deep green, and red light.

D. veneta	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	1%
PA	0-4 (~1.9)	1–5 (2.5)	1–6 (3.3)	2–8 (4)	3–9 (4.7)
PET	0–3 (1.6)	1–4 (2.3)	1–5 (3)	1–7 (3.4)	2–7 (3.8)
PS	0–2 (0.4)	0–1 (0.5)	0–2 (0.4)	1–3 (0.7)	1-4 (1)
PE	1–5 (2.3)	1–6 (2.8)	2–6 (3.5)	3–9 (4.2)	2–11 (6)

L. terrestris	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	1%
PA	2–4 (3.3)	2–6 (3.8)	3–8 (4.4)	4–9 (5.9)	4–11 (7.3)
PET	1–3 (2.2)	1–4 (2.7)	2–4 (3)	2–7 (4.1)	3–9 (5.2)
PS	1–3 (2)	1–5 (2.6)	1–5 (2.7)	1–6 (2.7)	3–8 (3.7)
PE	1–5 (2.8)	1–6 (3.3)	2–16 (4.3)	3–7 (3.8)	1–8 (4.7)

	Table 4. Plastic part	icles under visibl	e, UV, deep gree	n, and red light.
--	------------------------------	--------------------	------------------	-------------------

D. veneta	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	1%
PA	1–3 (1.4)	2–5 (3.1)	2–6 (3.7)	0–6 (3.1)	1–4 (2.2)
PET	0–3 (2.1)	0–5 (2.4)	2–7 (3.5)	1–7 (3.4)	1–5 (3.4)
PS	0–4 (2)	1–4 (2.2)	0–4 (1.9)	0–3 (1.8)	0-4 (2.1)
PE	1–5 (2.9)	2–6 (3.5)	3–9 (4.7)	2–8 (4.5)	1–6 (3.9)

 Table 5. Plastic part
 icles under visible
 e, UV, deep gree n, and red light.

L. terrestris	0.2%	0.4%	0.6%	0.8%	1%
PA	2–6 (4)	3–8 (4.7)	3–10 (6)	2–5 (4.2)	1–5 (3.8)
PET	1–3 (3.1)	1–6 (3.9)	2–4 (3.1)	1–5 (2.4)	0–4 (1.9)
PS	0–3 (1.8)	0–3 (2)	1–5 (2.2)	0–3 (1.5)	0–3 (1.1)
PE	2–7 (3.6)	3–8 (4.1)	2–12 (6.2)	4–9 (5.9)	3–8 (5.6)

Regarding the environmental test results and quantitative laboratory culture results, Tables 2–5 show the minimum and maximum amount of particles that were detected in the tissues of one individual (the average for 10 individuals is specified in parentheses

The differences in accumulation between micro- and macro-cultured individuals are clear, as the graphs below illustrate how macro-cultured individuals regress to soil microplastic concentrations above 0.6%, resulting in reduced tissue accumulation. The least pronounced changes occur for the smallest particle sizes. Figures 6–9 present graphs showing how the accumulation of particles changes depending on the concentration of microplastic in the soil.



Figure 6. Summary of the number of detected particles depending on their concentration in the soil—microculture.



Figure 7. Summary of the number of detected particles depending on their concentration in the soil—microculture.

Microplastic particles were detected in longitudinal and transverse muscles, along the metanephridia and nephrostome and in segmental ganglia. The most common type of plastic in optical microscopy were microgranules (PE) (Figures 1B and 3C) and fibers (PA) with sizes of 1–43 um (other images). The green light spectrum allowed for deeper penetration and better imaging of fractions that were inaccessible to ultraviolet and visible light. Further analysis made it possible to accurately determine the type of plastic that was accumulated in the muscles. The selective and total particle counts are shown in Tables 2 and 4 (*Dendrobaena veneta*) and Tables 3 and 5. (*Lumbricus terrestris*) for the average individual from 10 samples.



Figure 8. Summary of the number of detected particles depending on their concentration in the soil—macroculture.



Figure 9. Summary of the number of detected particles depending on their concentration in the soil—macroculture.

