

Procjena ekotoksičnosti mikroplastike i nanoplastike na gujavice (kolutićavci, Annelida) i oblice (Nematoda) u tlu

E. Čemerika, A. Knežević, D. Milički i M. Miloloža*

Ovo djelo je dano na korištenje pod
Creative Commons Attribution 4.0
International License



Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Trg Marka Marulića 19, 10 000 Zagreb

Sažetak

Poznato je da je onečišćenje plastikom postalo jedno od najvažnijih ekoloških pitanja u današnjem svijetu. Iako je stopa recikliranja plastičnih proizvoda u porastu, većina plastike još uvijek nekontrolirano dospijeva u okoliš. Plastika sama po sebi ne predstavlja veliku prijetnju ekosustavu za razliku od njezinih degradiranih komponenti, mikroplastike (MP) i nanoplastike (NP), koje su zbog svoje veličine reaktivnije te se lakše transportiraju. Posljednjih godina porast ljudske potražnje, proizvodnje te uporabe proizvoda koji su izvorno u obliku MP-a i NP-a dodatno povećavaju problem onečišćenja. Jednom oslobođeni, MP i NP se više akumuliraju u kopnenom ekosustavu nego u vodenom, koji je po tom pitanju znatno više istražen. Posljedično tome, degradirane komponente plastike akumuliraju se u organizme koji žive u tlu te ih ti organizmi svojim metabolizmom mogu dodatno razgraditi (usitniti). Cilj ovog rada je dati pregled o ekotoksičnosti MP-a i NP-a upravo na gujavice kao predstavnike koljena kolutićavaca (Annelida) te na oblice (koljeno Nematoda), kao dvije najčešće skupine beskralježnjaka koje obitavaju u tlu. Ispitivanje utjecaja MP-a i NP-a na gujavicama dosad je provedeno na vrstama *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* i *Lumbricus terrestris*, dok je kao predstavnik oblica upotrijebljena vrsta *Caenorhabditis elegans*. Navedeni su se organizmi izlagali česticama polietilena, polistirena i polipropilena različitih veličina, kao i njihovim različitim koncentracijama. Rezultati mnogobrojnih istraživanja štetnog utjecaja navedenih polimernih materijala na ispitivane kolutićavce i nematode, mjerenog testom inhibicije stope preživljavanja i rasta, pokazuju značajan gubitak tjelesne težine, oštećenje probavila te oksidativni stres.

Ključne riječi

Mikroplastika, nanoplastika, tlo, ekotoksičnost, kolutićavci, oblice

1. Uvod

Masovna proizvodnja i uporaba plastike te nepravilno odlaganje i upravljanje plastičnim otpadom povećavaju količinu mikroplastike (MP) i nanoplastike (NP) u okolišu. Čestice MP-a (0,1 – 5000 μm) i NP (0,001 – 0,1 μm) razlikuju se po svojoj veličini, a time i po omjeru površina/volumen. Činjenica da manje čestice imaju veću specifičnu površinu, odnosno više adsorpcijskih mjesta, ukazuje na veću kemijsku reaktivnost i pokretljivost NP-a u odnosu na MP. Zbog navedenog, općenito je teže detektirati i procijeniti količinu NP-a nego MP-a u ekosustavu. Navedene čestice dijele se na primarne i sekundarne, pri čemu su primarne namjerno projektirane da budu u mikro- i nanometarskoj veličini.¹ Primjer proizvoda koji sadrže primarne mikro- i nanočestice su sintetički tekstil (mikrovlakna iz tekstila) te kozmetika i osobni proizvodi za njegu (piling za lice, gelovi za tuširanje, šminka itd.).^{2,3} S druge strane, sekundarne čestice nastaju razgradnjom plastike procesima kao što su fotooksidacija, termooksidacija, hidroliza, biorazgradnja i abrazija.¹ MP i NP tek su nedavno prepoznati kao ekološka prijetnja ekosustavima u tlu, a u tlo dospijevaju različitim ljudskim aktivnostima među kojima je glavna poljoprivreda. Tehnologija malčiranja plastičnom folijom naširoko se primjenjuje u poljoprivredi, jer može znatno povećati prinose usjeva. Velike količine plastičnih folija ostaju i

akumuliraju se u tlu te se mogu razgraditi u MP, pa čak i NP.⁴ Navodnjavanjem poljoprivrednih zemljišta vodama onečišćenim plastikom plastika se dovodi izravno u kontakt s tlom. Do toga dolazi i primjenom komposta te kanalizacijskog mulja iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda.⁵ Tako postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda onečišćuju poljoprivredna zemljišta s približno 7,76 milijuna tona plastike.⁶ Pojačanim cestovnim prometom, točnije habanjem automobilskih guma, MP i NP uz dodatno djelovanje prirodnih čimbenika mogu vrlo lako dospjeti u tlo. Općenito, prirodni čimbenici kao što su vjetar, oluje i poplave utječu na njihov prijenos i taloženje na okolno tlo. Stoga velik problem predstavljaju i odlagališta otpada te nepropisno odlaganje otpada u tvornicama i stambenim područjima. Isto tako, životinje sudjeluju u prijenosu MP-a/NP-a s jednog mjesta na drugo, a biljke ih preko korijenja unose u tlo.⁷ Važnu ulogu u prijenosu kroz samo tlo imaju gujavice i oblice koji se obično nalaze u tlu hraneći se organskim tvarima. Oni mogu izravno progutati MP i NP, generirati sekundarne plastike i transportirati ih kroz tlo. Kao najvažniji modelni organizam u sustavu tla, uporaba gujavica ima prednosti kao što su jednostavnost identifikacije i pogodnost za provođenje pokusa. Stoga su gujavice i oblice obično odabrani za istraživanje različitih onečišćenja i njihovih učinaka na tlo ekosustava. No u ovom radu cilj je procijeniti toksični učinak MP-a i NP-a konkretno na same gujavice i oblice.

* Autor za dopisivanje: dr. sc. Martina Miloloža
E-pošta: miloloza@fkit.unizg.hr

2. Transport mikroplastike i nanoplastike u tlu

Sudbina MP-a/NP-a u tlu ponajprije ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima koji su određeni strukturom i sastavom. Tako će se npr. polietilen (PE) razgraditi brže od polistirena (PS), jer PS u strukturi sadrži aromatski prsten koji mu daje veću stabilnost.⁸ Površinsko tlo izravno je izloženo UV zračenju, kisiku i visokoj temperaturi, što osigurava pogodne uvjete za razgradnju MP-a/NP-a. To takozvano fotostarenje stvara slobodne radikale, odnosno čestice manje veličine. Uz to, raste broj funkcionalnih skupina s kisikom zbog čega se povećava hidrofilnost MP-a/NP-a, a time olakšava njihova migracija u dublje slojeve tla.^{9,10} Padaline pokreću vertikalni transport, tj. protok vode pospješuje prijenos MP-a/NP-a kroz matricu tla kombiniranim fizičkim i kemijskim učincima, a bioturbacija u tlima stvara puteve za njihov prijenos u dublje slojeve. Transportni učinak bolji je pri većim koncentracijama MP-a/NP-a. Međutim, s daljnjim povećanjem koncentracije raste vjerojatnost međusobnog sudara čestica, a formirani agregati usporavaju migraciju MP-a/NP-a. Uz homoagregaciju dolazi i do heteroagregacije s mineralima tla (anorganskim ionima).⁸ Ovisno o površinskom naboju te hidrofilnosti/hidrofobnosti, reaktivnost će biti različita. Pri interakciji sa sastavnicama tla, odnosno anorganskim ionima, otopljenom organskom tvari, organizmima i slično, dolazi do promjene raspršenosti i stabilnosti MP-a/NP-a.¹¹ Na interakcije, a time i transport MP-a u tlu, velik utjecaj imaju i svojstva tla kao što su temperatura, pH, vlaga i poroznost.¹² Mikroorganizmi mogu rabiti MP/NP kao izvor ugljika i energije i tako procesima biotičke razgradnje (enzimatska depolimerizacija, asimilacija, mineralizacija), koji su efikasniji pri višim temperaturama tla, poboljšati njihov transport.¹³ U eksperimentu sa stakleničkim posudama utvrđeno je da PE najmanje veličine doseže najdublji sloj tla kroz različite aktivnosti gujavica.¹⁴ Dakle, transport MP-a/NP-a u tlu vrlo je složen proces koji ovisi o mnogim čimbenicima.

