

Dziedzina nauki przyrodnicze Dyscyplina nauki biologiczne

## mgr Michał Szkudlarek

## Zanieczyszczenia mikroplastikiem płazów (Amphibia) w Polsce Zachodniej

Microplastic Contamination of Amphibians in Western Poland

Opieka naukowa nad przygotowaniem rozprawy doktorskiej: Promotor: dr hab. Bartłomiej Najbar, prof. UZ

Rozprawę akceptuję: .....

.....

Zielona Góra 2024

## Spis treści:

1.	Streszczenie1
2.	Summary4
3.	Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie7
4.	Wstęp
4.1.	Mikroplastik10
4.1.1	1. Typologia mikroplastików13
4.1.2	2. Mikroplastik w środowisku wodnym i jego wpływ na organizmy15
5.	Cele
6.	Materiały i metody
6.1.	Teren badań19
6.2.	Pobór prób
6.2.1	1. Larwy płazów31
6.2.1	1.1. Gatunki ujęte w badaniach
6.2.2	2. Woda
6.2.3	3. Osad denny
6.3.	Analiza prób
6.3.1	I. Pomiary larw płazów
6.3.2	2. Ekstrakcja drobin mikroplastiku
6.3.2	2.1. Larwy płazów
6.3.2	2.2. Woda
6.3.2	2.3. Osad denny
6.3.3	3. Analiza ilościowa, morfometryczna i chromatyczna mikroplastików
6.3.4	4. Walidacja i analiza jakościowa mikroplastików41
6.4.	Analiza przestrzenna stanowisk poboru prób42
6.5.	Analiza statystyczna42
6.5.1	1. Obciążenie mikroplastikiem larw płazów42
6.5.2	2. Zróżnicowanie typów morfologicznych mikroplastiku w larwach płazów44
6.5.3	3. Długość i pole powierzchni drobin mikroplastiku wyizolowanych z larw płazów45
6.5.4	4. Analiza podobieństw ANOSIM
6.5.5	5. Analiza Indicator Species Analysis (ISA)48
6.5.6 osad	<ol> <li>Podobieństwa w profilach zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów, wód i lów dennych</li></ol>

7. '	Wyniki	50
7.1.	Pomiary stadiów larwalnych płazów	50
7.2.	Obciążenie mikroplastikiem larw płazów	51
7.3.	Typy morfologiczne mikroplastików w larwach płazów	55
7.4.	Długość drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z larw płazów	61
7.5.	Pole powierzchni drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z larw płazów	65
7.6.	Kolory mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów	69
7.7.	Skład chemiczny drobin wyekstrahowanych z larw płazów	71
7.8.	Charakterystyka mikroplastiku wyekstrahowanego z wód i osadów dennych	73
7.9. osado	Podobieństwa w profilach zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów, wód i ów dennych	77
8. ]	Dyskusja	79
8.1.	Powszechność zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów	79
8.2. larwa	Czynniki wpływające na ilość mikroplastików i zróżnicowanie ich kształtów w nch płazów	79
8.3.	Typy morfologiczne mikroplastiku w larwach płazów	81
8.4.	Długość drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z larw płazów	82
8.5.	Pole powierzchni drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z larw płazów	82
8.6.	Kolory mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów	84
8.7.	Skład chemiczny drobin wyekstrahowanych z larw płazów	85
8.8.	Mikroplastik w wodach i osadach dennych	86
8.9. osado	Podobieństwa w profilach zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów, wód i ów dennych	87
8.10.	Ograniczenia i perspektywy	87
9. 1	Podsumowanie	
10.	Wnioski	91
11.	Bibliografia	92
12.	Załaczniki	
12.1	Załacznik 1. Zezwolenie Regionalnej Dyrekcji Ochrony Środowiska	107
12.1.	Załącznik 2. Oświadczenia autorów	114
12.2.	Załącznik 3. Snis rycin	120
12.5.	Załącznik 4. Spis tybu	120
1 20 r ·	Luquezinit il opio movinini internationali internat	•••

#### 1. Streszczenie

Płazy (Amphibia) są niezwykle istotnymi elementami ekosystemów. Kontrolują one liczebność populacji owadów, stanowiąc także bioindykatory stanu środowiska naturalnego. Niemniej od lat na całym świecie obserwowany jest drastyczny spadek liczebności przedstawicieli tej gromady, za co odpowiadają między innymi czynniki takie jak degradacja siedlisk, zmiany klimatu czy zawleczenia patogenów powodujących choroby infekcyjne. Z drugiej strony, kwestia wszechobecnego zanieczyszczenia środowiska naturalnego mikroplastikiem również skupia na sobie uwagę badaczy ze względu na niepoznane jeszcze do końca zagrożenia ze strony tej względnie nowej klasy polutantów. Mikroplastiki, czyli miniaturowe drobiny plastiku, mogą pochodzić z wielu różnych źródeł. Mają zatem różne kształty, kolory, rozmiary i skład chemiczny. Gdy znajdują się w środowisku wodnym, na przykład zawieszone w toni lub jako składnik osadów dennych, stanowią zagrożenie dla żyjących tam organizmów, zwłaszcza ze względu na skutki ich połknięcia. Szczególnie narażone są płazy, a zwłaszcza ich wrażliwe stadia larwalne. Konsekwencje zanieczyszczenia środowiska mikroplastikiem są wielopoziomowe. Na poziomie molekularnym obserwuje się np. desorpcję toksyn. Na poziomie osobniczym, może dochodzić do zmian dotyczących behawioru, histologii, morfologii czy funkcjonowania układu odpornościowego. Na poziomie ekosystemu z kolei, zanieczyszczenie mikroplastikiem może skutkować zaburzeniem struktury siedlisk i procesów biogeochemicznych.

Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów oraz ich siedlisk zlokalizowanych w województwie lubuskim. Dokonano ekstrakcji drobin mikroplastiku z osadów dennych, wód oraz martwych (wyschniętych) larw płazów pobranych z 23 stanowisk (oczka wodne, rowy, kałuże), położonych w gradiencie antropopresji. Łącznie przeanalizowano 934 larwy należące do 10 gatunków. Wśród nich był kumak nizinny (*Bombina bombina*) (Bombinatoridae), trzy gatunki traszek (Salamandridae), trzy gatunki ropuch (Bufonidae) oraz trzy gatunki żab (Ranidae) – w tym ujęte łącznie żaby z kompleksu żab zielonych (*Pelophylax esculentus* complex). Za wskaźnik antropopresji dla każdego ze stanowisk przyjęto procentowy udział powierzchni zurbanizowanej w obrębie okrągłego bufora o promieniu 1 km. W niektórych analizach statystycznych uwzględniono także, otrzymany również w GIS (systemie informacji geograficznej), procentowy udział powierzchni rolnej w obrębie buforów. Badania drobin mikroplastiku objęły ustalenie ich koloru, kształtu (typu morfologicznego), zmierzenie ich długości w najszerszym miejscu, ich pola powierzchni oraz przeanalizowanie składu chemicznego. Ostatniej z wymienionych analiz poddano reprezentatywną część drobin i wykorzystano do tego spektroskopię osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ATR-FTIR). Otrzymane w jej wyniku widma próbek porównano z widmami referencyjnymi pochodzącymi z bibliotek spektralnych. Zróżnicowanie kształtów mikroplastików w każdym osobniku wyrażono za pomocą wskaźnika Levina. Analizy statystyczne obejmowały m.in. analizę głównych składowych, model regresji o ujemnym rozkładzie dwumianowym z efektami mieszanymi, test chikwadrat dobroci dopasowania, testy post-hoc, analizę podobieństw ANOSIM oraz analizę wielowzorcową *Indicator Species Analysis*.

Wyniki badań wykazały, że zanieczyszczenie mikroplastikiem larw płazów jest powszechne (73% osobników). Najwyższy stopień zanieczyszczenia stwierdzono u kijanek ropuch (Bufonidae). Co warte zaznaczenia, odkryto że drapieżne larwy płazów (larwy traszek) są w zauważalnie mniejszym stopniu zanieczyszczone mikroplastikiem niż wszystkożerne larwy płazów (kijanki), nawet jeśli zasiedlają ten sam zbiornik wodny. Zarówno na stopień zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów, jak i na zróżnicowanie kształtów mikroplastików, dodatnio wpływało nasilenie antropopresji na stanowisku poboru próby. Jest to prawdopodobnie pierwsze badanie dowodzące tej prawidłowości. Na zróżnicowanie kształtów miała wpływ także przynależność taksonomiczna osobników.

Najczęściej stwierdzanym kształtem wśród drobin mikroplastiku wyizolowanych z larw płazów było włókno. Najczęściej stwierdzanym kolorem i polimerem był kolor niebieski i polietylen. Włókna były najdłuższe ze wszystkich wyróżnionych w badaniu kształtów mikroplastiku, tj. były dłuższe niż płatki, fragmenty i granulki. Pole powierzchni granulek było największe. Odnotowano także różnice pod względem wielkości pola powierzchni mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów należących do różnych jednostek taksonomicznych (rodzin). Kolejną interesującą prawidłowością odkrytą w toku niniejszych badań była dodatnia korelacja między rozmiarem (wielkością) larw płazów, a długością oraz polem powierzchni obecnych w nich mikroplastików mających formę granulek i płatków. Z drugiej strony, odnotowano negatywną korelację między długością i wielkością pola powierzchni mikroplastików o tych kształtach, a nasileniem antropopresji.

Wyniki analiz mikroplastików wyizolowanych z próbek wody wykazały, że najczęściej identyfikowanym kształtem, kolorem oraz typem polimeru było odpowiednio: fragment, kolor biały oraz polipropylen. Dla mikroplastików wyekstrahowanych z próbek osadów dennych było to odpowiednio: włókno, kolor niebieski oraz poli(etylen-propylen).

Sprawdzono, czy w obrębie stanowisk występuje zgodność pod względem kształtów, kolorów oraz składu chemicznego drobin mikroplastiku, które wyekstrahowano z larw płazów, wody oraz osadu dennego. Przeprowadzona w tym celu analiza statystyczna wykazała istotne podobieństwa pod względem kształtów i kolorów mikroplastików pochodzących z wody i larw płazów pobranych na tym samym stanowisku. Podobieństwa takie, choć słabiej zaznaczone, stwierdzono również między drobinami wyizolowanymi z osadów dennych oraz z larw płazów. Niemniej jednak jeśli chodzi o skład chemiczny, nie wykazano pod tym względem statystycznie istotnych podobieństw między mikroplastikami pochodzącymi z różnych elementów tego samego stanowiska.

Wyniki badań stanowią istotny wkład w ekotoksykologię siedlisk płazów. Podkreślają one złożone zależności miedzy działalnościa człowieka, а zanieczyszczeniem mikroplastikiem ekosystemów słodkowodnych i zamieszkujących je stadiów larwalnych płazów. Zaobserwowana zgodność w obrębie stanowiska pod względem kształtów i kolorów mikroplastików wyekstrahowanych z wody i larw płazów wskazuje na to, że organizmy te połykają mikroplastik z wody. Zwraca to uwagę na wzajemne powiązania w obrębie ekosystemów słodkowodnych. Wyniki badań wskazuja na potrzebe opracowania nowych strategii ochrony środowiska, które będą uwzględniać zanieczyszczenie siedlisk mikroplastikiem. Podkreślają równocześnie konieczność prowadzenia dalszych badań w celu lepszego zrozumienia długoterminowego wpływu tych zanieczyszczeń na ekosystemy słodkowodne i biologię gatunków chronionych.

#### 2. Summary

Amphibians are vital components of global biodiversity and fulfill diverse ecological roles, including controlling insect population, being part of the food chain themselves and serving as environmental health indicators. Therefore, it is very concerning that amphibian populations are in rapid decline worldwide, which is generally attributed to factors such as habitat loss, environmental pollution, climate change and emerging diseases. Concurrently, the issue of pervasive microplastic pollution has gained prominence due to its potential to affect aquatic ecosystems in many not yet understood ways. Microplastics, miniature plastic particles, originating from a plethora of sources, understandably exhibit various shapes, colors, sizes, and chemical compositions. When present in aquatic environments, for example suspended in the water column or as a component of sediments, microplastics pose risks to aquatic biota. Amphibians, particularly their vulnerable larval stages, are especially susceptible. The impact of environmental microplastic pollution is multi-layered. On a molecular level, effects like desorption of toxins and disruption of physiology are observed. At the individual level, after ingestion of microplastics, changes in behavior, morphology, or the immune system may occur. Finally, at the ecosystem level, microplastic pollution can lead to disruption of habitat structure or biogeochemical processes.

This PhD dissertation focuses on microplastic pollution of amphibian habitats located within the Lubusz Voivodeship. Microplastics were extracted from bottom sediments, surface water, and dead (desiccated) amphibian larvae collected in 23 sampling sites. These sites were all small inland water bodies, including ponds, puddles, and ditches. The sites experienced various levels of human impact (anthropopressure). In total, 934 amphibian larvae belonging to ten different species were collected and analyzed. These were: Bombina bombina (Bombinatoridae), three newt (Salamandridae) species, three toad (Bufonidae) species, three frog (Ranidae) species – including water frogs (the *Pelophylax esculentus* complex, grouped together). In order to extract possible microplastics, each specimen was individually digested with  $H_2O_2$ . To measure the human impact (anthropopressure) at each sampling site, the proportion of artificially modified land cover within a one-kilometer radius buffer was calculated. This category of land cover included urban fabric, industrial and commercial units, mines, construction sites, and artificial non-agricultural vegetated areas. Moreover, in some statistical analyses, the share of agricultural land cover within the buffers was also considered. Both types of spatial analyses were conducted with a Geographic Information System. Microplastic analyses involved determining their shape (morphological type), color,

measuring their length in the longest diameter, their surface area, and analyzing their chemical composition. The latter encompassed a representative subset of the particles and employed ATR-FTIR spectroscopy. The spectra obtained from the samples were compared against reference spectra from spectral libraries. In order to calculate the diversity of shapes of bioaccumulated microplastics, Levin's index was used. Statistical analyses included several different methods. These encompassed principal component analysis, a mixed-effects negative binomial regression model, a chi-square goodness-of-fit test, post-hoc tests, ANOSIM and multipattern analysis (Indicator Species Analysis).

The study found that microplastic pollution is prevalent among amphibian larvae (found in 73% of specimens). Of the studied amphibian families, toad (Bufonidae) tadpoles were the most polluted. Importantly, carnivorous amphibian larvae (Caudata larvae) were significantly less polluted than omnivorous amphibian larvae (Anura larvae), even if they inhabited the same water body. Both the number of microplastic particles and the diversity of their shapes in amphibian larvae were positively correlated with anthropopressure of a sampling site. To the best of my knowledge, this is the first study to prove that pattern. The diversity of microplastics' shapes was also influenced by species identity.

Among the microplastics extracted from amphibian larvae, fiber was the most common shape, blue was the most common color, while polyethylene turned out to be the most often identified synthetic polymer making up the particles. Fibers were found to be on average longer than any other shape of particle distinguished in the study, which means that they were longer than flakes, fragments and granules. Granules had the biggest surface area. Moreover, a statistically significant difference in the surface area of microplastics was noted between the different amphibian families. Another interesting pattern discovered in the course of this study was a positive correlation between the size of amphibian larvae, and both the length and the surface area of flake-shaped and granule-shaped microplastics. On the other hand, a negative correlation was found between anthropopressure and the same microplastics' characteristics.

The results of the analyses of microplastics extracted from surface water samples showed that the most often identified shape, color, and polymer were fragment, white, and polypropylene, respectively. For the particles extracted from bottom sediment samples, it was fiber, blue and poly(ethylene-propylene), respectively. Within-site similarities in shape, color, and polymer type of microplastics extracted from amphibian larvae, bottom sediments, and surface water were evaluated. Analyses revealed statistically significant similarities in shapes and colors between microplastics from water and those from amphibian larvae. Similar congruence, although less pronounced, was also observed between microplastics extracted from bottom sediments and amphibian larvae. However, the chemical composition (polymer type) of microplastics from water, sediment, and amphibian larvae did not exhibit any similarities beyond what would be expected by chance.

Results of the study, by clarifying intricate relationships between anthropopressure and microplastic pollution, significantly contribute to our knowledge of the ecotoxicology of small inland water bodies. The observed within-site similarities of microplastic profiles of those extracted from water and amphibian larvae suggest that these organisms primarily ingest microplastics from water rather than from bottom sediments. All these findings emphasize the interconnectedness within small inland water bodies and highlight the need to develop comprehensive strategies for preventing and mitigating microplastic pollution in the habitats of protected species. Lastly, these findings highlight the urgent need for additional research to fully understand the long-term impacts of these pollutants on freshwater ecosystems and biology of protected species.

#### 3. Wykaz skrótów stosowanych w rozprawie

ATR – Attenuated Total Reflectance (spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni)

- Bb ropucha szara Bufo bufo
- BFR Brominated Flame Retardants (bromowane opóźniacze spalania)
- Bob kumak nizinny Bombina bombina

BPA – bisfenol A

- Bv ropucha zielona Bufotes viridis
- cz.d.a. czysty do analiz

DenDf - Denominator Degrees of freedom (liczba stopni swobody mianownika)

- df Degrees of Freedom (liczba stopni swobody)
- Ec ropucha paskówka Epidalea calamita

FTIR – Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera)

- GIS Geographic Information System (system informacji geograficznej)
- GPS Global Positioning System
- Ia traszka górska Ichthyosaura alpestris

ISA – Indicator Species Analysis (analiza gatunków wskaźnikowych)

- LRT statystyka testu Likelihood Ratio Test (testu ilorazu wiarygodności)
- Lv traszka zwyczajna Lissotriton vulgaris
- MP mikroplastik
- NumDf Numerator Degrees of freedom (liczba stopni swobody licznika)
- PCA Principal Component Analysis (analiza głównych składowych)
- Pec żaby z kompleksu żab zielonych Pelophylax esculentus complex

- Pr(>F) wartość p dla statystyki F
- Ra żaba moczarowa Rana arvalis
- Rt żaba trawna *Rana temporaria*
- SD Standard Deviation (odchylenie standardowe)
- SE Standard Error (błąd standardowy)
- Tc traszka grzebieniasta Triturus cristatus
- v/v stężenie objętościowe

#### 4. Wstęp

Na konferencji Organizacji Narodów Zjednoczonych jako główne zagrożenia dla bioróżnorodności wymieniono: zmiany klimatyczne, wpływ gatunków inwazyjnych, niekorzystne zmiany użytkowania terenu, nadmierną eksploatację zasobów i zanieczyszczenie środowiska (Secretariat of the Convention on Biological Diversity 2021). Badania nad zanieczyszczeniem środowiska dotychczas skupiały się głównie na klasycznych polutantach, takich jak nawozy i pestycydy (López-Rojo i in. 2023). Obecnie jednak coraz więcej uwagi poświęca się "nowszym" rodzajom zanieczyszczeń – nanomateriałom czy plastikowi (np. Salla i in. 2024).

Plastikiem określa się syntetyczny lub półsyntetyczny hydrofobowy materiał zbudowany z polimerów, wykazujący zwykle niską gestość i masę. Polimery produkowane są z monomerów w wyniku polimeryzacji – przede wszystkim poliaddycji lub polikondensacji. Najczęściej wykorzystywanym typem polimeru do produkcji plastiku jest polietylen (PE; 26,3%) oraz polipropylen (PP; 18,9%) (PlasticsEurope 2023). Razem z polimerem, tworzywo sztuczne często współtworzą dodatki, np.: środki adhezyjne, stabilizatory, antyelektrostatyki, antypireny, a także plastyfikatory. Dzięki ogromnym możliwościom modyfikacji właściwości plastiku oraz stosunkowo niskim kosztom produkcji (Wąsowski i Bogdanowicz 2020), plastik znajduje wiele zastosowań. Obecnie jest to trzeci najczęściej produkowany materiał na świecie, zaraz po cemencie i stali (Rangel-Buitrago i in. 2022). W Polsce plastik wykorzystywany jest przede wszystkim do produkcji opakowań (34% zapotrzebowania) oraz w budownictwie (19%) (PlasticsEurope Polska 2022). W 2016 r. jego roczna globalna produkcja osiągnęła 335 milionów ton (PlasticsEurope 2017), a wzrastając rokrocznie o 10%, masa plastiku przekracza aktualnie łączną masę wszystkich zwierząt (Elhacham i in. 2020). Między innymi przez to, tworzywa sztuczne uznawane są za znak rozpoznawczy antropocenu (Porta 2021) – proponowanej nowej epoki geologicznej, która nie została jeszcze jednak formalnie uznana przez Międzynarodową Komisję Stratygrafii (Santos i in. 2022).

Plastik stanowi równocześnie najczęstszy rodzaj powstających w wyniku działalności człowieka odpadów (Bergmann i in. 2015). Jedynie 9% z nich poddawanych jest recyklingowi, a około 80% przedostaje się do środowiska (Evode i in. 2021). Konwencjonalne tworzywa sztuczne charakteryzuje wysoka wytrzymałość, zatem biorąc pod uwagę fakt, że zasadniczo nie ulegają one biodegradacji, stanowią wyjątkowo trwałe polutanty (Wąsowski i Bogdanowicz 2020). Dodatkowo, niska gęstość sprzyja przenoszeniu

ich przez wiatr i wodę. Przyczynia się to do powstawania "pułapek ekologicznych" wobec małych zwierząt (Kolenda i in. 2022) oraz wpływa na zmiany klimatu Ziemi (Sharma i in. 2023). Ponadto plastikowe odpady bywają wykorzystywane przez ptaki i ssaki do budowy gniazd i nor (Blettler i Mitchell 2021, Ayala i in. 2023). Stwierdzono je także w bocianich wypluwkach z Polski (Mikula i in. 2024). Przede wszystkim jednak, z przedostawaniem się plastiku do środowiska naturalnego wiąże się rosnące zanieczyszczenie mikroplastikiem akwenów, co postrzegane jest jako bardzo niepokojące globalne zjawisko (Eriksen i in. 2023).

#### 4.1. Mikroplastik

Mikroplastikiem (MP) określa się drobiny plastiku o wymiarach od 1 µm do 5 mm, mające różne kształty, kolory i skład chemiczny (Frias i Nash 2018), zawsze będące jednak w temperaturze pokojowej ciałem stałym. Ich obecność w środowisku była opisywana już w latach 1970 (Carpenter i in. 1972). Mikroplastik jako polutant jest wszechobecny, występując w środowisku naturalnym nawet w miejscach dzikich, odludnych i niedostępnych (np. Bergmann i in. 2015, Iannella i in. 2020, Godoy i in. 2022, Pastorino i in. 2023). Stwierdzono go także w powietrzu (Chandrakanthan i in. 2023), przy czym wiadomo że zanieczyszczenia te mogą przemieszczać się wskutek opadów deszczu i śniegu (Pastorino i in. 2020). Za główne źródło zanieczyszczenia środowiska mikroplastikiem uznaje się plastikowe odpady (np. produkty codziennego użytku), które w wyniku działań czynników biotycznych i abiotycznych ulegają fragmentacji dając w ten sposób początek tzw. mikroplastikowi wtórnemu. Innymi istotnymi źródłami zanieczyszczenia mikroplastikiem są ścieki komunalne (Browne i in. 2011) i przemysłowe (Prapanchan i in. 2023). Wiadomo także, że ciągła emisja mikroplastiku (oraz innych polutantów) ma miejsce przy ruchliwych drogach, w wyniku ścierania opon (Sommer i in. 2018) i nawierzchni jezdni (Mattsson i in. 2023). Co istotne, ta klasa polutantów dotyka szczególnie środowiska wodne, gdzie ma miejsce ich akumulacja (Auta i in. 2017, Li i in. 2020). Drobiny mikroplastiku obecne w środowisku odznaczają się wyjątkową heterogennością (Bonfanti i in. 2021) oraz współwystępują z innymi polutantami (Araújo i in. 2023), przez co ich wpływ na organizmy żywe jest wysoce złożony.

W ostatnich latach, ekosystemy wodne, w tym ich poszczególne składowe takie jak osad, woda i organizmy, są intensywnie badane pod kątem obecności i charakterystyki mikroplastiku (np. Jiang i in. 2021, Kabir i in. 2021, Talbot i Chang 2021, Joyce i Falkenberg 2022, Yusuf i in. 2022). Tworzone są modele, które opisują przestrzenną i czasową zmienność tych zanieczyszczeń (Rodrigues i in. 2018, Whitehead i in. 2021, Quik i in. 2023), uwzględniając także udział w tym organizmów (Kvale i in. 2020). Intensywnie rozwija się także metodologia ekotoksykologicznych badań mikroplastiku (np. Malafaia i in. 2022).

Jak obecnie wiadomo, tego typu zanieczyszczenia są w różnym stopniu celowo lub przypadkowo pochłaniane przez organizmy żywe, także rośliny (Dris i in. 2018). Może to prowadzić do rozmaitych zmian fizjologicznych: np. w biomineralizacji skorupy u ślimaków (Lopes i in. 2023) czy w mikrobiomie jelit ptaków (Fackelmann i in. 2023). Udowodniono transgeneracyjny wpływ tych polutantów (Junaid i in. 2022) a także ich efekt teratogenny (Araújo i in. 2020) i letalny (Cao i in. 2017). Niektóre zwierzeta myla mikroplastik z pokarmem i połykają go (Bergmann i in. 2015), a zawierające mikroplastik odchody innych proponowane są przez niektórych badaczy jako wskaźnik biodostępności tego polutanta w konkretnych środowiskach (Gallitelli i in. 2022). Wśród skutków połknięcia mikroplastiku przez zwierzęta wymienia się złudne uczucie sytości, albowiem tworzywo sztuczne wypełniające żołądek nie zapewnia składników odżywczych, gdyż nie ulega strawieniu. Ruthsatz i in. (2022) eksperymentalnie wykazali że długość i masa jelit kijanek żaby szponiastej (Xenopus laevis) była większa w grupie poddanej ekspozycji na mikroplastik niż w grupie kontrolnej. Odpowiedź taka sugeruje plastyczność fenotypową kompensującą brak składników odżywczych. Nadto uważa się, że pośredni wpływ drobin mikroplastiku, na przykład poprzez przenoszenie przez nie toksyn, jest również bardzo istotny (Nair i Permutal 2022).

Stopień akumulacji mikroplastiku w środowisku i w organizmach jest ważnym parametrem z punktu widzenia oceny ryzyka ze strony tych zanieczyszczeń (Li i in. 2023) i wynika m. in. z ekologii badanych gatunków (Bergman i in. 2015). Dursun i in. (2023) analizując okazy muzealne żab śmieszek (*Pelophylax ridibundus*), stwierdzili obecność mikroplastiku w przewodach pokarmowych także najstarszych spośród badanych okazów, pobranych w 1984 r. na terenie Turcji. Podobnie, Gül i in. (2022) badając okazy muzealne zaskrońców zwyczajnych (*Natrix natrix*) i zaskrońców rybołowów (*Natrix tessellata*), również z Turcji, dowiedli bioakumulacji tych polutantów w przewodzie pokarmowym osobników pobranych nawet w 1986 r., przy czym również były to najstarsze analizowane okazy. Wyniki tych badań wskazują na obecne od dekad zanieczyszczenie mikroplastikiem środowiska naturalnego, zachodzącą bioakumulację tych zanieczyszczeń w płazach i gadach oraz na możliwość badania tego zjawiska z wykorzystaniem okazów muzealnych.

Zanieczyszczenie plastikowymi odpadami ekosystemów wodnych bywa niekiedy bardzo nasilone (ryc. 1), mogąc dodatkowo prowadzić do zanieczyszczenia toksycznymi związkami chemicznymi, które ulegają desorpcji z makro-, mezo-, mikro- oraz nanoplastiku. Jest to tak zwany "efekt konia trojańskiego", a desorpcja może mieć miejsce także gdy drobiny plastiku znajdują się wewnątrz organizmu (O'Donovan i in. 2018). Zjawisku temu podlegają rozmaite metale ciężkie, półmetale i trwałe zanieczyszczenia organiczne np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (Ito i in. 2022). Takie związki chemiczne cechują się hydrofobowością, przez co bez trudu ulegają absorpcji lub adsorpcji do powierzchni o takim samym charakterze. Wśród parametrów decydujących o adsorpcji polutantów przez drobinę mikroplastiku wymienia się jej rozmiar, stosunek powierzchni do objętości, właściwości jej powierzchni (porowatość, chropowatość, naładowanie elektryczne) i skład chemiczny (Rist i Hartmann 2018).



Ryc. 1. Zbiornik wodny na obszarze badań zanieczyszczony różnymi rodzajami plastikowych odpadów.

Jedną z lepiej przebadanych substancji, związanych z plastikiem jest bisfenol A (BPA), związek endokrynnie czynny (López-Rojo i in. 2023). Wykorzystywany jest jako monomer do produkcji tworzyw sztucznych, głównie poliwęglanów i żywic epoksydowych. Na składowiskach odpadów BPA odnotowywany jest wśród odcieku (Morin i in. 2015), co wskazuje na to, że jest uwalniany do środowiska z produktów plastikowych. W stężeniach odpowiadającym tym, odnotowywanym w środowisku naturalnym, wywołuje on u kijanek zmiany histologiczne, morfologiczne i anatomiczne (Tamschick i in. 2016). Wiadomo także, że BPA może dostawać się do organizmu człowieka jako składnik mikroplastiku znajdującego się w pożywieniu, np. w krewetkach. Niemniej według szacunków Wąsowskiego i Bogdanowicz (2020), nie jest to droga ekspozycji wystarczająco znacząca, by

wpłyneła na zdrowie człowieka. Z plastikiem zwiazane sa także inne dodatki modyfikujące nie będące na stałe związane ze strukturą polimeru (tzn. stopniowo wymywane), jak ftalany (López-Rojo i in. 2023) czy bromowane opóźniacze spalania (BFR) (Muenhor i in. 2010). Wymywanie zależy m.in. od rodzaju polimeru, tarcia, temperatury i intensywności światła słonecznego (Dimassi i in. 2023). Ftalany jako plastyfikatory dodawane sa do produktów plastikowych by zwiększyć ich elastyczność i trwałość (López-Rojo i in. 2023). Jako wszechobecne w środowisku zanieczyszczenia (Squillante i in. 2023), zdolne są do zaburzania układu endokrynnego, wzrostu, metabolizmu i rozrodczości (Zhang i in. 2021). Ponadto niektóre maja działanie genotoksyczne, rakotwórcze i neurotoksyczne (Heudorf i in. 2007, Ventrice i in. 2013, Hlisníková i in. 2021, Zhang i in. 2021). Przedstawiciel bromowanych opóźniaczy spalania, tetrabromoetylcykloheksan (TBECH) wykazał działanie maskulinizujące w gonadogenezie żab Pelophylax nigromaculatus (Liu i in. 2017). Do BFR należą także polibromowane difenyloetery, które w środowisku moga ulegać debromowaniu, prowadząc do powstania bardziej toksycznych kongenerów (Crawford i Quinn 2017). Drobiny mikroplastiku mogą być także nośnikami organizmów, w tym tych patogennych (Barnes 2002, Gkoutselis i in. 2021). Wykazano również, że obecność mikroplastiku może prowadzić do zwiększenia antybiotykooporności wśród bakterii (Luo i in. 2023) i wirulencji wśród patogennych grzybów (Gkoutselis i in. 2024)

Mikroplastik w środowisku jest więc polutantem, który rozprzestrzenił się na przeogromną skalę i współcześnie wpływa na wiele aspektów funkcjonowania biosfery.

#### 4.1.1. Typologia mikroplastików

Biorąc pod uwagę fakt, że różne rodzaje mikroplastiku w odmienny sposób zachowują się w środowisku oraz wywierają zróżnicowany wpływ na organizmy żywe, istotna jest ujednolicona i precyzyjna typologia tej klasy zanieczyszczeń (Rodríguez-Seijo i Pereira 2017). Niemniej badania nad zanieczyszczeniem środowiska mikroplastikiem są względnie nowe, przez co nie wypracowano jeszcze jednolitej metodyki (Crawford i Quinn 2017, Dris i in. 2018, Imasha i Babel 2022). Z tego samego powodu, kategoryzacja plastikowych obiektów ze względu na ich rozmiar i inne cechy nie jest ujednolicona.

Mimo to, w odniesieniu do rozmiaru, zazwyczaj dokonuje się podziału, poczynając od największych, na: megaplastik, makroplastik, mezoplastik, mikroplastik, nanoplastik (Lambert i Wagner 2018). Ostatnia z wymienionych kategorii obejmuje najmniejsze drobiny,

zdolne do przenikania przez błony biologiczne (Shan i in. 2022), co wskazuje na stanowienie przez nie jeszcze większego zagrożenia dla organizmów niż mikroplastik.

Przyjmując pochodzenie za kryterium, mikroplastik dzieli się na pierwotny i wtórny. Pierwszy rodzaj stanowią drobiny docelowo produkowane w swoim rozmiarze. Są to zwykle granulki, na przykład składniki kosmetyków i produktów czyszczących, surowiec do produkcji przedmiotów plastikowych (granulat 2 – 5 mm lub proszek) czy tusz do drukarek 3D. Natomiast mikroplastik wtórny jest istotniejszy jako polutant i obejmuje drobiny powstałe np. w wyniku fotodegradacji czy wietrzenia mechanicznego większych obiektów, takich jak plastikowe butelki lub siatki (Andrady 2011, Rist i Hartmann 2018, Chinglenthoiba i in. 2023). Przynależność włókien z syntetycznych tekstyliów oraz mikroplastiku powstałego z użytkowania opon do jednego z ww. rodzajów jest sporna, tak jak sporna jest dokładna definicja mikroplastiku wtórnego. Część badaczy za mikroplastiki wtórne uznaje tylko takie, które powstają w wyniku fragmentacji zachodzącej w środowisku a nie podczas zwykłego użytkowania materiału przez ludzi. Przy przyjęciu takiej definicji, mikroplastik z opon i mikrowłókna z syntetycznych tekstyliów (powstałe w wyniku prania) należy uznać za mikroplastiki pierwotne (Acharya i in. 2021). Warto przy tym zaznaczyć, że na gram tkaniny poliestrowej poddawanej praniu, uwalnianych jest od kilkuset do nawet kilku tysięcy mikrowłókien (De Falco i in. 2018).