4.2. Particle Size Analysis

To the authors' knowledge, this is the first study of its kind in which the authors determined the sizes of particles that were accumulated in the bodies of living organisms, relative to any that were intentionally added to the soil (Figure 10). The data shown in the diagram (diagram x) represent the minimum and maximum size of each plastic and the size range of the particles that were isolated from the tissues. This study proved what particle sizes accumulate in tissues and what the reasons for this may be.



Figure 10. Relationship between the particles added to the soil and the particles detected in the tissues for *D. veneta* and *L. terrestris*.

This study proved that on a macroscale, earthworms that are exposed to different concentrations of particles of different polyamides have the ability to accumulate tissue in that particular range. In the case of polyamide, the molecular size in the soil was in the range of 30 μ m to 1000 μ m (in the graph, for simplicity, the maximum value is 100 μ m) but in the tissues, particles were only detected in the range of 33.5 μ m to 60.5 μ m. In the case of PET, heterogeneous particles of 10 μ m to 1000 μ m were found in the soil, but in the tissues, only sizes in the range of 19–71 μ m were detected. In the case of polystyrene, the polymer size in the soil was 30 μ m to 1000 μ m and detected in the range of 37.5 μ m to 64.5 μ m, and in the case of polyethylene, particles from 1 μ m to 90 μ m were added to the soil and detected in tissues from 5 μ m to 54 μ m, with the detection of particles below 10 μ m only being possible due to the strong fluorescence of the particles.

4.3. FTIR Analysis Results

Spectral peaks for individual plastics were compared based on a database (https: //spectra.chem.ut.ee/paint/binders/polyethylene-wax, accessed on 15 December 2024) and available pilot publications for plastics [38–42] and are presented in Table 1.

The graphs (Figures 11–14) depict selected analyses of the plastics that were contained in the tissues, with characteristic peaks marked to identify the plastic. The red line indicates the peaks whose values were assigned to a particular polymer. In addition, the graphs show other peaks with different values, resulting from the analysis of the powdered tissue and the compounds that were contained in it.

Pectrum Obtained from Tissue Analysis, Showing Strong Tissue Background and Peaks Characteristic of Polyethylene.



Figure 11. Characteristic peaks for polyethylene-2914, 2847, 1466, and 716.



Spectrum Obtained from Tissue Analysis, Showing Strong Tissue Background and Peaks Characteristic of Polyamide.

Figure 12. Characteristic peaks for polyamide- 3280, 2936, 1646, 1536, 1393, 1078, and 1022.

Spectrum Obtained from Tissue Analysis, Showing Strong Tissue Background and Peaks Characteristic of Polyethylene Terephthalate.



Figure 13. Characteristic peaks for pet 1713,1409, 1241, 1094, 1016, and 872.

Spectrum Obtained from Tissue Analysis, Showing Strong Tissue Background and Peaks Characteristic of Polyethylene Terephthalate.



Figure 14. Characteristic peaks for polystyrene 3060, 3026, 2913, 2844,1601, 1492, 1450, 1027, 751, and 694.

4.4. Coefficient of Determination

The coefficient of determination, R^2 , was used as a measure of the fit of the mathematical model with the data obtained from Tables 1-5 for both species and in both breeding variants.

This coefficient indicates what proportion of the variance in the data coincides with the correlation of the variables that are described in the model. Thus, we can say that it is a determinant of the fit of the sample to the model, described in the range of values between 0 and 1, with values close to unity corresponding to a higher model fit.

where

(SS_{res}) is the sum of the squares of the residuals, that is, the sum of the squares of the differences between the actual values and the values predicted by the model:

$$SSres = \sum_{i=1}^{n} (y_i - y^i)^2$$

 (SS_{tot}) is the total sum of squares, that is, the sum of the squares of the differences between the actual values and the average value of the actual data:

$$SStot = \sum_{i=1}^{n} (y_i - y_i)^2$$

The value of R² ranges from 0 to 1, where a value closer to 1 indicates a better fit of the model to the data.

Using all the data, which are the variables of concentrations and types of plastics, we initially performed a determination analysis for the linear function and quadratic function, but with such a number of variables, the function was not sufficient, and the determination index at each analysis indicated 1. For a better and more accurate depiction of the statistical fit of the model, a third-degree power polynomial and fourth-degree polynomial analysis were performed and are presented in the tables (Tables 6–9) and figures below (Figures 15–18). To increase the clarity of the results, the authors used the abbreviation of the third-degree polynomial as $(R^2)^3$ and the fourth-degree polynomial as $(R^2)^4$.