3. Testovi toksičnosti za mikroplastiku i nanoplastiku

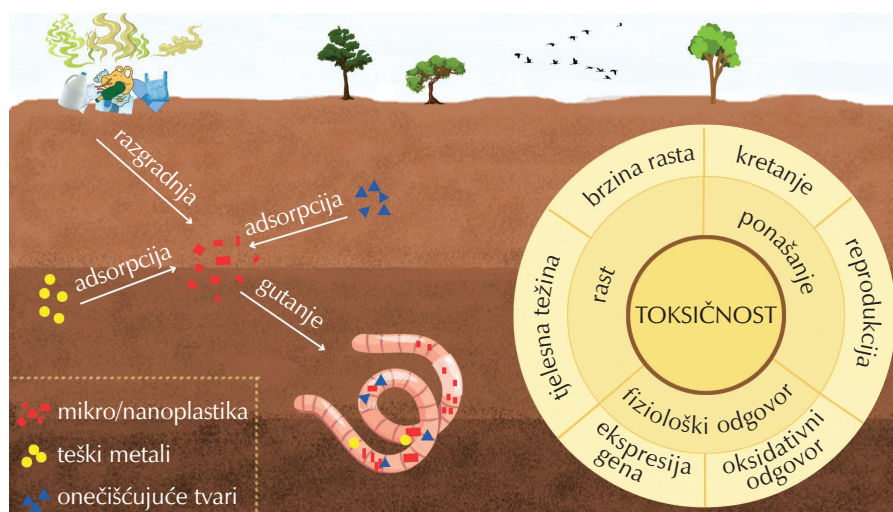
Testovi toksičnosti su testovi koji se primjenjuju za procjenu potencijalne štetnosti ispitivanih tvari na izložene žive testne organizme. Ti se testovi dijele na akutne i kronične, što ovisi o vremenu izlaganja testnog organizma ispitivanoj tvari. Rezultati testova toksičnosti obično se izražavaju kao koncentracija ispitivanog spoja koja uzrokuje određeni učinak (u postocima) na izloženu populaciju. Dakle, ekotoksičnost se može izraziti kao: (i) maksimalna koncentracija koja ne uzrokuje nikakav učinak, (ii) minimalna koncentracija koja uzrokuje 100 %-tni učinak, (iii) utjecajna koncentracija (engl. *effective concentration*, EC) koja uzrokuje određenu razinu učinka. Obično se primjenjuje koncentracija koja uzrokuje 50 %-tni učinak u testiranoj populaciji (EC₅₀), iako se po potrebi mogu primijeniti i druge razine, primjerice EC₁₀ i/ili EC₂₀. U slučaju smrtnosti učinak se izražava preko letalne koncentracije (engl. *lethal concentration*, LC). Utjecajne i letalne vrijednosti mogu se izraziti po masi testiranog organizma, što se izražava preko utjecajne doze (engl. *effective dose*, ED) i letalne doze

(engl. *lethal dose*, LD). Testovi toksičnosti za MP/NP mogu se provoditi uz izravno ili neizravno ispitivanje utjecaja plastičnih čestica na testne organizme. Ako se izravno određuje utjecaj plastičnih čestica, to označava izlaganje testnih organizama usitnjenim česticama MP-a/NP-a, dok se otapanjem MP/NP čestica u nekome otapalu određuje neizravan utjecaj tih čestica. Općenito, najčešće primijenjeni testni organizmi za ispitivanje ekotoksičnosti MP-a/NP-a u vodenim ekosustavima su bakterija *Vibrio fischeri*, morske i/ili slatkovodne mikroalge, račići *Daphnia magna*, zebrice *Danio rerio* te morske i/ili slatkovodne ribe. Međutim, gledajući istraživanja o utjecaju MP/NP na organizme u tlu, saznanja su dosad vrlo ograničena. Još uvijek je velik izazov istraživati karakteristike onečišćenja i procjenu ekološkog rizika MP-a/NP-a u tlu. Najčešće se u te svrhe kao testni organizmi upotrebljavaju gujavice (koljeno kolutičavci, Annelida) i oblići (koljeno Nematoda). Gujavice i oblići imaju ključnu ulogu u održavanju plodnosti tla i cijelog ekosustava. Gujavice razgrađuju organske tvari poput lišća i otpadaka te ih pretvaraju u hranjive tvari koje biljke mogu apsorbirati. Dodatno, ti organizmi poboljšavaju strukturu tla svojim kopanjem i miješanjem, što pomaže u cirkulaciji zraka i vode. Oblići razgrađuju organski materijal pomažući u ciklusu hranjivih tvari. Upotrebljavaju se kao modelni organizmi za ispitivanje ekotoksičnosti MP-a/NP-a s obzirom na to da su ključni za održavanje zdravlja tla i ekosustava.⁷ Stoga procjena ekotoksičnosti uporabom gujavica i oblića može pružiti informacije o tome kako određene tvari ili materijali mogu utjecati na njihovu populaciju i funkcije u ekosustavu tla.

4. Ekotoksičnost mikroplastike i nanoplastike na gujavice (koljeno kolutičavci, Annelida) u tlu

4.1. Važnost gujavica (koljeno kolutičavci, Annelida) u tlu

Gujavice (koljeno kolutičavci, Annelida) obično su najzastupljenije životinje u tlu, odnosno poljoprivrednim tlima. Poznato je da poboljšavaju fizičke, kemijske i biološke značajke tla. Zajedno s mikroorganizmima u tlu imaju velik potencijal za poboljšanje plodnosti tla. Drugim riječima, utječu na mnoge usluge ekosustava koje se odnose na plodnost tla i biljnu proizvodnju. Kretanjem gujavica kroz tlo povećava se količina makropora i na taj način doprinose dobrom prozračivanju tla gdje ostavljaju glavni dio svojih nutrijenata. To osigurava povoljan rast korijena biljaka. Također, gujavice razgrađuju mrtvu biljnu tvar i povećavaju biljne hranjive tvari. Prenose čestice tla i hranjive tvari iz dubinskog u površinski sloj i tako održavaju vitalnost tla.¹⁵ Predstavljaju važne modelne organizme u ekotoksikološkim istraživanjima, a njihova fiziološka aktivnost i metabolički status odražavaju stupanj onečišćenja tla. U 60 % istraživanja koja su provedena najčešće upotrijebljene vrste gujavica su *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* i *Lumbricus terrestris* zbog svoje visoke brzine aktivnosti i reprodukcije, kratkog životnog ciklusa, osjetljivosti na onečišćujuće tvari te nastanjanja površinskih slojeva tla bogatih organskom tvari.¹⁶ S obzirom na to da su gujavice odraz zastupljene količine MP-a i NP-a u tlu, uobičajeno se prate brzina rasta, promjena tjelesne težine, kretanje, reprodukcija, oksidativni odgovor i ekspresija gena (slika 1).