Ze względu na rozmiar, mikroplastik dzielony jest na mały mikroplastik (1  $\mu$ m – 1 mm) oraz duży mikroplastik (1 mm – 5 mm) (Rodríguez-Seijo i Pereira 2017).

Pod względem kształtów, drobiny mikroplastiku kategoryzuje się m.in. jako włókna, płatki, fragmenty i granulki. Obecnie nie ma jednak w tej kwestii konsensusu, zatem niektórzy badacze wyróżniają inne typy morfologiczne, jak na przykład pianka (Free i in. 2014), która często odnosi się do drobin styropianu, również mogącego stanowić źródło mikroplastiku (ryc. 2).

Mikroplastiki charakteryzuje się także pod kątem ich koloru oraz składu chemicznego (typu polimeru). Barwniki dodawane są do produktów plastikowych by nadać im atrakcyjności albo wynikają z dodatków zmniejszających palność lub zwiększających wytrzymałość na promieniowanie ultrafioletowe (Fries i in. 2013, Imhof i in. 2016). Ponadto w wyniku czynników abiotycznych oddziałujących na drobiny mikroplastiu, ich kolor może ulegać samoistnej zmianie. Powszechnie do scharakteryzowania drobin mikroplastiku pod względem kolorów używa się następujących kategorii: przezroczysty, krystaliczny, biały, kremowy, czerwony, pomarańczowy, niebieski, matowy, czarny, szary, brązowy, zielony, różowy, beżowy, żółty (Rodríguez-Seijo i Pereira 2017). Z kolei zaproponowany przez Crawforda i

Quinn (2017) system klasyfikacji mikroplastików na podstawie ich wielkości i kolorów, oprócz konkretnych z góry przewidzianych kolorów dopuszcza także ich kombinacje.



Ryc. 2. Plastikowe odpady (styropian) jako podłoże dla wzrostu roślin naczyniowych i glonów, zaobserwowane na obszarze badań.

# 4.1.2. Mikroplastik w środowisku wodnym i jego wpływ na organizmy

Od stanu środowisk słodkowodnych zależy byt wielu gatunków zwierząt, a miejsca te pełnią kluczowe funkcje ekosystemowe (Cera i in. 2022). Niestety do środowiska wodnego przedostaje się wiele rodzajów zanieczyszczeń, a jednym z nich są plastiki migrujące tam np. w wyniku spływu powierzchniowego czy drogą powietrzną. Obecność mikroplastiku a także tzw. trwałych zanieczyszczeń organicznych krytycznie zagraża funkcjonalności całego cyklu hydrologicznego (Castaño-Sánchez i in. 2020). Plastik w środowisku zarówno wodnym, jak i lądowym stanowi nowy rodzaj biocenozy nazwanej plastisferą – organizmy wykorzystują go jako schronienie i miejsce wzrostu (Barros i Seena 2021). Drobiny mikroplastiku mogą znajdować się na tafli wody, w słupie wody, w osadach dennych, plażowych czy jako składnik peryfitonu, przy czym między wymienionymi elementami zachodzić może migracja tych drobin. O ich rozmieszczeniu i "zachowaniu" decydują parametry fizykochemiczne, m.in. gęstość, kształt, skład chemiczny, a także stopień zaawansowania biofoulingu (tj. obrastania biologicznego). W wodzie plastik ulega fotooksydacji, degradacji hydrolitycznej, mechanicznej i termicznej oraz innym procesom prowadzącym do fragmentacji, toteż jest to jednocześnie miejsce powstawania mikroplastiku wtórnego (Wąsowski i Bogdanowicz 2020).

Jednocześnie, plastik będąc w wodzie powoduje jej zakwaszenie oraz zahamowanie wzrostu bakterii, co jest najbardziej zaznaczone w przypadku polipropylenu (Rubin i in. 2023). Wody słone są lepiej przebadane pod względem zanieczyszczenia mikroplastikiem niż wody słodkie (Bhatt i Chauhan 2023), choć Azevedo-Santos i in. (2021) uznali mikroplastik za dominujący polutant tych drugich. Uważa się, że globalnym miejscem gromadzenia się plastikowych odpadów są oceany, do których dostają się one przede wszystkim wodami rzek i prądami morskimi. W związku z tym, ostatnimi laty coraz większą uwagę skupia na sobie Wielka Pacyficzna Plama Śmieci przemieszczająca się w Wirze Północnopacyficznym. Miejscami gromadzenia się mikroplastiku są również sztuczne mokradła, tworzone m.in. w celu oczyszczania wody (Lu i in. 2022), a ponadto plaże, na których gromadzi się rozdrobniony plastik z mórz i oceanów, a także ten wynikający z ich rekreacyjnego użytkowania (Costa i in. 2023, Eric i in. 2023).

Bioakumulację mikroplastiku u zwierząt wodnych opisano u przedstawicieli różnych taksonów: skorupiaków (Bos i in. 2023), owadów (Khedre i in. 2023), ryb (Squillante i in. 2023), ptaków (GESAMP 2015), ssaków (Moreira-Mendieta i in. 2023, Ratnayaka i in. 2023) oraz zespołów organizmów: plankton, bentos, nekton (Chen i in. 2021, Kvale i in. 2021). Transfer troficzny tych zanieczyszczeń wykazano m.in. na przykładzie morskich sieci troficznych (Justino i in. 2023), w układzie eksperymentalnym obejmującym wioślarki (Cladocera) i ambystomę meksykańską (*Ambystoma mexicanum*) (Manríquez-Guzmán i in. 2023) oraz w układzie eksperymentalnym obejmującym kijanki *Physalaemus cuvieri*, ryby, oraz myszy (Araújo i Malafaia 2021). Ostatnie z wymienionych badań dowiodło możliwości zachodzenia transferu mikroplastiku z ekosystemu wodnego do lądowego. Zaobserwowano przy tym negatywne zmiany w behawiorze myszy w następstwie spożycia ryb z mikroplastikiem.

Większość badań nad związkiem mikroplastiku z płazami koncentruje się na płazach bezogonowych (Anura). Dotychczas ukazała się tylko jedna publikacja w odniesieniu do płazów ogoniastych (Caudata) i ani jedna dotycząca płazów beznogich (Gymnophiona) (López-Rojo i in. 2023). Eksperymentalnie dowiedziono że kijanki połykają mikroplastik i akumulują go w przewodzie pokarmowym (Araújo i in. 2022, Attademo i in. 2022), a przy wysokich stężeniach także w sercu i wątrobie (Zhang i in. 2023). Jednocześnie, spożyte drobiny mogą zostać wydalone z organizmu, czego dowiedziono na przykładzie żaby szponiastej (*Xenopus tropicalis*) (Hu i in. 2016). Intensywność pobierania przez kijanki mikroplastiku zależy m. in. od dostępności pokarmu (Hu i in. 2016) oraz właściwości samego

mikroplastiku – rozmiaru, kształtu, rodzaju polimeru, a nawet koloru (Balestrieri i in. 2022). Wpływ mikroplastików na przedstawicieli gromady płazów jest jeszcze słabo poznany (Araújo i in. 2021, Dong-Min i Ding-Qi 2022, White i in. 2023) i zależy między innymi od wielkości drobin (Hampton i in. 2022), wielkości osobników (Scribano i in. 2023), a także stopnia zanieczyszczenia środowiska mikroplastikiem (Boyero i in. 2020). Dowiedziono że pobrany mikroplastik może wpływać na morfologię kijanek (Araújo i in. 2020, Bacchetta i in. 2021), ich rozwój (Boyero i in. 2020), histologie (Attademo i in. 2023), przeżywalność, kondycję, zachowanie (Araújo i Malafaia 2020, Bacchetta i in. 2021) oraz pigmentację ciała (Araújo i in. 2020). Wśród odnotowanych subletalnych efektów ekspozycji kijanek na mikroplastik wymienia się także podwyższone tempo przemiany materii oraz podwyższony poziom hormonów stresu (Ruthsatz i in. 2023). Wpływ zanieczyszczenia mikroplastikiem może być również synergistyczny z innymi stresorami. Na przykładzie gatunku wrażliwego na chytridiomikozę - pętówki babienicy (Alytes obstetricans) dowiedziono, że pobieranie przez kijanki mikroplastiku zwiększa ich podatność na zakażenie ze strony Batrachochytrium dendrobatidis – grzyba wywołującego tą chorobę (Bosch i in. 2021). Niekiedy efekt stresorów może być antagonistyczny. I tak Buss i in. (2021) odkryli, że równoczesna ekspozycja na mikroplastik (poliestrowe włókna) kijanek oraz przywr należących do rodziny Echinostomatidae zmniejszyła skuteczność infekcji tego pasożyta. Mechanizmy proksymalne odpowiadające za ten efekt nie zostały jeszcze jednak dobrze poznane.

Dotychczas ukazało się niewiele analiz larw płazów pochodzących ze środowiska naturalnego pod kątem ich zanieczyszczenia mikroplastikiem (Rahman i in. 2024). Wyniki tych nielicznych, wstępnych europejskich badań w tym zakresie dały odmienne wnioski. Jedne prezentowały względnie niski stopień zanieczyszczenia – mikroplastik obecny w 26% zbadanych osobników (Kolenda i in. 2020), a inne wysoki – mikroplastik obecny we wszystkich analizowanych próbach (Ćirković i in. 2023). Wydaje się więc zasadne prowadzenie dalszych badań na tym polu.

### 5. Cele

Celem niniejszej pracy było zbadanie zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów, wody i osadów dennych pozyskanych na stanowiskach w zachodniej Polsce.

Przetestowano następujące hipotezy badawcze:

- istnieją międzygatunkowe różnice w stopniu zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów;
- 2. drapieżne larwy są w mniejszym stopniu zanieczyszczone mikroplastikiem niż larwy wszystkożerne;
- 3. istnieje dodatnia korelacja między wielkością larwy, a stopniem jej zanieczyszczenia mikroplastikiem i długością drobin tych zanieczyszczeń z niej wyekstrahowanych;
- istnieje dodatnia korelacja między udziałem powierzchni zurbanizowanej w obrębie bufora stanowiska poboru próby, a ilością mikroplastików i zróżnicowaniem ich kształtów w larwach płazów;
- istnieje ujemna korelacja między udziałem powierzchni rolnych w buforze stanowiska poboru próby, a stopniem obciążenia mikroplastikiem larw płazów;
- istnieją podobieństwa między larwami a wodą oraz między larwami a osadem pod względem kolorów, kształtów i składu chemicznego drobin mikroplastiku wyizolowanych z tych matryc pobranych na tym samym stanowisku;
- 7. drobiny mikroplastiku wyizolowane z larw płazów są w większym stopniu podobne pod względem ich kształtu, koloru oraz składu chemicznego do tych wyekstrahowanych z wody, niż do tych pochodzących z osadów dennych na tym samym stanowisku.

#### 6. Materiały i metody

#### 6.1. Teren badań

Badania terenowe przeprowadzono na obszarze województwa lubuskiego, w okresach od marca do września 2021 – 2023 r. Województwo to znajduje się w środku przeweżenia wielkiego Niżu Europejskiego, w zachodniej Polsce. Ze wschodu na zachód ciągną się szerokie pradoliny i bariery morenowe. Rzeki i jeziora mają w dużej mierze pochodzenie polodowcowe (Sczaniecki i Zajchowska 1950). Ukształtowanie terenu charakteryzują wysokości zawierające się przede wszystkim między 50 a 100 m n.p.m. Podłoże północnej części województwa zbudowane jest z triasowych złóż wapienia, kajperu i kredy, a wschodniej – z jurajskich piaskowców, łupków ilastych i iłów. Pod względem tektonicznym jest to obszar związany: na północy z Synklinorium Szczecińskim, w części środkowej i południowo-wschodniej z Monokliną Przedsudecką, na południowym-zachodzie z Perykliną Żar, a na południu z Blokiem Przedsudeckim. Panuje tu przejściowy, łagodny klimat z przewagą cech oceanicznych, a roczne i dobowe wahania temperatur są mniejsze niż w innych rejonach Polski. Średnia temperatura roczna wynosi 8°C, a okres wegetacyjny trwa ponad 220 dni. Suma rocznych opadów jest bardzo zróżnicowana i mieści się w przedziale 478 – 706 mm. Wieksze opady odnotowywano w obrębie wyniosłości terenu, a mniejsze w dolinach rzek. Najobfitsze opady stwierdza się w południowo-zachodniej części regionu, a najskromniejszse na północnym-wschodzie, np. w dolinie rzeki Obry. Zasadniczo, najwięcej opadów występuje w lipcu, a najmniej w lutym. W minionych dziesięcioleciach śnieg padał tu przez 35 – 43 dni w roku (co w ostatnich latach uległo znacznemu skróceniu), przy czym najwięcej dni z opadami śniegu odnotowywano w styczniu. Przeważają wiatry z kierunków zachodnich, ale zimą dominują wiatry wschodnie. Nierzadko notowane są także wiatry północne i północno-wschodnie, które jednak występują głównie wiosną (Zajchowska 1976, Król 1990).

W pierwszym etapie badań terenowych dokonywano identyfikacji potencjalnych stanowisk badawczych, gdzie poszukiwano depozycji jaj płazów. Następnie, spośród nich, na podstawie śledzenia bieżącej sytuacji hydrologicznej, identyfikowano zbiorniki wysychające – będące potencjalnymi miejscami poboru prób. Poddawano je bardzo częstym kontrolom. Takimi miejscami, stanowiącymi około jedną trzecią początkowo wytypowanych akwenów były efemeryczne i zazwyczaj silnie nasłonecznione zbiorniki o niewielkiej powierzchni jak większe kałuże, śródpolne i leśne oczka wodne, rowy melioracyjne oraz partie stawów, które w wyniku obniżenia poziomu lustra wody oddzieliły się od głównego zbiornika (ryc. 3).

Dzięki regularnym kontrolom, możliwe było zebranie prób wody oraz osadu dennego zanim nastąpiło całkowite wyschnięcie akwenu oraz martwych (zazwyczaj wysuszonych) larw płazów. Zwykle nie były to wszystkie osobniki, gdyż część z powodzeniem kończyła metamorfozę przed wyschnięciem zbiornika, a część padała ofiarą drapieżników.





Ryc. 3. Przykładowe typy badanych zbiorników wodnych:  $\mathbf{A}$  – większe kałuże,  $\mathbf{B}$  – śródpolne rowy melioracyjne,  $\mathbf{C}$  – wysychające partie oczek wodnych.

Miejsca poboru prób były zróżnicowane pod względem wpływu działalności ludzkiej oraz przekształcenia. Obejmowały zarówno miejsca dzikie, niezanieczyszczone i oddalone od jakichkolwiek budynków, jak i stanowiska silnie zaśmiecone, z widocznymi plastikowymi odpadami różnego pochodzenia. Za pomocą odbiornika GPS odnotowywano dokładną lokalizację każdego ze stanowisk (ryc. 4, tab. 2), co wykorzystano do przeprowadzenia analiz przestrzennych z zastosowaniem buforów o promieniu 1 km (zob. podr. 6.4.).



Ryc. 4. Teren badań. A – położenie ogólne województwa lubuskiego (zachodnia Polska), B – lokalizacja stanowisk poboru prób. Wykorzystano OpenStreetMaps.

Poniżej przedstawiono charakterystykę 23 stanowisk badawczych, a ich lokalizację zaprezentowano na ryc. 4. Część z nich znajduje się w pradolinach rzek: Odry, Warty i Bobru, tj. na nisko położonych terenach (25 – 50 m n.p.m.), a pozostałe zlokalizowane są w obrębie wzgórz i pagórków moreny czołowej Wału Zielonogórskiego i Wzniesień Żarskich (100 – 200 m n.p.m.).

Stanowisko S1 – **Gorzów Wielkopolski** (52°46'05"N, 15°13'59"E) stanowił żyzny las łęgowy położony w wilgotnej dolinie wciętej w wysoczyznę. Przepływa tędy struga Srebrna, wpływająca nieopodal do rzeki Kłodawki. To miejsce położone jest na obrzeżach miasta Gorzowa Wielkopolskiego, w pobliżu osiedli domków jednorodzinnych. Użytkowane jest

także turystycznie i regularnie obserwowane są tu plastikowe odpady. Materiał do badań pobrano z wysychających kałuż porastanych turzycami (*Carex* sp.) przy strudze Srebrna (ryc. 5) 11.05.2021 r. oraz 19.06.2021 r. Na podstawie analiz przestrzennych przeprowadzonych za pomocą systemu informacji geograficznej (GIS), udział powierzchni zurbanizowanej w obrębie bufora o promieniu 1 km obliczono na 43%, co świadczy o umiarkowanej antropopresji. Udział powierzchni rolnych w obrębie bufora był mniejszy i wyniósł 37%.



Ryc. 5. Miejsce poboru prób do badań z przedmieść Gorzowa Wielkopolskiego (stanowisko S1).

Stanowisko S2 – **Chotków** (51°42'15"N, 15°28'32"E) położone jest na południowy-zachód od miejscowości Kożuchów, na terenie typowo rolniczym z luźno rozrzuconą niską zabudową typu gospodarskiego. Przez ten teren przepływa ciek Brzeźnica, a niewielkie akweny tu obecne mają pochodzenie powyrobiskowe. Ze względu na stale obniżający się poziom wód gruntowych, wiele z tutejszych zbiorników ulega całkowitemu wysychaniu już w okresie wczesnej wiosny. Akwen wytypowany do badań ma okresowy charakter, jest płytki, zasadniczo pozbawiony szerokiej strefy litoralnej, która rozwija się tylko w zatoczkach. Wypłycone fragmenty strefy brzegowej w okresach bezdeszczowych tworzą rozległe kałuże, które szybko zanikają. W buforze stanowiska dominowały tereny rolne (71%). Poboru próbek do badań dokonywano 18.05.2022 r. i 4.06.2022 r.

Stanowisko S3 – Czerwieńsk (52°00'18"N, 15°25'26"E) zlokalizowane jest w obrębie miejscowości o tej samej nazwie. Obszar ten położony jest na krawędzi pradoliny Odry, od

strony południowej porośnięty jest zwartymi powierzchniami suchych borów sosnowych. W części północnej jest płaski i silnie nasłoneczniony, z pojedynczymi drzewami i grupami zakrzaczeń. Akwen eutroficzny, posiada nieznacznie wykształconą strefę litoralną i jest wykorzystywany przez wędkarzy. Najpłytsze jego fragmenty w okresach bezdeszczowych oddzielają się od głębszych partii zbiornika tworząc kałuże, które całkowicie wysychają. Według analiz, udział powierzchni zurbanizowanej w buforze wyniósł 17%, przy braku powierzchni rolniczej. Materiał do badań pobrano w okresie 15–23.05.2023 r.

Stanowisko S4 – **Dolina Bobru** (51°45'58"N, 15°15'33"E) położone jest w rejonie Nowogrodu Bobrzańskiego w pradolinie rzeki Bóbr. Miejsce to charakteryzuje się obecnością złóż piasków i żwirów, które od dziesięcioleci wydobywane były na dużą skalę (Bocheński i in. 2023). Utworzone w ten sposób różnej wielkości zagłębienia terenu ulegały zalaniu wodą, co prowadziło do powstania akwenów pochodzenia antropogenicznego. Wytypowany do badań zbiornik wodny jest eutroficzny, bardzo płytki i wysychający, często już w okresie wiosny. Okresowo zasiedla go kilka gatunków płazów. Jego otoczenie porastają pojedyncze drzewa i kępy krzewów a także duże połacie trzcinnika piaskowego (*Calamagrostis epigejos*) i szczotlichy siwej (*Corynephorus canescens*). Wokół stanowiska badawczego prowadzona jest tylko ekstensywna działalność rolnicza. W buforze otaczającym stanowisko badawcze dominowało zagospodarowanie rolnicze (65%). Poboru materiału badawczego dokonano w okresie 5–11.07.2021 r.

Stanowisko S5 – **Dolina Odry koło Czerwieńska** (52°02'39"N, 15°26'41"E), zlokalizowane jest na rozległym, płaskim obszarze zalewowym rzeki Odry (polderze), przeciętym ciekiem Zimny Potok. Obszar dna doliny rzecznej jest silnie nasłoneczniony z pojedynczymi drzewami i grupami zakrzaczeń, w obrębie których znajdują się niewielkie, zazwyczaj okresowe, bezrybne akweny wykorzystywane przez płazy do odbywania godów. Zbiornik wytypowany do badań był płytki i miał słabo rozwiniętą strefą litoralną. W okresach suszy wypłyca się całkowicie. Obszar ten jest typowym terenem rolniczym, toteż udział powierzchni tego typu w obrębie bufora wyniósł 82%. Materiał do badań pobrano w okresie 10–21.05.2021 r.

Stanowisko S6 – **Kłodawa** (52°47'28"N, 15°12'28"E) położone jest we wsi o tej samej nazwie. Miejsce poboru prób stanowił wysychający i zarastający staw położony wśród zabudowań. Obecna była szeroka strefa litoralna, a brzegi porastała wierzba szara (*Salix cinerea*). Do wysychania akwenu przyczynia się okresowe, mające miejsce szczególnie latem,

pobieranie z niego wody przez okolicznych mieszkańców za pomocą pomp, na potrzeby ogrodnictwa. Zbiornik jest zarybiony. Odnotowano w jego obrębie niewielkie ilości plastikowych odpadów. Dookoła dominowały tereny użytkowane rolniczo (54%). Poboru próbek osadu dennego, wody oraz martwych larw płazów dokonano 6.06.2021 oraz 27.07.2021 r.

Stanowisko S7 – **Krępa** (52°00'21"N, 15°32'08"E) położone jest granicach administracyjnych Zielonej Góry, nieopodal Doliny Środkowej Odry. Jest to teren typowo zalewowy, płaski, silnie nasłoneczniony, głównie użytkowany w celach rolniczych (65% udziału w buforze). Przecinają go płytkie rowy melioracyjne, które w okresie zimowym i wiosennym w różnym stopniu wypełnione są wodą. Stanowisko poboru prób stanowiło nieużytkowane przez ludzi wysychające śródpolne oczko wodne. Jego brzegi nie były porośnięte wyższą roślinnością. Zaobserwowano tam liczne żaby z kompleksu żab zielonych (*Pelophylax esculentus* complex). Nie odnotowano odpadów antropogenicznych. Pobór prób do badań odbył się w okresie 15–29.07.2021 r.

Stanowisko S8 – Laski (52°02'08"N, 15°19'06"E) położone jest w Dolinie Środkowej Odry, nieopodal miejscowości Nietków i Laski. Akwen wytypowany do badań znajduje się na terenie zalewowym, płaskim i mocno nasłonecznionym. Jest on płytki, z wypłycającymi się niewielkimi zatoczkami, które podczas wysychania szybko oddzielają się całkowicie od głównego zbiornika. W okresie późnowiosennym i letnim główny akwen również ma tendencję do całkowitego wysychania. Otoczenie zbiornika jest typowo rolnicze. Według analiz przestrzennych, w buforze stanowiska dominowała powierzchnia rolna (55%). Pobór materiału następował w okresie 29.05–4.06.2021 r.

Stanowisko S9 – Leśna Góra (52°01'38"N, 15°36'16"E) położone jest nieopodal miejscowości Cigacice. Znajduje się tu grupa niewielkich akwenów o różnej powierzchni, zlokalizowanych w strefie zalewowej rzeki Odry, na terenie otwartym i silnie nasłonecznionym. Brak zwartych zadrzewień, występują tylko pojedyncze drzewa i krzewy. Poziom wody jest tu bardzo zmienny, zależny od poziomu wody w Odrze. Akwen, z którego pobierano materiał, charakteryzuje się kilkoma zatoczkami. Jest bardzo płytki, zazwyczaj wysycha całkowicie lub niemal całkowicie już w okresie wiosennym. Jest chętnie wybieranym przez płazy zbiornikiem do odbywania godów, podobnie jak inne akweny znajdujące się w pobliżu. Zbiornik okresowo wykorzystywany jest przez wędkarzy. W

buforze dominowała powierzchnia rolna – 78%. Materiał do badań pobrano w okresie 23– 30.06.2021 r.

Stanowisko S10 – **Leśniów Wielki** (51°58'17"N, 15°18'06"E) zlokalizowane jest na zachód od Zielonej Góry, na obszarze częściowo wykorzystywanym rolniczo, otoczonym suchymi borami sosnowymi. Obecne tu akweny nie mają naturalnego charakteru, powstały w wyniku działalności wydobywczej i obecnie użytkowane są również przez wędkarzy. Są one różnej powierzchni i głębokości, a najpłytsze ulegają całkowitemu lub częściowemu wysychaniu w okresie wiosennym. Zbiornik wytypowany do badań charakteryzuje się obecnością głębszych partii oddzielonych wypłaceniami. Jego fragmenty, w wyniku obniżania się poziomu wody, całkowicie oddzielają się od głównego akwenu i w efekcie zanikają. Udział powierzchni rolnej w buforze otaczającym stanowisko badawcze obliczono na 35%, a udział powierzchni zurbanizowanej był minimalny i wyniósł 2%. Poboru materiału badawczego dokonywano od 16.05.2021 r. do 26.05.2021 r.

Stanowisko S11 – **Między Słonem a Wilkanowem** (51°55'55"N, 15°25'15"E) położone jest w lesie mieszanym z przewagą drzew iglastych, niecałe 100 m w linii prostej od najbliższej drogi leśnej oraz około 200 m od najbliższej drogi krajowej. Miejsce poboru prób stanowił wysychający płytki rów antropogenicznego pochodzenia (ryc. 6). W trakcie badań terenowych nie stwierdzono na tym stanowisku obecności odpadów antropogenicznych. Udział terenów rolnych i zurbanizowanych w buforze wokół tego stanowiska został obliczony na odpowiednio 24% i 9%. Materiał do badań pobrano 26.08.2021 r. oraz 14.09.2021 r.



Ryc. 6. Wysychający śródleśny rów stanowiący jedno z charakterystycznych miejsc poboru próbek do badań.

Stanowisko S12 – Zielona Góra, Jędrzychów I (51°53'39"N, 15°31'11"E) zlokalizowane jest na przedmieściach Zielonej Góry, w dzielnicy Jędrzychów. Jest to teren leśny, lecz nie tak odległy od bloków mieszkalnych. Miejsce poboru prób stanowił okresowy, płytki zbiornik wodny położone wśród gęstych krzewów. Odnotowano tam obecność różnorodnych śmieci mogących stanowić źródło mikroplastiku (np. worki, opony), które znajdowały się w różnych stadiach fragmentacji i wietrzenia. Stanowisko to jest również użytkowane przez wędkarzy. Obliczony za pomocą analiz przestrzennych udział terenów zurbanizowanych w buforze wyniósł 10%, a terenów rolnych – 13%. Materiał do badań pobrano 19.06.2021 oraz 11.08.2021 r.

Stanowisko S13 – Nowa Sól (51°49'10" N, 15°43'06" E) położone jest w północnej części miasta Nowa Sól, w pobliżu Czarnej Strugi przepływającej przez płaską i rozległą pradolinę Odry. Do badań wytypowano niewielki akwen powyrobiskowy. W jego otoczeniu dominuje niska zabudowa, a linię brzegową porastają pojedyncze drzewa i krzewy. Ten eutroficzny zbiornik jest silnie nasłoneczniony i posiada szeroką strefę litoralną złożoną głównie z pałki szerokolistnej (*Typha latifolia*), pałki wąskolistnej (*Typha angustifolia*) i trzciny pospolitej (*Phragmites australis*). Szczególnie we wschodniej części, okresowo ulega on silnemu wypłycaniu tworząc liczne i płytkie zagłębienia, które przy słonecznej i bezdeszczowej pogodzie ulegają całkowitemu wysychaniu. Zauważalne jest jego spore zaśmiecenie różnymi odpadami, w tym plastikowymi. Stopień zurbanizowania w buforze otaczającym stanowisko

jest wysoki – 64%. Poboru materiału do badań dokonywano w dniach: 21.05.2021 r., 1.06.2021 r., 15.06.2021 r. i 28.06.2021 r.

Stanowisko S14 – **Nowogród Bobrzański** (51°48'57"N, 15°13'36"E) zlokalizowane jest w rejonie Nowogrodu Bobrzańskiego, w pradolinie rzeki Bóbr. Miejsce to – podobnie jak w przypadku stanowiska Dolina Bobru – charakteryzuje się obecnością złóż kopalin, od dawna eksploatowanych na dużą skalę. W ten sposób powstało tu wiele zagłębień obecnie zalanych wodą. Są one różnej głębokości. Najpłytsze często ulegają wysychaniu w okresie wiosennym. Akwen wytypowany do badań jest oligotroficzny. Charakteryzuje się obecnością rozległych wypłyceń, które oddzielają się od głównego akwenu. Udział zagospodarowania rolniczego w buforze otaczającym stanowisko badawcze został obliczony na 30%, a powierzchni zurbanizowanej – na 8%. Poboru materiału badawczego dokonywano w okresie 10–20.05.2021 r.

Stanowisko S15 – Zielona Góra, przy Jeziorze Cegielni (51°55'47"N, 15°27'15"E) położone jest na obrzeżach miasta Zielona Góra, wśród wykorzystywanych rekreacyjnie terenów leśnych, nieopodal Rodzinnych Ogródków Działkowych. Miejsce poboru prób stanowił płytki, wysychający fragment względnie rozległego zbiornika wodnego (ryc. 7). Nie odnotowano widocznych odpadów mogących stanowić źródła mikroplastików wtórnych. Analiza pokrycia terenu, wykorzystująca okrągły bufor o promieniu 1 km, obliczyła udział powierzchni zurbanizowanej w jego obrębie na 13%, przy braku powierzchni rolnych. Próbki osadu dennego, wody oraz martwych larw płazów pobrano 16.07.2021 r. oraz 27.07.2021 r.



Ryc. 7. Wysychający fragment zbiornika wodnego, stanowiący miejsce poboru prób do badań (stanowisko S15).

Stanowisko S16 – **Sieniawa Żarska** (51°38'07"N, 15°02'50"E) zlokalizowane jest na zachód od Żar. Teren ten, niegdyś wykorzystywany jako obszar eksploatacji żwiru, do dziś charakteryzuje się zagłębieniami, które samoistnie wypełniają się wodą. Akweny te zasiedlane są przez kilka gatunków płazów. Teren jest nasłoneczniony, porastany przez pojedyncze drzewa i ich kępy oraz zakrzaczenia. Płytsze akweny w okresie wiosennym niekiedy całkowicie lub niemal całkowicie zanikają. Otoczenie wytypowanego do badań zbiornika częściowo porastają lasy mieszane, a częściowo nadal wykorzystywane jest rolniczo. Poziom zurbanizowania w buforze stanowiska wyniósł 23%, a udział powierzchni rolnej – 51%. Poboru materiału do badań dokonano 26.05.2021 r. i 28.06.2021 r.

Stanowisko S17 – **Sulechów** (52°04'32"N, 15°37'01"E) położone jest w obrębie miasta Sulechowa, na obszarze o mozaice luźnej niskiej zabudowy i pól uprawnych. Teren przekształcony jest w wyniku różnorodnej działalności ludzkiej, a akweny znajdujące się w tej okolicy nie mają naturalnego pochodzenia. Zazwyczaj powstały one po zakończeniu działalności wydobywczej (piasek, żwir, glina), po zalaniu pozostawionych zagłębień wodami przypowierzchniowymi lub opadowymi. W otoczeniu akwenu wytypowanego do badań znajdują się pojedyncze drzewa i ich grupy oraz zakrzaczenia. Zbiornik jest okresowo wykorzystywany przez wędkarzy. Najpłytsza jego część, w okresie suszy, ulega całkowitemu wyschnięciu. Stopień zurbanizowania tego stanowiska wyniósł 61%. Poboru materiału do badań dokonano 14.05.2021 r.

Stanowisko S18 – Świebodzin (52°15'06"N, 15°32'52"E) zlokalizowane jest w obrębie granic administracyjnych miasta Świebodzin, w rejonie charakteryzującym się mozaiką niskiej zabudowy i pól uprawnych oraz nieużytków. Obszar charakteryzuje się znacznym stopniem wpływu działalności ludzkiej, a tutejsze akweny nie mają naturalnego charakteru. Zazwyczaj powstały one po zakończeniu działalności wydobywczej. W otoczeniu akwenu wytypowanego do badań znajdują się pojedyncze drzewa oraz gęste zakrzaczenia. Zbiornik jest wykorzystywany przez wędkarzy. Najpłytsze jego części w okresie suszy ulegają stopniowemu oddzieleniu się od głębszych partii i szybko wysychają. W buforze stanowiska dominowały tereny zurbanizowane (55%). Poboru materiału do badań dokonano 7.06.2021 r.

Stanowisko S19 – Wilkanowo (51°55'35"N, 15°25'33"E) położone jest we wsi o tej samej nazwie, w pobliżu różnogatunkowego lasu i luźno rozmieszczonych zabudowań jednorodzinnych, z których część znajdowała się w trakcie budowy. Miejsce poboru prób stanowił niemal całkowicie wysychający latem staw (ryc. 8). Jest to akwen płytki, z szeroką i gęstą strefą litoralną wśród której dominuje pałka szerokolistna (*Typha latifolia*) i turzyce (*Carex* sp.). Wielokrotnie w obrębie zbiornika odnotowywano obecność styropianu, najprawdopodobniej pochodzącego z pobliskich prac budowlanych. Stosując analizę przestrzenną w GIS, udział powierzchni rolnych na tym stanowisku obliczono na 19%, a powierzchni zurbanizowanej na 25%. Materiał do badań pobrano 12.06.2021 r. oraz 28.07.2021 r.