Figure 15 rearranges the coefficient of determination for *D. veneta* in the micro-culture, based on the data in Table 2.



Figure 15. Determination coefficient for D. veneta from micro-culture.

The function values for each plastic in the concentration correlation are shown in Table 6.
	(R2)3	(R2)4
PA	0.995	1
PET	0.9983	1
PS	0.9451	1
PE	0.9971	1

Table 6. Values of the third-degree (R2)³ and fourth-degree (R2)⁴ polynomial coefficients of *D. veneta*—micro-culture.

Figure 16 rearranges the coefficient of determination for *L. terrestris* in the microculture, based on the data presented in Table 3.



Figure 16. Determination coefficient for *L. terrestris* from micro-culture.

Table 7. Values of the third-degree (R2)³ and fourth-degree (R2)⁴ polynomial coefficients of *L. terrestris*—micro-culture.

	(R2)3	(R2)4
PA	0.9957	1
PET	0.9920	1
PS	0.9453	1
PE	0.8514	1

Figure 17 rearranges the coefficient of determination for *D. veneta* in the macro-culture, based on the data presented in Table 4.



Figure 17. Determination coefficient for D. veneta from macro-culture.

Table 8. Values of the third-degree (R2)³ and fourth-degree (R2)⁴ polynomial coefficients of *D. veneta*—macro-culture.

	(R2)3	(R2)4
PA	0.9956	1
PET	0.9102	0.9102
PS	0.9643	1
PE	0.9405	0.9405

Table 9. Values of the third-degree (R2)³ and fourth-degree (R2)⁴ polynomial coefficients of *L. terrestris*— macro-culture.

	(R2)3	(R2)4
PA	0.6913	0.9998
PET	0.9845	0.9997
PS	0.9158	0.9996
PE	0.8906	0.9995

Figure 18 rearranges the coefficient of determination for *L. terrestris* in the macroculture, based on the data presented in Table 5.



Figure 18. Determination coefficient for *L. terrestris* from macro-culture.

5. Discussion of the Results

This article addresses the extremely important issue of comparing experimental results from the laboratory to those of organisms living in the environment. Taking into account existing publications, which extensively describe the overestimation of the amount of microplastic in organisms, and the significant differences between internal and external studies, it is worthwhile to analyze the factors affecting these differences in results. An important aspect is the analysis of the factors influencing these discrepancies, which is important for the correct interpretation of the results and their application in assessing the actual impact of microplastics on organisms. Trakic' et al. [43] emphasized that the toxicity of microplastics may be strongly dependent on the type of polymer and the presence of other contaminants, which further complicates the comparison of results from different environments. In turn, a review of [44] indicates that laboratory conditions may promote increased bioaccumulation of microplastics, because organisms do not have the ability to avoid them, as is the case in natural conditions. Such differences may lead to overestimates of the effects of microplastics on organisms, which have important implications for ecotoxicology.

The laboratory conditions in which the primary culture earthworms reproduced were an environment that was devoid of natural predators and rapid temperature changes and with a constant access to food. Placing earthworms in culture containers with microplastic contents that were evenly mixed with soil and food forced the earthworms to ingest particles as a consequence of starvation. In addition, the limited mobility and food selectivity meant that the microplastic exposure was consistently high. For this reason, the authors suggest that the obtained results should not only be interpreted as evidence of the ability of earthworms to accumulate microplastics, but also as a reliable estimate of their actual amount under environmental conditions. The rearing of earthworms in containers significantly affected the results of the study. The increased soil volume and depth of the containers made it possible for individuals to freely choose where to forage, thus contributing to the relocation of the microplastic. In turn, Trakic' et al. [43] emphasized that differences in food mobility and availability are key factors influencing the degree of exposure of soil organisms to microplastics, which may significantly alter the results of ecotoxicological studies.