Slika 1 – Prijenos i utjecaj mikro/nanoplastike na gujavice

Fig. 1 – Transport and impact of micro/nanoplastics on earthworms

MP/NP mogu adsorbirati različite oblike tvari poput teških metala i onečišćujućih tvari, pa čak ih i transportirati u druge dijelove tijela, kako je prikazano na slici 1. Time se smanjuje učinkovitost njihova uklanjanja, što uvelike predstavlja opasnost prema cjelokupnom živom svijetu u tlu.¹⁷

4.2. Biološki odgovor gujavica na postojanost mikro/nanoplastike u tlu

U istraživanju ekotoksičnosti MP-a i NP-a na gujavice u tlu identificirani su PE niske i visoke gustoće, PS i polipropilen (PP) kao četiri najčešće proučene vrste plastike, odnosno polimeri u kontekstu toksičnosti gujavica. Zbog svoje velike specifične i hidrofobne površine znatno mogu povećati štetan utjecaj organskih i anorganskih onečišćujućih tvari na značajke gujavica navedene na slici 1. Primjerice, nepolarni PE i PP ne sadrže određene funkcionalne skupine, no van der Waalove sile imaju glavnu ulogu u njihovoj adsorpciji. PS može uspostavljati veze s aromatskim spojevima (npr. poliklorirani bifenili) putem π vezivanja, što rezultira jačom adsorpcijom tvari.¹⁶ U tablici 1 prikazan je pregled provedenih istraživanja o negativnom utjecaju pojedine MP/NP na različite vrste gujavica.¹⁸

Promjene biomarkera i aktivnosti enzima važne su metode za procjenu ekotoksičnosti. Kad organizam stimuliraju vanjski čimbenici, to će dovesti do stvaranja slobodnih radikala u tijelu, a antioksidativni obrambeni sustav nastoji ukloniti slobodne radikale da bi zaštitio stanice od oksidativnih oštećenja. Zato se često prate promjene biomarkera (malondialdehida) i enzimskih antioksidansa (superoksid dismutaza, katalaza) i neenzimskih antioksidansa (glutathion sintetaza) kao odgovor organizma na prisutnost MP-a.¹⁸ Nakon ulaska MP-a u unutrašnjost organizma mogu se proizvesti različiti enzimi kao mehanizam odgovora imunološkog sustava na stres. S druge strane, u gujavica može doći do povećanja zasićenih masnih kiselina da bi se smanjila osjetljivost na slobodne radikale, što izaziva

oksidativni stres. Isto tako, prekomjerna količina izlučenih enzima može inhibirati vlastitu aktivnost (primjerice u slučaju prevelike koncentracije MP-a u organizmu) te povećati oštećenje neurona i DNA gujavice. Time dolazi do trovanja organizma, odnosno povećanja mortaliteta gujavica.^{16,27} Osim navedenog istraživanja o povećanju ekotoksičnosti kadmija u prisutnosti MP-a (tablica 1), nikal i bakar važni su metali prisutni u gnojivu. Infracrvenom spektroskopijom s Furierovom transformacijom utvrđeno je da PE ima sposobnost apsorpcije različitih metala, što je dovelo do oštećenja epiderme gujavica.²⁸ Nadalje, MP može prouzročiti histopatološka oštećenja u probavnom sustavu. *Rodriguez-Seijo i sur.*²⁶ utvrdili su da su gujavice izložene PE-u tijekom 28 dana pokazale znatno oštećenje crijevnog tkiva, uključujući gubitak crijevnog epitelnog tkiva, zagušenje i znakove upale u crijevnom traktu (tablica 1).^{16,23} Osim toga, gutanje MP-a utječe na mikrobiom crijeva gujavica koje može potaknuti njihovu degradaciju. Time se povećava rizik ulaska MP-a u podzemne vode, što donosi negativne posljedice s ekološkog aspekta.¹⁹ Osim povećanja mortaliteta i smanjenja stope rasta s porastom koncentracije polimera, oni uzrokuju značajnu inhibiciju razmnožavanja gujavica.^{16,29} Izloženost glista poli(vinil-kloridu) najveće koncentracije pokazala je smanjenje reprodukcije za čak 33 %.²⁹ *Bolton i Phillipson*²⁹ utvrdili su da je PE glavni uzročnik gubitka tjelesne težine gujavica. Polimeri ne mogu osigurati i zamijeniti potrebne hranjive tvari, što rezultira njihovom nedovoljnom količinom u gujavicama, a time i gubitkom tjelesne težine.³⁰ Biorazgradiva plastika općenito je ekološki prihvatljivija u odnosu na sintetsku s obzirom na to da sintetska nije podložna procesu biorazgradnje. Međutim, ispitivanjem ekotoksičnosti različite vrste MP-a uočeno je da polilaktička kiselina, kao sintetski polimer, nije imala utjecaja na smrtnost gujavica, dok je biorazgradiva plastika na bazi škroba imala stopu smrtnosti od 40 do 50 %. Dakle, ne može se svaka biorazgradiva plastika smatrati ekološki prihvatljivom u usporedbi sa sintetskom.³¹

Tablica 1 – Utjecaj polimera na pojedine vrste gujavica (koljeno kolutičavci, Annelida) pri različitim eksperimentalnim uvjetima
Table 1 – Effect of polymers on earthworms (phylum annelid worm, Annelida) under different experimental conditions

