

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Patrycja Mermer

Analiza wpływu diety z polipropylenem na strukturę komórek wybranych narządów
larw *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Pyralidae) ze szczególnym
uwzględnieniem procesów śmierci komórkowej

PRACA DOKTORSKA

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:

prof. dr hab. Magdalena Rost-Roszkowska

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Wydział Nauk Przyrodniczych

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Katowice, 2026

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania

Pani Promotor prof. dr hab. Magdalenie Rost-Roszkowskiej

za cenne wskazówki, wsparcie merytoryczne, cierpliwość okazywaną na każdym etapie przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej oraz motywację do dalszej pracy badawczej.

Członkom Zespołu Histologii i Embriologii Zwierząt

za życzliwość, pomoc oraz stworzenie przyjaznej atmosfery sprzyjającej realizacji pracy doktorskiej.

Z całego serca dziękuję

Mojemu mężowi

za nieustające wsparcie, cierpliwość, wyrozumiałość oraz wiarę we mnie, która była dla mnie ogromną siłą podczas przygotowywania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Rodzicom

za poświęcenie włożone w moje wykształcenie, a także za nieustającą wiarę we mnie na każdym etapie mojej drogi naukowej.

SPIS TREŚCI

1. Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej	1
2. Streszczenie	2
3. Summary	4
4. Autoreferat	6
4.1 Wprowadzenie	6
4.1.1 Tworzywa sztuczne - wszechobecność i zagrożenia.....	6
4.1.2 Cytotoksyczność	13
4.1.3 <i>Galleria mellonella</i> - charakterystyka gatunku	16
5. Cele badań i hipotezy badawcze	20
6. Materiał badawczy i metodologia	22
6.1 Materiał badawczy	22
6.1.1 Warunki hodowli.....	22
6.1.2 Eksperyment	23
6.2 Metodyka pracy badawczej	25
6.2.1 Mikroskopia świetlna i transmisyjna mikroskopia elektronowa	25
6.2.2 Analiza jakościowa – mikroskopia konfokalna	26
6.2.2.1 Dihydroetydyna (DHE) – barwienie komórek ROS-dodatnich.....	26
6.2.2.2 LysoTracker Red (LTR) – znakowanie organelli i struktur komórkowych silnie kwaśnych.....	26
6.2.2.3 BODIPY – znakowanie materiałów lipidowych.....	27
6.2.2.4 TUNEL assay – detekcja apoptozy	27
6.2.2.5 Barwienie lizosomów CellLight-GFP	27
6.2.2.6 Barwienie JC-1	28
6.2.2.7 Barwienie ThiolTracker Violet	28
6.2.3 Analiza ilościowa – cytometria przepływowa	28

6.2.3.1	Muse Oxidative Stress Kit	29
6.2.3.2	Muse Count & Viability Kit.....	29
6.2.3.3	Aneksyna V	29
6.2.3.4	Muse Multi-Color DNA Damage Kit	30
6.2.3.5	Muse MultiCaspase Kit	30
6.2.3.6	Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit.....	30
6.2.3.7	Zestaw Muse Cell Cycle Kit.....	30
6.2.3.8	Stosunek ADP/ATP i zawartość ATP	31
6.2.3.9	Analiza statystyczna.....	31
7.	Wyniki i dyskusja.....	33
8.	Wnioski.....	49
9.	Literatura.....	51
10.	Prace naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej	67
11.	Oświadczenia autorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej....	129
12.	Dodatkowe osiągnięcia naukowe.....	150

1. Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej

Rost-Roszkowska, M., **Mermer, P.**, Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., Wrońska, A., Karnówka, O. (2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *The European Zoological Journal* 91(1), 213–234. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>

IF: 1,4 MNiSW: 140pkt

Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. Student, S., Wrońska, A.K., Homa, J., Krpec, K., Magiera, K., Siwek, D., Rost-Roszkowska, M. (2026). Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Scientific Reports* 16, 3840. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>

IF: 3,9 MNiSW: 140pkt

Mermer, P., Martyna, F., & Ostróżka, A. (2025). The use of insects, some land and marine invertebrates, in the biodegradation of plastic. *The European Zoological Journal* 92(1), 1442–1458. <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2580744>