The identification of microparticles in soil and the determination of their concentration from soil analysis are methods that are subject to constant validation and qualitative and quantitative precision testing. Soil is an extremely complex structure, characterized by varying hydrological dynamics and organic contents. As indicated by studies by Wang [45], Qian [46], and Li [47], there are numerous obstacles to accurate concentration estimation, including the apparatus resolution, particle size, particle aggregation, bonding and adhesion to soil grains, and many others. The research conducted may be an indication of the possibility of using different types of apparatus to identify microplastics based on tissue analysis of earthworms. This method, while certainly requiring more measurements, can provide an open database in which each subsequent study will increase the pools of results that are available for comparison. Each of the aforementioned methods as a single tool is fraught with many possibilities for overestimation or underestimation, but combining them all in the right order offers a chance for effective plastic analysis. This approach is consistent with the conclusions of [43], where it was suggested that the effectiveness of microplastic detection methods depends on the size and shape of the particles and their interaction with body tissues, which means that the combination of several analytical methods can increase the reliability of the results. In turn, ref. [44], a literature review, indicates that the standardization of analytical procedures in microplastics research is crucial to obtain comparable results. Therefore, creating an open database based on various detection methods can be a valuable tool supporting the development of research on microplastics in terrestrial ecosystems.

5.1. Optical Analysis

During the tests and observations using the microscope described above, it was not possible to observe particles that were smaller than 10 um, excluding those with strong fluorescence, which does not mean that no such particles were accumulated in the tissues. Moreover, the authors are convinced that these plastics were contained, but the detection of such small particles is extremely difficult, and at any stage of processing, it is possible to miss them. Optical analysis works very well for identifying larger particles and tissue mapping, which makes it possible to mark all visible fragments for further analysis. And while Nile Red staining is a very promising method, there is still uncertainty about the level of precision of the described results below 10 µm. Similar limitations in the detection of small microplastic particles using optical microscopy and Nile Red staining have been reported in the literature. Research indicates that particle properties, such as morphology, color, and degree of degradation, may affect the detection efficiency after Nile Red staining. For example, black microplastics exhibit weak fluorescence, making them difficult to detect, and fibers are more difficult to identify compared to regularly shaped particles [48]. Therefore, although Nile Red staining is a useful tool for the rapid identification of microplastics, its limitations in the detection of small particles and the possibility of obtaining false positive results suggest the need to use complementary analytical methods, such as FTIR or Raman spectroscopy, to obtain more precise and reliable results.

5.2. Particle Concentration in Tissues

This study clearly shows significant differences in the tissue accumulation of earthworms that were reared under laboratory conditions and in outdoor containers with large soil volumes. The worms who were forced to forage in 3L containers showed a linear increase in microplastic particle concentration, which was triggered by the lack of mobility and stability of the plastics throughout the soil and food. These results further demonstrate the ability to accumulate microplastic in earthworm bodies to a high degree and the potential for further analysis for other polymer groups. Tests conducted on macro-cultured earthworms were variable with respect to the concentration, and it seems that earthworms avoided areas where microplastic accumulated at a concentration of ~0.6% and that the particle size also had a significant impact on the results. The authors draw the bold conclusion that earthworms are unable to sense plastic below 40 um, meaning that foraging in an area with a concentration of less than 0.6% and a particle size of less than 40 um occurred without the appearance of signs of stress or a desire to relocate. The size and concentration of microplastics in the soil have a significant impact on their accumulation in earthworms. Higher concentrations and smaller particle sizes increase the likelihood of their ingestion and accumulation in tissues [49]. In addition, particles with spherical shapes were most common in the tissue analysis, followed closely by irregular fragments of a similar size. The tissue images and optical analysis did not clearly prove signs of inflammation in the sites where the material was labeled, nor damage to the tissues themselves, as is often reported in articles. Therefore, it can be concluded that mechanical damage to the gastrointestinal tract or intestines can only be caused by larger fragments that damage tissues with their sharp edges during intestinal peristalsis. These conclusions are consistent with previous studies, although some aspects require further verification. In [50], which used Raman microscopy, the authors showed that spherical microplastics accumulate more often in earthworm tissues, which coincides with the results presented in the current study. However, some previous studies [43] have suggested that even small microplastic particles can cause subtle inflammatory reactions. Additionally, these results fit into the broader context of research on the ecotoxicity of microplastics in terrestrial ecosystems. Guo et al. [51] suggest that the ability of earthworms to avoid areas with high concentrations of microplastics may be a behavioral strategy to minimize its negative impact. Nevertheless, the lack of visible reactions to particles that are smaller than 40 µm requires further investigation, especially with regard to potential sublethal effects such as oxidative stress or metabolic disorders. The described particles are two orders of magnitude smaller, so there is a chance of internal tissue penetration. It is also possible that the smallest fragments of microplastic enter the body through the respiratory cavities along the body via the mucus produced. The available literature indicates that there are many problems associated with the detection of microplastic in soil and the whole procedure for its detection [52,53], pointing to the variability of the matrix that is soil, the number of samples taken, their size and spatial distribution, or the consideration of soil hydrodynamics.