Vrsta gujavice	Vrsta polimera	Veličina/ μm	Koncentracija polimera	Vrijeme izlaganja/temperatura tla/vlažnost tla	Rezultati istraživanja	Ref.
<i>Lumbricus terrestris</i>	Polietilen	40,7	0; 0,1; 1 % w/w (polimer/tlo)	35 dana/–/–	– promjena u odgovorima biomarkera (superoksid dismutaza)	18
<i>Enchytraeus crypticus</i>	Polistiren	0,05 – 0,10	0; 0,025; 0,5; 10 % w/w (polimer/tlo)	7 dana/–/–	– gubitak težine pri najvećoj koncentraciji – promjene u mikrobiomu gujavica	19
<i>Eisenia andrei</i>	Polietilen	180 – 212, 250 – 300	1000 mg kg ⁻¹ tla	21 dan/–/–	– oštećenje muških reproduktivnih organa	20
<i>Lumbricus terrestris</i>	Polietilen niske gustoće	< 150	7; 28; 45; 60 % (suhe tvari) u biljnoj smjesi	60 dana/16 – 18 °C/20 %	– subletalni učinci pri najvišoj koncentraciji mikroplastike (25 % smrtnost i znatan gubitak težine)	21
<i>Lumbricus terrestris</i>	Polietilen niske gustoće	50 – 150	–	–	– povećanje mortaliteta i smanjenje stope rasta s porastom koncentracije polimera	22
<i>Eisenia andrei</i>	Polietilen	250 – 1000	–	–	– ozljeda crijevnog tkiva (hiperemija crijevne stijenke i ljuštenje crijevnog epitelnog tkiva) – reakcija imunološkog sustava (upala crijevne stijenke)	23
<i>Eisenia foetida</i>	Polipropilen + Cd	< 150	-	-	– pojačan toksični učinak Cd	24
<i>Lumbricus terrestris</i>	Polietilen niske gustoće	≤ 50 (40 %) i 63 – 150 (60 %)	7; 28; 45 i 60 % (suhe tvari) u biljnoj smjesi	14 dana/16,5 °C/21 %	– gujavice izložene 7 % mikroplastici najmanje težine	25
<i>Lumbricus terrestris</i>	Polietilen $\pm 1,0$	710 – 850, 1180 – 1400, 1700 – 2000 i 2360 – 2800	750 mg/2,5 kg tla	21 dan/20 °C/-	– prijenos mikroplastike s površine tla u unutrašnjost (10,5 cm); izraženiji učinak s najmanjom mikroplastikom – mikroplastika veličine 710 – 850 μm i 1180 – 1400 μm prilijepljena na sluz kože gujavica	20
<i>Eisenia fetida</i>	Polietilen niske gustoće	250 – 1000	0; 62,5; 125; 250; 500 i 1000 mg kg ⁻¹ suhog tla	28 dana/20 °C/40 %	– lipidna peroksidacija (znak staničnog oksidativnog oštećenja) znatno povećana pri većim koncentracijama polimera – promjene u aktivnostima antioksidativnog enzima (katalaza)	26

5. Ekotoksičnost mikroplastike i nanoplastike na obliču u tlu

5.1. Važnost oblića u tlu

Obliču (koljeno Nematoda) važne su komponente u hranidbenoj mreži tla i imaju važnu funkciju u ekosustavu.³² Nastanjene su u tankim filmovima vode (1 – 5 μm) koji okružuju čestice tla.³³ Oblik tijela im je okrugao, končast ili vretenast, a zbog manjka pigmenta tijelo im je mliječno-bijele do žute boje. Veličina tijela im varira, od vrijednosti nevidljivih ljudskom oku do 8 cm. Lako ih je uzgajati, mogu opstati u širokom rasponu pH (1,6 – 11) i temperatura (do 61 °C) te imaju kratak životni vijek. Zbog tih karakteristika obliču su izvrstan testni organizam za procjenu ekotoksičnosti.^{33,34} Prema načinima ishrane, porodice obliču mogu se svrstati u četiri trofičke skupine: obliču koji se

hrane bakterijama, obliču koji se hrane gljivama, obliču koji se hrane biljkama i obliču omnivori (predatori).³² Znanstvenici ih nazivaju “cijev u cijevi” jer im crijevo čini najveći dio tjelesne šupljine.³³ Obliču mogu regulirati procese koji se odvijaju u ekosustavu hraneći se mikroorganizmima, ne mrtvim organskim tvarima, a njihova brojnost i aktivnost usko su povezane s biogeokemijskim ciklusima, poput mineralizacije hranjivih tvari i procesa kruženja ugljika.³² Neizravno utječu na dostupnost hranjivih tvari regulacijom brojnosti ili aktivnosti mikroorganizama, otpuštanjem dušika i fosfora iz bakterija koje probavljaju te izlučivanjem viška dušika kao amonijaka.³³ Budući da se obliču mogu kretati samo u sredinama, tj. tlima s kontinuiranim filmovima vode, na njihovu aktivnost utječu tekstura i vlaga tla. Osjetljivi su na promjene okoliša, primjerice onečišćenje tla ili dodatak gnojiva za bolju plodnost tla. Shodno tome,

oblici se smatraju korisnim pokazateljima stanja hranidbenih mreža u tlu, kao i zdravlja ekosustava.³² Upotrebljavaju se u ekotoksikološkim ispitivanjima te se promatra kako razne štetne tvari djeluju na njihov rast, preživljavanje, reprodukciju, poremećaj u probavi, oksidativni stres i promjenu u genima.³⁵ Probavni sustav najčešće je pogođen toksičnim djelovanjem MP-a, a crijevna barijera važna je za borbu oblića protiv toksikanata, u čemu pomažu geni za prijenos signala (*hmp-2*, *erm-1*, *pkc-3*).^{36,37} Funkcije navedenih proteina prikazane su u tablici 2.

Apikalno-bazalni polaritet bitan je za oblik i funkciju epitelnih stanica, budući da određuje lokalizaciju adhezijskih molekula koje drže stanice zajedno. Pod pojmom cjelo-

Tablica 2 – Informacije o genima koji su potrebni za razvoj crijeva u oblicima (koljeno Nematoda)³⁶

Table 2 – Information on genes required for gut development in nematodes (phylum Nematoda)³⁶

Gen	Kodirani protein	Funkcija
<i>pkc-3</i>	protein kinaze C	apikalna bazalna polarnost
<i>hmp-2</i>	β -katenin	cjelovitost tkiva u crijevu
<i>erm-1</i>	ezrin radiksni moesin protein	povezuje aktin citoskelet i plazmu membrane

Tablica 3 – Utjecaj polimera na vrstu oblića *Caenorhabditis elegans* pri različitim eksperimentalnim uvjetima

Table 3 – Effect of polymers on nematode *Caenorhabditis elegans* under different experimental conditions

Vrsta oblića	Vrsta polimera	Veličina čestica / μm	Koncentracija polimera	Utjecaj MP na ispitani organizam	Ref.
<i>Caenorhabditis elegans</i>	PE	57 ± 40	1; 10; 100 mg MP/l	manje potomaka	37
	PLA/PBAT	40 ± 31		manja duljina tijela	
	HDPE	250 – 1000	0,01; 0,1; 1 %	manje potomaka, manja duljina tijela	38
	PET				
	PP				
	PS				
	PP	200	0,5; 1; 2 %	<ul style="list-style-type: none"> smanjenje raznolikosti oblića utjecaj na metaboličke tragove 	45
	PS	1 – 5	$< 1 \text{ mg l}^{-1}$	<ul style="list-style-type: none"> pojava oksidativnog stresa akumulacija čestica MP-a u crijevima oštećenje crijeva 	34
	PS	–	1 mg l^{-1}	<ul style="list-style-type: none"> poremećaj u kretanju oksidativni stres oštećenje crijeva 	39
	PS	1 – 5	$2,4 \cdot 10^7$ čestica/ m^2	kraći životni ciklus	40
			$2,4 \cdot 10^8$ čestica/ m^2	oštećenje crijeva	
			$2,4 \cdot 10^9$ čestica/ m^2	razlike u ekspresiji gena	
			$2,4 \cdot 10^{10}$ čestica/ m^2		
	PS	0,042, 0,530	0,01; 0,1; 1; 10; 100 mg kg^{-1} tla	smanjen broj potomaka	41

vitost tkiva u crijevu podrazumijeva se crijevni epitel koji stvara zaštitnu podlogu da bi održao cjelovitost barijere i spriječio ulazak toksina.³⁶

5.2. Biološki odgovor oblića na postojanost mikro/nanoplastike u tlu

Znanstvenici kao najčešći testni organizam upotrebljavaju vrstu oblića *Caenorhabditis elegans*. Ona je rasprostranjena po cijelom svijetu, zadovoljava potrebne karakteristike da bi se upotrebljavala kao testni organizam za ekotoksikološka istraživanja različitih vrsta onečišćujućih tvari (mikotoksini, postojana organska onečišćivala) i upotrebljava se za procjenu biološke sigurnosti nanočestica.³⁷ Često upotrebljavani polimerni materijali za ispitivanje njihove ekotoksičnosti na oblice bili su PE, PP i PS, ali dostupni su i podaci za poli(etilen-tereftalat) (PET), polietilen visoke gustoće (HDPE) te kompozit polilaktid/poli(butilen adipat-ko-tereftalat) (PLA/PBAT). Dobiveni rezultati te upotrijebljene veličine i koncentracije navedenih polimera nalaze se u tablici 3.