Ryc. 8. Wysychający i zarastający latem staw w Wilkanowie (stanowisko S19).

Stanowisko S20 – Zielona Góra, przy Parku Braniborskim (51°55'33"N, 15°32'42"E) mieści się na obrzeżach miasta Zielona Góra, niedaleko parku miejskiego. Miejsce poboru prób stanowił niemal całkowicie wysychający latem staw. Odnotowano w nim obecność ryb oraz niewielkie ilości odpadów plastikowych, mogących stanowić źródła mikroplastików wtórnych. Przeprowadzona analiza przestrzenna ujawniła, że powierzchnia zurbanizowana w buforze stanowi 35%, przy całkowitym braku terenów rolnych. Materiał do badań w postaci osadu dennego, wody oraz martwych larw płazów pobrano 10.05.2021 r. oraz 16.06.2021 r.

Stanowisko S21 – Zielona Góra, działki (51°54'37"N, 15°31'42"E) zlokalizowane jest poza obszarem zabudowanym lecz blisko Rodzinnych Ogródków Działkowych. Miejsce poboru prób stanowiły rozległe, wysychające fragmenty antropogenicznego stawu, w którym stwierdzono bardzo licznie występujące żaby z kompleksu żab zielonych (*Pelophylax esculentus* complex). Staw ma nieznacznie rozwiniętą strefę litoralną z dominującą trzciną pospolitą (*Phragmites australis*) i wykorzystywany jest przez wędkarzy. Obliczony udział terenów zurbanizowanych w buforze tego stanowiska wyniósł 48%, przy braku udziału powierzchni rolnych. Materiał do badań pobrano 29.06.2021 r. oraz 18.07.2021 r.

Stanowisko S22 – Żary (51°37'46"N, 15°05'11"E) położone jest na zachód od miejscowości Żary. Jest to obszar po byłej żwirowni, na którym pozostawiono liczne bardzo płytkie zagłębienia terenu, zimową porą w różnym stopniu napełniające się wodą. Powstające w ten sposób akweny chętnie zasiedlane są przez płazy. Teren jest nasłoneczniony, częściowo trawiasty, z dominującym trzcinnikiem piaskowym (*Calamagrostis epigejos*), sukcesywnie porastany przez coraz bardziej zwarte kępy drzew i gęste zakrzaczenia. Większość zbiorników wodnych zanika już w okresie wiosennym, a woda utrzymuje się tylko w większych zagłębieniach. Poziom wody w akwenie wytypowanym do badań utrzymuje się zazwyczaj 2 – 4 tygodnie dłużej niż w sąsiednich zbiornikach. Teren jest silnie zaśmiecany. Otoczenie częściowo porośnięte jest przez lasy sosnowe, a częściowo wykorzystywane jest rolniczo. Stopień zagospodarowania rolnego w buforze stanowiska wyniósł 34%, a udział terenów zurbanizowanych obliczony został na 16%. Poboru materiału do badań dokonano 18–20.05.2021 r. i 18–20.07.2021 r.

Stanowisko S23 – Zielona Góra, Jędrzychów II (51°53'46"N, 15°30'47"E) zlokalizowane jest na przedmieściach Zielonej Góry, w dzielnicy Jędrzychów. Miejsce poboru prób stanowiły wysychające partie stawu położone wśród zadrzewień, a przy wyższym poziomie wody, łączące się w większe przyjeziorne rozlewisko. W linii brzegowej głębszych partii

akwenu znajduje się wykształcona strefa litoralna z dominującą trzciną pospolitą (*Phragmites australis*). Stanowisko charakteryzuje się obecnością różnorodnych odpadów mogących stanowić źródło mikroplastiku (fotele, siatki, opakowania). Obliczony w GIS procentowy udział powierzchni zurbanizowanej na tym stanowisku wyniósł 25%, a powierzchni rolnej – 14%. Materiał do badań pobrano 15.04.2021 r. oraz 31.05.2021 r.

#### 6.2. Pobór prób

Materiał do badań zbierano na terenie województwa lubuskiego, od kwietnia do września w latach 2021 – 2023. Łącznie w tym okresie, zarówno materiał biologiczny (larwy płazów) jak również próby wody i osadów dennych, zebrano na 23 stanowiskach zlokalizowanych głównie w rejonie Zielonej Góry, Sulechowa i Żar, a ponadto Gorzowa Wielkopolskiego (ryc. 4). Szczegółowe informacje na temat stanowisk i liczby zebranych larw płazów poszczególnych gatunków przedstawiono w tab. 2.

#### 6.2.1. Larwy płazów

Martwych larw płazów poszukiwano wzrokowo w wodzie, wśród roślinności, ale przede wszystkim na wypłycających się pozostałościach akwenów i na wysychających osadach dennych. Delikatnie zbierano je metalową pincetą i umieszczano w szklanych słoikach wypełnionych 70% etanolem, które opisywano. Zbiór larw przeprowadzono na podstawie decyzji Regionalnej Dyrekcji Ochrony Środowiska w Gorzowie Wielkopolskim (zezwolenie nr WPN-I.6401.161.2021.JK /zał. 1/). Łącznie pobrano 934 larwy płazów należące do 10 gatunków (tab. 1, tab. 2). Były to 244 stadia larwalne przedstawicieli salamandrowatych (Salamandridae), 23 kumakowatych (Bombinatoridae), 361 ropuchowatych (Bufonidae) oraz 306 żabowatych (Ranidae).

Rodzina	Takson	Liczba larw [szt.]	Liczba stanowisk poboru prób
salamandrowate	traszka grzebieniasta Triturus cristatus (Tc)	61	3
Salamandridae	traszka zwyczajna Lissotriton vulgaris (Lv)	93	3
	traszka górska <i>Ichthyosaura alpestris</i> (Ia)	90	3
kumakowate Bombinatoridae	kumak nizinny <i>Bombina bombina</i> (Bob)	23	1
ropuchowate	ropucha szara Bufo bufo (Bb)	124	5
	ropucha zielona Bufotes viridis (Bv)	120	3
Butonidae	ropucha paskówka Epidalea calamita (Ec)	117	3
żabowate	żaba trawna <i>Rana temporaria</i> (Rt)	128	5
D 11	żaba moczarowa Rana arvalis (Ra)	88	4
Kanidae	żaby z kompleksu żab zielonych <i>Pelophylax</i> esculentus complex (Pec)	90	3

Tabela 1. Taksony larw płazów pobrane do badań, liczba larw oraz stanowisk poboru prób. Liczba stanowisk poboru prób nie sumuje się do 23, gdyż z niektórych stanowisk pobrano kilka różnych taksonów.

Na ośmiu spośród wszystkich 23 stanowisk pobrano larwy płazów więcej niż jednego gatunku. Umożliwiło to kontrolowanie wpływu zmiennej "stanowisko" w późniejszych analizach statystycznych.
Stanowisko	Koordynaty geograficzne	Udział powierzchni zurbanizowanej [%]	Udział powierzchni rolnej [%]	Takson	Liczba larw [szt.]
S1	52°46'05"N, 15°13'59"E	43	37	Rt	37
S2	51°42'15"N, 15°28'32"E	29	71	Tc / Lv / Ra	29 / 33/ 22
S3	52°00'18"N, 15°25'26"E	18	0	Ec	41
S4	51°45'58"N, 15°15'33"E	0	65	Bv	42
S5	52°02'39"N, 15°26'41"E	0	82	Ec	30
S6	52°47'28"N, 15°12'28"E	36	54	Pec	30
S7	52°00'21"N, 15°32'08"E	10	65	Pec	30
S8	52°02'08"N, 15°19'06"E	10	55	Ra	32
S9	52°01'38"N, 15°36'16"E	10	78	Bv	41
S10	51°58'17"N, 15°18'06"E	2	35	Bb / Rt	30 / 30
S11	51°55'55"N, 15°25'15"E	9	24	Ia	30
S12	51°53'39"N, 15°31'11"E	10	13	Ia	30
S13	51°49'10"N, 15°43'06"E	64	27	Tc / Lv / Ra	24 / 30 / 14
S14	51°48'57"N, 15°13'36"E	8	30	Bb / Bv	10 / 37
S15	51°55'47"N, 15°27'15"E	13	0	Ia / Lv	30 / 30
S16	51°38'07"N, 15°02'50"E	23	51	Ec / Rt	46 / 30
S17	52°04'32"N, 15°37'01"E	61	39	Bb / Rt	10 / 30
S18	52°15'06"N, 15°32'52"E	55	45	Ra	20
S19	51°55'35"N, 15°25'33"E	25	19	Тс	8
S20	51°55'33"N, 15°32'42"E	35	0	Bb / Rt	44 / 1
S21	51°54'37"N, 15°31'42"E	49	0	Pec	30
S22	51°37'46"N, 15°05'11"E	16	34	Bob	23
S23	51°53'46"N, 15°30'47"E	25	14	Bb	10

Tabela 2. Koordynaty położenia geograficznego miejsc poboru prób oraz udział powierzchni zurbanizowanej i rolnej w obrębie bufora o promieniu 1 km (zob. podr. 6.4.). Podano ponadto taksony i liczby larw zebrane na poszczególnych stanowiskach. Skróty taksonów – zob. rozdz. 3.

## 6.2.1.1. Gatunki ujęte w badaniach

Gatunki płazów i ilość osobników pobranych do badań odzwierciedlają oportunistyczny pobór prób wynikający z ograniczenia się do zbierania martwych larw. Ich przynależność gatunkową określano na podstawie cech morfologicznych przedstawionych w kluczu Bergera (2000), z wykorzystaniem binokularu Nikon SM Z445. Poprawność oznaczeń była konsultowana z 2 - 3 osobami, a larwy niemożliwe do oznaczenia były pomijane.

### Traszka grzebieniasta – Triturus cristatus (Laurenti, 1768)

Dorastając do 18 cm długości całkowitej, jest ona największym krajowym gatunkiem traszek. Brzuszna strona ciała dorosłych osobników jest żółta lub pomarańczowa, z obecnymi różnokształtnymi, czarnymi plamami. Podczas pory godowej u samców wykształca się szata godowa, silnie zatem zaznaczony jest wtedy dymorfizm płciowy. W warunkach klimatycznych Polski traszki rozpoczynają okres godowy już na przełomie zimy i wiosny. Ich larwy są żarłoczne, przez co szybko rosną. Odżywiają się przede wszystkim pokarmem zwierzęcym. Poza porą godową, traszki prowadzą lądowy i bardzo skryty tryb życia. Znaczącą część czasu spędzają na polowaniu na drobne bezkręgowce, w szczególności nagie ślimaki i dżdżownice (Najbar 1995, Thiesmeier i in. 2009). Zasięg występowania tego gatunku jest szeroki, przy czym w wielu krajach obserwuje się lokalne zanikanie populacji, wynikające w głównej mierze z działalności ludzkiej (Jehle i in. 2011).

### Traszka zwyczajna – Lissotriton vulgaris (Linnaeus, 1758)

Traszkę zwyczajną uznaje się za najczęściej występujący w Polsce gatunek traszek (Juszczyk 1987). Zasiedla ona również cały obszar województwa lubuskiego. Najbardziej wyrośnięte osobniki osiągają 11 cm długości całkowitej. Nie jest ona wybredna co do wyboru stanowisk rozrodczych, wnikając w tym okresie nawet do płytkich zagłębień okresowo wypełnionych wodą. Na terenie, który objęły badania, w niektórych zbiornikach rozrodczych, przedstawiciele tego gatunku występowali razem z traszkami górskimi i traszkami grzebieniastymi. Larwy traszek są żarłoczne i odżywiają się drobnymi bezkręgowcami. Dorosłe polują głównie na niewielkie lądowe owady, pajęczaki, mięczaki i pierścienice (Grosse i in. 2013).

### Traszka górska – Ichthyosaura alpestris (Laurenti, 1768)

Dorosłe samce traszki górskiej dorastają do 8 cm, a samice do 11 cm. Samce w szacie godowej są niebieskawe. Podobnie jak w przypadku innych krajowych gatunków traszek, ich

jaja są pojedynczo przylepiane przez samice do liści roślin podwodnych. Larwy traszki górskiej odżywiają się głównie zooplanktonem. Dorosłe osobniki poza porą godową prowadzą lądowy i skryty tryb życia, polując na drobne bezkręgowce (Thiesmeier i Schulte 2010). Najbardziej na północ wysunięte stanowiska zwartego zasięgu występowania traszki górskiej w Polsce znajdują się w rejonie Zielonej Góry (Najbar 1995).

#### Kumak nizinny – Bombina bombina (Linnaeus, 1761)

Jest to jedyny przedstawiciel rodziny kumakowatych (Bombinatoridae) występujący na obszarze badań. Jest on gatunkiem związanym z nizinami i dolinami rzecznymi (Głowaciński i Sura 2018). Dorosłe osobniki osiągają 4 – 5 cm długości, a ich skórę, głównie w wierzchniej części ciała, pokrywają liczne brodawki. Kumaki nizinne zasiedlają zróżnicowane akweny, także o niestałym charakterze. Okresowo prowadzą wędrowny tryb życia przemieszczając się w obrębie blisko położonych zbiorników wodnych. Pokarmem larw kumaka nizinnego są zarówno drobne rośliny jak również szczątki zwierząt. Dorosłe polują głównie na pospolite organizmy litoralne o niewielkich rozmiarach.

#### **Ropucha paskówka** – *Epidalea calamita* (Laurenti, 1768)

Ropucha paskówka występuje w środkowej i zachodniej Europie. Jest to najrzadszy i najmniejszy gatunek spośród rodzimych ropuch. Także na obszarze zachodniej Polski jest rzadko i lokalnie spotykana. Prowadzi skryty, wędrowny tryb życia. Rzadko skacze, porusza się raczej krocząc lub biegając. Dorosłe samce osiągają 7 cm, a samice 8 cm długości (Najbar 1995). Jest to gatunek w pewnym stopniu przystosowany do zasiedlania płytkich, typowo okresowych i często wysychających zbiorników wodnych, w których próbuje się rozmnażać. Larwy i dorosłe osobniki są żarłoczne, a ich pokarm początkowo stanowią niewielkie wodne glony i szczątki roślinne oraz zwierzęce, a po opuszczeniu środowiska wodnego małe powszechnie występujące bezkręgowce lądowe (Sinsch 1998).

### Ropucha szara – Bufo bufo (Linnaeus, 1758)

Ropucha szara jest na obszarze badań gatunkiem pospolitym. Podobnie jak inne krajowe gatunki ropuch, poza okresem godowym prowadzi typowo zmierzchowy, nocny i lądowy tryb życia (Najbar 1995). Jej skrzek i kijanki są trujące za sprawą posiadanych toksyn. Ropuchy szare odnoszą zatem sukces rozrodczy także w zarybionych akwenach, gdyż nie ulegają silnej presji drapieżniczej ze strony ryb. Zarówno larwy, jak i dorosłe osobniki są bardzo żarłoczne. Podczas kilkutygodniowego okresu larwalnego, kijanki poza glonami porastającymi rośliny wodne i przedmioty zanurzone w wodzie, odżywiają się także szczątkami roślinnymi i

zwierzęcymi. Dorosłe polują przede wszystkim na drobne, pospolite zwierzęta lądowe (Maletzky i in. 2016).

### Ropucha zielona – Bufotes viridis (Laurenti, 1768)

Ciało przedstawicieli tego gatunku jest krępe i masywne. Dorosłe samce dorastają zwykle do 8,5 cm, a samice nawet do 10,5 cm (Najbar 1995). Ropuchy zielone, podobnie jak ropuchy paskówki godują później niż ropuchy szare, tj. zazwyczaj w maju i w czerwcu. Jest to gatunek, który najchętniej spośród naszych ropuch wnika w obręb terenów zurbanizowanych i pobliże człowieka, wykorzystując do godów nawet większe kałuże, rozlewiska polne, koleiny dróg, baseny, stawiki ogrodowe czy fontanny. Podobnie jak pozostałe gatunki ropuch, są one także żarłoczne pożerając niewielkie wodne i lądowe organizmy. Larwy odżywiają się głównie glonami, które porastają rośliny i przedmioty zanurzone w toni wodnej.

### Żaby z kompleksu żab zielonych – *Pelophylax esculentus* complex

Występujący na terenie województwa lubuskiego przedstawiciele tej grupy płazów to: żaba śmieszka (*Pelophylax ridibundus*), żaba jeziorkowa (*Pelophylax lessonae*) i żaba wodna (*Pelophylax* kl. *esculentus*) (Głowaciński i Sura 2018). Ostatni z wymienionych taksonów jest hybrydogenetycznym płodnym mieszańcem dwóch pierwszych. Często występują wspólnie w różnych akwenach, gdzie się krzyżują. Polska nazwa tej grupy nawiązuje do przeważnie zielonego ubarwienia grzbietowej części ciała jej przedstawicieli. Ze względu na wyjątkową trudność w rozróżnianiu tych taksonów na podstawie morfologii stadiów larwalnych, wszystkich przedstawicieli rodzaju *Pelophylax* w pracy potraktowano jako *Pelophylax esculentus* complex. Kijanki żab zielonych są bardzo żarłoczne, odżywiają się zarówno materiałem roślinnym, jak i zwierzęcym (Berger 1975).

### Żaba trawna – Rana temporaria Linnaeus, 1758

Przedstawiciele tego gatunku dorastają do ok. 10 cm. Wewnątrzgatunkowa zmienność ubarwienia i uplamienia jest znaczna. Zawsze obecne są jednak ciemne plamy skroniowe, a grzbiet ubarwiony jest w odcieniach brązu. Żaba trawna jest lokalnie pospolitym gatunkiem o szerokim zasięgu występowania, jednakże na terenie badań obserwuje się zanik jej stanowisk i spadek liczebności poszczególnych populacji. Żaba trawna występuje na stanowiskach zacienionych, często w pobliżu akwenów wodnych i cieków. Larwy są żarłoczne pożerając zarówno pokarm roślinny, jak i zwierzęcy, natomiast podczas życia na lądzie żaby te odżywiają się niewielkimi, pospolitymi bezkręgowcami.

### Żaba moczarowa – Rana arvalis Nilsson, 1842

Żaba moczarowa należy z żabą trawną do grupy tzw. żab brunatnych. W przeciwieństwie do powyżej opisanego gatunku, prowadzi ona bardziej dzienny tryb życia i zasiedla mniej wilgotne środowiska. Dorasta do ok. 7 cm długości. Pysk jest ostro zakończony, co odróżnia ją od żaby trawnej. Samce podczas godów przybierają niebieski kolor. Na badanym terenie nie należy ona do gatunków pospolitych. Lokalnie, głównie w dolinie rzeki Odry, jest nieco bardziej liczebna. Żarłoczne kijanki żaby moczarowej odżywiają się przede wszystkim drobnymi, miękkimi roślinami i szczątkami roślin oraz zwierząt. Dorosłe osobniki prowadzą lądowy tryb życia, a ich pokarmem są wówczas niewielkie bezkręgowce, w szczególności pajęczaki, owady, mięczaki i pierścienice (Berger 1975, Glandt i Jehle 2008).

### 6.2.2. Woda

W okresie od kwietnia do września z każdego z badanych zbiorników (N=23) pobrano po dwa litry wody z głębokości 0 – 18 cm. Pobór prób odbywał się przed poborem osadów dennych, dla uniknięcia zanieczyszczenia wzburzonymi z dna drobinami osadu. Za pomocą wiaderka wykonanego ze stali nierdzewnej, wodę wlewano do uprzednio starannie umytych i zabezpieczonych szklanych butelek, które następnie zamykano i etykietowano. Metodyka ta stosowana była przez innych badaczy (np. Hu i in. 2018, Karaoğlu i Gül 2020), co pozwala na wzajemne porównanie wyników badań.

## 6.2.3. Osad denny

Z dna każdego ze zbiorników (N=23) pobrano około 1 kg osadu dennego. Posłużono się przy tym małym wiaderkiem ze stali nierdzewnej. Pobrany materiał umieszczano i zamykano w uprzednio starannie umytych dwulitrowych szklanych słojach, które etykietowano. Do czasu ich analizy, zamknięte słoje przechowywano w zamrażarce w temperaturze -20°C.

## 6.3. Analiza prób

Badania laboratoryjne przeprowadzone zostały z zastosowaniem praktyk mających na celu minimalizację możliwości zanieczyszczenia krzyżowego obcym mikroplastikiem (Koelmans i in. 2019). Sprzęt laboratoryjny oraz pojemniki do przechowywania próbek każdorazowo płukano wodą destylowaną. Prace wykonywano fartuchu laboratoryjnym i jednorazowych rękawiczkach nitrylowych, rezygnując z używania jakichkolwiek plastikowych przyrządów czy pojemników. Ponadto pracowano w laboratorium z minimalną liczbą personelu i pozbawionym wykładzin, a wykorzystywane powierzchnie były czyszczone przed każdą procedurą. Aby ograniczyć ekspozycję na potencjalne zanieczyszczenia z powietrza, czas przetwarzania próbek był minimalizowany, a próbki, jeśli nie były analizowane, pozostawały pod przykryciem.

## 6.3.1. Pomiary larw płazów

Długość całkowita każdej z zebranych larw płazów została indywidualnie zmierzona linijką z dokładnością do 1 mm. Do pomiaru masy ciała osobników, z dokładnością do 0,1 mg, posłużono się wagą elektroniczną RADWAG AS 160.R2. Zaawansowanie rozwoju larwalnego określono na podstawie stadiów Gosnera (1960), z wykorzystaniem binokularu Nikon SM Z445.

### 6.3.2. Ekstrakcja drobin mikroplastiku

Przed przystąpieniem do detekcji, walidacji i pomiarów mikroplastików, przeprowadzano ich izolację z larw płazów, wody oraz osadów dennych. Szczegóły metodyki ekstrakcji przedstawiono poniżej.

### 6.3.2.1. Larwy płazów

Każdą z analizowanych larw płukano wodą destylowaną, krojono skalpelem chirurgicznym, a następnie pojedynczo umieszczano w 100 ml szklanej zlewce laboratoryjnej wypełnionej 30 ml 30% (v/v)  $H_2O_2$  (cz.d.a.). Zlewki pozostawiano na 24 godziny w ustawionej na 50°C cieplarce laboratoryjnej CLW 15 STD (ryc. 9). Następnie zawartość każdej ze zlewek, za pomocą pompki wodnej, kolby ssawkowej oraz lejka Büchnera, pojedynczo przefiltrowywano na filtrach z włókna szklanego o średnicy 47 mm i porowatości 1,2 µm (Whatman 1822-047). Filtry te, za pomocą pincety, umieszczano następnie pod przykryciem w opisanych szklanych szalkach Petriego.



Ryc. 9. Trawienie larw płazów celem ekstrakcji mikroplastików.

## 6.3.2.2. Woda

Przy użyciu pompki wodnej, kolby ssawkowej i lejka Büchnera, woda z każdego stanowiska była osobno filtrowana przez nylonowe filtry o średnicy 47 mm i porowatości 20  $\mu$ m (Merck Millipore NY2004700). Filtrację prowadzono do momentu znacznego zmniejszenia przepływu filtratu, wynikającego z osadzenia się na filtrze dużej ilości cząsteczek stałych. W celu usunięcia materii organicznej, zawartość każdego filtra, przypuszczalnie zawierająca zarówno mikroplastiki, jak i materię organiczną, była spłukiwana 150 ml 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (cz.d.a.) do oddzielnej szklanej kolby laboratoryjnej o pojemności 250 ml. Następnie kolba była przykrywana i umieszczana w cieplarce laboratoryjnej CLW 15 STD, gdzie pozostawała przez dobę w temperaturze 65°C. Po tym czasie, pozostała ciecz była wstrząsana i filtrowana przez poliwęglanowy filtr o średnicy 47 mm i porowatości 5  $\mu$ m (Whatman Nuclepore 10417412). Każdy z filtrów następnie umieszczano osobno w opisanych i przykrytych szklanych szalkach Petriego.

### 6.3.2.3. Osad denny

Przed rozpoczęciem analiz, osad z każdego stanowiska był rozmrażany poprzez przeniesienie słoja do pomieszczenia o temperatury pokojowej. Następnego dnia, jego zawartość była umieszczana w aluminiowym garnku, który pozostawiano na przynajmniej 24 godziny w cieplarce laboratoryjnej CLW 15 STD w temperaturze 65°C. Wysuszony osad zamykano w szklanych słoikach zaopatrzonych w etykiety. W celu dokonania rozdzielenia

gestościowego, opartego na różnicy w średnich masach drobin mikroplastiku i pozostałych składowych osadu (np. ziarenek piasku), wykorzystano nasycony wodny roztwór NaCl (1,19 g / cm<sup>3</sup>, cz.d.a.). Związek ten jest powszechnie używany do tych celów przez innych badaczy (np. Hu i in. 2018, Duong i in. 2022). Pojedynczo, do 250 ml szklanych zlewek laboratoryjnych wypełnionych nasyconym wodnym roztworem NaCl wsypywano po 30 g wysuszonego osadu z każdego z badanych zbiorników. Zawartość mieszano szklaną bagietką i pozostawiano na 24 godziny. Następnego dnia, dekantowano warstwe wodna (ok. 125 – 150 ml). Za pomocą pompki wodnej, kolby ssawkowej i lejka Büchnera filtrowano ją przez nylonowy filtr o średnicy 47 mm i porowatości 20 µm (Merck Millipore NY2004700). Materiał na filtrze był następnie spłukiwany 150 ml 30% (v/v)  $H_2O_2$  (cz.d.a.) do szklanej kolby laboratoryjnej. Aby wspomóc trawienie materii organicznej, kolby były przykrywane i umieszczane w cieplarce laboratoryjnej CLW 15 STD w temperaturze 65°C, gdzie pozostawały przez dobę. Po tym czasie zawartość kolb była wstrząsana i filtrowana przez poliweglanowy filtr o średnicy 47 mm i porowatości 5 µm (Whatman Nuclepore 10417412). Każdy filtr z tak wyekstrahowanymi cząstkami był starannie umieszczany za pomocą pincety w indywidualnie oznaczonej i przykrytej szklanej szalce Petriego. Po pierwszej dekantacji, roztwór NaCl z osadem w każdej ze szklanych zlewek był uzupełniany nasyconym roztworem NaCl do 200 ml. Zawartość zlewek była ponownie mieszana i pozostawiana na noc, po czym następowała druga ekstrakcja, mająca zapewnić odzyskanie wszystkich mikroplastików z próbek.

## 6.3.3. Analiza ilościowa, morfometryczna i chromatyczna mikroplastików

Wstępna identyfikacja drobin mikroplastiku była przeprowadzana poprzez wizualną inspekcję całych filtrów, w powiększeniu 40x, za pomocą mikroskopu Nikon ECLIPSE Ni-U wyposażonego w kamerę Nikon DS-Fi2. Uzyskany obraz był analizowany na komputerze za pomocą programu NIS-Elements Br. Do oświetlenia próbek wykorzystywano oświetlacz światłowodowy zapewniający jednakowe warunki świetlne przy każdej inspekcji. Dla celów dokumentacyjnych, każda cząsteczka była sfotografowana przy użyciu kamery Nikon DS-Fi2.

Cząstki mikroplastików były identyfikowane, liczone i kategoryzowane do jednego z czterech odrębnych typów morfologicznych (kształtów): włókno, płatek, fragment, granulka.

Każdej cząstce przypisano także jeden dominujący kolor, z 15 kolorów zaproponowanych przez Hankego i in. (2013), tj.: czarny, niebieski, brązowy, biało-kremowy, krystaliczny, zielony, szary, matowy, pomarańczowy, różowy, czerwony, beżowy, przezroczysty, biały, żółty.

Za pomocą oprogramowania NIS-Elements Br zmierzono długość każdej drobiny w najszerszym jej miejscu. Dla włókien, nawet zwiniętych, pomiar ten obejmował całą długość. W przypadkach, gdy włókno rozgałęziało się, pomiar uwzględniał długość najdłuższego pasma.

Za pomocą ww. oprogramowania zmierzono także pola powierzchni płatków, fragmentów i granulek.

### 6.3.4. Walidacja i analiza jakościowa mikroplastików

Do walidacji i analizy jakościowej reprezentatywnych drobin podejrzanych o stanowienie mikroplastiku posłużono się spektrometrem Nicolet™ iS50 FTIR wyposażonym w przystawke ATR, pozwalająca na wykorzystanie techniki osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia. W ten sam sposób przeanalizowano także część drobin wyizolowanych z larw płazów, których nie podejrzewano o stanowienie mikroplastiku. Wybrane do badań próbki były reprezentatywne dla całości zebranych materiałów, co zapewniało wiarygodność wyników. Drobiny były indywidualnie przenoszone z powierzchni filtrów na kryształ spektrometru za pomocą stalowej igły lub pincety. Ze względu na bardzo małe rozmiary badanych próbek, każdy pomiar spektrometryczny złożony był z 50 skanów. Widma spektralne rejestrowano w zakresie 4000 - 400 cm<sup>-1</sup>, z rozdzielczościa 4 cm<sup>-1</sup>. Pomiędzy pomiarami kryształ ATR, kowadło oraz stalowe narzędzia były każdorazowo czyszczone 70% etanolem, zapewniając pełne odparowanie wszelkich pozostałości alkoholu przed kolejnymi pomiarami. Uzyskane widma analizowano przy użyciu oprogramowania OMNIC i platformy Open Specy (Cowger i in. 2021). Walidacja prób polegała na porównaniu ich widm spektralnych z dostępnymi w bibliotekach referencyjnymi widmami spektralnymi polimerów syntetycznych oraz materiałów naturalnych. Dla walidacji wymagane było dopasowanie na poziomie przynajmniej 60%. W przypadkach, gdy dopasowanie wynosiło między 60 a 70%, przeprowadzano dodatkowo manualna analize widm. Cząstki, które nie zostały przeanalizowane, ale wykazywały wyraźne podobieństwa w

wyglądzie (rozmiar, kolor i kształt) do potwierdzonych drobin mikroplastiku, były również traktowane jako mikroplastiki.

### 6.4. Analiza przestrzenna stanowisk poboru prób

Analizy przestrzenne wykonano przy użyciu oprogramowania QGIS (wersja 'Firenze') (QGIS Development Team 2022) i bazy danych CORINE LandCover 2018 (European Environment Agency 2020).

W celu oszacowania antropopresji, zastosowano system informacji geograficznej (GIS) do obliczenia udziału terenów zurbanizowanych w obrębie okrągłego buforu o promieniu 1 km dla każdego ze stanowisk poboru prób (N=23). Za obszary zurbanizowane przyjęto klasę "tereny antropogeniczne" (kod 1 w CORINE LandCover), która obejmuje zabudowę miejską, tereny przemysłowe, handlowe i komunikacyjne, kopalnie, wyrobiska i budowy oraz miejskie tereny zielone i wypoczynkowe.

Obliczono także jaką część powierzchni tych buforów stanowiły "tereny rolne" (kod 2 w CORINE LandCover), tj.: grunty orne, uprawy trwałe, łąki i pastwiska oraz obszary upraw mieszanych. Wyniki tych analiz w ujęciu procentowym przedstawiono w tab. 2.

## 6.5. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono w środowisku R (R Development Core Team 2021). Do wygenerowania wykresów zastosowano pakiet ggplot2 (Wickham 2016).

### 6.5.1. Obciążenie mikroplastikiem larw płazów

Poprzez obciążenie mikroplastikiem rozumie się ilość drobin mikroplastiku przypadającą na osobnika.

Ponieważ długość i masa ciała stadiów larwalnych płazów były skorelowane (współczynnik korelacji Pearsona, P<0,001), zastosowano analizę głównych składowych (PCA) aby uzyskać zmienną będącą dobrym wskaźnikiem rozmiaru larw. Tak otrzymana zmienna, nazwana "rozmiar", była silnie skorelowana zarówno z masą ciała, jak i z długością (0,98 dla obu

zmiennych, ryc. 10). Uznano ją za specyficzny dla gatunku wiarygodny wskaźnik zaawansowania rozwoju larwalnego (Alford i in. 2013) i wykorzystano w dalszych analizach.



Ryc. 10. Korelacja Pearsona między masą ciała larw płazów, ich długością oraz otrzymaną z tych zmiennych składową główną "rozmiar". \*\*\* oznacza wartość *p* poniżej 0,001.

Analiza współliniowości predyktorów mających postać zmiennych ciągłych (rozmiar larwy, dzień roku poboru próby, udział terenów zurbanizowanych w obrębie bufora, udział terenów rolnych w obrębie bufora) przeprowadzona z zastosowaniem współczynnika inflacji wariancji (VIF) wykazała brak współliniowości – najwyższa wartość VIF wynosiła 2,1.

Celem zbadania wpływu: 1) udziału obszarów zurbanizowanych w obrębie bufora wokół stanowiska poboru próby (zmienna ciągła), 2) udziału obszarów rolnych w obrębie tego bufora (zmienna ciągła), 3) gatunku (zmienna kategoryczna), 4) rozmiaru osobników (zmienna ciągła, otrzymana z PCA), 5) dnia roku poboru próby (zmienna ciągła) na obciążenie mikroplastikiem larw płazów, zastosowano model regresji o ujemnym rozkładzie dwumianowym z efektami mieszanymi. Użyto w tym celu funkcji 'glmer.nb' z pakietu 'MASS' (Venables i Ripley 2002). Model ten bierze pod uwagę potencjalną zmienność między stanowiskami i między gatunkami w obrębie tych stanowisk. Dzięki zastosowaniu efektów losowych (składnia: 1 + rozmiar | gatunek: stanowisko), model kontroluje możliwą zmienność w wyrazie wolnym oraz efekt wielkości próby gatunków i stanowisk. By przetestować zmienne zależne, pełen model (ze wszystkimi zmiennymi) został porównany za pomocą testu zgodności chi-kwadrat z jego uproszczonymi wersjami pozbawionymi zmiennych docelowych wskutek zastosowania funkcji drop1(). Funkcja ta umożliwiła usuwanie konkretnych zmiennych, i tak zredukowane modele porównywano pod względem zgodności z pełnym, oryginalnym, modelem za pomocą kryterium informacyjnego Akaikego. W przypadku zmiennej kategorycznej grupy taksonów (rodziny, z wyłączeniem kumakowatych /Bombinatoridae/), stopień obciążenia mikroplastikiem został porównany przy użyciu testów post-hoc Sidaka.