5.3. Conclusions

The conducted research confirmed that there is an opportunity to use *L. terrestris* and *D. veneta* as indicator species for microplastic-contaminated soil, and that further studies may be helpful for a more accurate estimation of the correlation of soil and tissue concentrations, as well as for a broader understanding of the mechanisms in different soil types. In this case, earthworms become an interesting solution, because they actively move in the soil and are able to collect plastic from different depths. With a sufficiently large number of repetitions for a given region, concentration estimation can be a very helpful method. The most important issue remains the linearity of the results and the very fact that the concentration of plastics in the soil has a direct effect on the amount of plastics in the tissues. The authors suggest that it may be important to study individual internal organs and visualize the possible accumulation by a specific organ.

Author Contributions: Conceptualization, A.G.; validation, A.G.; investigation, M.K.; resources, A.K.; data curation, M.K.; writing—original draft, M.K.; writing—review & editing, A.G.; visualization, M.K.; supervision, A.G.; project administration, A.G.; funding acquisition, A.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The scientific research was funded by the statute subvention of the Czestochowa University of Technology (Faculty of Infrastructure and Environment).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Ojha, R.B.; Devkota, D. Earthworms: "Soil and Ecosystem Engineers"—A Review. World J. Agric. Res. 2014, 2, 257– 260.
- Byers, J.E.; Cuddington, K.; Jones, C.G.; Talley, T.S.; Hastings, A.; Lambrinos, J.G.; Crooks, J.A.; Wilson, W.G. Using Ecosystem Engineers to Restore Ecological Systems. *Trends Evol.* 2006, *21*, 493–500. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Huerta-Lwanga, E.; Mendoza-Vega, J.; Ribeiro, O.; Gertsen, H.; Peters, P.; Geissen, V. Is the Polylactic Acid Fiber in Green Compost a Risk for *Lumbricus terrestris* and *Triticum aestivum*? *Polymers* **2021**, *13*, 703. [CrossRef]
- 4. Rorat, A.; Suleiman, H.; Grobelak, A.; Grosser, A.; Kacprzak, M.; Płytycz, B.; Vandenbulcke, F. Interactions between sewage sludge-amended soil and earthworms—Comparison between *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* composting species. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 3026–3035. [CrossRef] [PubMed]
- 5. Lavelle, P.; Spain, A.V. Soil Ecology; Kluwer Academic Publishers: New York, NY, USA, 2001.
- 6. Blakemore, R.J. An Updated List of Valid, Invalid and Synonymous Names of Criodriloidea and Lumbricoidea (Annelida:

Oligochaeta: Criodrilidae, Sparganophilidae, Ailoscolecidae, Hormogastridae, Lumbricidae, Lutodrilidae). A Series of Searchable

Texts on Earthworm Biodiversity, Ecology and Systematics from Various Regions of the World-Supplemental. CDPublicationUnderICZN(1999: Art. 8).2008.Availableonline:https://www.researchgate.net/publication/292401504(accessed on 14 October 2012).