Istraženo je da *C. elegans* može progutati kuglice PS-a te na taj način MP ulazi u hranidbenu mrežu tla i uzrokuje toksičnost na navedeni organizam. Posljedice izloženosti MP-u su inhibicija stope preživljavanja, smanjenje duljine tijela, utjecaj na reproduktivni sustav, oštećenje crijeva i oksidativni stres.³⁷ Yu i sur.³⁴ promatrali su fiziološke, bi-

okemijske i molekularne parametre za *C. elegans* nakon izloženosti mikročesticama PS-a. Naime, uočili su razne fiziološke promjene na *C. elegans* uz akumulaciju MP-a PS-a u probavnom sustavu *C. elegans*. Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji MP-PS-a od $100 \mu\text{g l}^{-1}$ uočena je povećana akumulacija lipofuscina te ekspresija gena koji su povezani s oksidativnim stresom te oštećenje probavnog sustava *C. elegans*.³⁴ Nadalje, oblici mogu progutati i akumulirati u svojim crijevima čestice MP-a veličine $1 - 5 \mu\text{m}$. Posljedica akumulacije MP-a bila je pojava oksidativnog stresa, što je rezultat neravnoteže između proizvodnje i detoksikacije reaktivnih spojeva kisika te hiperpermeabilno stanje crijeva gdje je protok crijeva veći od normalnog.³⁴ Utjecaj čestica MP-a PS-a veličine $1 - 5 \mu\text{m}$ na *C. elegans* ispitivali su i *Shang i sur.*,⁴⁰ te su pomoću fluorescentnog stereo mikroskopa dokazali kako je *C. elegans* progutala MP i da je MP bio prisutan u izlučenim fekalnim tvarima. Praćenje je bilo omogućeno zelenom fluorescencijom MP-a. Uočeno je gutanje čestica MP-PS-a 24, 48, 72 i 96 h nakon izlaganja. Životni vijek *C. elegans* ispitan je kod izloženosti MP-u koncentracijama od 0, $2,4 \cdot 10^7$, $2,4 \cdot 10^8$, $2,4 \cdot 10^9$ i $2,4 \cdot 10^{10}$ čestica/ m^2 . Rezultati pokazuju da je izloženost MP-u veličina $1 \mu\text{m}$ i $5 \mu\text{m}$ te koncentracije $2,4 \cdot 10^7$ čestica/ m^2 najviše smanjila životni ciklus oblića i to za čak 50 %. Ispitalo se funkcioniranje neurona koji stimuliraju crijevne mišiće tijekom ciklusa defekacije (izbacivanje fekalija) otpuštanjem gama-aminomaslačne kiseline (GABA). Vrijeme defekacije može se smanjiti ili povećati, ali nema velike razlike u usporedbi s oblicima koji nisu kontaminirani MP-om. Osim izlučivanja MP-a mišićnom kontrakcijom i izbacivanjem iz crijeva, ono se može provesti i ekskretornim stanicama, čija uloga uključuje osmotsku/ionsku regulaciju i eliminaciju otpada, analogno bubrežnom sustavu. Transkripcijska ekspresija analizirana je za pet gena povezanih sa životnim ciklusom i defekacijom u crijevnom traktu vrste *C. elegans*: *skn-1*, *mkk-4*, *pmk-1*, *cpr-1* i *itr-1*. Gen *skn-1* uključen je u detoksikaciju i regulaciju životnog vijeka oblića. Geni *mkk-4* i *pmk-1* sudjeluju u intestinalnom signalizacijskom putu, dok *cpr-1* i *itr-1* reguliraju funkciju crijeva oblića. Ekstrahirana je ukupna RNA te mjerena spektrofotometrom. Oblici izloženi MP-u veličine 1 i $5 \mu\text{m}$ koncentracija $2,4 \cdot 10^7$ i $2,4 \cdot 10^8$ čestica/ m^2 tijekom 72 h pokazali su razlike u ekspresiji gena za svih pet navedenih gena (tablica 4).

Utjecaj nešto manje veličine čestica MP-a PS-a, $0,042$ i $0,530 \mu\text{m}$ (42 i 530nm), na *C. elegans* ispitivali su *Kim i sur.*⁴¹ Jedinke *C. elegans* bile su izložene koncentracijama MP-PS-a u vrijednosti od $0,01$, $0,1$, 1 , 10 i 100mg kg^{-1} tla. Pokazano je da izloženost MP-u smanjuje broj potomaka oblića kod 10mg kg^{-1} za čestice od $0,530 \mu\text{m}$, te kod 100mg kg^{-1} za čestice veličine $0,042 \mu\text{m}$. Drugi znanstvenici, poput *Donga i sur.*³⁹ također su ispitivali utjecaj manjih čestica PS-a, za koje se može reći da su NP. Oni su došli do rezultata da PS-NP uzrokuje toksičnost funkcije motornih neurona, odnosno kretanja, dolazi do oksidativnog stresa i toksičnosti probavnog sustava, jer PS-NP ciljano djeluje na crijevne stanice oblića. *Shao i sur.*⁴³ uočili su da su signalni putevi vezani za kontrolu odgovora na PS-NP povezani s transkripcijskim faktorom *elt-2*. *Elt-2* je dominantni faktor transkripcije koji kontrolira diferencijaciju i funkciju crijeva *C. elegans* od embrija do odrasle jedinke. Dobiveni rezultati sugeriraju da ekspresija *elt-2* gena ovisi o koncentraciji PS-NP-a kojoj je izložen. U interakciji s nanočesticama

Tablica 4 – Prikaz djelovanja gena kod različitih uvjeta izloženosti oblića (koljeno Nematoda)⁴⁰

Table 4 – Representation of gene action under different exposure conditions of nematodes (phylum Nematoda)⁴⁰

Gen	Koncentracija / čestice/ m^2	Veličina čestica / μm	Djelovanje, ekspresija gena
<i>skn-1</i>	$2,4 \cdot 10^7$	1	smanjenje
		5	povećanje
	$2,4 \cdot 10^8$	1	smanjenje
		5	povećanje
<i>pmk-1</i>	$2,4 \cdot 10^7$	1	smanjenje
		5	smanjenje
	$2,4 \cdot 10^8$	1	povećanje
		5	povećanje
<i>mkk-4</i>	$2,4 \cdot 10^7$	1	povećanje
		5	povećanje
	$2,4 \cdot 10^8$	1	povećanje
		5	povećanje
<i>cpr-1, itr-1</i>	$2,4 \cdot 10^7$	1	smanjenje
		5	smanjenje
	$2,4 \cdot 10^8$	1	povećanje
		5	povećanje