## 6.5.2. Zróżnicowanie typów morfologicznych mikroplastiku w larwach płazów

Aby wyrazić zróżnicowanie typów morfologicznych (kształtów) drobin mikroplastiku wyizolowanych z larw płazów, wykorzystano wskaźnik Levina (Krebs 1989). Wskaźnik ten obliczono tylko dla larw obciążonych mikroplastikiem, czyli takich, u których stwierdzono obecność przynajmniej jednej drobiny (N=663).

Wzór na wskaźnik Levina przedstawia się następująco:

$$B = \frac{1}{\sum p_j^2}$$

gdzie:

B = wskaźnik Levina

 $p_j$  = stosunek połkniętych drobin typu morfologicznego *j* do całkowitej liczby połkniętych drobin.

W przypadku czterech różnych typów morfologicznych mikroplastiku (włókno, płatek, granulka, fragment), wskaźnik ten uwzględnia zarówno zróżnicowanie, jak i ilość konkretnych kształtów.

Wartości wskaźnika Levina nie miały rozkładu normalnego, dlatego też do analizy zastosowano regresję o rozkładzie ujemnym dwumianowym. Z tego względu, że regresja wymaga liczebności, przed analizą pomnożono wartości wskaźnika Levina przez 10.

Struktura modelu i procedura jest analogiczna do analizy stopnia zanieczyszczenia mikroplastikiem larw (podrozdz. 6.5.1.).

# 6.5.3. Długość i pole powierzchni drobin mikroplastiku wyizolowanych z larw płazów

Do zbadania wpływu: 1) rodziny (ranga taksonomiczna, zmienna kategoryczna), 2) rozmiaru larw (zmienna ciągła), 3) stopnia ich obciążenia mikroplastikiem (zmienna ciągła), 4) kształtu mikroplastików (zmienna kategoryczna) oraz 5) udziału terenów zurbanizowanych w buforze wokół stanowiska poboru próby (zmienna ciagła) na długość i pole powierzchni drobin mikroplastiku wykorzystano modele regresji z efektami mieszanymi. Wykorzystano przy tym pakiet "lme4" (Bates i in. 2014). Model ten bierze pod uwagę potencjalną zmienność między stanowiskami i między gatunkami w obrębie tych stanowisk. Poprzez zastosowanie efektów losowych (składnia: 1 + rozmiar | rodzina: stanowisko), uwzględniono potencjalne różnice zarówno w wyrazie wolnym, jak i w efekcie wielkości próby rodzin i (jednostka taksonomiczna) i stanowisk. Przetestowano także modele z interakcjami: kształt mikroplastiku × rozmiar larwy oraz kształt mikroplastiku × udział terenów zurbanizowanych w obrębie bufora. Przed przeprowadzeniem analiz, zmienne zależne (długość drobin, powierzchnia drobin) oraz zmienna niezależna (rozmiar larwy) zostały poddane transformacji logarytmicznej. Jak można zaobserwować na wykresie kwantylowym (ryc. 11), model zlogarytmowanej długości wykazywał rozkład normalny. Jednorodność wariancji dla zmiennej "kształt" potwierdzono testem Levene'a (F=1,067; p=0,362).



Ryc. 11. Wykres kwantylowy reszt modelu liniowego z efektami mieszanymi. Oceniono normalność reszt dopasowanych do zlogarytmowanych wartości długości.

Wobec zmiennej "pole powierzchni", która nie wykazywała rozkładu normalnego, użyto przekształcenia Boxa-Coxa ( $\lambda$ =-0,141). W ten sposób otrzymano zmienną "powierzchnia\_przekształcone", która charakteryzowała się rozkładem normalnym (ryc. 12). Test Levene'a dla kształtu również potwierdził jednorodność wariancji (F=0,333; p=0,717).



Ryc. 12. Wykres kwantylowy reszt modelu liniowego z efektami mieszanymi. Oceniono normalność reszt dopasowanych do wartości pola powierzchni poddanych transformacji Boxa-Coxa.

Do oceny wpływu poszczególnych zmiennych zastosowano test chi-kwadrat, który porównuje pełny model z wersjami zredukowanymi, które to pomijały zmienne docelowe. W procedurze tej wykorzystano funkcję drop1(), pozwalającą na usuwanie zmiennych z modelu i porównywanie powstałych tak modeli z modelem oryginalnym. Do porównań wykorzystano kryterium Akaikego. Interakcje nieistotne statystycznie nie zostały włączone do końcowego modelu.

Długości poszczególnych typów morfologicznych drobin mikroplastiku porównano ze sobą za pomocą testów post-hoc Tukeya. Ponadto za pomocą testów Tukeya porównano ze sobą także pola powierzchni mikroplastików mających formę granulek, płatków oraz fragmentów. Temu porównaniu post-hoc zostały także poddane średnie pola powierzchni mikroplastików wyizolowanych z larw należących do różnych rodzin, tak by sprawdzić obecność potencjalnych różnic.

## 6.5.4. Analiza podobieństw ANOSIM

Dla analizy częstości występowania: 1) kształtów mikroplastików dla poszczególnych gatunków, 2) kolorów MP dla ich poszczególnych kształtów, 3) kolorów mikroplastików dla poszczególnych gatunków, 4) polimerów dla poszczególnych gatunków, 5) substancji innych niż syntetyczne polimery dla poszczególnych gatunków, przeprowadzono wielopoziomową analizę ANOSIM w pakiecie vegan (Oksanen i in. 2023). ANOSIM to nieparametryczny odpowiednik do ANOVA, który ocenia międzygrupowe różnice w zmiennych jakościowych (Clarke 1993). Obliczana jest wartość R, która wskazuje poziom podobieństwa. Wartości R-ANOSIM większe niż 0,75 dowodzą że grupy są wyraźnie odrębne. Wartości między 0,50 a 0,75 sugerują, że grupy są oddzielne, ale nakładają się. Wartości między 0,25 a 0,50 dowodzą, że grupy są różne lecz częściowo się pokrywają, podczas gdy wartości niższe niż 0,25 oznaczają minimalne różnice między grupami (Ramette 2007).

## 6.5.5. Analiza Indicator Species Analysis (ISA)

Aby zidentyfikować podobieństwa pod względem kształtu, koloru i składu chemicznego mikroplastików wyizolowanych z larw płazów, zastosowano analizę wielowzorcową *Indicator Species Analysis* (De Cáceres i in. 2010) wykorzystując pakiet indicspecies (De Cáceres i Legendre 2009). Kluczową cechą tej metody jest możliwość określania podobnych grup dla zadanych zmiennych kategorycznych. W analizie tej użyto 99 permutacji. Metodę tą zastosowano do wyróżnienia: 1) grup gatunków, w których nadreprezentowane są mikroplastiki konkretnych kształtów, 2) grup gatunków, w których nadreprezentowane są mikroplastiki konkretnych kolorów, 3) kształtów mikroplastików, w których nadreprezentowane są mikroplastiki konkretnych typów polimerów, 5) grup gatunków, w których nadreprezentowane są detekcje konkretnych substancji innych niż syntetyczne polimery.

## 6.5.6. Podobieństwa w profilach zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów, wód i osadów dennych

Przeprowadzono porównania w obrębie stanowisk pod kątem podobieństw koloru, kształtu (typu morfologicznego) oraz składu chemicznego (typu polimeru) drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z wody, osadu oraz larw płazów. Zliczono dopasowania, tzn. gdy ta sama cecha (np. kolor niebieski lub obecność polipropylenu) obecna była w obu grupach. Każdą larwę płaza porównywano w układzie larwa-woda oraz larwa-osad. Jako kontrolę dla analiz larwa-woda i larwa-osad użyto odpowiednio porównań z mikroplastikami wyekstrahowanymi z wody i osadów z wylosowanych stanowisk (z wyłączeniem autoporównań). Wykorzystano 999 permutacji i obliczono średnią liczbę dopasowań. Liczba permutacji została wybrana na podstawie powszechnie stosowanych praktyk statystycznych, tak by zapewnić kompromis między efektywnością obliczeniową, a wiarygodnością wyników. Aby ocenić podobieństwa w obrębie stanowisk pod kątem cech mikroplastików (średnia liczba dopasowań z porównań), zastosowano test chi-kwadrat dobroci dopasowania. Pozwala on porównać zaobserwowaną średnią liczbę dopasowań w obrębie stanowisk do wartości otrzymanych dla kontroli. Hipoteza zerowa, zakładająca brak podobieństw w obrębie stanowisk, oczekuje stosunku 1:1.

## 7. Wyniki

W podrozdziałach: 7.1. Pomiary stadiów larwalnych płazów, 7.2. Obciążenie mikroplastikiem larw płazów oraz 7.3. Typy morfologiczne mikroplastików w larwach płazów przedstawiono wyniki, które zostały opublikowane w artykule Szkudlarek, M., Najbar, B., Jankowiak, Ł. (2023). Microplastics pollution in larvae of toads, frogs and newts in anthropopressure gradient. Ecological Indicators, 155: 110971. Z kolei w podrozdziałach: 7.8. Charakterystyka mikroplastiku wyekstrahowanego z wód i osadów dennych oraz 7.9. Podobieństwa w profilach zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów, wód i osadów dennych zaprezentowano wyniki, które ukazały się w publikacji Szkudlarek, M., Najbar, B., Jankowiak, Ł. (2024). Similarity of Microplastic Characteristics between Amphibian Larvae and Their Aquatic Environment. Animals, 14: 717. Oświadczenia autorów tych prac znajdują się w Załączniku 2.

## 7.1. Pomiary stadiów larwalnych płazów

Wyniki pomiarów długości, masy ciała oraz stadiów Gosnera przeanalizowanych larw płazów przedstawiono w tab. 3.

Takson	Długość całkowita [mm]	Masa ciała [mg]	Stadium Gosnera		
Bb	$20,\!89\pm5,\!81$	$31,\!05\pm17,\!47$	26 - 45		
Bv	$12,\!07\pm2,\!31$	$\textbf{24,}\textbf{42} \pm \textbf{14,}\textbf{92}$	26 - 27		
Ec	$13,05 \pm 3,34$	$29,83\pm6,79$	26 – 27		
Ra	$22,16 \pm 7,15$	$131,07 \pm 47,49$	27 - 37		
Pec	$60,\!91\pm9,\!03$	$2663,\!91\pm570,\!6$	37 - 44		
Rt	$24,\!29\pm7,\!38$	187,47 ± 121,38	27 – 37		
Ia	$41,\!49\pm11,\!47$	$606,01 \pm 327,37$			
Lv	$25{,}49 \pm 3{,}95$	$160,82\pm15,52$	nie dotyczy		
Тс	$31,3\pm4,85$	$251,79\pm98,79$			
Bob	$26{,}57\pm4{,}92$	353,35 ± 133,71	28-35		

Tabela 3. Średnia długość całkowita ( $\pm$ SD), średnia masa ciała ( $\pm$ SD) i zakresy stadiów Gosnera larw poszczególnych taksonów. Skróty taksonów – zob. rozdz. 3.

Przedstawione w tab. 3 pomiary wskazują na to, że największe i najbardziej masywne były kijanki żab z kompleksu żab zielonych (*Pelophylax esculentus* complex; Pec) – średnio 60,9 mm i 2663,9 mg. Najmniejsze i równocześnie najlżejsze okazały się kijanki ropuchy zielonej (*Bufotes viridis*; Bv) – średnio 12 mm i 24,4 mg.

## 7.2. Obciążenie mikroplastikiem larw płazów

Mikroplastik (MP) wykryto w 73% larw płazów, co świadczy o powszechności zanieczyszczenia. Jednak obciążenie mikroplastikiem badanych prób było relatywnie niskie, co zaprezentowano na ryc. 13.



Ryc. 13. Liczba larw płazów, w których odnotowano poszczególne liczby mikroplastików.

Jak wynika z powyższej ryciny, w wielu przebadanych osobnikach (N=251) nie stwierdzono zanieczyszczenia mikroplastikiem. Z drugiej strony, pojedyncze larwy płazów miały w sobie nawet po kilkanaście drobin MP. Dane dotyczące liczb mikroplastiku wyizolowanego z poszczególnych taksonów przedstawiono w tab. 4.

Tabela 4.	Liczba m	nikroplastików	v wyekstrah	iowanych z larv	v płazów	poszczególn	ych	
taksonów	. Podano	wartość minir	nalną (Min	.), maksymalna	ą (Maks.)	oraz średnią	arytmetyc	zną
(Śr.).								

Takson	Min.	Maks.	Śr. ± SD
Bb	0	22	$4,\!516\pm3,\!566$
Bv	0	13	$3{,}267 \pm 2{,}857$
Ec	0	18	$2,\!709 \pm 2,\!453$
Ra	0	8	$1,614 \pm 1,654$
Pec	0	5	$1,\!444 \pm 1,\!326$
Rt	0	17	$1,586 \pm 2,259$
Ia	0	10	$0,\!633 \pm 1,\!224$
Lv	0	11	$1,\!075\pm1,\!595$
Tc	0	5	$1,164 \pm 1,119$
Bob	0	4	$1,\!217 \pm 1,\!061$

Badając model regresji o ujemnym rozkładzie dwumianowym z efektami mieszanymi, zidentyfikowano pozytywną korelację między obciążeniem mikroplastikiem, a udziałem powierzchni zurbanizowanej wokół stanowiska poboru próby (LRT=4,527; df=1; p=0,033; ryc. 14).



Ryc. 14. Dane przedstawiające obciążenie mikroplastikiem larw płazów w stosunku do udziału powierzchni zurbanizowanej w buforze stanowiska poboru próby. Rekordy poszczególnych taksonów zaznaczono kolorami. Linie przerywane reprezentują granice 95% przedziału ufności.

Wyniki te wskazują na to, że larwy płazów pobrane na terenie o większym stopniu urbanizacji były bardziej zanieczyszczone mikroplastikiem.

Stwierdzono również silny efekt gatunku (LRT=19,115; df=9; p=0,024). Wyniki testu posthoc Sidaka, ujawniły bardzo wyraźne różnice (p<0,001) pomiędzy larwami traszek i ropuch pod względem stopnia ich obciążenia mikroplastikiem. Statystycznie istotne różnice (p<0,05) odnotowano także w porównaniu ropuchy-żaby oraz traszki-żaby (ryc. 15). Kijanki ropuch wykazywały najwyższy (śr. 3,5 MP / osobnika), a larwy traszek najniższy (śr. 0,9 MP / osobnika) poziom zanieczyszczenia mikroplastikiem. Poziom pośredni (śr. 1,5 MP / osobnika) stwierdzono dla kijanek żab.



Ryc. 15. Wyniki predykcji średnich z modelu (wraz z 95% zakresami przedziałów ufności) dotyczącego obciążenia mikroplastikiem larw płazów poszczególnych taksonów. Różnice między rodzinami (z wyłączeniem kumakowatych /Bombinatoridae/) zbadano stosując testy post-hoc Sidaka. Wartości *p* mniejsze niż 0,05 są oznaczone jedną gwiazdką (\*), natomiast wartości *p* mniejsze niż 0,001 zaznaczono trzema gwiazdkami (\*\*\*).

Tabela 5. Szacunek parametrów modelu dotyczącego stopnia obciążenia mikroplastikiem larw płazów. Wyraz wolny wskazuje na takson Bb. Podano wartości błędu standardowego (SE) oraz wartości standaryzowane (Wartość Z). Wartości *p* mniejsze niż 0,05 są oznaczone jedną gwiazdką (\*), wartości *p* mniejsze niż 0,01 zaznaczono dwoma gwiazdkami (\*\*), natomiast wartości *p* mniejsze niż 0,001 są oznaczone trzema gwiazdkami (\*\*\*). Ponadto wszystkie statystycznie istotne wyniki zaznaczono pogrubieniem.

Zmienna	Parametr	SE	Wartość Z	Wartość <i>p</i>
Efekty stałe				
wyraz wolny	0,579	0,719	0,806	0,42
powierzchnia zurbanizowana	1,557	0,577	2,698	0,007**
powierzchnia rolnicza	-0,073	0,358	-0,205	0,838
Bv	0,037	0,37	0,1	0,921
Ec	-0,042	0,308	-0,137	0,891
Pec	-0,514	0,642	-0,8	0,423
Ra	-0,815	0,323	-2,521	0,012*
Rt	-0,672	0,308	-2,182	0,029*
Ia	-1,405	0,591	-2,377	0,017*
Lv	-1,313	0,369	-3,561	<0,001***
Tc	-1,144	0,428	-2,673	0,008**
Bob	-0,686	0,652	-1,053	0,292
rozmiar	-0,099	0,08	-1,243	0,214
dzień poboru próby	0,001	0,005	0,182	0,856
Efekty losowe				
grupy				
gatunek: stanowisko	0,165	0,428		
rozmiar	0,007	0,652		

Jak przedstawia powyższa tabela, w modelu dotyczącym obciążenia mikroplastikiem larw płazów, nieistotnymi statystycznie czynnikami okazały się: ich rozmiar (LRT=1,544; df=1; p=0,214), dzień roku poboru próby (LRT=0,033; df=1; p=0,856) oraz udział terenów rolnych w buforze stanowiska poboru próby (LRT=0,042; df=1; p=0,837). Oznacza to, że zmienne te nie miały wpływu na stopień obciążenia mikroplastikiem larw płazów.

## 7.3. Typy morfologiczne mikroplastików w larwach płazów

Wśród drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z larw płazów, najczęściej stwierdzanym typem morfologicznym (kształtem) było włókno – 57,2%, a najrzadziej odnotowywanym – granulka (2,6%; tab. 6).

	Łąc	znie	Fi	ragmen	nt	(	Granul	ka		Płatek	Ĩ	V	Vłókna	)
Takson (N)	N	% Occ	N	%	% Occ	N	%	% Occ	N	%	% Occ	N	%	% Occ
Łącznie (914)	1831	73	453	24,7	14	48	2,6	2	283	15,5	10	1047	57,2	29
Bb (104)	391	88	129	33	63	24	6,1	17	72	18,4	34	166	42,5	69
Bv (120)	392	87	93	23,7	48	2	0,5	2	44	11,2	18	253	64,6	81
Ec (117)	317	87	92	29	42	1	0,3	1	6	1,9	4	218	68,8	79
Pec (90)	130	69	19	14,6	18	2	1,5	2	29	22,3	28	80	61,6	51
Ra (88)	142	73	22	15,5	15	0	0	0	33	23,2	22	87	61,3	61
Rt (128)	203	73	59	29,1	20	6	3	5	23	11,3	15	115	56,6	52
Ia (90)	57	42	8	14	8	4	7	1	16	28,1	17	29	50,9	27
Lv (93)	100	54	18	18	13	3	3	3	28	28	17	51	51	42
Tc (61)	71	67	8	11,3	13	1	1,4	2	19	26,7	28	43	60,6	51
Bob (23)	28	74	5	17,8	17	5	17,8	22	13	46,6	57	5	17,8	22

Tabela 6. Drobiny mikroplastiku poszczególnych kształtów w różnych taksonach: liczba (N), udział procentowy w łącznej liczbie MP (%) i procent larw z przynajmniej 1 mikroplastikiem danego kształtu (częstość występowania w całkowitej liczbie larw danego taksonu; % Occ), wraz z wartościami dla wszystkich kształtów i taksonów (Łącznie).

W powyższej tabeli zaobserwować można także, że najmniejszy odsetek osobników zanieczyszczonych mikroplastikiem stwierdzono dla traszki górskiej (*Ichthyosaura alpestris*; Ia) – 42%, a najwyższy dla ropuchy szarej (*Bufo bufo*; Bb) – 88%.

Analogiczne zestawienie, lecz z podziałem na każde z 23 stanowisk poboru prób, przedstawiono w tab. 7.

Tabela 7. Drobiny mikroplastiku poszczególnych kształtów, które wyizolowano z larw płazów pobranych na różnych stanowiskach: ich liczba (N), ich udział w łącznej liczbie mikroplastików (%) i procent larw z przynajmniej 1 mikroplastikiem konkretnego kształtu (częstość występowania w całkowitej liczbie larw na danym stanowisku; % Occ). Podano także łączną liczbę MP i procent larw z przynajmniej 1 mikroplastikiem (% Occ) dla każdego ze stanowisk (Łącznie).

		Łą	cznie	F	ragn	nent	(	Gran	ulka		Plat	ek	١	Włókno	
Stanowisko	Takson	N	% Occ	N	%	% Occ	N	%	% Occ	N	%	% Occ	N	%	% Occ
S1	Rt	97	84	45	46	38	1	1	3	3	3	8	48	50	65
S2	Ra, Lv, Tc	98	62	9	9	11	1	1	1	21	22	23	67	68	54
S3	Ec	116	85	52	45	49	1	1	2	1	1	2	62	53	76
S4	Bv	115	81	28	24	45	0	0	0	2	2	5	85	74	81
S5	Ec	60	83	17	29	37	0	0	0	2	3	7	41	68	77
S6	Pec	32	57	4	12	10	1	3	3	7	22	17	20	63	43
S7	Pec	53	83	8	15	27	0	0	0	7	13	23	38	72	67
S8	Ra	47	59	9	19	19	0	0	0	12	26	19	26	55	47
S9	Bv	210	95	44	21	58	2	1	5	39	19	41	125	59	90
S10	Bb, Rt	69	70	17	25	27	0	0	0	4	6	7	48	69	50
S11	Ia	32	50	5	16	13	4	12	3	9	28	27	14	44	33
S12	Ia	9	30	1	11	3	0	0	0	2	22	7	6	67	20
S13	Ra, Lv, Tc	112	76	24	21	19	3	3	4	31	28	28	54	48	57
S14	Bb, Bv	94	87	32	34	47	0	0	0	10	11	11	52	55	68
S15	Ia, Lv	30	38	2	7	3	0	0	0	5	17	8	23	76	28
S16	Ec, Rt	164	78	24	15	25	0	0	0	10	6	12	130	79	67
S17	Bb, Rt	96	77	18	19	27	7	7	15	24	25	32	47	49	60
S18	Ra	31	80	3	10	10	0	0	0	14	45	35	14	45	55
S19	Тс	11	87	3	27	37	0	0	0	2	18	12	6	55	62
S20	Bb, Rt	237	98	82	34	78	21	9	35	47	20	49	87	37	76
S21	Pec	45	67	7	16	17	1	2	3	15	33	43	22	49	43
S22	Bob	28	74	5	18	17	5	18	22	13	46	57	5	18	22
S23	Bb	45	100	14	31	80	1	2	10	3	7	30	27	60	90

Jak przedstawia tab. 7, na każdym ze stanowisk przynajmniej część larw płazów była zanieczyszczona mikroplastikiem. Powszechność tego zjawiska była jednak różna, wynosząc od 30% dla osobników pobranych na stanowisku S12, do 100% dla tych z S23.

Analiza podobieństw ANOSIM wykazała znaczący wpływ przynależności gatunkowej larw na rozkład typów morfologicznych mikroplastiku (wartość R-ANOSIM: 0,1079; p=0,001). Niemniej jednak zaobserwowane różnice międzygatunkowe były niewielkie.

Analiza ISA wyróżniła cztery grupy gatunków, w obrębie których nadreprezentowane były poszczególne kształty MP (dla wszystkich porównań p<0,05): 1) Bb: fragment; 2) Bb + Bob: granulka; Bb + Bv + Ec: włókno; 4) Bb + Bv + Pec + Ra + Ia + Lv + Tc + Bob: płatek.

Do odzwierciedlenia zróżnicowania kształtów mikroplastików wyizolowanych z poszczególnych osobników posłużono się wskaźnikiem Levina. Badając model regresji o ujemnym rozkładzie dwumianowym z efektami mieszanymi dotyczący wartości tego wskaźnika, zaobserwowano pozytywną korelację między udziałem powierzchni zurbanizowanej wokół miejsca poboru próby, a wartościami tego wskaźnika (LRT=8,345; df=1; p=0,004; ryc. 16).



Ryc. 16. Dane reprezentujące wartości wskaźnika Levina w stosunku do udziału powierzchni zurbanizowanej w buforze stanowiska poboru próby. Rekordy poszczególnych taksonów zaznaczono kolorami. Linie przerywane reprezentują granice 95% przedziału ufności.

Wskazuje to na to, że przy bardziej nasilonej antropopresji, zróżnicowanie kształtów mikroplastików w larwach płazów jest większe.

Odnotowano także istotny efekt gatunku (LRT=55,279; df=9; p<0,001). Różnorodność kształtów mikroplastików w kijankach ropuch (Bufonidae) była znacznie większa niż w kijankach żab (Ranidae) czy w larwach traszek (Salamandridae) (ryc. 17). Wartości wskaźnika Levina dla poszczególnych taksonów przedstawia tab. 8.



Ryc. 17.Wyniki predykcji średnich z modelu (wraz z 95% zakresami przedziałów ufności) dotyczącego wartości wskaźnika Levina dla poszczególnych taksonów. Różnice między rodzinami (z wyłączeniem kumakowatych /Bombinatoridae/) zbadano stosując testy post-hoc Sidaka. Wartości *p* mniejsze niż 0,05 są oznaczone jedną gwiazdką (\*).

Takson	Res	SE	Dolna granica przedziału ufności	Górna granica przedziału ufności
Bb	1,76	0,118	1,54	2,00
Bv	1,60	0,125	1,37	1,86
Ec	1,39	0,098	1,21	1,60
Ra	1,25	0,080	1,10	1,42
Pec	1,38	0,144	1,12	1,69
Rt	1,22	0,072	1,09	1,37
Ia	1,28	0,099	1,10	1,49
Lv	1,25	0,131	1,02	1,54
Tc	1,23	0,089	1,07	1,42
Bob	1,56	0,187	1,26	2,00

Tabela 8. Przewitywane wartości wskaźnika Levina (Res) dla różnych taksonów. Podano także wartości błędu standardowego (SE).

Tabela 9. Szacunek parametrów modelu dotyczącego wartości wskaźnika Levina. Wyraz wolny wskazuje na takson Bb. Podano wartości błędu standardowego (SE) oraz wartości standaryzowane (Wartość Z). Wartości p mniejsze niż 0,05 są oznaczone jedną gwiazdką (\*), wartości p mniejsze niż 0,01 zaznaczono dwoma gwiazdkami (\*\*), natomiast wartości p mniejsze niż 0,001 są oznaczone trzema gwiazdkami (\*\*\*). Ponadto wszystkie statystycznie istotne wyniki zaznaczono pogrubieniem.

Zmienna	Parametr	SE	Wartość Z	Wartość <i>p</i>
Efekty stałe				
wyraz wolny	2,621	0,222	11,804	<0,001***
powierzchnia zurbanizowana	0,39	0,128	3,037	0,002**
powierzchnia rolnicza	0,126	0,098	1,281	0,200
Bv	-0,138	0,107	-1,296	0,195
Ec	-0,259	0,087	-2,961	0,003**
Pec	-0,301	0,146	-2,061	0,039*
Ra	-0,394	0,092	-4,271	<0,001***
Rt	-0,4	0,085	-4,725	<0,001***
Ia	-0,351	0,143	-2,448	0,014*
Lv	-0,392	0,098	-4,023	<0,001***
Тс	-0,371	0,113	-3,284	0,001**
Bob	-0,13	0,144	-0,904	0,366
rozmiar	-0,006	0,032	-0,190	0,849
dzień poboru próby	0,001	0,001	0,570	0,569
Efekty losowe				
grupy				
gatunek: stanowisko	0,005	0,071		
rozmiar	<0,0001	0,009		

Jak przedstawia powyższa tabela, czynnikami nieistotnymi statystycznie w badanym modelu okazały się: udział powierzchni rolniczej w buforze stanowiska poboru próby (LRT=1,603; df=1; p=0,205), rozmiar (wielkość) larwy płaza (LRT=0,036; df=1; p=0,849) oraz dzień roku poboru próby (LRT=0,320; df=1; p=0,569). Znaczy to, że zmienne te nie wpływają na zróżnicowanie kształtów mikroplastików w larwach płazów.

### 7.4. Długość drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z larw płazów

Długości mikroplastików wyizolowanych z larw płazów wahały się od 12 do 5700 µm, przy czym trzy włókna przekraczały powszechnie akceptowany górny limit uznania ich za mikroplastiki wynoszący 5000 µm (Li i in. 2020). Mimo to, zdecydowano się włączyć je do analiz, aby zapewnić bardziej kompletny obraz zanieczyszczenia badanych larw płazów.

Badając pozbawiony interakcji model dotyczący czynników wpływających na długość mikroplastików, wykazano że jedynie kształt drobin był statystycznie istotny (NumDf=3; DenDf=1812,417; wartość F=908,164; p<0,001). Wpływ pozostałych zmiennych, tj.

przynależność taksonomiczna (rodzina) larw płazów, ich rozmiar, stopień obciążenia mikroplastikiem czy udział terenów zurbanizowanych wokół stanowiska poboru próby, nie był statystycznie istotny (p>0,005 dla wszystkich, tab. 10).

Efekt	Suma kwadratów	Średni kwadrat	NumDf	DenDf	Wartość F	Pr(>F)
rodzina	3,559	1,186	3	23,859	1,371	0,276
rozmiar	0,010	0,010	1	13,273	0,011	0,918
kształt	2357,951	785,984	3	1812,417	908,164	<0,001
obciążenie MP	0,790	0,790	1	929,553	0,912	0,340
udział powierzchni zurbanizowanej	0,178	0,178	1	17,521	0,206	0,656

Tabela 10. Wyniki testowania zmiennych modelu, który dotyczy długości drobin mikroplastiku. Wyniki statystycznie istotne zaznaczono pogrubieniem.

Zmienna zależna: log(długość)

Struktura modelu: rozmiar + kształt + obciążenie MP + rodzina + udział powierzchni zurbanizowanej + (1 + rozmiar | rodzina: stanowisko)

Średnio, mikroplastiki mające formę włókien były najdłuższe (840 μm). Porównania posthoc wykazały, że długość MP tego typu morfologicznego różniła się statystycznie istotnie od długości mikroplastików innych kształtów (płatek, granulka, fragment, p<0,001 dla wszystkich porównań) (tab. 11).

Tabela 11. Przewidywane długości mikroplastików (µm) dla ich różnych kształtów oraz porównania między nimi z zastosowaniem testów post-hoc Tukeya. Wyniki statystycznie istotne zaznaczono pogrubieniem.

Kształt	Odpowiedź	SE	df	Dolna granica przedziału ufności	_	
włókno	839,98	65,46	30,14	716,41	_	
płatek	95,52	8,30	45,29	80,19		
fragment	65,94	5,52	41,33	55,68		
granulka	108,58	16,13	336,64	81,07		
Porównanie	Stosunek	SI	E	df	Statystyka t	Wartość <i>p</i>
włókno / płatek	8,794	0,5	576	1810,680	33,208	<0,001
włókno / fragment	12,738	0,6	95	1793,102	46,648	<0,001
włókno / granulka	7,736	1,0	81	1827,985	14,642	<0,001
płatek / fragment	1,449	0,1	07	1787,120	5,018	<0,001
płatek / granulka	0,880	0,1	28	1826,163	-0,882	0,814
fragment / granulka	0,607	0,0	87	1828,086	-3,490	0,003

Wykonane pomiary wskazują na to, że przeciętna długość (w najdłuższej osi) dla płatka i granulki wyniosła odpowiednio 96 i 109 μm. Oba te typy morfologiczne mikroplastików były wyraźnie dłuższe (p<0,005) niż fragmenty, ze średnią długością 66 μm. Niemniej jednak nie

odnotowano statystycznie istotnej różnicy między długością granulek a płatków (p=0,814; tab. 11).

Jednakże statystycznie istotne okazały się następujące interakcje: a) kształt MP i rozmiar larwy (NumDf=3; DenDf=1803,605; wartość F=8,507; p<0,001) oraz b) kształt MP i udział powierzchni zurbanizowanej w buforze (NumDf=3; DenDf=1804,815; wartość F=8,680; p<0,001; tab. 12).

Tabela 12. Wyniki testowania zmiennych modelu z interakcjami, który dotyczy długości drobin mikroplastiku. Wyniki statystycznie istotne zaznaczono pogrubieniem.

Efekt	Suma kwadratów	Średni kwadrat	NumDF	DenDF	Wartość F	Pr(>F)
obciążenie MP	1,198	1,198	1	963,589	1,425	0,233
rodzina	2,470	0,823	3	22,208	0,979	0,420
kształt: rozmiar	21,465	7,155	3	1803,605	8,507	<0,001
kształt: udział powierzchni zurbanizowanej	21,901	7,300	3	1804,815	8,680	<0,001

Zmienna zależna: log(długość)

Struktura modelu: rozmiar + kształt \* rozmiar + obciążenie MP + rodzina + kształt \* udział powierzchni zurbanizowanej + (1 + rozmiar | rodzina: stanowisko).

Te dwie interakcje przedstawione są odpowiednio na ryc. 18A i 18B. Według tego modelu, rozmiar larw płazów ma statystycznie istotny, dodatni wpływ na długość zjadanych mikroplastików mających formę granulek i płatków. Natomiast zależności takiej nie zaobserwowano dla drobin o kształcie włókien i fragmentów (ryc. 18A). Druga statystycznie istotna interakcja wskazuje na to, że wzrost udziału powierzchni zurbanizowanej w obrębie buforu stanowiska poboru próby (większa antropopresja) zmniejsza długość mikroplastików mających postać płatków i granulek (ryc. 18B).