 Geraskina, A.; Shevchenko, N. Spatial Distribution of the Anecic Species of Earthworms *Dendrobaena nassonovi* nassonovi (Oligochaeta: Lumbricidae) in the Forest Belt of the Northwestern Caucasus. Forests 2023, 14, 2367. [CrossRef]

- Tedesco, D.E.A.; Castrica, M.; Tava, A.; Panseri, S.; Balzaretti, C.M. From a Food Safety Prospective: The Role of Earthworms as Food and Feed in Assuring Food Security and in Valuing Food Waste. *Insects* 2020, 11, 293. [CrossRef] [PubMed]
- Rillig, M.C.; Ziersch, L.; Hempel, S. Microplastic Transport in Soil by Earthworms. Sci. Rep. 2017, 7, 1362. [CrossRef] [PubMed]
- 10. Arab, M.; Yu, J.; Nayebi, B. Microplastics in Sludges and Soils: A Comprehensive Review on Distribution, Characteristics, and Effects. *ChemEngineering* **2024**, *8*, 86. [CrossRef]
- 11. Kim, H. A Study on the Utilization of the Earthworms Eisenia Fetida and Eisenia Andrei for the Disposal of Polymers. Int. J. Environ. Sci. Dev. 2016, 7, 355–358. [CrossRef]
- Lwanga, E.H.; Thapa, B.; Yang, X.; Gertsen, H.; Salánki, T.; Geissen, V.; Garbeva, P. Decay of Low-Density Polyethylene by Bacteria Extracted from Earthworm's Guts: A Potential for Soil Restoration. *Sci. Total Environ.* 2018, 624, 753– 757. [CrossRef]
- Khaldoon, S.; Lalung, J.; Maheer, U.; Kamaruddin, M.A.; Yhaya, M.F.; Alsolami, E.S.; Alorfi, H.S.; Hussein, M.A.; Rafatullah, M. A Review on the Role of Earthworms in Plastics Degradation: Issues and Challenges. *Polymers* 2022, 14, 4770. [CrossRef] [PubMed]
- Lwanga, E.H.; Gertsen, H.; Gooren, H.; Peters, P.; Salánki, T.; van der Ploeg, M.; Besseling, E.; Koelmans, A.A.; Geissen, V.
 Incorporation of Microplastics from Litter into Burrows of Lumbricus Terrestris. *Environ. Pollut.* 2017, 220, 523– 531. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Alauzet, N.; Garreau, H.; Bouché, M.; Vert, M. Earthworms and the Degradation of Lactic Acid-Based Stereocopolymers. *J. Polym. Environ.* **2002**, *10*, 53–58. [CrossRef]
- 16. Wang, Y.; Liu, G.; Wang, Y.; Mu, H.; Shi, X.; Wang, C.; Wu, N. The Global Trend of Microplastic Research in Freshwater Ecosystems. *Toxics* **2023**, *11*, 539. [CrossRef] [PubMed]
- 17. Chen, Y.; Liu, X.; Leng, Y.; Wang, J. Defense Responses in Earthworms (Eisenia Fetida) Exposed to Low-Density Polyethylene Microplastics in Soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**, *187*, 109788. [CrossRef] [PubMed]
- Lithner, D.; Larsson, A.; Dave, G. Environmental and Health Hazard Ranking and Assessment of Plastic Polymers Based on Chemical Composition. *Sci. Total Environ.* 2011, 409, 3309–3324. [CrossRef]
- 19. Ju, H.; Yang, X.; Osman, R.; Geissen, V. Effects of microplastics and chlorpyrifos on earthworms (*Lumbricus terrestris*) and their biogenic transport in sandy soil. *Environ. Pollut.* **2023**, *316*, 120483. [CrossRef]
- 20. Edwards, C.A.; Fletcher, K.E. Interactions between Earthworms and Microorganisms in Organic-Matter Breakdown. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1988**, *24*, 235–247. [CrossRef]
- Karthikeyan, M.; Gajalakshmi, S.; Abbasi, S.A. Ingestion of Sand and Soil by Phytophagous Earthworm Eudrilus Eugeniae: A Finding of Relevance to Earthworm Ecology as Well as Vermitechnology. *Arch. Agron. Soil Sci.* 2014, 60, 1795–1805. [CrossRef]
- 22. Sanchez-Hernandez, J.C.; Capowiez, Y.; Ro, K.S. Potential Use of Earthworms to Enhance Decaying of Biodegradable Plastics. ACS Sustain. *Chem. Eng.* **2020**, *8*, 4292–4316.
- 23. Li, J.; Liu, Y.; Gao, Y.; Li, X.; Gong, Y. Study on the Extraction Method of Microplastic System in Textile Wastewater. *Polymers* **2023**, *15*, 1394. [CrossRef] [PubMed]
- 24. Cole, M.; Webb, H.; Lindeque, P.K.; Fileman, E.S.; Halsband, C.; Galloway, T.S. Isolation of microplastics in biota-rich seawater samples and marine organisms. *Sci. Rep.* **2015**, *4*, 4528. [CrossRef] [PubMed]
- 25. Roch, S.; Brinker, A. Rapid and efficient method for the detection of microplastic in the gastrointestinal tract of fishes. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 4522–4530. [CrossRef]
- Dehaut, A.; Cassone, A.L.; Frère, L.; Hermabessiere, L.; Himber, C.; Rinnert, E.; Rivière, G.; Lambert, C.; Soudant, P.; Huvet, A.; et al. Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environ. Pollut.* 2016, *215*, 223–233. [CrossRef]
- 27. Munno, K.; Helm, P.A.; Jackson, D.A.; Rochman, C.; Sims, A. Impacts of temperature and selected chemical digestion methods on microplastic particles. *Environ. Toxicol. Chem.* **2018**, *37*, 91–98. [CrossRef] [PubMed]
- 28. Lusher, A.L.; Welden, N.A.; Sobral, P.; Cole, M. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Anal. Methods* **2017**, *9*, 1346–1360. [CrossRef]
- 29. Foekema, E.M.; Gruijter, C.D.; Mergia, M.T.; van Franeker, J.A.; Murk, A.T.J.; Koelmans, A.A. Plastic in North Sea Fish. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 8818–8824. [CrossRef] [PubMed]
- Karami, A.; Golieskardi, A.; Choo, C.K.; Romano, N.; Ho, Y.B.; Salamatinia, B. A high-performance protocol for extraction of microplastics in fish. *Sci. Total Environ.* 2017, *578*, 485–494. [CrossRef] [PubMed]