IF: 1,6 MNiSW: 140pkt

Łączna suma IF= 6,9

Łącznie punktów MNiSW= 420

2. Streszczenie

Tworzywa sztuczne zbudowane są z polimerów, otrzymywanych w wyniku polimeryzacji monomerów. Wysoka trwałość, opłacalność oraz wszechstronność wykorzystania sprawiły, że tworzywa polimerowe stały się nieodłącznym elementem życia człowieka. Jednocześnie stale rosnąca produkcja odpadów z tworzyw sztucznych jest obecnie jednym z najpoważniejszych zagrożeń ekologicznych, wpływających także na zdrowie i życie zwierząt oraz człowieka. Gatunek *Galleria mellonella* jest często wykorzystywanym organizmem badawczym w pracach naukowych. Dane literaturowe donoszą również o zdolności tego gatunku do biodegradacji tworzyw sztucznych, w tym polipropylenu (PP). Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu diety opartej na PP na ultrastrukturę oraz aktywację wybranych parametrów cytotoksyczności w wybranych narządach larw *G. mellonella*. Analizie poddano jelito środkowe, ciało tłuszczowe i gruczoł przedny. Do badań wybrano larwy w ostatnim (VII) stadium rozwojowym. Porównywano poszczególne parametry u osobników kontrolnych (karmionych standardową pożywką), osobników głodzonych oraz karmionych PP przez 24 h i 48 h. Przyjęto kompleksową strategię badawczą łączącą analizy jakościowe z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) i mikroskopii konfokalnej, a także analizy ilościowe oparte na cytometrii przepływowej, luminometrii i analizach statystycznych. Przy zastosowaniu techniki mikroskopii TEM wykazano różnice w liczbie struktur autofagicznych w badanych narządach osobników karmionych PP w porównaniu z grupami kontrolnymi. Analiza przeprowadzona metodą mikroskopii konfokalnej ujawniła ponadto zróżnicowanie intensywności sygnałów emitowanych przez kwaśne organelle i komórki ROS+, a także zmiany potencjału błon mitochondrialnych i poziomu wytwarzania przeciwutleniaczy między grupami badawczymi a kontrolnymi. W toku analiz ilościowych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej ujawniono istotne różnice w odsetku komórek żywych, na poziomie uszkodzeń DNA, liczebności populacji komórek ROS+, ekspresji białka Bcl-2, a także zmian w obrębie cyklu komórkowego. Ponadto analizy ilościowe z wykorzystaniem luminometrii pozwoliły zobrazować stosunek ADP/ATP oraz poziom ATP w narządach analizowanych grup. Wykazany wzrost uszkodzeń komórkowych w badanych organach po spożyciu PP był kompensowany przez szereg procesów, takich jak nasilenie autofagii, wzrost wakuolizacji komórkowej czy aktywacja przeciwutleniaczy i świadczy o zdolnościach naprawczych narządów larw *G. mellonella*. Skorelowanie tych wyników z

wysoką przeżywalnością badanych osobników może być dowodem na potencjalne wykorzystanie tego gatunku na szerszą skalę. Niniejsze badania uzupełniają dotychczasowy brak danych dotyczących wpływu tworzyw sztucznych na poziomie komórkowym i ultrastrukturalnym u *G. mellonella* i stanowią istotny wkład w badania nad możliwością wykorzystania tego gatunku w procesach biodegradacji polipropylenu.

3. Summary

Plastic materials are composed of polymers obtained through the polymerization of monomers. Their high durability, cost-effectiveness, and versatility have made polymeric materials indispensable to human life. At the same time, the continuously increasing production of plastic waste has become one of the most serious environmental threats, also affecting the health and life of animals and humans. The species *Galleria mellonella* is frequently used as a model organism in scientific research. Literature data also indicate the ability of this species to biodegrade plastics, including polypropylene (PP). The aim of this doctoral dissertation was to investigate the effects of a polypropylene-based diet on the ultrastructure and activation of selected cytotoxicity parameters in chosen organs of *G. mellonella* larvae. The analyses focused on the midgut, fat body, and silk gland. Larvae in the final (VII) developmental stage were selected for the study. Individual parameters were compared among control specimens (fed a standard diet), starved specimens, and specimens fed PP for 24 h and 48 h. A comprehensive research strategy was adopted, combining qualitative analyses using transmission electron microscopy (TEM) and confocal microscopy with quantitative analyses based on flow cytometry, luminometry, and statistical methods. TEM analyses revealed differences in the number of autophagic structures in the examined organs of PP-fed individuals compared with the control groups. Confocal microscopy also demonstrated differences in signal intensity from acidic organelles and ROS⁺ cells, as well as changes in mitochondrial membrane potential and antioxidant production levels between the experimental and control groups. Quantitative analyses using flow cytometry revealed significant differences in the percentage of viable cells, the level of DNA damage, the abundance of ROS⁺ cell populations, Bcl-2 protein expression, and alterations in the cell cycle. Furthermore, luminometric analyses enabled visualization of the ADP/ATP ratio and ATP levels in organs from the analyzed groups. The observed increase in cellular damage in the examined organs following PP ingestion was compensated for by a range of processes, such as intensified autophagy, increased cellular vacuolization, and activation of antioxidant mechanisms, demonstrating the regenerative capabilities of *G. mellonella* larval organs. Correlating these findings with the high survival rate of the studied individuals may indicate the potential for broader application of this species.