Ryc. 18. Relacja między długością mikroplastików poszczególnych kształtów a rozmiarem larwy płaza (**A**) i udziałem powierzchni zurbanizowanej w buforze stanowiska poboru próby (**B**). Linie przerywane reprezentują granice 95% przedziału ufności.

Podsumowując, długość drobiny mikroplastiku w larwie płaza zależy od kształtu tej drobiny. W przypadku MP w postaci granulek i płatków, ich długość zależy także od wielkości larwy oraz od poziomu antropopresji.

## 7.5. Pole powierzchni drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z larw płazów

Zmierzono pola powierzchni mikroplastików trzech z czterech wyróżnionych typów morfologicznych: płatków, granulek oraz fragmentów (wyłączono włókna). Dokonano tego na podstawie fotografii 2D, wykorzystując programu NIS-Elements Br.

Wyniki testowania zmiennych modelu pozbawionego interakcji wskazują na to, że typ morfologiczny (kształt) mikroplastiku statystycznie istotnie wpływa na wielkość jego pola powierzchni (NumDf=2; DenDf=774,116; wartość F=33,459; p<0,001). Ponadto w modelu tym odnotowano statystycznie istotny efekt rangi taksonomicznej (rodziny) larwy płaza (NumDf=3; DenDf=21,981; wartość F=4,470; p=0,014) (tab. 13).

Tabela 13. Wyniki testowania zmiennych modelu, który dotyczy wielkości pola powierzchni mikroplastików. Wyniki statystycznie istotne zaznaczono pogrubieniem.

Efekt	Suma kwadratów	Średni kwadrat	NumDF	DenDF	Wartość F	Pr(>F)
rozmiar	0,001	0,001	1	71,208	0,002	0,961
obciążenie MP	0,006	0,006	1	652,782	0,023	0,880
rodzina	3,748	1,249	3	21,981	4,470	0,014
kształt	18,702	9,351	2	774,116	33,459	<0,001
udział powierzchni zurbanizowanej	0,057	0,057	1	25,690	0,204	0,057

Zmienna zależna: powierzchnia\_przekształcone

Struktura modelu: rozmiar + obciążenie MP + rodzina + kształt + udział powierzchni zurbanizowanej + (1 + rozmiar | rodzina: stanowisko)

Drobiny mikroplastiku w formie granulek miały średnio największe pole powierzchni (4033  $\mu$ m<sup>2</sup>). Porównania post-hoc wykazały, że wartość ta jest znacząco większa (p<0,001) niż dla fragmentów, mających średnio 1140  $\mu$ m<sup>2</sup>. Średnie pole powierzchni dla płatków wyniosło 3025  $\mu$ m<sup>2</sup>, co było również znacząco większe niż dla fragmentów (p<0,001). Jednakże różnica pomiędzy płatkami a granulkami nie okazała się statystycznie istotna (p=0,528) (tab. 14).

Tabela 14. Przewidywane pola powierzchni (μm<sup>2</sup>) drobin mikroplastiku dla ich różnych kształtów oraz porównania między nimi z zastosowaniem testów post-hoc Tukeya. Zmienna odpowiedzi oraz 95% przedziały ufności zostały przywrócone do pierwotnej skali. Wyniki statystycznie istotne zaznaczono pogrubieniem.

Kształt Odpowiedź		df	Dolna granica przedziału ufności	Górna granica przedziału ufności	
płatek	3025	19	1928	4893	_
fragment	1140	19	769	1731	
granulka	4033	68	2179	7915	
Porównania	Stosunek	SE	df	Statystyka t	Wartość <i>p</i>
płatek / fragment	0,337	0,045	760	7,428	<0,001
płatek / granulka	-0,091	0,084	771	-1,078	0,528
fragment / granulka	-0,428	0,084	769	-5,098	<0,001

Porównania post-hoc Tukeya wykazały obecność istotnych różnic pod względem wielkości pola powierzchni drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z kijanek ropuch (Bufonidae) i żab (Ranidae) w stosunku do tych wyizolowanych z larw traszek (Salamandridae) (tab. 15).

Tabela 15. Przewidywane pola powierzchni mikroplastików (μm<sup>2</sup>) dla drobin wyekstrahowanych z poszczególnych rodzin oraz porównania między nimi z zastosowaniem testów post-hoc Tukeya. Zmienna odpowiedzi oraz 95% przedziały ufności zostały przywrócone do pierwotnej skali. Wyniki statystycznie istotne zaznaczono pogrubieniem.

Rodzina	Odpowiedź	df	Dolna granica przedziału ufności	Górna granica przedziału ufności	-
Bombinatoridae	3985	9	1117	18783	-
Ranidae	2862	38	1711	4983	
Salamandridae	1078	17	599	2046	
Bufonidae	3811	21	2169	7032	
Porównania	Stosunek	SE	df	Statystyka t	Wartość <i>p</i>
Bombinatoridae / Ranidae	0,105	0,204	10,017	0,514	0,954
Bombinatoridae / Salamandridae	0,445	0,209	9,005	2,130	0,215
Bombinatoridae / Bufonidae	0,014	0,210	11,441	0,066	1,000
Ranidae / Salamandridae	0,340	0,113	12,685	3,004	0,045
Ranidae / Bufonidae	-0,091	0,128	25,475	-0,714	0,891
Salamandridae / Bufonidae	-0,431	0,145	21,700	-2,974	0,033

Mikroplastiki pochodzące z larw traszek miały średnio mniejsze pola powierzchni (ryc. 19).



Ryc. 19. Wykres obrazujący przewidywane średnie pola powierzchni (wraz z 95% przedziałami ufności) dla drobin MP wyekstrahowanych z larw płazów należących do poszczególnych rodzin. Wartości *p* mniejsze niż 0,05 oznaczono gwiazdką (\*).

Jak wykazano w poniższej tabeli, w modelu zidentyfikowano dwie statystycznie istotne interakcje: a) kształt MP i rozmiar larwy (NumDf=2; DenDf=751,866; wartość F=6,128; p=0,002) oraz b) kształt MP i udział powierzchni zurbanizowanej w buforze stanowiska poboru próby (NumDf=2; DenDf=760,710; wartość F=9,678; p<0,001).

Efekt	Suma kwadratów	Średni kwadrat	NumDF	DenDF	Wartość F	Pr(>F)
obciążenie MP	0,012	0,012	1	650,689	0,045	0,832
rodzina	4,318	1,439	3	18,413	5,356	0,008
kształt: rozmiar	3,293	1,647	2	751,866	6,128	0,002
kształt: udział powierzchni zurbanizowanej	5,201	2,600	2	760,710	9,678	<0,001

Tabela 16. Wyniki testowania zmiennych modelu z interakcjami, który dotyczy wielkości pola powierzchni drobin mikroplastiku. Wyniki statystycznie istotne zaznaczono pogrubieniem.

Zmienna zależna: powierzchnia przekształcone

Struktura modelu: rozmiar + kształt \* rozmiar + obciążenie MP + rodzina + kształt \* udział powierzchni zurbanizowanej + (1 + rozmiar | rodzina: stanowisko)

Interakcje te przedstawione są odpowiednio na ryc. 20A i 20B. Wynika z nich, że wielkość pola powierzchni mikroplastików konkretnych kształtów zależy od wielkości larwy płaza oraz od nasilenia antropopresji.



Ryc. 20. Pole powierzchni mikroplastików poszczególnych kształtów w stosunku do wielkości (rozmiaru) larwy płaza (A) oraz udziału powierzchni zurbanizowanej w buforze stanowiska poboru próby (B). Linie przerywane reprezentują granice 95% przedziału ufności.

W przypadku mikroplastików mających postać granulek i płatków wpływ rozmiaru larwy płaza na wielkość pola powierzchni tych drobin był dodatni, a w przypadku fragmentów był on ujemny (ryc. 20A). Druga z interakcji wskazuje na to, że wzrost udziału powierzchni zurbanizowanej w buforze stanowiska poboru próby prowadzi do zmniejszenia pola powierzchni mikroplastików mających postać płatków i granulek (ryc. 20B). Dla mikroplastików o morfologii fragmentów, relacja była odwrotna – ich pole powierzchni rosło.
## 7.6. Kolory mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów

Wśród mikroplastików wyizolowanych z larw płazów odnotowano 15 kategorii kolorów. Kolor niebieski, reprezentując 53,4% wszystkich kolorów, był najczęściej stwierdzanym kolorem wśród mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów. Najrzadsze z kolei były mikroplastiki koloru żółtego i biało-kremowego – odpowiednio 0,5% i 0,2% (tab. 17).

Tabela 17. Liczebność i procentowy udział poszczególnych kolorów wśród mikroplastików wyizolowanych z danych taksonów. Podano także sumę i średni procentowy udział (Śr.) MP poszczególnych kolorów.

	czarny	niebieski	brązowy	biało-kremowy	krystaliczny	zielony	szary	matowy	pomarańczowy	różowy	czerwony	beżowy	przezroczysty	bialy	żółty
Bb	103	198	38	3	43	1	31	29	19	20	21	13	38	2	1
Bv	(18,3%) 72	(35,3%) 145 (27%)	) (6,8%) 19 (4.0%)	(0,5%) 2 (0,5%)	(7,7%) 19	(0,2%) 2 (0,5%)	(5,5%) 20 (5,1%)	(5,2%) 22 (5,6%)	(3,4%) 11	(3,6%) 28 (7,1%)	(3,8%) 22 (5,6%)	(2,3%) 9 (2,2%)	(6,8%) 13	(0,4%) 5 (1,2%)	(0,2%)
Ec	(18,4%) 55 (17,3%)	(37%) 172 (54,1%)	(4,9%) 6 ) (1,9%)	(0,3%)	(4,8%) 5 (1,6%)	(0,5%) 2 (0,6%)	(3,1%) 3 (0,9%)	(3,0%) 14 (4,4%)	(2,8%) 4 (1,3%)	(7,1%) 17 (5,3%)	(3,0%) 13 (4,1%)	(2,3%) 12 (3,8%)	(3,5%) 11 (3,5%)	(1,5%) 3 (0,9%)	1 (0,3%)
Ra	6 (4,2%)	101 (71,1%)	2 ) (1,4%)		2 (1,5%)	8 (5,6%)	1 (0,7%)		1 (0,7%)	5 (3,5%)	12 (8,5%)		3 (2,1%)	1 (0,7%)	
Pec	1 (0,8%)	103 (79,2%)	2 ) (1,5%)		3 (2,3%)	5 (3,9%)			5 (3,9%)	3 (2,3%)	6 (4,6%)		2 (1,5%)		
Rt	31 (15,3%)	84 (41,4%	5 ) (2,5%)	1 (0,5%)	25 (12,2%)	4 ) (2%)	12 (5,8%)	2 (1%)	3 (1,5%)	1 (0,5%)	10 (4,9%)	6 (3%)	1 (0,5%)	16 (7,9%)	2 (1%)
Ia	7 (12,3%)	27 (47,3%)	1 ) (1,8%)		4 (7%)	3 (5,3%)	4 (7%)		2 (3,5%)	4 (7%)	2 (3,5%)		2 (3,5%)		1 (1,8%)
Lv	1 (1%)	72 (72%)	1 (1%)		2 (2%)	6 (6%)	3 (3%)			8 (8%)	6 (6%)	1 (1%)			
Тс	3 (3,7%)	49 (60,6%)	1 ) (1,2%)		1 (1,2%)	8 (9,9%)	1 (1,2%)		1 (1,2%)	5 (6,2%)	11 (13,6%)	)			1 (1,2%)
Bob		10	``````````````````````````````````````		4	2				2	4		6		
Suma	279	<u>(35,8%)</u> 961	) 75		(14,3%)	)(7,1%) 41	75	67	46	<u>(7,1%)</u> 93	(14,3%) 107	<u>)</u> 41	(21,4%) 76	27	
Śr.	9,1%	53,4%	2,3%	0,2%	5,5%	4,1%	2,9%	1,6%	1,8%	5,1%	6,9%	1,2%	4,3%	1,1%	0,5%

Analiza podobieństw ANOSIM wykazała, że wpływ przynależności gatunkowej larwy płaza na rozkład kolorów mikroplastików z niej wyekstrahowanych był nieistotny statystycznie (wartość R-ANOSIM: 0,008; p=0,175). Wskazuje to na jednorodność składu kolorystycznego mikroplastików wyekstrahowanych ze stadiów larwalnych płazów należących do różnych gatunków.

Analiza ISA wyróżniła osiem grup gatunków, w obrębie których konkretne kolory drobin mikroplastiku były częstsze (p<0,05) niż w innych gatunkach: 1) Rt: biały; 2) Bb + Bv:

brązowy; 3) Bb + Bob: przezroczysty; 4) Bb + Bv + Ec: matowy; 5) Bb + Bv + Ec + Rt: czarny, beżowy; 6) Bb + Bv + Rt + Ia: szary; 7) Bb + Bv + Rt + Bob: krystaliczny; 8) Ec + Pec + Ra + Lv: niebieski (ryc. 21).



Ryc. 21. Kolory mikroplastików wyekstrahowanych z larw poszczególnych taksonów. A – procentowy udział kolorów, B – liczebności mikroplastików danych kolorów.

Wykorzystując bazę danych wszystkich mikroplastików, przeanalizowano kolorystykę ich poszczególnych typów morfologicznych, tj.: granulek, płatków, fragmentów i włókien. Analiza podobieństw ANOSIM wykazała statystycznie istotny wpływ kształtu mikroplastiku na rozkład kolorów (wartość R-ANOSIM: 0,119; p=0,001). Niemniej różnice między typami morfologicznymi tych zanieczyszczeń były niewielkie.

Analiza ISA wyróżniła siedem grup kształtów mikroplastików, w obrębie których określone kolory były częstsze (p<0,05) niż w innych kształtach: 1) włókno: biały; 2) płatek: krystaliczny; 3) fragment: różowy; 4) granulka: matowy, zielony, biało-kremowy, brązowy; 5) włókno + płatek: przezroczysty; 6) włókno + fragment: niebieski, czarny, czerwony; 7) płatek + granulka: szary (ryc. 22).



Ryc. 22. Kolory mikroplastików poszczególnych kształtów. Przedstawiono procentowe udziały poszczególnych kolorów (**A**) oraz ilości mikroplastików poszczególnych kolorów (**B**).

### 7.7. Skład chemiczny drobin wyekstrahowanych z larw płazów

Zastosowanie spektroskopii ATR-FTIR pozwoliło na zidentyfikowanie 17 różnych syntetycznych polimerów tworzących drobiny mikroplastiku. Zidentyfikowano także sześć innych substancji. Identyfikacja syntetycznego polimeru w analizowanej próbce potwierdzała jej klasyfikację jako mikroplastik. Z kolei brak dopasowania spektralnego do referencyjnego widma jakiejkolwiek substancji, lub identyfikacja substancji innej niż syntetyczny polimer, skutkowało wykluczeniem próbki z kategorii mikroplastików. Spośród polimerów syntetycznych, w przeanalizowanych próbkach najczęściej wykrywany był polietylen (PE, 33%), polipropylen (PP, 24%) oraz poli(etylen-propylen-dien) (EPDM, 22%).

Analiza podobieństw ANOSIM wykazała statystycznie istotny wpływ przynależności gatunkowej larwy płaza na rozkład stwierdzeń poszczególnych syntetycznych polimerów (wartość R-ANOSIM: 0,079; p=0,001). Różnice międzygatunkowe były jednak w tym przypadku wyjątkowo słabo zaznaczone.

Analiza ISA wyróżniła jedną grupę gatunków, w której określony syntetyczny polimer wykrywany był częściej (p<0,05) niż w innych gatunkach: 1) Bv + Ec + Rt + Ia + Bob: polietylen (PE) (ryc. 23).



Ryc. 23. Procentowy udział wykryć (**A**) i liczba detekcji (**B**) poszczególnych syntetycznych polimerów wśród mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów. Objaśnienia skrótów: PU – poliuretan; EPDM – poli(etylen-propylen-dien); PDMS – poli(dimetylosiloksan); PS – polistyren; PET – poli(tereftalan etylenu); PE – polietylen; PVAL – poli(alkohol winylowy); PP – polipropylen; EAA – poli(etylen-co-(kwas akrylowy); EVOH – alkohol etylowinylowy; CP – celofan; PA – poliamidy (w tym nylony); PAM – poliakryloamid; PMP – polimetylopenten; EEA – kopolimer etylen/akrylan etylu; ABS – terpolimer akrylonitrylobutadieno-styrenowy; PEP – poli(etylen-propylen).

Oprócz syntetycznych polimerów, w próbkach wykryto także sześć innych substancji, z których najczęściej występującymi był materiał roślinny i celuloza. W mniejszych ilościach stwierdzono wełnę, chitynę, futro i len (ryc. 24).



Ryc. 24. Procentowy udział wykryć (A) i liczba detekcji (B) substancji innych niż syntetyczne polimery wśród analizowanych próbek z larw płazów.

Analiza podobieństw ANOSIM dotycząca substancji innych niż syntetyczne polimery wykazała istotny wpływ przynależności gatunkowej stadiów larwalnych płazów na rozkład stwierdzeń tych substancji (wartość R-ANOSIM: 0,044; p=0,019). Niemniej jednak podobnie

jak w przypadku analogicznej analizy dotyczącej syntetycznych polimerów, różnice międzygatunkowe, choć statystycznie istotne, były niewielkie.

Analiza ISA nie wyróżniła żadnych grup gatunków wykazujących unikalny wzorzec rozkładu tych substancji.

## 7.8. Charakterystyka mikroplastiku wyekstrahowanego z wód i osadów dennych

Z próbek wody, pobranych z tych samych stanowisk co larwy płazów, wyizolowano łącznie 153 cząsteczki mikroplastików, podczas gdy z osadów dennych wyekstrahowano 121 drobin. Najczęstszym typem morfologicznym wśród tych zanieczyszczeń wyizolowanych z wody był fragment (ok. 48%, tab. 18, ryc. 25B), natomiast dla osadów dennych było to włókno (ok. 43%, tab. 18, ryc. 26B).

Tabela 18. Procentowy udział różnych kształtów mikr	oplastików wśród drobin
wyizolowanych z wód i osadów dennych (wartości za	okrąglono do jedności).

Kształt	Woda (%)	Osad (%)
Fragment	48	23
Włókno	23	43
Płatek	22	22
Granulka	7	12

Zarówno w wodzie, jak i w osadach dennych najrzadsze były mikroplastiki mające postać granulek, co zgodne jest z analogicznymi wynikami otrzymanymi dla larw płazów zamieszkujących te zbiorniki wodne (tab. 6).

Udział poszczególnych kolorów w obrębie mikroplastików różnych kształtów został zilustrowany na ryc. 25A dla drobin wyizolowanych z wód oraz na ryc. 26A dla tych pochodzących z osadów dennych.



Ryc. 25. Kolorystyka mikroplastików wyekstrahowanych z wód, a reprezentujących różne kształty: A – udział procentowy poszczególnych kolorów, B – liczba MP poszczególnych kolorów.

Jak ukazują ryc. 25, ryc. 26 i tab. 19, drobiny mikroplastiku wyizolowane z wód i osadów dennych reprezentowały 14 z 15 wyróżnionych w badaniu kolorów.



Ryc. 26. Kolorystyka mikroplastików wyekstrahowanych z osadów dennych, a reprezentujących różne kształty: A – procentowy udział poszczególnych kolorów, B – liczba MP poszczególnych kolorów.

Procentowy udział każdego koloru przedstawia tab. 19. Podsumowując, biały okazał się najczęściej występującym kolorem wśród mikroplastików wyekstrahowanych z próbek wody

(ok. 24%), natomiast niebieski dominował w osadach (ok. 26%). W obu tych matrycach najrzadsze były mikroplastiki koloru szarego, beżowego oraz żółtego. Mikroplastiki tych kolorów były również rzadkie wśród drobin wyizolowanych z larw płazów (tab. 17).

	niebieski	biały	biało-kremowy	czerwony	pomarańczowy	czarny	krystaliczny	brązowy	zielony	różowy	przezroczysty	żółty	beżowy	szary
Woda (%)	12	24	18	5	4	8	8	5	5	4	3	2	1	1
Osad (%)	26	7	5	11	11	9	8	5	4	4	4	3	2	1

Tabela 19. Procentowy udział poszczególnych kolorów mikroplastików wśród drobin wyekstrahowanych z wód i osadów dennych (wartości zaokrąglono do jedności).

Analiza spektroskopowa przeprowadzona wobec drobin mikroplastiku wyizolowanych z wód i osadów dennych wykazała obecność 12 różnych syntetycznych polimerów. Wśród drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z wód najczęściej identyfikowany był polipropylen (PP, ok. 34%), natomiast dla tych wyizolowanych z osadów najczęściej stwierdzanym rodzajem polimeru był poli(etylen-propylen) (PEP, ok. 27%, ryc. 27, tab. 20). Oba te rodzaje polimerów stwierdzono także wśród mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów: o ile polipropylen stanowił u nich 24% detekcji, to poli(etylen-propylen) zidentyfikowano zaledwie kilka razy.



Ryc. 27. Procentowy udział wykryć (**A**) i liczba detekcji (**B**) poszczególnych syntetycznych polimerów wśród mikroplastików wyizolowanych z osadów dennych i wód. Objaśnienia skrótów: ABS – terpolimer akrylonitrylo-butadieno-styrenowy; CP – celofan; CSPE – hypalon; EEA – kopolimer etylen/akrylan etylu; PDMS – poli(dimetylosiloksan); PMMA – poli(metakrylan metylu); PS – polistyren; PE – polietylen; PP – polipropylen; PEP – poli(etylen-propylen); EPDM – poli(etylen-propylen-dien).

Jak ukazuje tab. 20, wśród mikroplastików wyizolowanych z próbek wody i osadów dennych stwierdzono obecność wielu różnych polimerów, co świadczy o szerokim zakresie zanieczyszczeń tych elementów środowiska. Wyizolowano między innymi polipropylen (PP), polietylen (PE) i polistyren (PS), które są powszechnie stosowane w różnych sektorach przemysłu.

Polimer	Woda (%)	Osad (%)
Polipropylen (PP)	34	19
Polietylen (PE)	14	19
Polistyren (PS)	22	11
Poli(etylen-propylen) (PEP)	0	27
Poli(etylen-propylen-dien) (EPDM)	24	0
Celofan (CP)	3	4
Terpolimer akrylonitrylo-butadieno-styrenowy (ABS)	0	4
Hypalon (CSPE)	0	4
Kopolimer etylen/akrylan etylu (EEA)	0	4
Poli(dimetylosiloksan) (PDMS)	0	4
Poli(metakrylan metylu) (PMMA)	0	4
Alkidale	3	0

Tabela 20. Procentowy udział wykryć poszczególnych syntetycznych polimerów wśród mikroplastików wyizolowanych z wód i osadów dennych (wartości zaokrąglono do jedności).

# 7.9. Podobieństwa w profilach zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów, wód i osadów dennych

W przypadku kolorów mikroplastików, zidentyfikowano statystycznie istotne różnice między zaobserwowaną, a kontrolną liczbą dopasowań w obu porównaniach: larwy-woda oraz larwy-osad. Świadczy to o podobieństwie kolorów mikroplastików w obrębie tych zestawień. Taka sama relacja i zbliżona istotność statystyczna została stwierdzona również w odniesieniu do kształtów mikroplastików. Zarówno w przypadku kolorów, jak i kształtów, podobieństwo (liczba dopasowań) było słabiej zaznaczone w porównaniach między mikroplastikami wyekstrahowanymi z larw płazów i osadu dennego, niż w porównaniach między larwami płazów, a wodą (tab. 21).

Tabela 21. Wyniki testów zgodności chi-kwadrat porównujących liczbę zaobserwowanych dopasowań (porównanie larw płazów z próbką ze zbiornika wodnego) i dopasowań kontrolnych (porównanie larw z losowo wybraną próbką zbiornika wodnego, wykluczając autoporównania) w dwóch różnych zestawieniach (larwy-woda oraz larwy-osad). Kolory, kształty i skład chemiczny (typy polimerów) mikroplastików analizowano osobno. Wartości *p* niższe niż 0,05, wskazujące na istotność statystyczną, oznaczono pogrubieniem i gwiazdką.

Porównywana cecha	Porównywane matryce	Zaobserwowane	Kontrola	Wartość testu χ2	Wartość <i>p</i>
	larwy-woda	803	658	14,391	<0,001*
kolor	larwy-osad	807	707	6,605	0,010*
	larwy-woda	1563	1381	11,379	<0,001*
kształt	larwy-osad	1438	1321	4,9616	0,025*
	larwy-woda	62	72	0,74627	0,3877
skład chemiczny	larwy-osad	37	40	0,11688	0,7324

Jak ukazuje powyższa tabela, w odniesieniu do składu chemicznego mikroplastików, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy między dopasowaniami zaobserwowanymi, a kontrolnymi.

## 8. Dyskusja

## 8.1. Powszechność zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów

Przeprowadzone badania na kilkuset larwach 10 gatunków płazów pozyskanych w zachodniej Polsce ukazały, że ich zanieczyszczenie mikroplastikiem jest powszechne, zdecydowanie przekraczając 26%, o których donosił Kolenda i in. (2020) z innej części kraju. Najprawdopodobniej więc, zanieczyszczenie organizmów wodnych bywa bardzo mocno zróżnicowane i zależy od metod, czasu pobierania prób, regionu, rodzaju i stanu siedlisk, w których one bytują. Przykładowo, Pastorino i in. (2022) nie wykazali zanieczyszczenia mikroplastikiem wśród kijanek żaby trawnej (Rana temporaria) pochodzących z naturalnego alpejskiego oczka wodnego, mimo odnotowania go na tym terenie we wszystkich przebadanych dorosłych osobnikach tego gatunku. Natomiast inne badania wykazały z kolej powszechne zanieczyszczenie mikroplastikiem wśród kijanek pochodzących z delty rzeki Jangey w Chinach (Hu i in. 2018), dorosłych płazów bezogonowych z delty Gangesu (Shetu i in. 2023), dorosłych neotropikalnych ropuch (Mackenzie i Vladimirova 2021) czy dorosłych żab z kompleksu żab zielonych (Pelophylax spp.) z Turcji (Tatlı i in. 2022). Powyżej wymienione i inne badania potwierdzają niepokojący fakt powszechnego zanieczyszczenia mikroplastikiem płazów i ich siedlisk na skalę globalna. Celem przyszłych badań powinno być poznanie czynników wpływających na stopień zanieczyszczenia mikroplastikiem tych organizmów, tj. w jakim stopniu zjawisko to zależy od dostępności pokarmu, trybu żerowania, temperatury, właściwości drobin mikroplastiku.

## 8.2. Czynniki wpływające na ilość mikroplastików i zróżnicowanie ich kształtów w larwach płazów

W niniejszej pracy dowiedziono różnic między rodzinami płazów, odnoszących się zarówno do ich stopnia obciążenia mikroplastikiem, jak i do (wyrażonego poprzez wskaźnik Levina) zróżnicowania typów morfologicznych tych zanieczyszczeń. Larwy ropuch (Bufonidae) okazały się być najbardziej zanieczyszczone mikroplastikiem (śr. 3,5 MP / osobnika; ryc. 15). Kontrastuje to z wynikami otrzymanymi przez Hu i in. (2018). Jednakże, badacze ci analizom poddali także kijanki odżywiające się poprzez filtrowanie (*Microhyla ornata,* rodzina żab wąskopyskich /Microhylidae/), i to one wykazywały najwyższy stopień zanieczyszczenia mikroplastikiem, prawdopodobnie wynikający właśnie ze specyfiki żerowania. Wyższe zanieczyszczenie kijanek ropuch w stosunku do kijanek żab (Ranidae)

może wynikać także z wyższej śmiertelności tych drugich w wodach zanieczyszczonych mikroplastikiem (Balestrieri i in. 2022). Badania przeprowadzone na rybach dowiodły, że gatunki wszystkożerne są w większym stopniu obciążone mikroplastikiem niż gatunki drapieżne czy roślinożerne (Mizraji i in. 2017). Jak wykazano w niniejszej dysertacji, podobna prawidłowość ma miejsce również u płazów, gdzie drapieżne larwy traszek okazały się być zanieczyszczone MP w mniejszym stopniu niż larwy płazów bezogonowych, cechujące się wszystkożernością (ryc. 15). Być może wynika to z tego, że peryfiton i fitoplankton (podstawowy pokarm kijanek) są w większym stopniu zanieczyszczone mikroplastikiem niż zooplankton, będący podstawowym pokarmem larw traszek. Hipoteza ta zdecydowanie zasługuje na przetestowanie w przyszłych badaniach.

Nie stwierdzono korelacji między rozmiarem larwy płaza, a stopniem jej obciążenia mikroplastikiem (tab. 5). Niemniej jednak badanie Karaoğlu i Gül'a (2020) wykazało obecność negatywnej korelacji między masą ciała kijanek, a stopniem ich obciążenia tego rodzaju zanieczyszczeniami. Może za to odpowiadać brak wartości odżywczych mikroplastików, prowadzący do zaburzenia rozwoju (wzrostu) (Venâncio i in. 2022). Jednakże eksperymenty Araújo i in. (2022) oraz Scribano i in. (2023) nie potwierdziły by ekspozycja kijanek na mikroplastik miała wpływ na masę ich ciała. Z kolei Hu i in. (2018) odnotowali w swoich badaniach pozytywną korelację między długością kijanek, a ich obciążeniem mikroplastikiem. W niniejszej pracy natomiast stwierdzono silną korelację między długością oraz masą ciała larw płazów, co może wskazywać na to, że wzrost nie był u nich zaburzony mimo obecności tego rodzaju zanieczyszczeń.

Wykazano także dodatnią korelację między antropopresją (wyrażoną poprzez udział powierzchni zurbanizowanej wokół miejsc poboru prób), a obciążeniem mikroplastikiem larw płazów (ryc. 14). Dodatnia korelacja zachodziła również między antropopresją, a wyrażonym poprzez wskaźnik Levina zróżnicowaniem typów morfologicznych mikroplastików wyekstrahowanych z larw (ryc. 16). Za oba te wzorce odpowiadać może wyższe zanieczyszczenie mikroplastikiem (oraz związane z nim zróżnicowanie ich kształtów) wód i osadów dennych na terenach bliskich budynkom i drogom, tj. prawdopodobnych źródeł zanieczyszczeń. Mimo tego, że prawidłowość taka nie została jeszcze dobrze udokumentowana w literaturze naukowej, wyniki niektórych badań (np. Hu i in 2022) wskazują na wyraźne różnice w zanieczyszczeniu mikroplastikiem między stanowiskami na różny sposób użytkowanymi przez ludzi. Otrzymane w niniejszej pracy wyniki wskazujące na wpływ antropopresji, mogą okazać się wartościowe dla działań w nurcie ochrony przyrody

opartej na dowodach (ang. *evidence-based conservation*) oraz dla modelowania przestrzennej dynamiki zanieczyszczenia mikroplastikiem.

## 8.3. Typy morfologiczne mikroplastiku w larwach płazów

Typ morfologiczny (kształt) drobiny mikroplastiku dostarcza informacji o jej pochodzeniu i możliwych dalszych losach w środowisku (Wu i in. 2019).

Ogólnie rzecz ujmując, najczęściej stwierdzanym kształtem MP w larwach płazów było włókno. Inne badania, przeprowadzone w różnych miejscach globu na dziko żyjących kijankach również odnotowały taką samą prawidłowość (Hu i in. 2018, Kolenda i in. 2020, Hu i in. 2022). Zaobserwowany odsetek włókien w ogólnej liczbie mikroplastiku, wynoszący u kijanek żab moczarowych (*Rana arvalis*) 61%, a u żab trawnych (*Rana temporaria*) 57% okazał się zbliżony do 57,1% odnotowanych przez Karaoğlu i Gül'a (2020) dla kijanek żaby kaukaskiej (*Rana macrocnemis*). Wśród mikroplastików, wyekstrahowanych z kijanek żab z kompleksu żab zielonych (*Pelophylax esculentus* complex), włókna stanowiły 61,6% (tab. 6), podczas gdy odsetek ten otrzymany przez ww. badaczy dla kijanek żaby śmieszki (*Pelophylax ridibundus*) wyniósł około 64%. Podobieństwa te mogą wynikać ze zbliżonych ekologii żywienia kijanek należących do tego samego rodzaju.

Co ciekawe, włókna były także dominującym kształtem wśród mikroplastików wyekstrahowanych z przewodów pokarmowych zaskrońca zwyczajnego (*Natrix natrix*) oraz zaskrońca rybołowa (*Natrix tessellata*), stanowiąc odpowiednio około 94% oraz 88% wszystkich MP (Gül i in 2022). Dietę obu tych gatunków węży, w szczególności zaskrońca zwyczajnego, stanowią zarówno kijanki żab, jak i przeobrażone osobniki (Najbar i Borczyk 2012). Prawdopodobne jest zatem, że przynajmniej część tych włókien mikroplastiku została pobrana przez węże w wyniku drapieżnictwa wobec płazów. Według wyników badań przeprowadzonych na rybach, włókna mikroplastiku dłużej niż te o innych kształtach przebywają w organizmach zwierząt (Xiong i in. 2019). Być może zjawisko to, przynajmniej częściowo, odpowiada za dominację mikroplastików tego typu morfologicznego o której donoszą badania zanieczyszczenia dziko żyjących zwierząt. Jednocześnie, może to wskazywać na poważniejsze skutki zdrowotne dla organizmów jakie stwarzają mikroplastiki tego kształtu.

Zbiorcze wyniki badań wielkości, kształtów, kolorów i składu chemicznego mikroplastików mogą stanowić swoisty "odcisk palca" zanieczyszczenia stanowiska poboru

próby. Taki "odcisk palca" może być wykorzystywany do porównań składowych środowiska (np. osad, woda, glony, plankton), jak również do analiz mających na celu zbadanie zmian zanieczyszczenia mikroplastikiem w czasie. W ten sposób można badać dynamikę tej klasy polutantów, na przykład wzorce ich przemieszczania czy fizycznych oraz chemicznych przemian.