- Herrera, A.; Garrido-Amador, P.; Martínez, I.; Samper, M.D.; López-Martínez, J.; Gómez, M.; Packard, T.T. Novel methodology to isolate microplastics from vegetal-rich samples. *Mar. Pollut. Bull.* 2018, 129, 61–69. [CrossRef] [PubMed]
- Maes, T.; Jessop, R.; Wellner, N.; Haupt, K.; Mayes, A.G. A rapid-screening approach to detect and quantify microplastics based on fluorescent tagging with Nile Red. Sci. Rep. 2017, 7, 44501. [CrossRef]
- Prata, J.C.; da Costa, J.P.; Girão, A.V.; Lopes, I.; Duarte, A.C.; Rocha-Santos, T. Identifying a quick and efficient method of removing organic matter without damaging microplastic samples. *Sci. Total Environ.* 2019, *686*, 131–139. [CrossRef] [PubMed]
- 34. Ma, C.; Li, L.; Chen, Q.; Lee, J.S.; Gong, J.; Shi, H. Application of internal persistent fluorescent fibers in tracking microplastics in vivo processes in aquatic organisms. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *401*, 12333. [CrossRef] [PubMed]
- 35. Shruti, V.C.; Pérez-Guevara, F.; Elizalde-Martínez, I.; Kutralam-Muniasamy, G. First study of its kind on the microplastic contamination of soft drinks, cold tea and energy drinks—Future research and environmental considerations. *Sci. Total Environ.* **2020**, *726*, 138580. [CrossRef]
- Greenspan, P.; Fowler, S.D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red. J. Lipid Res. 1985, 26, 781–789.
 [CrossRef] [PubMed]
- Martinez, V.; Henary, M. Nile red and nile blue: Applications and syntheses of structural analogues. *Chem. A Eur. J.* 2016, 22, 13764–13782. [CrossRef]
- Löder, M.G.J.; Gerdts, G. Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics—A Critical Appraisal. In *Marine Anthropogenic Litter*; Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2015. [CrossRef]
- Pereira, T.; Freitas, C.; Costa, J.L.; Morgado, J.; Silva, F.; Negrão, E.; de Lima, B.F.; da Silva, M.C.; Madureira, A.J.; Ramos, I.; et al. Comprehensive Perspective for Lung Cancer Characterisation Based on AI Solutions Using CT Images. J. Clin. Med. 2021, 10, 118. [CrossRef]
- Primpke, S.; Christiansen, S.H.; Cowger, W.; De Frond, H.; Deshpande, A.; Fischer, M.; Holland, E.B.; Meyns, M.; O'Donnell, B.A.;
 Ossmann, B.E.; et al. Critical Assessment of Analytical Methods for the Harmonized and Cost-Efficient Analysis of
- 41. Renner, K.O.; Foster, H.A.; Routledge, E.J.; Scrimshaw, M.D. A Comparison of Different Approaches for Characterizing Microplastics in Selected Personal Care Products. *Environ. Toxicol. Chem.* **2022**, *41*, 880–887. [CrossRef]