PS-a proizvodi reaktivne oksidacijske tvari. Stoga dugotrajno izlaganje niskim dozama nanočestica PS-a izaziva aktivaciju intestinalnog *elt-2*, koji posreduje zaštitni odgovor protiv nanočestica PS-a održavanjem funkcionalnog stanja crijevne barijere. Promatrajući opisane štetne učinke mikro i nanočestica PS-a, pretpostavilo bi se da je njegov utjecaj među najtoksičnijima za oblice. Međutim, *Schöpfer i sur.*³⁷ pokazali su da štetni učinci ne ovise o vrsti MP-a kojoj je organizam izložen, već o njegovoj veličini i obliku čestica. Istraživanje su upotpunili ispitujući utjecaj LDPE i kompozita PLA/PBAT čije su koncentracije iznosile 1 , 10 i 100mg MP/l . Čestice MP-a veličine $1,3 - 5,1 \mu\text{m}$ oblik je mogao progutati. Rezultati su pokazali da oblici izložene djelovanju MP-a proizvode $4,6 - 22,9 \%$ manje potomaka i duljina tijela im je manja od oblića u kontrolnoj skupini. Zaključuje se da su nepravilni oblici MP-a toksičniji od onih sferičnog oblika, zbog veće specifične površine čestica MP-a. Nadalje, *Woong Kim i sur.*³⁸ proučavali su štetni učinak djelovanja mikročestica HDPE-a, PEZ-a, PP-a i PS-a na *C. elegans*. Veličina čestica MP-a nalazila se u rasponu od 250 do $1000 \mu\text{m}$, a koncentracija navedenih MP-a iznosila je $0,01$, $0,1$ i 1mas. \% . Kako je navedeno, *C. elegans* može progutati čestice MP-a veličine do $5 \mu\text{m}$, a u ovom istraživanju je veličinom čestica MP-a to izbjegnuto. Zaključuje se da aditivi u MP-u bitno doprinose njegovoj ekotoksičnosti, jer se mogu ispirati iz strukture. Aditivi su kemijske tvari koje se namjerno dodaju u strukturu plastičnih materijala da bi se postigla bolja svojstva. Posljedice izloženosti bile su smanjeni životni ciklus, manja duljina tijela i oštećenje crijeva. Osim štetnih utjecaja koje MP ima na oblice, po-

sljedice može osjetiti i cijeli ekosustav. Tako su Yang i sur.⁴⁴ pokazali da PP veličine 200 μm i koncentracije 0,5, 1 i 2 mas. % djeluje na metaboličke tragove oblića. Metabolički tragovi (otisci) važni su pokazatelji stanja ekosustava na koje ukazuju različite skupine oblića. Naime, različite skupine oblića pokreću kruženje biomase, metaboličku aktivnost i protok ugljika i energije u hranidbenim mrežama. Smanjuje se otisak organizama koji se hrane biljkama, bakterijama i gljivama, što ukazuje da je dodatak MP-a uvelike utjecao na kruženje hranjivih tvari i protok energije koji pokreću oblići u tlu. Istraživanje je dokazalo da se smanjuje brojnost ukupnih oblića, s iznimkom onih koji se hrane bakterijama. Taj neizravni pozitivni učinak na obliće koji se hrane bakterijama zbog povećanog unosa ugljika modulira izravni toksični učinak MP-a. Onečišćenje MP-om također je rezultiralo smanjenjem raznolikosti rodova oblića, a poznato je da veća raznolikost organizama u tlu potiče složenije hranidbene mreže i povećanu vjerojatnost da biljke razviju veze s korisnim zajednicama u tlu, da bi se obranile od napada biljojeda ili patogena.⁴⁵

6. Zaključak

Pregledom znanstvenih istraživanja utvrđeno je da MP/NP PE-a (niske i visoke gustoće), PP-a te PS-a uvelike doprinose toksičnosti. Rezultati su pokazali promjene u odgovorima biomarkera, gubitak težine, oštećenje reproduktivnog sustava, povećanje smrtnosti, negativnu reakciju probavnog i imunološkog sustava te oksidativno oštećenje gujavica pri najvećim koncentracijama i veličinama MP-a prisutnog u tlu. Uočeno je da MP/NP štetno djeluje na obliće s obzirom na njihov smanjen rast i reprodukciju, poremećaj u probavi, oksidativni stres i promjene u genima kao posljedice izloženosti oblića MP-u/NP-u. Međutim, štetni učinci neće ovisiti o vrsti MP-a/NP-a, već o njihovoj veličini, koncentraciji i obliku. Štetnije će djelovati plastične čestice manjih veličina, jer će ih oblići progutati i akumulirati u tijelu. Također, oblići su osjetljivi na prisutnost MP-a/NP-a, tako da će osjećati njegove štetne učinke već pri niskim koncentracijama. Povezanost oblića MP-a/NP-a i kako će o njemu ovisiti štetnost leži u velikoj specifičnoj površini fragmenata.

Ekotoksikološka istraživanja od suštinskog su značaja za razumijevanje utjecaja polimera plastike na životnu sredinu, uključujući tlo. Primjena organizama poput gujavica i oblića može biti ključna u očuvanju zemljišta, ali je važno najprije razumjeti kako plastika utječe na ekosistem prije nego što se poduzmu koraci za njezino rješavanje. Ekotoksikološke studije omogućavaju nam da procijenimo kako čestice plastike utječu na biljni, životinjski, ali i

mikrobni svijet u tlu. Te studije mogu ukazati na različite vrste toksičnih efekata, uključujući onesposobljavanje rasta

biljaka, poremećaj mikrobnih populacija ili akumulaciju toksina u hranidbenom lancu. Kad je riječ o gujavicama i obličima, ti biološki organizmi mogu imati ulogu u smanjenju onečišćenja plastikom. Primjerice, gujavice mogu poboljšati strukturu tla i povećati njegovu sposobnost zadržavanja vode, što može ublažiti neke negativne učinke plastičnih čestica u tlu. Oblići, također, mogu doprinijeti razgradnji čestica plastike kroz svoje aktivnosti razlaganja organske tvari. Međutim, ekotoksikološka istraživanja ključna su za utvrđivanje mogu li ti organizmi efikasno riješiti probleme uzrokovane akumulacijom plastičnih čestica u tlu ili postoji li potencijalna štetnost ili neželjeni učinci. Na primjer, moguće je da se neki od tih materijala ponašaju kao nosači toksina ili da doprinose akumulaciji određenih štetnih onečišćujućih tvari. U svakom slučaju, interdisciplinarnost između ekotoksikologije, agronomije i inženjerstva materijala ključna je za razvijanje održivih rješenja za problem plastike u tlu. To bi uključivalo testiranje različitih materijala, kao i praćenje njihovih dugoročnih učinaka na ekosustav tla da bi se osigurala primjena samo onih metoda koje su efikasne i sigurne za životnu sredinu.