## 8.4. Długość drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z larw płazów

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono różnice w średnich długościach mikroplastików należących do różnych typów morfologicznych (kształtów). Włókna okazały się z nich najdłuższe. Hu i in. (2022) stwierdzili dodatnia korelację między długościa MP, a zawansowaniem rozwoju larwalnego kijanek. Niniejsze studium nie wykazało jednak by na długość mikroplastików wpływała antropopresja, rozmiar (wielkość) larwy, jej stopień obciążenia MP czy przynależność do konkretnej rodziny (ranga taksonomiczna). Niemniej jednak analiza modelu bioracego pod uwage poszczególne typy morfologiczne mikroplastiku, wykazała pozytywną korelację między rozmiarem larwy, a długością mikroplastików mających postać granulek i płatków (ryc. 18A). Co zrozumiałe, wieksze i prawdopodobnie starsze larwy, posiadając szersze aparaty gebowe, są w stanie połykać wieksze pokarmy, w tym drobiny mikroplastiku, co tłumaczyłoby zaobserwowana w niniejszym studium pozytywną korelację między rozmiarem larw, a długością granulek i płatków. Według analiz modelu, prawidłowości tej nie podlegają jednak mikroplastiki mające postać włókien i fragmentów. Zazwyczaj wąskie włókna są prawdopodobnie łatwiejsze do połknięcia niezależnie od wielkości osobnika, co tłumaczyłoby niepodleganie przez nie wspomnianej prawidłowości. Nadto inny model wykazał ujemną korelację między nasileniem antropopresji, a długością mikroplastików w postaci płatków i granulek (ryc. 18B).

## 8.5. Pole powierzchni drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z larw płazów

Wielkość pola powierzchni drobiny mikroplastiku jest jej istotnym parametrem, albowiem ma wpływ na możliwe skutki toksykologiczne cząsteczki (Hale 2018). Nie mniejsze role pod tym względem odgrywają jednak chropowatość oraz właściwości sorpcyjne jej powierzchni (Burrows i in 2020).

W swoich badaniach, na podstawie wykonanych fotografii, zmierzyłem pola powierzchni trzech z czterech wyróżnionych typów morfologicznych mikroplastików – granulek, fragmentów oraz płatków. Włókna pominięto ze względu na ich niewielką szerokość. Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały obecność dodatniej korelacji między rozmiarem larwy, a polem powierzchni granulek i płatków z niej wyekstrahowanych. Dla fragmentów, relacja ta była odwrotna, tj. zaobserwowano negatywną korelację (ryc. 20A) – u większych larw pole powierzchni fragmentów było mniejsze. Co zrozumiałe, większe larwy płazów są w stanie połykać większe drobiny. Tłumaczyłoby to zaobserwowaną zależność, jednak niepodleganie jej przez fragmenty wymaga dalszych badań, gdyż wskazuje to na obecność dotychczas niezidentyfikowanego, odpowiadającego za to czynnika.

Co więcej, poziom antropopresji wokół stanowiska poboru próby był negatywnie skorelowany z wielkością pola powierzchni granulek i płatków, a pozytywnie z polem powierzchni fragmentów (ryc. 20B). Prawidłowość ta jest zgodna z wynikami analogicznych analiz dotyczących długości mikroplastików tych kształtów (ryc. 18B). Może to oznaczać, że w warunkach nasilonej antropopresji, mikroplastiki mające postać płatków ulegają bardziej intensywnej fragmentacji, co skutkuje powstawaniem zarówno krótszych, jak i powierzchniowo mniejszych drobin. Nadto zaobserwowanie większych mikroplastików mających postać fragmentów na stanowiskach o wyższej antropopresji, może być wytłumaczone przez napływ drobin o tym kształcie wraz ze spływem powierzchniowym i fragmentacją odpadów plastikowych w tych miejscach. Niemniej jednak obie te hipotezy wymagają przetestowania w przyszłych badaniach.

Warto także wspomnieć o tym, że na intensywność fragmentacji (rozdrabniania) mikroplastików wpływają nie tylko ich parametry morfologiczne, ale także skład chemiczny i kolor drobin. Niezwykle istotnymi czynnikami są również warunki środowiskowe, takie jak: fluktuacje temperatury, ekspozycja na światło słoneczne, stres mechaniczny oraz czynniki biologiczne (Mateos-Cárdenas i in. 2020). Wszystkie te zmienne warto uwzględniać w przyszłych badaniach przy modelowaniu fragmentacji mikroplastików. Co więcej, interpretując wyniki pomiarów długości i pola powierzchni MP wyekstrahowanych z larw płazów, warto mieć na uwadze możliwość ulegania przez nie rozdrobnieniu podczas przechodzenia przez układ pokarmowy. Zjawisko takie zostało udokumentowane u krabów (Watts i in. 2015). Ponadto drobiny mikroplastiku być może ulegają biodegradacji i skróceniu w tkankach. Zjawisko to, choć jeszcze nie udowodnione, może wyjaśnić wyniki otrzymane

przez Burger'a i in (2024), którzy stwierdzili, że w tkankach starszych żab *Amietia delalandii* występują włókna mikroplastiku w mniejszej ilości i o mniejszej długości. Dodatkowo, istnieje możliwość, że poszczególne kształty i rozmiary mikroplastików są w mniejszym stopniu wykrywane u larw płazów, albowiem w mniejszym stopniu ulegają one bioakumulacji, będąc szybciej usuwanymi przez ich układ pokarmowy. Wskazują na to wyniki badań Araújo i in. (2020), którzy na podstawie eksperymentów stwierdzili że większe drobiny akumulują się w skrzelach, średniej wielkości przechodzą przez układ pokarmowy i są wydalane, a najmniejsze najprawdopodobniej wchodzą do krwioobiegu i akumulują się w organach wewnętrznych. Nadto poza samym rozmiarem drobin mikroplastiku (Browne i in. 2008), ich sferyczność (kulistość) ma również wpływ na uleganie przez nie translokacji i akumulacji (Araújo i in. 2020).

## 8.6. Kolory mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów

W związku tym, że drobiny mikroplastiku pochodzą z wielu źródeł, charakteryzują się one przeróżnymi kolorami. Kolor, jako cecha tych drobin nie pozostaje bez znaczenia dla zwierząt, albowiem wpływa na celowe ich połykanie (Kühn i in. 2015). Ponadto kolorystyka mikroplastików może informować o ich pochodzeniu (Hartmann i in. 2019), a także stanowić dodatkowe zagrożenie dla organizmów, wynikające z obecności szkodliwych pigmentów (Onoja i in. 2022). Z drugiej strony, opieranie się na kolorze drobin przy wstępnej wizualnej identyfikacji mikroplastików, może prowadzić do przeszacowania obecności jaskrawo ubarwionych drobin (np. czerwonych, niebieskich) w stosunku do mikroplastików pozbawionych kolorów (Dris i in. 2015). Kolor jako cecha drobin nie jest często raportowany w badaniach MP pochodzących ze środowiska naturalnego, a jeszcze rzadziej w odniesieniu do ich kształtów (Lu i in. 2021). Niemniej jednak metaanaliza studiów nad mikroplastikami środowisk słodkowodnych wykazała, że najczęściej stwierdzanym kolorem wśród MP wyekstrahowanych z wód był przezroczysty (35%), biały (21,8%) oraz niebieski (16,7%). Z kolei w próbkach z osadów dennych, najczęściej stwierdzanym kolorem mikroplastiku był biały – 38,5% (Lu i in. 2021).

W niniejszej pracy, wśród mikroplastików wyizolowanych z larw płazów, najczęściej stwierdzanym kolorem był niebieski (53%). Wynik ten kontrastuje z wynikami uzyskanymi przez Karaoğlu i Gül'a (2020). Jednakże, przebadana przez nich próba była znacznie mniejsza. W niniejszym badaniu nie stwierdzono znaczących różnic dotyczących kompozycji kolorystycznej mikroplastików zakumulowanych przez larwy płazów różnych gatunków.

Niemniej jednak niektóre kolory tych zanieczyszczeń były nadreprezentowane w konkretnych taksonach. Stwierdzono jednak istotne różnice w kompozycji kolorystycznej drobin mikroplastiku różnych kształtów. Według mojej wiedzy, wzorzec ten nie został dotychczas opisany w literaturze naukowej.

Warto zaznaczyć, że kolor wpływa na intensywność degradacji makroplastiku i mezoplastiku do mikroplastiku. I tak plastik koloru niebieskiego, poprzez nieefektywną absorbancję promieniowania ultrafioletowego, ulega degradacji szybciej niż plastik o innym kolorze (Zhao i in. 2022). Zjawisko to może odpowiadać za stwierdzoną w niniejszej pracy powszechność koloru niebieskiego wśród mikroplastików. Na dodatek, dowiedziono, że mikroplastiki w środowisku, poddane promieniowaniu ultrafioletowemu lub wietrzeniu, zmieniają swój kolor (Guo i Wang 2019), co również powinno być brane pod uwagę przy interpretacji danych dotyczących kolorów.

## 8.7. Skład chemiczny drobin wyekstrahowanych z larw płazów

Za zachowanie drobiny mikroplastiku w wodzie odpowiada m.in. jej gęstość (wynikająca z kolei ze składu chemicznego) oraz sferyczność (kulistość) (Brooks i in. 2023). Według metaanalizy przeprowadzonej przez López-Rojo i in. (2023), najczęściej wykrywanym mikroplastikiem w kijankach pozyskanych ze środowiska naturalnego były nylonowe włókna. Z drugiej strony, wykazano, że wśród MP wyekstrahowanych z wód, osadów, ryb i większych bezkręgowców dominuje polipropylen i polietylen (Cera i in. 2020).

Najczęściej stwierdzanym syntetycznym polimerem W mikroplastikach wyekstrahowanych z larw płazów był polietylen, polipropylen oraz poli(etylen-propylendien). O ile dwa pierwsze polimery są dobrze udokumentowane jako zanieczyszczenia powszechnie znajdowane w wodach śródlądowych, a także w kijankach (Hu i in. 2018, Karaoğlu i Gül 2020, Hu i in. 2022), to niewatpliwie warta uwagi jest obecność poli(etylenupropylenu-dienu). Związek ten reprezentował aż 22% identyfikacji syntetycznych polimerów spośród przebadanych mikroplastików wyizolowanych z larw, a według dostępnych danych literaturowych, nie był on dotychczas odnotowywany wśród MP wyekstrahowanych z płazów. Był jednak stwierdzany w próbach z wód (Ben Ismail i in. 2022) i osadów (Liong i in. 2021). Co istotniejsze, ten rodzaj syntetycznej gumy był powszechny wśród drobin mikroplastiku wyizolowanych z dennych słodkowodnych bezkręgowców (/Naididae/, ośliczkowate /Asellidae/, larwy ochotkowatych /Chironomidae/) (Pan i in. 2021). Organizmy te stanowią potencjalny pokarm larw płazów (Juszczyk 1987), co wskazuje na możliwość

transferu troficznego tego polimeru. Ewentualne potwierdzenie zachodzenia tego zjawiska wymaga jednak dalszych badań.

Oprócz syntetycznych polimerów, wśród przeanalizowanych drobin wyekstrahowanych z larw płazów, wykryto także substancje takie jak materia roślinna czy celuloza. O ile pierwsza z wymienionych jest bez wątpienia pochodzenia naturalnego, to pochodzenie celulozy może być dwojakie (Athey i in. 2020). Może pochodzić ona zarówno ze źródeł antropogenicznych (np. tekstyliów), jak i naturalnych (np. glonów).

## 8.8. Mikroplastik w wodach i osadach dennych

Najczęściej stwierdzanym typem morfologicznym mikroplastiku wśród MP wyekstrahowanych z wód okazał się fragment, a spośród tych wyizolowanych z osadów dennych – włókno. Podobne wyniki otrzymali w swoich badaniach Karaoğlu i Gül (2020). Niemniej jednak Hu i in. (2018), przebadawszy mikroplastiki wyizolowane z wód i osadów niewielkich zbiorników śródlądowych, stwierdzili że w tych matrycach środowiskowych dominują odpowiednio włókna i fragmenty. Różnica ta może wynikać ze specyfiki badanych w niniejszej pracy stanowisk, z których część była zauważalnie zanieczyszczona plastikowymi odpadami. Przypuszczalnie, na stanowiskach takich znaczną część mikroplastików stanowią fragmenty (zasadniczo MP wtórne powstałe w wyniku fragmentacji plastikowych odpadów /Lehmann i in. 2021/), a nie włókna, zwykle dostające się do zbiorników wodnych w wyniku spływu powierzchniowego (Werbowski i in. 2021).

Najczęściej stwierdzanym kolorem mikroplastiku spośród drobin wyekstrahowanych z wód i osadów dennych był odpowiednio biały (24%) oraz niebieski (26%). Co interesujące, kolor niebieski dominował także wśród MP wyizolowanych z larw płazów na tych stanowiskach. Jednakże biały kolor drobin mikroplastiku, choć powszechny wśród tych wyizolowanych z wód, był rzadko stwierdzany w larwach. Rozbieżność taka może sugerować potencjalne unikanie przez larwy MP niektórych kolorów, co zdecydowanie wymaga dalszych badań.

Biorąc pod uwagę skład chemiczny przeanalizowanych drobin mikroplastiku wyekstrahowanych z wód, najczęściej identyfikowanym polimerem był polipropylen (34%). Wynik ten jest zgodny z innymi badaniami MP wód słodkich, gdzie polimer ten był również stwierdzony jako dominujący w wodzie (metaanaliza Cera i in. 2020, Li i in. 2020). Polipropylen jest szeroko stosowanym polimerem do produkcji różnorodnych plastikowych produktów takich jak: zakrętki, materiały budowlane, części samochodowe, sprzęt sportowy

czy opakowania (Bora i in. 2020). Produkty te, w wyniku niewłaściwej utylizacji, tj. po dostaniu się do środowiska naturalnego, ulegają fragmentacji i stanowią źródło mikroplastiku wtórnego. Wśród przeanalizowanych spektroskopowo mikroplastików wyizolowanych z osadów dennych, najczęściej identyfikowany był poli(etylen-propylen) (27%). Co interesujące, tego rodzaju polimeru tego nie stwierdzono wśród mikroplastików wyekstrahowanych z próbek wód pobranych z tych samych zbiorników (tab. 20).

# 8.9. Podobieństwa w profilach zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów, wód i osadów dennych

Niniejsze badanie wykazało obecność podobieństw w obrębie tego samego stanowiska – pod względem kształtów i kolorów mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów oraz wód. Prawidłowości te dla porównań larwy-osad, choć obecne, były słabiej zaznaczone. Obserwacje te częściowo potwierdzają wyniki uzyskane przez Hu i in. (2018), którzy stwierdzili podobieństwa w rozkładach kształtów i typów polimerów mikroplastików wyizolowanych z kijanek oraz wody z ich siedlisk. Ta częściowa zgodność w naszych wynikach spowodowana może być tym, że larwy płazów pobierają mikroplastiki w większej mierze z wody niż z osadów dennych. Brak zaobserwowanych (choć oczekiwanych) podobieństw w obrębie stanowiska pod katem składu chemicznego mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów, wód oraz osadów dennych jest zastanawiająca i skłania do dalszych, dogłębnych badań. Być może ten brak podobieństw wynika z faktu, że niniejsze badania objęły jedynie wodę pobraną tuż przy powierzchni lustra wody, a niekiedy jej resztki. Profil takich prób prawdopodobnie nadreprezentuje mikroplastiki złożone z mniej gęstych polimerów, w przeciwieństwie do profilu głębszych warstw wód, z których kijanki być może pobierają większość mikroplastików. Niemniej jednak modelując dynamikę przestrzenną i zachowanie mikroplastików w różnych typach środowisk, należy mieć na uwadze nie tylko ich skład chemiczny, lecz także ich kształt i rozmiar.

## 8.10. Ograniczenia i perspektywy

Zakres niniejszego studium był ograniczony poprzez skupienie się jedynie na obszarze województwa lubuskiego oraz pominięcie aspektu czasowej zmienności w zanieczyszczeniu mikroplastikiem, którą kształtuje między innymi sezonowa dynamika sedymentacji mikroplastików (Saarni i in. 2023). Ponadto ograniczenia metodologiczne, wynikające z

wielkości porów stosowanych filtrów mogły doprowadzić do niewykrycia najmniejszych frakcji mikroplastików. Spośród organizmów badano jedynie larwy płazów, z oczywistych względów pomijając inne mogące stanowić ważne bioindykatory zanieczyszczenia mikroplastikiem. Podkreśla to potrzebę dalszych badań mających na celu poznanie kompleksowego wpływu zanieczyszczenia mikroplastikiem ekosystemów słodkowodnych, tak istotnych dla wielu, często rzadkich i chronionych gatunków zwierząt. Ponadto oprócz porównań profili zanieczyszczenia MP między osadami dennymi, wodą oraz organizmami, przyszłe badania powinny brać pod uwagę zarówno troficzne, jak i nietroficzne interakcje międzygatunkowe wpływające na przestrzenną dynamikę tych zanieczyszczeń w ekosystemach słodkowodnych (D'Avignon i in. 2023). Wreszcie, z drobinami mikroplastiku obecnymi w środowisku naturalnym związane są unikalne skupiska mikroorganizmów, w tym bakterii (tzw. plastisfera, Amaral-Zettler i in. 2020). Rodzi to pytanie o zachodzenie preferencyjnego połykania takich drobin mikroplastiku przez kijanki żywiące się mikroorganizmami. Kwestia ta nie doczekała się jednak jeszcze zbadania.

#### 9. Podsumowanie

Przeprowadzone badania wzbogacają nadal ograniczoną (Cera i Scalici 2021), lecz stale rosnącą bazę wiedzy dotyczącą właściwości mikroplastików wyekstrahowanych z dziko żyjących płazów i komponentów ich wodnych siedlisk. Niniejsze studium dowodzi powszechności zanieczyszczenia polutantami tego rodzaju wśród larw płazów. Na stopień obciążenia mikroplastikiem okazała się mieć wpływ zarówno przynależność gatunkowa larw, jak i nasilenie antropopresji w miejscu poboru próby, wyrażone przez procentowy udział powierzchni zurbanizowanej wokół stanowiska badawczego. Ostatnia z tych zależności nie była dotychczas jednoznacznie dowiedziona, co świadczy o pionierskości niniejszej pracy w tym zakresie. Nadto wykazano także znaczący efekt zarówno przynależności gatunkowej larw, jak i stopnia antropopresji, na zróżnicowanie typów morfologicznych (kształtów) stwierdzonych w nich mikroplastików. Niemniej nie wykazano istotnej korelacji między rozmiarem (wielkością) larw, a stopniem ich obciążenia mikroplastikiem.

Stwierdzone w niniejszej pracy podobieństwa między woda, a zamieszkującymi je larwami płazów – pod względem kształtów i kolorów wyekstrahowanych mikroplastików, podkreślają wzajemne powiązania w obrębie ekosystemu słodkowodnego, i wskazują na to, że larwy płazów pobierają mikroplastik raczej z wody niż z osadów dennych. Ponadto podobieństwa te wskazuja na bioindykacyjny potencjał larw płazów odnośnie profilowania zanieczyszczenia mikroplastikiem. Otrzymane wyniki dostarczają pośredniego dowodu na to, że przeobrażone płazy mogą odgrywać rolę w transferze drobin mikroplastiku z ekosystemów wodnych do lądowych, co zdecydowanie zasługuje na dalsze badania. Możliwość taką eksperymentalnie wykazała Ruthsatz i in. (2023).Porównania charakterystyk mikroplastików wyekstrahowanych z wody, osadów dennych oraz larw płazów mogą także wskazywać na preferencje tych organizmów dotyczące połykania drobin konkretnych kształtów, kolorów czy klas wielkości. Nadto kompleksowa analiza drobin mikroplastiku pod wzgledem ich wielkości, kształtu, koloru i składu chemicznego jest w stanie dostarczyć istotnych informacji na temat potencjalnych źródeł pochodzenia tych polutantów. Wiedza taka może mieć kluczowe znaczenie dla ochrony środowiska, ponieważ umożliwiłaby identyfikację priorytetowych obszarów interwencji oraz wskazanie środków zapobiegawczych, służacych ochronie siedlisk wielu chronionych gatunków zwierząt. Mam nadzieję że wyniki moich badań przyczynia się do lepszej ochrony płazów również ze względu na to, że rozpoznanie charakterystyk zanieczyszczenia mikroplastikiem ich siedlisk (wody, osadów dennych) jest niezwykle istotne w projektowaniu eksperymentów. Jedynie takie eksperymenty, oparte na

znajomości charakterystyk zanieczyszczenia siedlisk i odzwierciedlające warunki środowiskowe, są w stanie wykazać jak dokładnie mikroplastiki wpływają na biologię dziko żyjących płazów, i jak wpływ ten zależy od innych stresorów, takich jak toksyny, podwyższona temperatura otoczenia czy patogeny (np. te wywołujące chytridiomikozy). Przyszłe badania ekotoksykologiczne powinny także wyjaśnić, a następnie inkorporować do analizowanych modeli, dynamikę bioakumulacji oraz wydalania mikroplastików przez organizmy, uwzględniając charakterystyczne dla nich typy żerowania. Istotne w przyszłych badaniach jest także to, by analizować większą liczbę organizmów ze stanowiska (także bezkregowce i glony), aby rozpoznać ewentualny transfer troficzny mikroplastików i ogólne funkcjonowanie sieci troficznych w zanieczyszczonych ekosystemach. Innym aspektem wymagającym dogłębnych badań, a stanowiącym obecnie terra incognita, jest tzw. "efekt konia trojańskiego", tj. stanowienie przez mikroplastiki wektorów dla patogenów i toksyn. Toksykologiczne skutki desorbowania dodatków pochodzących z mikroplastików, takich jak plastyfikatory czy endokrynnie czynny bisfenol A, nie są jeszcze dostatecznie poznane. Kolejnym, niemal nieprzedsięwziętym jeszcze w stosunku do płazów kierunkiem badań, jest zjawisko bioadhezji (przylegania) drobin mikroplastiku. Zjawisko to jednak badane jest obecnie u ryb (Kalčíková 2023).

### 10. Wnioski

Głównym celem niniejszej pracy było kompleksowe zbadanie zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów oraz ich siedlisk. Przeanalizowano w tym celu osobniki należące do 10 różnych taksonów reprezentujących cztery rodziny. Badania objęły również powierzchniową warstwę wód oraz osady denne pobrane z 23 zbiorników wodnych położonych na terenie województwa lubuskiego. Drobiny mikroplastiku wyizolowano, a następnie zbadano pod kątem ich kształtu (typu morfologicznego), koloru, długości, pola powierzchni oraz składu chemicznego. Poniżej przedstawiono główne wnioski płynące z przeprowadzonych analiz.

- 1. Zanieczyszczenie mikroplastikiem stwierdzono w 73% larw płazów.
- Najczęściej stwierdzanym kształtem, kolorem oraz polimerem wśród mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów było odpowiednio: włókno, kolor niebieski oraz polietylen.
- 3. Stopień obciążenia mikroplastikiem larw płazów zależał od nasilenia antropopresji oraz od ich przynależności gatunkowej.
- 4. Nie stwierdzono, by udział powierzchni rolnej wokół stanowisk poboru prób miał wpływ na stopień zanieczyszczenia mikroplastikiem larw płazów.
- 5. Drapieżne larwy były w mniejszym stopniu zanieczyszczone mikroplastikiem niż larwy wszystkożerne.
- 6. Nie wykazano, by wielkość larw miała statystycznie istotny wpływ na stopień ich obciążenia mikroplastikiem.
- 7. Zarówno przynależność gatunkowa, jak i nasilenie antropopresji mają wpływ na odnotowane w przebadanych osobnikach zróżnicowanie kształtów drobin mikroplastiku.
- 8. Mikroplastiki wyizolowane na tym samym stanowisku z larw, wody oraz osadów dennych wykazywały podobieństwa pod względem kształtów i kolorów, które były wyraźniej zaznaczone w porównaniu larwy-woda niż w porównaniu larwy-osad.
- 9. Nie stwierdzono podobieństw pod względem składu chemicznego między drobinami mikroplastików, które wyizolowano z wody, osadu i larw płazów na tym samym stanowisku.

## 11. Bibliografia

Acharya, S., Rumi, S., Hu, M., Abidi, N. (2021). Microfibers from synthetic textiles as a major source of microplastics in the environment: A review. *Textile Research Journal*, 91: 17-18.

Alford, R., Richards, S., McDonald, K. (2013). Amphibians, Biodiversity of. [W:] Levin, SA. [Red.] Encyclopedia of Biodiversity, second edition. Waltham: Academic Press.

Amaral-Zettler, L.A., Zettler, E.R., Mincer, T.J. (2020). Ecology of the plastisphere. *Nature Reviews Microbiology*, 18: 139-151.

Andrady, A.L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 1596-1605.

Araújo, A., de Melo, N.F.S., de Oliveira Jr, A.G.f, Rodrigues, F.P., Fernandes, T., de Andrade Vieira, J.E., Rocha, T.L., Malafaia, G. (2020). How much are microplastics harmful to the health of amphibians? A study with pristine polyethylene microplastics and *Physalaemus cuvieri*. *Journal of Hazardous Materials*, 382: 121066.

Araújo, A., Lopes Rocha, T., Silva, D.M. Malafaia, G. (2021). Micro(nano)plastics as an emerging risk factor to the health of amphibian: A scientometric and systematic review. *Chemosphere*, 283: 131090.

Araújo, A., Luz, T., Ahmed, M., Ali, M., Rahman, M.M., Bojan, N., Silva, D. de M., Barceló, D., Malafaia, G. (2023). Toxicity assessment of polyethylene microplastics in combination with a mix of emerging pollutants on *Physalaemus cuvieri* tadpoles. *Journal of Environmental Sciences*, 127: 465-482.

Araújo, A., Malafaia, G. (2021). Microplastic ingestion induces behavioral disorders in mice: A preliminary study on the trophic transfer effects via tadpoles and fish. *Journal of Hazardous Materials*, 401: 123263.

Araújo, A.P.D.C., Malafaia, G. (2020). Can short exposure to polyethylene microplastics change tadpoles' behavior? A study conducted with neotropical tadpole species belonging to order anura (*Physalaemus cuvieri*). Journal of Hazardous Materials, 391: 122214.

Araújo, A., Luz, T., Gonçalves, S., Rajagopal, R., Rahman, M.M., de Silva, D.M., Malafaia, G. (2022). How can "my shoes" affect the amphibian health? A study of the toxicity of microplastics from shoe sole (Polyvinyl chloride acetate) on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Hazardous Materials*, 440: 129847.

Athey, S., Adams, J., Erdle, L., Jantunen, L., Helm, P., Finkelstein, S., Diamond, M. (2020). The Widespread Environmental Footprint of Indigo Denim Microfibers from Blue Jeans. *Environmental Science and Technology Letters*, 7: 840-847.

Attademo, A., Curi, L., Cuzziol Boccioni, A., Barrios, C., Peltzer, P., Simoniello, M., Lajmanovich, R., Michlig, P., Repetti, M., Ríos, J. (2023). Microplastics and plastic additives as contaminants of emerging concern: A multi-biomarker approach using *Rhinella arenarum* tadpoles. *Environmental Advances*, 14: 100444.

Attademo, A., Cuzziol Boccioni, A., Peltzer, P., Franco, V., Simoniello, M., Jr, M.C.G., Lajmanovich, R. (2022). Effect of microplastics on the activity of carboxylesterase and phosphatase enzymes *in Scinax squalirostris* tadpoles. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194(10): 718.

Auta, H., Emenike, C., Fauziah, S.H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International*, 102: 165-176.

Ayala, F., Zeta-Flores, M., R. Baldárrago, S., Tume-Ruiz, J., Rangel-Vega, A., Reyes, E., Quinde, E., De-la-Torre, G., Lajo, L., Cardenas, S. (2023). Terrestrial mammals of the Americas and their interactions with plastic waste. *Environmental Science and Pollution Research*, 30: 57759–57770.

Azevedo-Santos, V., Brito, M., Manoel, P., Perroca, J., Rodrigues-Filho, J.L., Paschoal, L., Gonçalves, G., Wolf, M., Blettler, M., Andrade, M., Nobile, A., Pontieri de Lima, F., Ruocco, A., da Silva, C., Perbiche-Neves, G., Portinho, J., Giarrizzo, T., Arcifa, M., Pelicice, F. (2021). Plastic pollution: A focus on freshwater biodiversity. *AMBIO A Journal of the Human Environment*, 50(7): 1313-1324.

Bacchetta, R., Winkler, A., Santo, N., Tremolada, P. (2021). The Toxicity of Polyester Fibers in *Xenopus laevis. Water*, 13: 3446.

Balestrieri, A., Winkler, A., Scribano, G., Gazzola, A., Lastrico, G., Grioni, A., Pellitteri-Rosa, D., Tremolada, P. (2022). Differential effects of microplastic exposure on anuran tadpoles: A still underrated threat to amphibian conservation? *Environmental Pollution*, 303: 119137.

Barros, J., Seena, S. (2021). Plastisphere in freshwaters: An emerging concern. *Environmental Pollution*, 290: 118123.

Barnes, D. (2002). Invasions by marine life on plastic debris. Nature, 416: 808-809.

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. (2014). lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1–7.

Ben Ismail, S., Costa, E., Jaziri, H., Morgana, S., Boukthir, M., Ismail, M., Minetti, R., Montarsolo, A., Narizzano, R., Sammari, C., Faimali, M., Garaventa, F. (2022). Evolution of the Distribution and Dynamic of Microplastic in Water and Biota: A Study Case From the Gulf of Gabes (Southern Mediterranean Sea). *Frontiers in Marine Science*, 9: 786026.

Berger, L. (1975). Gady i płazy. Reptilia et Amphibia. Fauna Słodkowodna Polski. Warszawa-Poznań: PWN.

Berger, L. (2000). Płazy i gady Polski. Klucz do oznaczania. Warszawa-Poznań: PWN.

Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. [Red.] (2015). Marine Anthropogenic Litter. Cham: Springer.

Bhatt, V., Chauhan, J.S. (2023). Microplastic in freshwater ecosystem: bioaccumulation, trophic transfer, and biomagnification. *Environmental Science and Pollution Research*, 30: 9389-9400.

Blettler, M., Mitchell, C. (2021). Dangerous traps: Macroplastic encounters affecting freshwater and terrestrial wildlife. *Science of The Total Environmen*, 798: 149317.

Bocheński, M., Ciebiera, O., Czechowski, P., Dolata, S., Dubicka-Czechowska, A., Ludwisiak, Ł., Najbar, B., Wieczorek, M., Zieleniewski, W. (2023). Od eksploatacji do ekosystemu – studium przypadku Żwirowni Żagań-Miodnica. Poznań: Bogucki Wydawnictwo Naukowe.

Bonfanti, P., Colombo, A., Saibene, M., Motta, G., Saliu, F., Catelani, T., Mehn, D., La Spina, R., Ponti, J., Cella, C., Floris, P., Mantecca, P. (2021). Microplastics from miscellaneous plastic wastes: Physico-chemical characterization and impact on fish and amphibian development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 225: 112775.

Bos, R., Zhao, S., Sutton, T., Frank, T. (2023). Microplastic ingestion by deep-pelagic crustaceans and fishes. *Limnology and Oceanography*, 68: 1595-1610.

Bosch, J., Thumsová, B., López-Rojo, N., Pérez, J., Alonso, A., Fisher, M., Boyero, L. (2021). Microplastics increase susceptibility of amphibian larvae to the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Scientific Reports*, 11: 22438.

Bora, R., Wang, R., You, F. (2020). Waste Polypropylene Plastic Recycling toward Climate Change Mitigation and Circular Economy: Energy, Environmental, and Technoeconomic Perspectives. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8: 16350-16363.

Boyero, L., López-Rojo, N., Bosch, J., Alonso, A., Correa-Araneda, F., Pérez, J. (2020). Microplastics impair amphibian survival, body condition and function. *Chemosphere*, 244: 125500.

Brooks, J., Stewart, C., Haberstroh, C., Arias, M. (2023). Characteristics and fate of plastic pollution in urban stormwater ponds. *Environmental Pollution*, 320: 121052.

Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines woldwide: sources and sinks. *Environmental Science & Technology*, 45(21): 9175-9179.

Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis. Environmental Science & Technology*, 42: 5026-5031.

Burger, M., Bouwman, H., du Preez, L.H., Landman, W. (2024). Larger Common River Frogs (*Amietia delalandii*) have Fewer and Shorter Tissue Microplastic Fibres than Smaller Frogs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 112(2): 29.

Burrows, S., Frustaci, S., Thomas, K., Galloway, T. (2020). Expanding exploration of dynamic microplastic surface characteristics and interactions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 130(3): 115993.

Buss, N., Sander, B., Hua, J. (2021). Effects of Polyester Microplastic Fiber Contamination on Amphibian-Trematode Interactions. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(4): 869-879.

Cao, D., Wang, X., Luo, X., Liu, G. (2017). Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 61: 012148.

Carpenter, E., Anderson, S.J., Miklas, H.P., Peck, B.B., Harvey, G.R. (1972). Polystyrene spherules in coastal waters. *Science*, 178(4062): 749.

Castaño-Sánchez, A., Hose G.C., Reboleira, A.S.P.S. (2020). Ecotoxicological effects of anthropogenic stressors in subterranean organisms: A review. *Chemosphere*, 244: 125422.

Cera, A., Cesarini, G., Scalici, M. (2020). Microplastics in freshwater: What is the news from the world? *Diversity*, 12(7): 276.

Cera, A., Gallitelli, L., Cesarini, G., Scalici, M. (2022). Occurrence of Microplastics in Freshwater. [W:] Hashmi, M.Z. [Red.] Microplastic Pollution. Cham: Springer.