Microplastics. Appl. Spectrosc. 2020, 74, 1012–1047. [CrossRef]

- Wander, L.; Lommel, L.; Meyer, K.; Braun, U.; Paul, A. Development of a low-cost method for quantifying microplastics in soils and compost using near-infrared spectroscopy. *Meas. Sci. Technol.* 2022, *33*, 075801. [CrossRef]
- 43. Trakić, T.; Popović, F.; Sekulić, J.; Hackenberger, D.K. Ecotoxicological Effects of Commercial Microplastics on Earthworm Eisenia fetida (Savigny, 1826) (Clitellata; Lumbricidae). *Agriculture* **2024**, *14*, 267. [CrossRef]
- 44. Sanchez-Hernandez, J.C. Microplastic contamination and earthworms: Current trends and research needs. *CABI Rev.* **2024**, *19*, 1. [CrossRef]
- 45. Wang, J.; Coffin, S.; Sun, C.; Schlenk, D.; Gan, J. Negligible Effects of Microplastics on Animal Fitness and HOC Bioaccumulation in Earthworm Eisenia Fetida in Soil. *Environ. Pollut.* **2019**, *249*, 776–784. [CrossRef]
- 46. Qian, Z.; Zhang, H.; Yang, Z.; Yuan, L.; Yong, X.; Feng, C.; Chen, T.; Lu, Y. Separation of microplastics from a coastal soil and their surface microscopic features. *Chin. Sci. Bull.* **2016**, *61*, 1604–1611.
- 47. Li, Q.; Wu, J.; Zhao, X.; Gu, X.; Ji, R. Separation and identification of microplastics from soil and sewage sludge. *Environ. Pollut.* **2019**, *254*, 113076. [CrossRef]
- Süssmann, J.; Fischer, E.K.; Hildebrandt, L.; Walz, E.; Greiner, R.; Rohn, S.; Fritsche, J. Nile red staining for rapid screening of plastic-suspect particles in edible seafood tissues. *Anal. Bioanal. Chem.* 2024, 416, 3459–3471. [CrossRef] [PubMed]
- Guo, S.; Wang, Q.; Li, Z.; Chen, Y.; Li, H.; Zhang, J.; Wang, X.; Liu, J.; Cao, B.; Zou, G.; et al. Ecological risk of microplastic toxicity to earthworms in soil: A bibliometric analysis. *Front. Environ. Sci.* 2023, *11*, 1126847. [CrossRef]
- Klimasz, M.; Grobelak, A. Accumulation of Spherical Microplastics in Earthworms Tissues-Mapping Using Raman Microscopy. Appl. Sci. 2024, 14, 10117. [CrossRef]
- Liu, T.; Hou, B.; Zhang, Y.; Wang, Z. Determination of Biological and Molecular Attributes Related to Polystyrene MicroplasticInduced Reproductive Toxicity and Its Reversibility in Male Mice. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, 19, 14093. [CrossRef]

- 52. Zhang, S.; Bao, A.; Lin, X.; Jia, G.; Zhang, Q. Microplastic Accumulation in Agricultural Soils with Different Mulching Htories in Xinjiang, China. *Sustainability* **2023**, *15*, 5438. [CrossRef]
- 53. Salikova, N.S.; Rodrigo-Ilarri, J.; Rodrigo-Clavero, M.-E.; Urazbayeva, S.E.; Askarova, A.Z.; Magzhanov, K.M. Environmental Assessment of Microplastic Pollution Induced by Solid Waste Landfills in the Akmola Region (North Kazakhstan). *Water* **2023**, *15*, 2889. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.