Popis kratica

List of abbreviations

MP	– mikroplastika – microplastics
MP/NP	– mikroplastika i nanoplastika – microplastics and nanoplastics
nm	– nanometar – nanometer
NP	– nanoplastika – nanoplastics
PE	– polietilen – polyethylene
EC	– utjecajna koncentracija – effective concentration
EC ₅₀	– utjecajna koncentracija koja ima učinak na 50 % izložene populacije – effective concentration influencing 50 % of the exposed population
EC ₂₀	– utjecajna koncentracija koja ima učinak na 20 % izložene populacije – effective concentration influencing 20 % of the exposed population
PP	– polipropilen – polypropylene
PS	– polistiren – polystyrene
HDPE	– polietilen visoke gustoće – high density polyethylene
PLA/PBAT	– polilaktid/poli(butiran adipat-ko-terefalato) – polylactide/polybutylene adipate terephthalate

Literatura References

1. S. I. Pathan, P. Arfaioi, T. Bardelli, M. T. Ceccherini, P. Nanipieri, G. Pietramellara, Soil pollution from micro- and nanoplastic debris: a hidden and unknown biohazard, *Sustainability* **12** (2020) 7255, doi: <https://doi.org/10.3390/su12187255>.
2. L. S. Fendall, M. A. Sewell, Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers, *Mar. Pollut. Bull.* **58** (2009) 1225–1228, doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.04.025>.
3. N. L. Hartline, N. J. Bruce, S. N. Karba, E. O. Ruff, S. U. Sonar, P. A. Holden, Microfiber masses recovered from conventional machine washing of new or aged garments, *Environ. Sci. Technol.* **50** (2016) 11532–11538, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03045>.
4. Y. Huang, Q. Liu, W. Jia, C. Yan, J. Wang, Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment, *Environ. Pollut.* **260** (2020) 114096, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114096>.
5. N. Weithmann, J. N. Möller, M. G. J. Löder, S. Piehl, C. Laforsch, R. Freitag, Organic fertilizer as a vehicle for the entry of microplastic into the environment, *Sci. Adv.* **4** (2018) 1–8, doi: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aap8060>.
6. J. Peccia, P. Westerhoff, We should expect more out of our sewage sludge, *Environ. Sci. Technol.* **49** (14) (2015) 8271–8276, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01931>.
7. D. He, Y. Luo, S. Lu, M. Liu, Y. Song, L. Lei, Microplastics in soils: analytical methods, pollution characteristics and ecological risks, *Trends Anal. Chem.* **109** (2018) 163–172, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.006>.
8. J. Hou, X. Xu, L. Lan, L. Miao, Y. Xu, G. You, Z. Liu, Transport behavior of micro polyethylene particles in saturated quartz sand: Impacts of input concentration and physicochemical factors, *Environ. Pollut.* **263** (2020) 114499, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114499>.
9. E. Yousif, R. Haddad, Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: review, *Springer-Plus* **2** (2013) 398, doi: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-398>.
10. J. Liu, T. Zhang, L. Tian, X. Liu, Z. Qi, Y. Ma, W. Chen, Aging significantly affects mobility and contaminant-mobilizing ability of nanoplastics in saturated loamy sand, *Environ. Sci. Technol.* **53** (2019) 5801–5815, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00787>.
11. A. A. de Souza Machado, C. W. Lau, J. Till, W. Kloas, A. Lehmann, R. Becker, M. C. Rillig, Impacts of microplastics on the soil biophysical environment, *Environ. Sci. Technol.* **52** (2018) 9656–9665, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02212>.
12. X. Wu, X. Lyu, Z. Li, B. Gao, X. Zeng, J. Wu, Y. Sun, Transport of polystyrene nanoplastics in natural soils: Effect of soil properties, ionic strength and cation type, *Sci. Total Environ.* **707** (2020) 136065, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136065>.
13. X. Zhang, Y. Li, D. Ouyang, J. Lei, Q. Tan, L. Xie, Z. Li, T. Liu, Y. Xiao, T. H. Farooq, X. Wu, L. Chen, W. Yan, Systematical review of interactions between microplastics and microorganisms in the soil environment, *J. Hazard. Mater.* **418** (2021) 126288, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126288>.
14. M. C. Rillig, L. Ziersch, S. Hempel, Microplastic transport in soil by earthworms, *Sci. Rep.* **7** (2017) 1362, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01594-7>.
15. L. Pfiffner, Earthworms – architects of fertile soils, *FiBL* **1629** (2022) 1–12, doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6670157>.
16. S. Guo, Q. Wang, Z. Li, Y. Chen, H. Li, J. Zhang, X. Wang, J. Liu, B. Cao, G. Zou, B. Zhang, M. Zhao, Ecological risk of microplastic toxicity to earthworms in soil: A bibliometric analysis, *Front. Environ. Sci.* **11** (2023) 1126847, doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2023.1126847>.
17. W. Sun, Z. Meng, R. Li, R. Zhang, M. Jia, S. Yan, S. Tian, Z. Zhou, W. Zhu, Joint effects of microplastic and dufulin on bioaccumulation, oxidative stress and metabolic profile of the earthworm (*Eisenia fetida*), *Chemosphere* **263** (2021) 128171, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128171>.
18. M. T. Prendergast-Miller, A. Katsiamides, M. Abbass, S. R. Sturzenbaum, K. L. Thorpe, M. E. Hodson, Polyester-derived microfibre impacts on the soil-dwelling earthworm *Lumbricus terrestris*, *Environ. Pollut.* **251** (2019) 453–459, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.037>.
19. B.-K. Zhu, Y.-M. Fang, D. Zhu, P. Christie, X. Ke, Y.-G. Zhu, Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*, *Environ. Pollut.* **239** (2018) 408–415, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.017>.
20. J. I. Kwak, Y.-J. An, Microplastic digestion generates fragmented nanoplastics in soils and damages earthworm spermatogenesis and coelomocyte viability, *J. Hazard. Mater.* **402** (2021) 124034, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124034>.
21. J. C. Sanchez-Hernandez, Y. Capowicz, K. S. Ro, Potential use of earthworms to enhance decaying of biodegradable plastics, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **8** (2020) 4292–4316, doi: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05450>.
22. H. Lwanga, H. Gertsen, H. Gooren, P. Peters, T. Salánki, M. van der Ploeg, E. Besseling, A. A. Koelmans, V. Geissen, Microplastics in the terrestrial ecosystem: Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae), *Environ. Sci. Technol.* **50** (2016) 2685–2691, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05478>.
23. A. Rodríguez-Seijo, J. Lourenço, T. A. P. Rocha-Santos, J. da Costa, A. C. Duarte, H. Vala, R. Pereira, Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché, *Environ. Pollut.* **220** (2017) 495–503, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.092>.
24. Y. Zhou, X. Liu, J. Wang, Ecotoxicological effects of microplastics and cadmium on the earthworm *Eisenia foetida*, *J. Hazard. Mater.* **392** (2020) 122273, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122273>.
25. H. Lwanga, H. Gertsen, H. Gooren, P. Peters, T. Salánki, M. van der Ploeg, E. Besseling, A. A. Koelmans, V. Geissen, Incorporation of microplastics from litter into burrows of *Lumbricus terrestris*, *Environ. Pollut.* **220** (2017) 523–531, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.096>.
26. A. Rodríguez-Seijo, J. P. da Costa, T. Rocha-Santos, A. C. Duarte, R. Pereira, Oxidative stress, energy metabolism and molecular responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25** (2018) 33599–33610, doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3317-z>.
27. X. Jiang, Y. Chang, T. Zhang, Y. Qiao, G. Klobučar, M. Li, Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (*Eisenia fetida*), *Environ. Pollut.* **259** (2020) 113896, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113896>.
28. M. Li, Y. Liu, G. Xu, Y. Wang, Y. Yu, Impacts of polyethylene microplastics on bioavailability and toxicity of metals in soil, *Sci. Total Environ.* **760** (2021) 144037, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144037>.
29. Z. Sobhani, C. Fang, R. Naidu, M. Megharaj, Microplastics as a vector of toxic chemicals in soil: Enhanced uptake of

- perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid by earthworms through sorption and reproductive toxicity, *Environ. Technol. Innov.* **22** (2021) 101476, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101476>.
30. P. J. Bolton, J. Phillipson, Burrowing, feeding, egestion and energy budgets of *Allolobophora rosea* (Savigny) (Lumbricidae), *Oecologia* **23** (1976) 225–245, doi: <https://doi.org/10.1007/BF00361238>.
31. S. Khaldoon, J. Lalung, U. Maheer, M. A. Kamaruddin, M. F. Yhaya, E. S. Alsolami, H. S. Alorfi, M. A. Hussein, M. Rafatul-lah, A review on the role of earthworms in plastics degradation: Issues and challenges, *Polym. J.* **14** (2022) 4770, doi: <https://doi.org/10.3390/polym14214770>.
32. Q. Zhou, Y. Xiang, D. Li, X. Luo, J. Wu, Global patterns and controls of soil nematode responses to nitrogen enrichment: A meta-analysis, *Soil Biol. Biochem.* **163** (2021) 108433, doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108433>.
33. D. Hillel, Nematodes, u D. Hilel (ur.), *Encyclopedia of soils in the environment*. Vol. 1, Academic Press, 2004, str. 1–5.
34. Y. Yu, H. Chen, X. Hua, Y. Dang, Y. Han, Z. Yu, X. Chen, P. Ding, H. Li, Polystyrene microplastics (PS-MPs) toxicity induced oxidative stress and intestinal injury in nematode *Caenorhabditis elegans*, *Sci. Total. Environ.* **726** (2020) 138679, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138679>.
35. Z. Ji, Y. Huang, Y. Feng, A. Johansen, J. Xue, L. A. Tremblay, Z. Li, Effects of pristine microplastics and nanoplastics on soil invertebrates: A systematic review and meta-analysis of available data, *Sci. Total. Environ.* **788** (2021) 147784, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147784>.
36. M. Ren, L. Zhao, X. Ding, N. Krasteva, Q. Rui, D. Wang, Developmental basis for intestinal barrier against the toxicity of graphene oxide, *Part. Fibre Toxicol.* **1** (2018) 15–26, doi: <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0262-4>.
37. L. Schöpfer, R. Menzel, U. Schnepf, L. Ruess, S. Marhan, F. Brümmer, H. Pagel, E. Kandeler, Microplastics effects on reproduction and body length of the soil-dwelling nematode *Caenorhabditis elegans*, *Front. Environ.* **8** (2020) 8–41, doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00041>.
38. S. W. Kim, W. R. Waldman, T. Kim, M. C. Riling, Effects of different microplastics on nematodes in the soil environment: tracking the extractable additives using an ecotoxicological approach, *Environ. Sci. Technol.* **54** (2020) 13868–13878, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04641>.
39. S. Dong, M. Qu, Q. Rui, D. Wang, Combinational effect of titanium dioxide nanoparticles and nanopolystyrene particles at environmentally relevant concentrations on nematode *Caenorhabditis elegans*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **161** (2018) 444–450, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.021>.
40. X. Shang, J. Lu, C. Feng, Y. Ying, Y. He, S. Fang, Y. Lin, R. Daglgren, J. Ju, Microplastic (1 and 5 µm) exposure disturbs lifespan and intestine function in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *Sci. Total. Environ.* **705** (2020) 135837, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135837>.
41. S. W. Kim, D. Kim, S. W. Jeong, Y. J. An, Size-dependent effects of polystyrene plastic particles on the nematode *Caenorhabditis elegans* as related to soil physicochemical properties, *Environ. Pollut.* **258** (2020) 113740, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113740>.
42. L. Lei, M. Liu, Y. Song, S. Lu, J. Hu, J. Cao, Polystyrene (nano) microplastics cause size-dependent neurotoxicity, oxidative damage and other adverse effects in *Caenorhabditis elegans*, *Environ. Sci.* **5** (2018) 2009–2020, doi: <https://doi.org/10.1039/C8EN00412A>.
43. H. Shao, D. Wang, Long-term and low-dose exposure to nanopolystyrene induces a protective strategy to maintain functional state of intestine barrier in nematode *Caenorhabditis elegans*, *Environ. Pollut.* **258** (2020) 113649, doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113649>.
44. B. Yang, P. Li, W. Entemake, Z. Guo, S. Xue, Concentration-dependent impacts of microplastics on soil nematode community in bulk soils of maize: evidence from a pot experiment, *Front. Environ. Sci.* **10** (2022) 872898, doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.872898>.
45. M. Delgado-Baquerizo, J. R. Powell, K. Hamonts, F. Reith, P. Mele, M. V. Brown, Circular linkages between soil biodiversity, fertility and plant productivity are limited to topsoil at the continental scale, *New Phytol.* **215** (2017) 1186–1196, doi: <https://doi.org/10.1111/nph.14634>.

SUMMARY

Evaluation of the Ecotoxicity of Microplastics and Nanoplastics on Earthworms (Annelid Worm, Annelida) and Nematodes (Nematoda) in Soil

*Ema Čemerika, Andrea Knežević, Dora Milički, and Martina Miloloža**

It is common knowledge that plastic pollution has become one of the foremost environmental problems worldwide. Despite the increasing rates in plastic products recycling, the majority of plastic still finds its way unchecked into the environment. Plastic in itself poses no substantial threat to ecosystems, unlike its degraded components, microplastics (MP) and nanoplastics (NP), which are more reactive and easier to transport due to their reduced size. In recent years, the increasing demand, production, and utilisation of products originally manufactured in the form of MP and NP have further exacerbated the pollution problem. Once released, MPs and NPs tend to accumulate more in terrestrial ecosystems than in aquatic environments, an area that has been researched more comprehensively. Consequently, the degraded components of plastic accumulate within soil-dwelling organisms, which can then further break them down (degrade) through their metabolism. The aim of this study was to provide an overview of the ecotoxicity of MP and NP specifically on earthworms, as representatives of the phylum annelid worm (Annelida), and on nematodes (phylum Nematoda), the two most prevalent groups of soil-dwelling invertebrates. Research into the effects of MP and NP on earthworms has so far been conducted on the species *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei*, and *Lumbricus terrestris*, with the species *Caenorhabditis elegans* serving as a representative nematode species. These organisms were exposed to polyethylene (PE), polystyrene (PS), and polypropylene (PP) particles of varying sizes and concentrations. The results of numerous studies on the harmful effects of these polymeric materials on earthworms and nematodes were measured by testing for inhibition of survival and growth rate, showing significant body weight loss, along with damage to the digestive system, and oxidative stress.

Keywords

Microplastics, nanoplastics, soil, ecotoxicity, earthworms, nematodes

*University of Zagreb Faculty of Chemical
Engineering and Technology, Trg Marka
Marulića 19, 10 000 Zagreb, Croatia*

Review
Received October 5, 2023
Accepted February 24, 2024