Cera, A., Scalici, M. (2021). Freshwater wild biota exposure to microplastics: A global perspective. *Ecology and Evolution*, 11: 9904-9916.

Chandrakanthan, K., Fraser, M., Herckes, P. (2023). Airborne microplastics in a suburban location in the desert southwest: Occurrence and identification challenges. *Atmospheric Environment*, 298: 119617.

Chen, J.C., Fang, C., Zheng, R.H., Hong, F.K., Jiang, Y.L., Zhang, M., Li, Y., Hamid, F.S., Bo, J., Lin, L.S. (2021). Microplastic pollution in wild commercial nekton from the South China Sea and Indian Ocean, and its implication to human health. *Marine Environmental Research*, 167: 105295.

Chinglenthoiba, C., Amesho, K., Reddy, Dekketi G.C., Chellappan, S., Lani, M. (2023). Microplastic as an Emerging Environmental Threat: A Critical Review on Sampling and Identification Techniques Focusing on Aquactic Ecoystem. *Journal of Polymers and the Environment*, 31: 1725-1747.

Clarke, K.R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18(1): 117-143.

Costa, L., da Costa, I., Oliveira, A., Zalmon, I. (2023). "Microplastic ecology": Testing the influence of ecological traits and urbanization in microplastic ingestion by sandy beach fauna. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 290: 108406.

Cowger, W., Steinmetz, Z., Gray, A., Munno, K., Lynch, J., Hapich, H., Primpke, S., De Frond, H., Rochman, C., Herodotou, O. (2021). Microplastic Spectral Classification Needs an Open Source Community: Open Specy to the Rescue! *Analytical Chemistry*, 93: 7543-7548.

Crawford, C.B., Quinn, B. (2017). Microplastic Pollutants. Amsterdam: Elsevier.

Ćirković, G., Mitrović, A., Ajtic, R. (2023). Results of the first analysis of tadpoles' diet and determination of microplastics presence of *Rana*, *Bufo* and *Bufotes* species from different localities in Serbia. 14. *Biologica Nyssana*, 14(1): 31-38.

D'Avignon, G., Hsu, S., Gregory-Eaves, I., Ricciardi, A. (2023). Feeding behavior and species interactions increase the bioavailability of microplastics to benthic food webs. *Science of The Total Environment*, 896: 165261.

De Cáceres, M., Legendre, P., Moretti, M. (2010). Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos*, 119: 1674-84.

De Cáceres, M., Legendre, P. (2009). Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology*, 90: 3566-3574.

De Falco, F., Gullo, M.P., Gentile, G., Di Pace, E., Cocca, M., Gelabert, L., Brouta-Agnésa, M., Rovira, A., Escudero, R., Villalba, R., Mossotti, R., Montarsolo, A., Gavignano, S., Tonin, C., Avella, M. (2018). Evaluation of microplastic release caused by textile washing processes of synthetic fabrics. *Environmental Pollution*, 236: 916-925.

Dimassi, S., Hahladakis, J., Yahia, M., Ahmad, M., Sayadi, S., Al-Ghouti, M. (2023). Effect of temperature and sunlight on the leachability potential of BPA and phthalates from plastic litter under marine conditions. *Science of The Total Environment*, 894: 164954.

Dong-Min Hou, D., Ding-Qi Rao, D. (2022). Microplastics: Their Effects on Amphibians and Reptiles-A Review. *Pakistan Journal of Zoology*, 54: 2931-2951.

Duong, T.T., Le, P.T., Nguyen, T.N.H., Hoang, T.Q., Ngo, H.M., Doan, T.O., Le, T.P.Q., Bui, H.T., Bui, M.H., Trinh, V.T., Nguyen, T.L., Da Le, N., Vu, T.M., Tran, T.K.C., Ho, T.C., Phuong, N.N., Strady, E. (2022). Selection of a density separation solution to study microplastics in tropical riverine sediment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194: 75.

Dris, R., Imhof, H., Löder, M., Gasperi, J., Laforsch, C., Tassin, B. (2018). Microplastic Contamination in Freshwater Systems: Methodological Challenges, Occurrence and Sources [W:] Zeng, E.Y. [Red.] Microplastic Contamination in Aquatic Environments. Cambridge: Elsevier.

Dursun, C., Karaoğlu, K., Özdemir, N., Candan, K., Kumlutaş, Y., Ilgaz, Ç., Gül, S. (2023). Spatiotemporal distribution of microplastics in true frogs (Ranidae:*Pelophylax*) populations from Türkiye. *Environmental Research*, 236: 116774.

Elhacham, E., Ben-Uri, L., Grozovski, J., Bar-On, Y.M., Milo, R. (2020). Global human-made mass exceeds all living biomass. *Nature*, 588(7838): 442-444.

Eric, N., Manga, V., Foba, J., Yengong, F. (2023). Quantitative Analysis of the Sized Ranged Plastic Debris on Beach Shoreline along the Limbe Coastline, Cameroon. *Journal of Environmental Protection*, 14: 441-469.

Eriksen, M., Cowger, W., Erdle, L.M., Coffin, S., Villarrubia-Gómez, P., Moore, C.J., Carpenter, E.J., Day, R.H., Thiel, M., Wilcox, C. (2023). A growing plastic smog, now estimated to be over 170 trillion plastic particles afloat in the world's oceans-Urgent solutions required. *PLoS One*, 8(3): e0281596.

European Environment Agency (EEA). (2020). CORINE Land Cover 2018 dataset. Dostępny online na: https://land.copernicus.eu/pan-european/corine-land-cover/clc2018

Evode, N., Qamar, S.A., Bilal, M., Barceló, D., Iqbal, H.M. (2021). Plastic waste and its management strategies for environmental sustainability. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 4914: 100142.

Fackelmann, G., Pham, C., Rodríguez, Y., Mallory, M., Provencher, J., Baak, J., Sommer, S. (2023). Current levels of microplastic pollution impact wild seabird gut microbiomes. *Nature Ecology & Evolution*, 7: 698-706.

Free, C., Jensen, O., Mason, S., Eriksen, M., Williamson, N., Boldgiv, B. (2014). High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. *Marine Pollution Bulletin*, 85: 156-163.

Frias, J., Nash, R. (2018). Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin*, 138: 145-147.

Fries, E., Dekiff, J.H., Willmeyer, J., Nuelle, M.-T., Ebert, M., Remy, D. (2013). Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2013(15): 1949e1956.

Gallitelli, L., Pietrelli, L., Scalici, M. (2022). Anthropogenic particles in coypu (*Myocastor coypus*; Mammalia, Rodentia) faeces: first evidence and considerations about their use as track for detecting microplastic pollution. *Environmental Science and Pollution Research*, 29: 55293-55301.

GESAMP (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. *Reports and Studies GESAMP*, 90: 96.

Gkoutselis, G., Rohrbach, S., Harjes, J., Brachmann, A., Horn, M., Rambold, G. (2024). Plastiphily is linked to generic virulence traits of important human pathogenic fungi. *Communications Earth & Environment*, 5: 51.

Gkoutselis, G., Rohrbach, S., Harjes, J., Obst, M., Brachmann, A., Horn, M., Rambold, G. (2021). Microplastics accumulate fungal pathogens in terrestrial ecosystems. *Scientific Reports*, 11: 13214.

Glandt, D., Jehle, R. [Red.] (2008). Der Moorfrosch / The Moor Frog. Der Zeitschrift Für Feldherpetologie, Supplement 13. Bielefeld: Laurenti-Verlag.

Godoy, V., Calero, M., Gonzalez Olalla, J., Martín-Lara, M., Olea, N., Ruiz-Gutierrez, A., Villar-Argaiz, M. (2022). The human connection: First evidence of microplastics in remote high mountain lakes of Sierra Nevada, Spain. *Environmental Pollution*, 311: 119922.

Gosner, K. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica*. 16(3): 183-190.

Grosse, W. R., Kühnel, K. D., Nöllert, A. (2013). Verbreitung, Biologie und Schutz des Teichmolches, *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758). Mertensiella, 19.

Głowaciński, Z., Sura, P. [Red.] (2018). Atlas płazów i gadów Polski: Status-Rozmieszczenie-Ochrona, z kluczami do oznaczania. Warszawa: PWN.

Guo, X., Wang, J. (2019). The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 142: 1-14.

Gül, S., Karaoğlu, K., Özçifçi, Z., Candan, K., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y. (2022). Occurrence of microplastics in herpetological museum collection: grass snake (*Natrix natrix* [Linnaeus, 1758]) and dice snake (*Natrix tessellata* [Laurenti, 1769]) as model organisms. *Water Air and Soil Pollution*, 233(5): 160.

Hampton, L., Brander, S., Coffin, S., Cole, M., Hermabessiere, L., Koelmans, A., Rochman, C. (2022). Characterizing microplastic hazards: Which concentration metrics and

particle characteristics are most informative for understanding toxicity in aquatic organisms? *Microplastics and Nanoplastics*, 2: 20.

Hanke, G., Galgani, F., Werner, S., Oosterbaan, L., Nilsson, P., Fleet, D., Kinsey, S., Thompson, R., Palatinus, A., Van Franeker, J., Vlachogianni, T., Scoullos, M., Veiga, J., Matiddi, M., Alcaro, L., Maes, T., Korpinen, S., Budziak, A., Leslie, H., Gago, J., Liebezeit, G. (2013). Guidance on Monitoring of Marine Litter in European Seas. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

Hale, R.C. (2018). Are the risks from microplastics truly trivial? *Environmental* Science & Technology, 52: 931.

Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., Angerer, J. (2007). Phthalates: toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(5): 623-634.

Hlisníková, H., Petrovičová, I., Kolena, B., Šidlovská, M., Sirotkin, A. (2021). Effects and mechanisms of phthalates' action on neurological processes and neural health: a literature review. *Pharmacological Reports*, 73(2): 386-404.

Hu, L., Chernick, M., Hinton, D.E., Shi, H. (2018). Microplastics in Small Waterbodies and Tadpoles from Yangtze River Delta, China. *Environmental Science & Technology*, 52(15): 8885-8893.

Hu, L., Fu, J., Zheng, P., Dai, M., Zeng, G., Pan, X. (2022). Accumulation of microplastics in tadpoles from different functional zones in Hangzhou Great Bay Area, China: Relation to growth stage and feeding habits. *Journal of Hazardous Materials*, 424(Pt D): 127665.

Hu, L., Su, L., Xue, Y., Mu, J., Zhu, J., Xu, J., Shi, H. (2016). Uptake, accumulation and elimination of polystyrene microspheres in tadpoles of *Xenopus tropicalis*. *Chemosphere*, 164: 611-617.

Iannella, M., Console, G., D'Alessandro, P., Cerasoli, F., Mantoni, C., Ruggieri, F., Di Donato, M., Biondi, M. (2020). Preliminary analysis of the diet of *Triturus carnifex* and pollution in mountain Karst ponds in central Apennines. *Water*, 12(1): 44.

Imasha, E., Babel, S. (2022). Microplastics Analytical Techniques in Water, Sediments, and Biota. [W:] Joo, S.H. [Red.]. Assessing the Effects of Emerging Plastics on the Environment and Public Health. Hershey: IGI Global.

Imhof, H.K., Laforsch, C., Wiesheu, A.C., Schmid, J., Anger, P.M., Niessner, R., Iveleva, N.P. (2016). Pigments and plastics in limnetic ecosystems: A qualitative and quantitative study on microparticles of different size classes. *Water Research*, 98: 64-74.

Ito, M., Hano, T., Kono, K., Ohkubo, N. (2022). Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from polyethylene microplastics in two morphologically different digestive tracts of marine teleosts: Gastric red seabream (*Pagrus major*) and agastric mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Pollution*, 308: 119589.

Jehle, R., Thiesmeier, B., Foster, J. (2011). The Crested Newt: A Dwindling Ponddweller. Bielefeld: Laurenti-Verlag.

Jiang, Y., Yang, F., Kazmi, S.S., Zhao, Y., Chen, M., Wang, J. (2021). A review of microplastic pollution in seawater, sediments and organisms of the Chinese coastal and marginal seas. *Chemosphere*, 286: 131677.

Joyce, P., Falkenberg, L. (2022). Microplastic abundances in co-occurring marine mussels: Species and spatial differences. *Regional Studies in Marine Science*, 57: 102730.

Junaid, M., Liu, S., Chen, G., Liao, H., Wang, J. (2022). Transgenerational impacts of micro(nano)plastics in the aquatic and terrestrial environment. *Journal of Hazardous Materials*, 443: 130274.

Justino, A.K., Ferreira, G.V., Fauvelle, V., Schmidt, N., Lenoble, V., Pelage, L., Martins, K., Travassos, P., Lucena Frédou, F. (2023). From prey to predators: Evidence of microplastic trophic transfer in tuna and large pelagic species in the southwestern Tropical Atlantic. *Environmental Pollution*, 327: 121532.

Juszczyk, W. (1987). Płazy i Gady Krajowe. Warszawa: PWN.

Kabir, A.H.M.E., Sekine, M., Imai, T., Yamamoto, K., Kanno, A., Higuchi, T. (2021). Assessing Small-Scale Freshwater Microplastics Pollution, Land-use, Source-to-Sink Conduits, and Pollution Risks: Perspectives from Japanese Rivers Polluted with Microplastics. *Science of The Total Environment*, 768: 144655.

Kalčíková, G. (2023). Beyond ingestion: Adhesion of microplastics to aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 258: 106480.

Karaoğlu, K., Gül, S. (2020). Characterization of microplastic pollution in tadpoles living in small water-bodies from Rize, the northeast of Turkey. *Chemosphere*, 255: 126915.

Khedre, A.M., Ramadan, S.A., Ashry, A., Mohamed, A. (2023) Assessment of microplastic accumulation in aquatic insects of different feeding guilds collected from wastewater in Sohag Governorate, Egypt. *Marine and Freshwater Research*, 74: 733-745.

Koelmans, A.A., Mohamed Nor, N.H., Hermsen, E., Kooi, M., Mintenig, S.M., De France, J. (2019). Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Research*, 155: 410-422.

Kolenda, K., Kuśmierek, N., Kujawa, K., Smolis, A., Wiśniewski, K., Salata, S., Maltz, T.K., Stachowiak, M., Kadej, M. (2022). Bottled & canned - Anthropogenic debris as an understudied ecological trap for small animals. *Science of The Total Environment*, 837: 155616.

Kolenda, K., Kuśmierek, N., Pstrowska, K. (2020). Microplastic ingestion by tadpoles of pond-breeding amphibians-first results from Central Europe (SW Poland). *Environmental Science and Pollution Research*, 27: 33380-33384.

Krebs, C.J. (1989). Ecological Methodology. New York: Harper Collins Publishers.

Król, S. (1990). Nasza przyroda. Województwa gorzowskie i zielonogórskie. Warszawa: Zarząd Główny Ligi Ochrony Przyrody.

Kühn, S., Bravo Rebolledo, E., Van Franeker, J. (2015). Deleterious effects of litter on marine life [W:] Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. [Red.] Marine Anthropogenic Litter. Cham: Springer.

Kvale, K., Prowe, A.E.F., Chien, C.T, Landolfi, A., Oschlies, A. (2021). Zooplankton grazing of microplastic can accelerate global loss of ocean oxygen. *Nature Communications*, 12: 2358.

Kvale, K., Prowe, A.E.F., Chien, C.T., Landolfi, A., Oschlies, A. (2020). The global biological microplastic particle sink. *Scientific Reports*, 10: 16670.

Lambert, S., Wagner, M. (2018). Microplastics Are Contaminants of Emerging Concern in Freshwater Environments: An Overview. [W:] Wagner, M., Lambert, S. [Red.] Freshwater Microplastics. Cham: Springer.

Lehmann, A., Leifheit, E.F., Gerdawischke, M., Rillig, M.C. (2021). Microplastics have shape- and polymer-dependent effects on soil aggregation and organic matter loss—An experimental and meta-analytical approach. *Microplastics and Nanoplastics*, 1: 7.

Li, P., Bao, L., Wei, Y., Zhao, W., Wang, F., Liu, X., Su, H., Zhang, R. (2023). Occurrence, Bioaccumulation, and Risk Assessment of Microplastics in the Aquatic Environment: A Review. *Water*, 15(9): 1768.

Li, X., Busquets, R., Campos, L. (2020). Assessment of microplastics in freshwater systems: A review. *Science of the Total Environment*, 707: 135578.

Liong, R., Hadibarata, T., Yuniarto, A., Kuok Ho, D.T., Khamidun, M.H. (2021). Microplastic occurrence in the water and sediment of Miri River Estuary, Borneo Island. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232: 342.

Liu, P.-Y., Meng, T., Li, Y., Cai, M., Li, X.-H., Chen, J., Qin, Z.-F. (2017). Tetrabromoethylcyclohexane affects gonadal differentiation and development in the frog *Pelophylax nigromaculatus*. *Aquatic Toxicology*, 192: 40-47.

Lopes, L., Lopes, F., Quintana, K., Costa, P., Martins, C., Souza, M. (2023). Biomineralization biomarkers to assess microplastics toxic effects in the freshwater snail *Pomacea canaliculata. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 268: 109585.

López-Rojo, N., Alonso, A., Boyero, L., Bosch, J. (2023). Effects of microplastics on amphibian performance and survival: Current knowledge and research gaps. *Advances in Chemical Pollution, Environmental Management and Protection*, 11: 263-285.

Lu, H.C., Ziajahromi, S., Locke, A., Neale, P., Leusch, F. (2022). Microplastics profile in constructed wetlands: Distribution, retention and implications. *Environmental Pollution*, 313: 120079.

Lu, H.C., Ziajahromi, S., Neale, P., Leusch, F. (2021). A systematic review of freshwater microplastics in water and sediments: Recommendations for harmonisation to enhance future study comparisons. *Science of the Total Environment*, 781: 146693.

Mackenzie, C., Vladimirova, V. (2021). Preliminary study and first evidence of presence of microplastics in terrestrial herpetofauna from Southwestern Paraguay. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 58(1): 16-24.

Malafaia, G., Luz, T., Ahmed, M., Karthi, S., Araújo, A. (2022). When toxicity of plastic particles comes from their fluorescent dye: a preliminary study involving neotropical *Physalaemus cuvieri* tadpoles and polyethylene microplastics. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 6: 100054.

Maletzky, A., Geiger, A., Kyek, M., Nöllert, A. [Red.] (2016). Distribution, Biology and Protection of the Common Toad *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) with Special Consideration of Roadside Amphibian Protection. Mertensiella, 24.

Manríquez-Guzmán, D., Chaparro-Herrera, D., Ramírez-García, P. (2023). Microplastics are transferred in a trophic web between zooplankton and the amphibian Axolotl (*Ambystoma mexicanum*): Effects on their feeding behavior. *Food Webs*, 37: e00316.

Mateos-Cárdenas, A., O'Halloran, J., van Pelt, F.N.A.M., Jansen, M.A.K. (2020). Rapid fragmentation of microplastics by the freshwater amphipod *Gammarus duebeni* (Lillj.). *Scientific Reports*, 10: 12799.

Mattsson, K., De Lima, J., Wilkinson, T., Järlskog, I., Ekstrand, E., Andersson-Sköld, Y., Gustafsson, M., Hassellöv, M. (2023). Tyre and road wear particles from source to sea. *Microplastics and Nanoplastics*, 3: 14.

Mikula, P., Karg, J., Jerzak, L., Walasz, K., Siekiera, J., Czyż, S., Mikicińska, K., Pietkiewicz, M., Sztwiertnia, H., Wyka, J., Tryjanowski, P. (2024). Diet analysis and the assessment of plastic and other indigestible anthropogenic litter in the white stork pellets. *Environmental Science and Pollution Research*, 31: 6922-6928.

Mizraji, R., Ahrendt, C., Perez-Venegas, D., Vargas, J., Pulgar, J., Aldana, M., Patricio Ojeda, F., Duarte, C., Galbán-Malagón, C. (2017). Is the feeding type related with the content of microplastics in intertidal fish gut? *Marine Pollution Bulletin*, 116(1-2): 498-500.

Moreira-Mendieta, A., Garcia-Garin, O., Muñoz-Pérez, J., Urquía, D., Drago, M., Borrell, A., Páez-Rosas, D. (2023). Detection and quantification of microplastic pollution in the endangered Galapagos Sea lion. *The Science of The Total Environment*, 896: 166223.

Morin, N., Arp, H.P.H., Hale, S.E. (2015). Bisphenol a In Solid Waste Materials, Leachate Water, And Air Particles From Norwegian Waste-handling Facilities: Presence And Partitioning Behavior. *Environmental Science & Technology*, 13(49): 7675-7683.

Muenhor, D., Harrad, S., Ali, N., Covaci, A. (2010). Brominated flame retardants (BFRs) in air and dust from electronic waste storage facilities in Thailand. *Environment International*, 36(7): 690-698.

Nair, H.T., Perumal, S. (2022). Trophic Transfer and Accumulation of Microplastics in Freshwater Ecosystem: Risk to Food Security and Human Health. *International Journal of Ecology*, 2022(3): 1-11.

Najbar, B. (1995). Płazy i gady Polski. Zielona Góra: Wyższa Szkoła Inżynierska w Zielonej Górze.

Najbar, B., Borczyk, B. (2012). Zaskroniec zwyczajny. Biologia i ochrona. Zielona Góra: Oficyna Wydawnicza Uniwersytetu Zielonogórskiego.

O'Donovan, S., Mestre, M.C., Abel, S., Fonseca, T.G., Carteny, C.C., Cormier, B., Keiter, S.H., Bebianno, M.J. (2018). Ecotoxicological effects of chemical contaminants adsorbed to microplastics in the clam *Scrobicularia plana*. *Frontiers in Marine Science*, 5: 143.

Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B.,

Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., Evangelista, H., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M., Lahti, L., McGlinn, D., Ouellette, M., Ribeiro Cunha, E., Smith, T., Stier, A., Ter Braak, C., Weedon, J. (2023). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-5, Dostępny online na: https://github.com/vegandevs/vegan.

Onoja, S., Nel, H.A., Abdallah, M.A.E., Harrad, S. (2022). Microplastics in freshwater sediments: Analytical methods, temporal trends, and risk of associated organophosphate esters as exemplar plastics additives. *Environmental Research*, 203: 111830.

Pan, C.G., Mintenig, S.M., Redondo-Hasselerharm, P.E., Neijenhuis, P.H M.W., Yu, K.F., Wang, Y.H., Koelmans, A.A. (2021). Automated µFTIR imaging demonstrates taxonspecific and selective uptake of microplastic by freshwater invertebrates. *Environmental Science & Technology*, 55(14): 9916-9925.

Pastorino, P., Anselmi, S., Esposito, G., Bertoli, M., Pizzul, E., Barceló, D., Elia, A., Dondo, A., Prearo, M., Renzi, M. (2023). Microplastics in biotic and abiotic compartments of high-mountain lakes from Alps. *Ecological Indicators*, 150: 110215.

Pastorino, P., Pizzul, E., Bertoli, M., Anselmi, S., Kušće, M., Menconi, V., Prearo, M., Renzi, M. (2021). First insights into plastic and microplastic occurrence in biotic and abiotic compartments, and snow from a high-mountain lake (Carnic Alps). *Chemosphere*, 265: 129121.

Pastorino, P., Prearo, M., Di Blasio, A., Barcelò, D., Anselmi, S., Colussi, S., Alberti, S., Tedde, G., Dondo, A., Ottino, M., Pizzul, E., Renzi, M. (2022). Microplastics Occurrence in the European Common Frog (*Rana temporaria*) from Cottian Alps (Northwest Italy). *Diversity*, 14(2): 66.

PlasticsEurope (2017). Plastics - the Facts 2017 an Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. Dostępny online na: https://plasticseurope.org/wpcontent/uploads/2021/10/2017-Plastics-the-facts.pdf

PlasticsEurope (2023). Plastics – the fast Facts 2023. Dostępny online na: https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/

PlasticsEurope Polska (2022). Branża tworzyw sztucznych 2022. Dostępny online na: https://plasticseurope.org/pl/knowledge-hub/branza-tworzyw-sztucznych-2022/

Porta, R. (2021). Anthropocene, the plastic age and future perspectives. *FEBS Open Bio*, 11(4): 948-953.

Prapanchan, V.N., Kumar, E., Subramani, T., Sathya, U., Li, P. (2023). A Global Perspective on Microplastic Occurrence in Sediments and Water with a Special Focus on Sources, Analytical Techniques, Health Risks, and Remediation Technologies. *Water*, 15: 1987.

QGIS Development Team. (2022). QGIS Geographic Information System (Wersja 3.28.10). QGIS Association.

Quik, J., Meesters, J.A.J., Koelmans, A. (2023). A multimedia model to estimate environmental fate of microplastic particles. *Science of The Total Environment*, 882: 163437.

R Development Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Rahman, Md.M., Kim, E.-S., Sung, H-Ch. (2024). Microplastics as an emerging threat to amphibians: Current status and future perspectives. *Heliyon*, 10(7): e28220.

Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 62: 142-160.

Rangel-Buitrago, N., Neal, W., Williams, A. (2022). The Plasticene: Time and rocks. *Marine Pollution Bulletin*, 186: 114358.

Ratnayaka, A., Serieys, L., Hangawatte, T., Leung, L., Fisher, D. (2023). Plastic ingestion by fishing cats suggests trophic transfer in urban wetlands. *Environmental Pollution*, 316: 120694.

Rist, S., Hartmann, N.B. (2018). Aquatic ecotoxicity of microplastics and nanoplastics: lessons learned from engineered nanomaterials. [W:] Wagner, M., Lambert, S. [Red.] Freshwater Microplastics. Cham: Springer.

Rodrigues, M., Abrantes, N., Gonçalves, F., Nogueira, H., Marques, J., Gonçalves, A. (2018). Spatial and temporal distribution of microplastics in water and sediments of a freshwater system (Antuã River, Portugal). *Science of The Total Environment*, 633: 1549-1559.

Rodríguez-Seijo, A., Pereira, R. (2017). Morphological and Physical Characterization of Microplastics. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 75: 49-66.

Rubin, A., Gnaim, R., Levi, S., Zucker, I. (2023). Risk assessment framework for microplastic in marine environments. *Science of The Total Environment*, 901(25): 166459.

Ruthsatz, K., Domscheit, M., Engelkes, K., Vences, M. (2022). Microplastics ingestion induces plasticity in digestive morphology in larvae of *Xenopus laevis*. *Comparative biochemistry and physiology*. *Part A, Molecular & integrative physiology*, 269: 111210.

Ruthsatz, K., Schwarz, A., Gomez-Mestre, I., Meyer, R., Domscheit, M., Bartels, F., Schaeffer, S.-M., Engelkes, K. (2023). Life in plastic, it's not fantastic: Sublethal effects of polyethylene microplastics ingestion throughout amphibian metamorphosis. *Science of The Total Environment*, 885: 163779.

Saarni, S., Soininen, T., Uurasjärvi, E., Hartikainen, S., Meronen, S., Koistinen, A. (2023). Seasonal variation observed in microplastic deposition rates in boreal lake sediments. *Journal of Soils and Sediments*, 23: 1960-1970.

Salla, R.F., Oliveira, F.N., Jacintho, J.C., Cirqueira, F., Tsukada, E., Vieira, L.G., Rocha, T.L. (2024). Microplastics and TiO2 nanoparticles mixture as an emerging threat to amphibians: A case study on bullfrog embryos. *Environmental Pollution*, 346, 123624.

Santos, F., Rebelo Diório, G., Fernandino, G. (2022). Why do plastic debris forms matter for the Anthropocene? MICRO 2022, Online Atlas Edition: Plastic Pollution from MACRO to nano.

Scribano, G., Gazzola, A., Winkler, A., Balestrieri, A., Grioni, A., Lastrico, G., Tremolada, P., Pellitteri-Rosa, D. (2023). Anti-predator behavioral responses of Italian agile

frog tadpoles (*Rana latastei*) exposed to microplastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 30: 1-9.

Sczaniecki, M., Zajchowska, S. [Red.] (1950) Ziemia Lubuska. Poznań: Instytut Zachodni.

Secretariat of the Convention on Biological Diversity. (2021). First draft of the post-2020 global biodiversity framework. Dostępny online na: https://www.cbd.int/doc/c/abb5/591f/2e46096d3f0330b08ce87a45/wg2020-03-03-en.pdf

Shan, S., Zhang, Y., Zhao, H., Zeng, T., Zhao, X. (2022). Polystyrene nanoplastics penetrate across the blood-brain barrier and induce activation of microglia in the brain of mice. *Chemosphere*, 298: 134261.

Sharma, S., Sharma, V., Chatterjee, S. (2023). Contribution of plastic and microplastic to global climate change and their conjoining impacts on the environment - A review. *Science of The Total Environment*, 875: 162627.

Shetu, M., Fahmida, P., Tareq, S. (2023). Identifying the presence of microplastics in frogs from the largest delta of the world. *Environmental Advances*, 11: 100355.

Sinsch, U. (1998). Biology and Ecology of the Natterjack Toad. Bochum: Laurenti-Verlag.

Sommer, F., Dietze, V., Baum, A., Sauer, J., Gilge, S., Maschowski, C., Gieré, R. (2018). Tire Abrasion as a Major Source of Microplastics in the Environment. *Aerosol and Air Quality Research*, 18(8): 2014-2028.

Squillante, J., Scivicco, M., Ariano, A., Nolasco, A., Esposito, F., Cacciola, N.A., Severino, L., Cirillo, T. (2023). Occurrence of phthalate esters and preliminary data on microplastics in fish from the Tyrrhenian sea (Italy) and impact on human health. *Environmental Pollution*, 316(1): 120664.

Szkudlarek, M., Najbar, B., Jankowiak, Ł. (2023). Microplastics pollution in larvae of toads, frogs and newts in anthropopressure gradient. *Ecological Indicators*, 155: 110971.

Szkudlarek, M., Najbar, B., Jankowiak, Ł. (2024). Similarity of Microplastic Characteristics between Amphibian Larvae and Their Aquatic Environment. *Animals*, 14: 717.

Tamschick, S., Rozenblut-Kościsty, B., Ogielska, M., Kekenj, D., Gajewski, F., Krüger, A., Kloas, W., Stöck, M. (2016). The plasticizer bisphenol A affects somatic and sexual development, but differently in pipid, hylid and bufonid anurans. *Environmental Pollution*, 216: 282-291.

Talbot, R., Chang, H. (2021). Microplastics in freshwater: A global review of factors affecting spatial and temporal variations. *Environmental Pollution*, 292: 118393.

Tatlı, H., Altunışık, A., Gedik, K. (2022). Microplastic prevalence in Anatolian water frogs (*Pelophylax* spp.). *Journal of Environmental Management*, 321: 1-7.

Thiesmeier, B., Kupfer, A., Jehle, R. (2009). Der Kammmolch ein "Wasserdrache" in Gefahr. Bielefeld: Laurenti-Verlag.
Thiesmeier, B., Schulte, U. (2010). Der Bergmolch im Flachland wie im Hochgebirge zu Hause. Bielefeld: Laurenti-Verlag.

Venables, B., Ripley, B. (2002). Modern Applied Statistics With S. New York: Springer.

Venâncio, C., Gabriel, A., Oliveira, M., Lopes, I. (2022). Feeding exposure and feeding behaviour as relevant approaches in the assessment of the effects of micro(nano)plastics to early life stages of amphibians. *Environmental Research*, 212(Pt D): 113476.

Ventrice, P., Ventrice, D., Russo, E., De Sarro, G. (2013). Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(1), 88-96.

Watts, A., Urbina, M., Corr, S., Lewis, C., Galloway, T. (2015). Ingestion of plastic microfibers by the crab *Carcinus maenas* and its effect on food consumption and energy balance. *Environmental Science and Technology*, 49(24): 14597-14604.

Wąsowski, J., Bogdanowicz, A. (2020). Mikroplastiki w środowisku wodnym. Warszawa: PWN.

White, K., Petrovan, S., Mayes, W. (2023). Pollutant accumulation in road mitigation tunnels for amphibians: A multisite comparison on an ignored but important issue. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11: 1133253.

Whitehead, P.G., Bussi, G., Hughes, J.M.R., Castro-Castellon, A.T., Norling, M.D., Jeffers, E.S., Rampley, C.P.N., Read, D.S., Horton, A.A. (2021). Modelling Microplastics in the River Thames: Sources, Sinks and Policy Implications. *Water*, 13(6): 861.

Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York: Springer.

Wu, P., Huang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Zhang, Y., He, F., Chen, H., Quan, G., Yan, J., Li, T., Gao, B. (2019). Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184: 109612.

Xiong, X., Tu, Y., Chen, X., Jiang, X., Shi, H., Wu, C., Elser, J.J. (2019). Ingestion and egestion of polyethylene microplastics by goldfish (*Carassius auratus*): Influence of color and morphological features. *Heliyon*, 5: e03063.

Yusuf, A., Sodiq, A., Giwa, A., Eke, J., Pikuda, O., Eniola, J.O., Ajiwokewu, B., Sambudi, N.S., Bilad, M.R. (2022). Updated review on microplastics in water, their occurrence, detection, measurement, environmental pollution, and the need for regulatory standards. *Environmental Pollution*, 292(Pt B): 118421.

Zajchowska, S. [Red.] (1972). Atlas województwa zielonogórskiego. Warszawa: Lubuskie Towarzystwo Naukowe. Wydawnictwa Geologiczne.

Zhang, Q., Lv, Y., Liu, J., Chang, L., Chen, Q., Zhu, L., Wang, B., Jiang, J., Zhu, W. (2023). Size matters either way: Differently-sized microplastics affect amphibian host and symbiotic microbiota discriminately. *Environmental Pollution*, 328: 121634.

Zhang, Y.J., Guo, J.L., Xue, J.C., Bai, C.L., Guo, Y. (2021). Phthalate metabolites: Characterization, toxicities, global distribution, and exposure assessment. *Environmental Pollution*, 291: 118106.

Zhao, X., Wang, J., Yee Leung, K.M., Wu, F. (2022). Color: An Important but Overlooked Factor for Plastic Photoaging and Microplastic Formation. *Environmental Science & Technology*, 56(13): 9161-9163.

## 12. Załączniki

# 12.1. Załącznik 1. Zezwolenie Regionalnej Dyrekcji Ochrony Środowiska



Gorzów Wlkp., dnia 15 kwietnia 2021 r.

# Ochrony Środowiska w Gorzowie Wielkopolskim

**REGIONALNY DYREKTOR** 

WPN-I.6401.161.2021.JK

## DECYZJA

Na podstawie art. 104 § 1 oraz art. 105 § 1 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. z 2020 r. poz. 256 ze zm.) oraz art. 56 ust. 2 pkt. 1 i 2 ust. 4 pkt. 4 w związku z art. 52 ust. 1 pkt 4 i 6 ustawy z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody (Dz. U. z 2020 r. poz. 55 ze zm.) oraz § 6 ust. 1 pkt 4 i 6 rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 16 grudnia 2016 roku w sprawie ochrony gatunkowej zwierząt (Dz. U. z 2016 r., poz. 2183 ze zm.), po rozpatrzeniu wniosku Rektora prof. dr hab. Wojciecha Strzyżewskiego, Uniwersytet Zielonogórski, ul. prof. Z. Szafrana 1, 65-516, Zielona Góra z dnia 08 marca 2021 r. (data wpływu do tut. urzędu: 12.03.2021 r.) w sprawie wydania zezwolenia na niektóre czynności objęte zakazami w odniesieniu do gatunków objętych ochroną gatunkową,

#### I. zezwalam

Panu dr hab. prof. UZ Bartłomiejowi Najbarowi oraz Panu mgr Michałowi Szkudlarkowi Uniwersytet Zielonogórski, ul. prof. Z. Szafrana 1, 65-516, Zielona Góra na zbieranie, przetrzymywanie i posiadanie martwych okazów gatunków oraz ich transport w granicach województwa lubuskiego w następującym zakresie:

1. w postaci larwalnej z całego terenu województwa lubuskiego:

- traszka grzebieniasta Triturus cristatus do 150 osobników,
- traszka zwyczajna Lissotriton vulgaris do 350 osobników,
- traszka górska Ichthyosaura alpestris do 200 osobników,
- kumak nizinny Bombina bombina do 150 osobników,
- grzebiuszka ziemna Pelobates fuscus do 300 osobników,
- ropucha szara Bufo bufo do 500 osobników,
- ropucha zielona Bufotes viridis do 500 osobników,
- ropucha paskówka Epidalea calamita do 200 osobników,
- rzekotka drzewna Hyla arborea do 300 osobników,
- żaba jeziorkowa Pelophylax lessonae do 400 osobników,
- żaba wodna Pelophylax esculentus do 500 osobników,
- żaba śmieszka Pelophylax ridibundus do 400 osobników,
- żaba trawna Rana temporaria do 550 osobników,
- żaba moczarowa Rana arvalis do 500 osobników,

- osobniki dorosłe zbierane na terenie powiatu zielonogórskiego, powiatu nowosolskiego, powiatu żarskiego, powiatu słubickiego oraz powiatu gorzowskiego:
  - traszka grzebieniasta Triturus cristatus do 100 osobników,
  - traszka zwyczajna Lissotriton vulgaris do 200 osobników,
  - traszka górska Ichthyosaura alpestris do 200 osobników,
  - kumak nizinny Bombina bombina do 100 osobników,
  - grzebiuszka ziemna Pelobates fuscus do 200 osobników,
  - ropucha szara Bufo bufo do 500 osobników,
  - ropucha zielona Bufotes viridis do 300 osobników,
  - ropucha paskówka Epidalea calamita do 100 osobników,
  - rzekotka drzewna Hyla arborea do 100 osobników,
  - żaba jeziorkowa Pelophylax lessonae do 300 osobników,
  - żaba wodna Pelophylax esculentus do 300 osobników,
  - żaba śmieszka Pelophylax ridibundus do 300 osobników,
  - żaba trawna Rana temporaria do 500 osobników,
  - żaba moczarowa Rana arvalis do 200 osobników,
  - jaszczurka zwinka Lacerta agilis do 500 osobników,
  - jaszczurka żyworodna Zootoca vivipara do 400 osobników,
  - padalec zwyczajny Anguis fragilis do 500 osobników,
  - zaskroniec zwyczajny Natrix natrix do 500 osobników,
  - gniewosz plamisty Coronella austriaca do 100 osobników,
  - żmija zygzakowata Vipera berus do 100 osobników,
  - żółw błotny Emys orbicularis do 50 osobników,

w celu przeprowadzenia badań naukowych realizowanych w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Zielonogórskiego, w zakresie pobrania larw płazów z wysychających zbiorników wodnych w celu określenia mikroplastiku u różnych gatunków żyjących w zbiornikach o różnym stopniu antropopresji w Polsce Zachodniej oraz określenia stopnia zanieczyszczenia mikroplastikiem płazów i gadów przejechanych przez samochody, ich śmiertelności na wybranych odcinkach dróg i tras migracji,

#### pod następującymi warunkami:

- larwy płazów należy zbierać za pomocą pesety do szklanych pojemników z wodnym roztworem alkoholu (należy je oznaczyć), natomiast martwe płazy i gady należy zbierać przy użyciu lateksowych rękawiczek (po oznaczeniu zamrozić);
- miejscem przetrzymywania okazów do czasu ich analizy będzie Uniwersytet Zielonogórski, Instytut Nauk Biologicznych, ul. Prof. Szafrana 1, 65-516 Zielona Góra;

#### II. umarzam

postępowanie w części dotyczącej pozyskiwania okazów oraz fotografowania, filmowania lub obserwacji mogących powodować płoszenie lub niepokojenie następujących osobników: traszka grzebieniasta *Triturus cristatus*, traszka zwyczajna *Lissotriton vulgaris*, traszka górska *Ichthyosaura alpestris*, kumak nizinny *Bombina bombina*, grzebiuszka ziemna *Pelobates fuscus*, ropucha szara *Bufo bufo*, ropucha zielona *Bufotes viridis*, ropucha paskówka *Epidalea calamita*, rzekotka drzewna *Hyla arborea*, żaba jeziorkowa *Pelophylax lessonae*, żaba wodna *Pelophylax esculentus*, żaba śmieszka *Pelophylax ridibundus*, żaba trawna *Rana temporaria*, żaba moczarowa *Rana arvalis*, jaszczurka zwinka *Lacerta agilis*, jaszczurka żyworodna *Zootoca vivipara*, padalec zwyczajny *Anguis fragilis*, zaskroniec zwyczajny *Natrix natrix*, gniewosz plamisty *Coronella austriaca*, żmija zygzakowata *Vipera berus*, żółw błotny *Emys orbicularis* z uwagi na bezprzedmiotowość postępowania.

#### Zezwolenie jest ważne w terminie do 01 października 2024 r.

Jednocześnie zobowiązuję Wnioskodawcę do przedłożenia Regionalnemu Dyrektorowi Ochrony Środowiska w Gorzowie Wielkopolskim sprawozdania z zakresu wykorzystania niniejszego zezwolenia w terminie do dnia 31 stycznia 2022 r., do dnia 31 stycznia 2023 r. oraz do 31 października 2024 r. W sprawozdaniach należy powołać się na numer niniejszej decyzji.

#### UZASADNIENIE

Wnioskiem z dnia 08 marca 2021 r. (data wpływu do tut. urzędu: 12.03.2021 r.), Rektor prof. dr hab. Wojciech Strzyżewski, Uniwersytet Zielonogórski, ul. prof. Z. Szafrana 1, 65-516, Zielona Góra, zwrócił się do Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Gorzowie Wielkopolskim o wydanie zezwolenia na pozyskiwani, zbieranie okazów gatunków, transport, przetrzymywanie i posiadanie okazów oraz fotografowanie, filmowanie lub obserwacje mogące powodować płoszenie lub niepokojenie następujących osobników: larwy płazów z wysychających zbiorników wodnych z całego terenu województwa lubuskiego: traszka grzebieniasta Triturus cristatus - 150 osobników, traszka zwyczajna Lissotriton vulgaris - 350 osobników, traszka górska Ichthyosaura alpestris - 200 osobników, kumak nizinny Bombina bombina - 150 osobników, grzebiuszka ziemna Pelobates fuscus -300 osobników, ropucha szara Bufo bufo - 500 osobników, ropucha zielona Bufotes viridis -500 osobników, ropucha paskówka Epidalea calamita - 200 osobników, rzekotka drzewna Hyla arborea - 300 osobników, żaba jeziorkowa Pelophylax lessonae - 400 osobników, żaba wodna Pelophylax esculentus - 500 osobników, żaba śmieszka Pelophylax ridibundus - 400 osobników, żaba trawna Rana temporaria - 550 osobników, żaba moczarowa Rana arvalis -500 osobników; płazy i gady przejechane przez samochody zbierane na terenie powiatu zielonogórskiego, powiatu nowosolskiego, powiatu żarskiego, powiatu słubickiego oraz

powiatu gorzowskiego: traszka grzebieniasta Triturus cristatus - 100 osobników, traszka zwyczajna Lissotriton vulgaris - 200 osobników, traszka górska Ichthyosaura alpestris - 200 osobników, kumak nizinny Bombina bombina - 100 osobników, grzebiuszka ziemna Pelobates fuscus - 200 osobników, ropucha szara Bufo bufo - 500 osobników, ropucha zielona Bufotes viridis - 300 osobników, ropucha paskówka Epidalea calamita - 100 osobników, rzekotka drzewna Hyla arborea - 100 osobników, żaba jeziorkowa Pelophylax lessonae - 300 osobników, żaba wodna Pelophylax esculentus - 300 osobników, żaba śmieszka Pelophylax ridibundus - 300 osobników, żaba trawna Rana temporaria - 500 osobników, żaba moczarowa Rana arvalis - 200 osobników, jaszczurka zwinka Lacerta agilis - 500 osobników, jaszczurka żyworodna Zootoca vivipara - 400 osobników, padalec zwyczajny Anguis fragilis - 500 osobników, zaskroniec zwyczajny Natrix natrix - 500 osobników, gniewosz plamisty Coronella austriaca - 100 osobników, żmija zygzakowata Vipera berus -100 osobników, żółw błotny Emys orbicularis - 50 osobników w terminie od 15 marca 2021 r. do 01 października 2024 r. w celu przeprowadzenia badań naukowych realizowanych w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Zielonogórskiego, tj. pobrania larw płazów z wysychających zbiorników wodnych w celu określenia mikroplastiku u różnych gatunków żyjących w zbiornikach o różnym stopniu antropopresji w Polsce Zachodniej oraz określenia stopnia zanieczyszczenia mikroplastikiem płazów i gadów przejechanych przez samochody, ich śmiertelności na wybranych odcinkach dróg i tras migracji.

Zgodnie z zał. nr 3 do rozporządzenia Ministra Środowiska w sprawie ochrony gatunkowej zwierząt, zostały określone gatunki zwierząt objętych ochroną częściową, które mogą być pozyskiwane, oraz sposoby ich pozyskiwania. Gatunki płazów i gadów wymienione w przedmiotowym wniosku nie zostały ujęte w ww. załączniku. Natomiast zakaz fotografowania, filmowania lub obserwacji mogących powodować płoszenie lub niepokojenie dotyczy tylko osobników, które dodatkowo zostały oznaczone symbolem (3) w ww. rozporządzeniu. Gatunki wymienione we wniosku posiadają dodatkowy symbol (1) lub (2). W związku z powyższym, z uwagi na brak podstawy prawnej w zakresie przepisów ustawy o ochronie przyrody, Organ uznał postępowanie w przedmiotowym zakresie za bezprzedmiotowe i umorzył postępowanie na podstawie art. 105 § 1 Kodeksu postępowania administracyjnego.

Regionalny Dyrektor Ochrony Środowiska w Gorzowie Wielkopolskim pismem z dnia 22 marca 2021 r., znak WPN-I.6401.161.2021.JK, zawiadomił Wnioskodawcę o prawie strony do zapoznania się i wypowiedzenia, co do zebranych dowodów i materiałów przed wydaniem decyzji w przedmiotowej sprawie, w myśl art. 10 § 1 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 roku – Kodeks postępowania administracyjnego. W trakcie prowadzonego postępowania strona skorzystała z powyższego uprawnienia i dnia 30 marca 2021 r. poinformowała, że nie wnosi uwag w przedmiotowej sprawie.

Na podstawie załącznika nr 1 do rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 16 grudnia 2016 roku w sprawie ochrony gatunkowej zwierząt traszka grzebieniasta *Triturus cristatus*, kumak nizinny *Bombina bombina*, grzebiuszka ziemna *Pelobates fuscus*, ropucha zielona *Bufotes viridis*, ropucha paskówka *Epidalea calamita*, rzekotka drzewna *Hyla arborea*, żaba moczarowa *Rana arvalis*, gniewosz plamisty *Coronella austriaca* oraz żółw błotny *Emys orbicularis* objęte są ścisłą ochroną gatunkową.

Na podstawie załącznika nr 2 do rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 16 grudnia 2016 roku w sprawie ochrony gatunkowej zwierząt traszka zwyczajna *Lissotriton vulgaris*, traszka górska *Ichthyosaura alpestris*, ropucha szara *Bufo bufo*, żaba jeziorkowa *Pelophylax lessonae*, żaba wodna *Pelophylax esculentus*, żaba śmieszka *Pelophylax ridibundus*, żaba trawna *Rana temporaria*, jaszczurka zwinka *Lacerta agilis*, jaszczurka żyworodna *Zootoca vivipara*, padalec zwyczajny *Anguis fragilis*, zaskroniec zwyczajny *Natrix natrix* oraz żmija zygzakowata *Vipera berus* objęte są częściową ochroną gatunkową.

W stosunku do dziko występujących zwierząt objętych ochroną, zgodnie z art. 52 ust. 1 pkt 4 i 6 ustawy z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody obowiązuje zakaz zbierania okazów gatunków, przetrzymywania i posiadania okazów oraz transportu. Powyższe zostało uszczegółowione § 6 ust. 1 pkt 1 pkt 24 i 6 rozporządzenia Ministra Środowiska w sprawie ochrony gatunkowej zwierząt.

Na podstawie art. 56 ust. 2 pkt 1 i 2 ustawy o ochronie przyrody, regionalny dyrektor ochrony środowiska na obszarze swojego działania może zezwolić w stosunku do dziko występujących gatunków zwierząt objętych ochroną na czynności podlegające zakazom określonym w art. 52 ust. 1 w przypadku braku rozwiązań alternatywnych, jeżeli nie spowoduje to zagrożenia dla dziko występujących populacji chronionych gatunków oraz w przypadku zaistnienia jednej z przesłanek wskazanych w art. 56 ust. 4 pkt 1-7 cytowanej ustawy.

Zgodnie z informacjami przedstawionymi we wniosku, wnioskowane czynności prowadzone beda w celu przeprowadzenia badań naukowych realizowanych w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Zielonogórskiego, tj. pobrania larw płazów z wysychających zbiorników wodnych w celu określenia mikroplastiku u różnych gatunków żyjących w zbiornikach o różnym stopniu antropopresji w Polsce Zachodniej oraz określenia stopnia zanieczyszczenia mikroplastikiem płazów i gadów przejechanych przez samochody, ich śmiertelności na wybranych odcinkach dróg i tras migracji. Wnioskodawca zaznaczył, że wnioskowane czynności nie wpłyną negatywnie na stan liczebny gatunków chronionych, ponieważ pobierane będą tylko martwe osobniki. Larwy płazów zostaną zebrane pęsetą do szklanych pojemników, z wodnym roztworem alkoholu, które zostana oznaczone. Natomiast przejechane płazy i gady z dróg zostaną zebrane przy użyciu lateksowych rękawiczek. Następnie zostaną one oznaczone i zamrożone. We wniosku zaznaczono również, że niemożliwe jest zbadanie zanieczyszczenia mikroplastikiem krajowych larw płazów w naturalnym środowisku nie pobierając ich ze środowiska oraz niemożliwe jest zbadanie wiosennych migracji, śmiertelności drogowej i zanieczyszczenia mikroplastikiem płazów i gadów w naturalnym środowisku nie pobierając przejechanych osobników ze środowiska.

Organ po przeanalizowaniu zgromadzonego materiału stwierdził, że w stosunku do wnioskowanego odstępstwa nie istnieją rozwiązanie alternatywne. Mając na uwadze zakres czynności, na które wydaje się zezwolenie, stwierdzono, że czynność objęta zezwoleniem nie będzie szkodliwa dla zachowania we właściwym stanie ochrony dziko występującej populacji przedmiotowych gatunków, ponieważ zwierzęta te nie będą zabijane, tylko pobierane będą martwe osobniki. Ponadto warunki wskazane w sentencji decyzji pozwalają na zapewnienie odpowiednich wymagań w zakresie ochrony ww. gatunków podczas trwania przedmiotowych badań, umożliwiając zachowanie, we właściwym stanie ochrony ich lokalne populacje.

Mając na uwadze powyższe, co odpowiada przesłance wymienionej w art. 56 ust. 4 pkt 4 ustawy o ochronie przyrody, warunkującej wydanie wnioskowanego zezwolenia przez Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Gorzowie Wielkopolskim, Organ postanowił wydać zezwolenie w przedmiotowym zakresie.

W związku z powyższym należało orzec, jak w sentencji.

#### POUCZENIE

Od niniejszej decyzji zgodnie z art. 129 § 1 i 2 Kodeksu postępowania administracyjnego strona może odwołać się do Generalnego Dyrektora Ochrony Środowiska, za pośrednictwem Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Gorzowie Wielkopolskim w terminie 14 dni od daty doręczenia decyzji.

Jednocześnie informuję, że zgodnie z art. 127a § 1 i 2 Kodeksu postępowania administracyjnego w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do wniesienia odwołania wobec organu administracji publicznej, który wydał decyzję. Oświadczenie o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania należy wnieść do Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Gorzowie Wielkopolskim. Z dniem doręczenia organowi administracji publicznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Zgodnie z art. 130 § 4 Kodeksu postępowania administracyjnego decyzja podlega wykonaniu przed upływem terminu do wniesienia odwołania, gdy jest zgodna z żądaniem wszystkich stron.

W celu realizacji zezwolenia, Regionalny Dyrektor Ochrony Środowiska w Gorzowie Wielkopolskim dokonuje kontroli spełniania przez Wnioskodawcę warunków w nim określonych, a także cofa zezwolenie, jeżeli warunki te nie są spełnione, zgodnie z art. 56 ust. 7a oraz ust. 7j ustawy o ochronie przyrody.

Nadmieniam, że w sytuacji kiedy w trakcie przystępowania oraz realizacji prac, zostaną stwierdzone rośliny, grzyby oraz zwierzęta inne niż wymienione w przedmiotowym zezwoleniu oraz jeżeli zostałyby naruszone zakazy inne niż w przedmiotowym zezwoleniu, należy uzyskać dodatkowe zezwolenie regionalnego dyrektora ochrony środowiska na odstępstwo od zakazów, o których mowa w art. 51 ust. 1 oraz art. 52 ust. 1 ustawy o ochronie przyrody.

Przedmiotowe zezwolenie nie zwalnia ze stosowania innych przepisów, w tym przepisów określonych w ustawie z dnia 23 kwietnia 1964 roku Kodeks cywilny (Dz. U. z 2019 r., poz. 1145 ze zm.). Wobec tego przed wejściem na nieruchomość należy uzyskać stosowną zgodę osoby do tego uprawnionej (właściciela lub zarządcy).

Zgodnie z art. 2 ust. 1 pkt 1 lit. g ustawy z dnia 16 listopada 2006 r. o opłacie skarbowej (Dz. U. z 2020, poz.1546 1.j.) nie podlega opłacie skarbowej dokonanie czynności urzędowej m.in. w sprawach nauki, szkolnictwa i oświaty pozaszkolnej.

Joanna Kuternozińska Specjalista ds. ochrony przyrody

Otrzymuja: D Uniwersytet Zielonogórski, ul. prof. Z. Szafrana 1, 65-516, Zielona Góra 2. aa

Zielona Góra, 24 kw

mgr Michał Szkudlarek Katedra Zoologii Instytut Nauk Biologicznych Uniwersytet Zielonogórski ul. Prof. Z. Szafrana 1, 65-516 Zielona Góra e-mail: 20000902@stud.uz.zgora.pl

> Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Zielonogór: Przewodniczący Senatu Uniwers Zielonogórskiego

## Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji zatytułowanej "Microplastics r larvae of toads, frogs and newts in anthropopressure gradient", która ukaz czasopiśmie Ecological Indicators (rok publikacji 2023, vol. 155, numer publikacji

Mój wkład w przygotowanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncej metodologii, walidacji, zebraniu materiału do badań, przeprowadzeniu procedur be wstępnym opracowaniu danych, napisaniu manuskryptu i zarządzaniu projektem.

Swój całkowity wkład w przygotowanie publikacji oceniam na 70 procent.

mgr Michał

Zielona Góra, 26 marca 2024

dr hab Bartłomiej Najbar, prof. UZ Katedra Zoologii Instytut Nauk Biologicznych Uniwersytet Zielonogórski ul. Prof. Z. Szafrana 1, 65-516 Zielona Góra e-mail: <u>b.najbar@wnb.uz.zgora.pl</u>

> Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Zielonogórskiego Przewodniczący Senatu Uniwersytetu Zielonogórskiego

### Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji zatytułowanej "Microplastics pollution in larvae of toads, frogs and newts in anthropopressure gradient", która ukazała się w czasopiśmie Ecological Indicators (rok publikacji 2023, vol. 155, numer publikacji 110971).

Mój wkład w przygotowanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, metodologii, zebraniu materiału do badań, nadzorze, poprawieniu manuskryptu.

Swój całkowity wkład w przygotowanie publikacji oceniam na 20 procent.

Bortlanic, Niglos dr hab Bartiomiej Najbar, prof. UZ

Szczecin, 18 marca 2024

dr hab Łukasz Jankowiak, prof. US Katedra Ekologii i Antropologii Instytut Biologii Uniwersytet Szczeciński ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin e-mail: jankowiakl@gmail.com

> Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Zielonogórskiego Przewodniczący Senatu Uniwersytetu Zielonogórskiego

## Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji zatytułowanej "*Microplastics pollution in larvae of toads, frogs and newts in anthropopressure gradient*", która ukazała się w czasopiśmie *Ecological Indicators (rok publikacji 2023, vol. 155, numer publikacji 110971)*. Mój wkład w przygotowanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, metodologii, algorytmów, wizualizacji, wstępnym opracowaniu danych, analizie formalnej i napisaniu manuskryptu.

Swój całkowity wkład w przygotowanie publikacji oceniam na 10 procent.

dr hab. Łukasz Jankowiak, prof. US KIEROWNIK Kitedra Ekologiti i Antropologii Uniwersytet Szczeciński dr hab Łukasz Jankowiak, prof. US

Zielona Góra, 24 kw

mgr Michał Szkudlarek Katedra Zoologii Instytut Nauk Biologicznych Uniwersytet Zielonogórski ul. Prof. Z. Szafrana 1, 65-516 Zielona Góra e-mail: 20000902@stud.uz.zgora.pl

> Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Zielonogórs Przewodniczący Senatu Uniwersy Zielonogórskiego

# Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji zatytułowanej "Similarity of M Characteristics between Amphibian Larvae and Their Aquatic Environment", ktć się w czasopiśmie Animals (rok publikacji 2024, vol. 14(5), numer publikacji 717).

Mój wkład w przygotowanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncer metodologii, walidacji, zebraniu materiału do badań, przeprowadzeniu procedur ba wstępnym opracowaniu danych, analizie formalnej, napisaniu manuskryptu i z projektem.

Swój całkowity wkład w przygotowanie publikacji oceniam na 70 procent.

mgr Michał

Zielona Góra, 26 marca 2024

dr hab Bartłomiej Najbar, prof. UZ Katedra Zoologii Instytut Nauk Biologicznych Uniwersytet Zielonogórski ul. Prof. Z. Szafrana 1, 65-516 Zielona Góra e-mail: <u>b.najbar@wnb.uz.zgora.pl</u>

> Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Zielonogórskiego Przewodniczący Senatu Uniwersytetu Zielonogórskiego

### Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji zatytułowanej "Similarity of Microplastic Characteristics between Amphibian Larvae and Their Aquatic Environment", która ukazała się w czasopiśmie Animals (rok publikacji 2024, vol. 14(5), numer publikacji 717).

Mój wkład w przygotowanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy i metodologii, zebraniu materiału do badań, przeprowadzeniu procedur badawczych, nadzorze, zarządzaniu projektem, pozyskaniu funduszy i poprawieniu manuskryptu.

Swój całkowity wkład w przygotowanie publikacji oceniam na 20 procent.

Bornomiej Noj (~ dr hab Bartiomiej Najbar, prof. UZ

Szczecin, 18 marca 2024

dr hab Łukasz Jankowiak, prof. US Katedra Ekologii i Antropologii Instytut Biologii Uniwersytet Szczeciński ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin e-mail: jankowiakl@gmail.com

> Jego Magnificencja Rektor Uniwersytetu Zielonogórskiego Przewodniczący Senatu Uniwersytetu Zielonogórskiego

## Oświadczenie

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji zatytułowanej "Similarity of Microplastic Characteristics between Amphibian Larvae and Their Aquatic Environment", która ukazała się w czasopiśmie Animals (rok publikacji 2024, vol. 14(5), numer publikacji 717).

Mój wkład w przygotowanie tej publikacji polegał na pozyskaniu funduszy, opracowaniu koncepcji pracy, metodologii, algorytmów, wizualizacji, wstępnym opracowaniu danych, analizie formalnej i napisaniu manuskryptu.

Swój całkowity wkład w przygotowanie publikacji oceniam na 10 procent.

dr hab. Łukasz Jankowiak, prof. US KIEROWNIK dr habunkasz Jankowiak, prof. US

# 12.3. Załącznik 3. Spis rycin

Ryc. 1. Zbiornik wodny na obszarze badań zanieczyszczony różnymi rodzajami plastikowych
odpadów12
Ryc. 2. Plastikowe odpady (styropian) jako podłoże dla wzrostu roślin naczyniowych i
glonów, zaobserwowane na obszarze badań15
Ryc. 3. Przykładowe typy badanych zbiorników wodnych: A – większe kałuże, B – śródpolne
rowy melioracyjne, C – wysychające partie oczek wodnych
Ryc. 4. Teren badań. A – położenie ogólne województwa lubuskiego (zachodnia Polska), B –
lokalizacja stanowisk poboru prób. Wykorzystano OpenStreetMaps21
Ryc. 5. Miejsce poboru prób do badań z przedmieść Gorzowa Wielkopolskiego (stanowisko
S1)
Ryc. 6. Wysychający śródleśny rów stanowiący jedno z charakterystycznych miejsc poboru
próbek do badań
Ryc. 7. Wysychający fragment zbiornika wodnego, stanowiący miejsce poboru prób do badań
(stanowisko S15)
Ryc. 8. Wysychający i zarastający latem staw w Wilkanowie (stanowisko S19)
Ryc. 9. Trawienie larw płazów celem ekstrakcji mikroplastików
Ryc. 10. Korelacja Pearsona między masą ciała larw płazów, ich długością oraz otrzymaną z
tych zmiennych składową główną "rozmiar"43
Ryc. 11. Wykres kwantylowy reszt modelu liniowego z efektami mieszanymi. Oceniono
normalność reszt dopasowanych do zlogarytmowanych wartości długości46
Ryc. 12. Wykres kwantylowy reszt modelu liniowego z efektami mieszanymi. Oceniono
normalność reszt dopasowanych do wartości pola powierzchni poddanych transformacji
Boxa-Coxa
Ryc. 13. Liczba larw płazów, w których odnotowano poszczególne liczby mikroplastików. 51
Ryc. 14. Dane przedstawiające obciążenie mikroplastikiem larw płazów w stosunku do
udziału powierzchni zurbanizowanej w buforze stanowiska poboru próby
Ryc. 15. Wyniki predykcji średnich z modelu (wraz z 95% zakresami przedziałów ufności)
dotyczącego obciążenia mikroplastikiem larw płazów poszczególnych taksonów54
Ryc. 16. Dane reprezentujące wartości wskaźnika Levina w stosunku do udziału powierzchni
zurbanizowanej w buforze stanowiska poboru próby
Ryc. 17. Wyniki predykcji średnich z modelu (wraz z 95% zakresami przedziałów ufności)
dotyczącego wartości wskaźnika Levina dla poszczególnych taksonów60
Ryc. 18. Relacja między długością mikroplastików poszczególnych kształtów a rozmiarem
larwy płaza (A) i udziałem powierzchni zurbanizowanej w buforze stanowiska poboru próby
(B)
Ryc. 19. Wykres obrazujący przewidywane średnie pola powierzchni (wraz z 95%
przedziałami ufności) dla drobin MP wyekstrahowanych z larw płazów należących do
poszczególnych rodzin
Ryc. 20. Pole powierzchni mikroplastików poszczególnych kształtów w stosunku do
wielkości (rozmiaru) larwy płaza (A) oraz udziału powierzchni zurbanizowanej w buforze
stanowiska poboru próby (B)68

Ryc. 21. Kolory mikroplastików wyekstrahowanych z larw poszczególnych taksonów. A – procentowy udział kolorów, B – liczebności mikroplastików danych kolorów
Ryc. 22. Kolory mikroplastików poszczególnych kształtów. Przedstawiono procentowe
udziały poszczególnych kolorów (A) oraz ilości mikroplastików poszczególnych kolorów (B).
Ryc. 23. Procentowy udział wykryć (A) i liczba detekcji (B) poszczególnych syntetycznych
polimerów wśród mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów
Ryc. 24. Procentowy udział wykryć (A) i liczba detekcji (B) substancji innych niż
syntetyczne polimery wśród analizowanych próbek z larw płazów
Ryc. 25. Kolorystyka mikroplastików wyekstrahowanych z wód, a reprezentujących różne
kształty: A – udział procentowy poszczególnych kolorów, B – liczba MP poszczególnych
kolorów74
Ryc. 26. Kolorystyka mikroplastików wyekstrahowanych z osadów dennych, a
reprezentujących różne kształty: A – procentowy udział poszczególnych kolorów, B – liczba
MP poszczególnych kolorów74
Ryc. 27. Procentowy udział wykryć (A) i liczba detekcji (B) poszczególnych syntetycznych
polimerów wśród mikroplastików wyizolowanych z osadów dennych i wód

# 12.4. Załącznik 4. Spis tabel

Tabela 1. Taksony larw płazów pobrane do badań, liczba larw oraz stanowisk poboru prób. 32
Tabela 2. Koordynaty położenia geograficznego miejsc poboru prób oraz udział powierzchni
zurbanizowanej i rolnej w obrębie bufora o promieniu 1 km (zob. podr. 6.4.). Podano ponadto
taksony i liczby larw zebrane na poszczególnych stanowiskach
Tabela 3. Średnia długość całkowita ( $\pm$ SD), średnia masa ciała ( $\pm$ SD) i zakresy stadiów
Gosnera larw poszczególnych taksonów
Tabela 4. Liczba mikroplastików wyekstrahowanych z larw płazów poszczególnych
taksonów. Podano wartość minimalna (Min.), maksymalna (Maks.) oraz średnia arytmetyczna
(Śr.)
Tabela 5. Szacunek parametrów modelu dotyczącego stopnia obciążenia mikroplastikiem
larw płazów
Tabela 6. Drobiny mikroplastiku poszczególnych kształtów w różnych taksonach
Tabela 7. Drobiny mikroplastiku poszczególnych kształtów, które wyizolowano z larw
płazów pobranych na różnych stanowiskach
Tabela 8. Przewitywane wartości wskaźnika Levina (Res) dla różnych taksonów60
Tabela 9. Szacunek parametrów modelu dotyczącego wartości wskaźnika Levina
Tabela 10. Wyniki testowania zmiennych modelu, który dotyczy długości drobin
mikroplastiku
Tabela 11. Przewidywane długości mikroplastików (μm) dla ich różnych kształtów oraz
porównania między nimi z zastosowaniem testów post-hoc Tukeya
Tabela 12. Wyniki testowania zmiennych modelu z interakcjami, który dotyczy długości
drobin mikroplastiku
Tabela 13. Wyniki testowania zmiennych modelu, który dotyczy wielkości pola powierzchni
mikroplastików
Tabela 14. Przewidywane pola powierzchni (μm <sup>2</sup> ) drobin mikroplastiku dla ich różnych
kształtów oraz porównania między nimi z zastosowaniem testów post-hoc Tukeya
Tabela 15. Przewidywane pola powierzchni mikroplastików (µm <sup>2</sup> ) dla drobin
wyekstrahowanych z poszczególnych rodzin oraz porównania między nimi z zastosowaniem
testów post-hoc Tukeya
Tabela 16. Wyniki testowania zmiennych modelu z interakcjami, który dotyczy wielkości
pola powierzchni drobin mikroplastiku67
Tabela 17. Liczebność i procentowy udział poszczególnych kolorów wśród mikroplastików
wyizolowanych z danych taksonów
Tabela 18. Procentowy udział różnych kształtów mikroplastików wśród drobin
wyizolowanych z wód i osadów dennych73
Tabela 19. Procentowy udział poszczególnych kolorów mikroplastików wśród drobin
wyekstrahowanych z wód i osadów dennych75
Tabela 20. Procentowy udział wykryć poszczególnych syntetycznych polimerów wśród
mikroplastików wyizolowanych z wód i osadów dennych77
Tabela 21. Wyniki testów zgodności chi-kwadrat porównujących liczbę zaobserwowanych
dopasowań i dopasowań kontrolnych w dwóch różnych zestawieniach