These studies fill the existing gap in data concerning the cellular and ultrastructural effects of plastics in *G. mellonella* and constitute a significant contribution to research on the potential use of this species in polypropylene biodegradation processes.

4. Autoreferat

4.1 Wprowadzenie

4.1.1 Tworzywa sztuczne - wszechobecność i zagrożenia

Jednym z najpoważniejszych zagrożeń ekologicznych wynikających z działalności człowieka jest produkcja ton plastiku (Khan i in., 2024). Produkcja tworzyw sztucznych jest ściśle związana z petrochemią i surowcami kopalnymi (Nielsen i in., 2020). Tworzywa sztuczne to materiały, które wykonane są z różnych syntetycznych i półsyntetycznych związków organicznych. Można je formować w ciała stałe o dowolnych kształtach i rozmiarach (Barría i in., 2020). Podstawowym składnikiem tworzyw sztucznych są polimery, które otrzymywane są w reakcji polimeryzacji monomerów, czyli związków posiadających co najmniej dwie grupy funkcyjne (Stachurek, 2012). Od lat 50. XX w. niemal w każdej dziedzinie życia człowiek wykorzystuje tworzywa polimerowe, wynalezione w XIX w. przez Aleksandra Parksa (Samsonowska i Kaszuba, 2022). Szeroki zakres wykorzystania tworzyw sztucznych doprowadził do poważnej ekotoksyczności i zaburzeń równowagi środowiskowej (Naz i in., 2024). Powszechne stosowanie tworzyw sztucznych powodowane jest ich opłacalną produkcją, wysoką trwałością oraz wszechstronną użytecznością (Barría i in., 2020). Ponadto tworzywa sztuczne są wykorzystywane na dużą skalę z uwagi na m.in. ich wszechobecność, lekkość, trwałość, a także zdolność adaptacji (Nielsen i in., 2020). Światowa produkcja tworzyw sztucznych wzrosła prawie dwukrotnie w porównaniu z dwiema dekadami temu (Sarkar i in., 2023). Obecnie Chiny są największym producentem tworzyw sztucznych na świecie – kraj ten odpowiada za 24% światowej produkcji. W 2010 roku w Europie produkcja tworzyw sztucznych wynosiła 57 mln ton, co stanowiło 22% produkcji na całym świecie (Stachurek, 2012). Ta masowa produkcja sprawiła, iż mimo recyklingu (np. 8,4 mln ton w Europie w 2016 r.), znacznie większa część tworzyw sztucznych trafia na wysypiska śmieci (16,7 mln ton) (Welden, 2020). Za największy problem uważa się opakowania jednorazowe m.in. butelki wykonane z poli (tereftalanu etylenu) (PET), torebki śniadaniowe, czy folie do pakowania przedmiotów i żywności wykonane z polietylenu (PE) lub polipropylenu (PP) (Stachurek, 2012). Ponadto w krajach rozwiniętych większość metod recyklingu tworzyw sztucznych obejmuje recykling chemiczny bądź spalanie. Jednak metody te nie przyczyniają się do zmniejszenia ryzyka zanieczyszczenia mikroplastikiem, wręcz mogą powodować

powstawanie bardziej toksycznych substancji z końcowych produktów spalania tworzyw sztucznych (Sarkar i in., 2023). Podczas spalania tworzyw sztucznych może dojść do powstania związków takich jak: lotne związki organiczne (LZO), polichlorowany bifenyl (PCB), metale ciężkie, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) i inne emisje gazowe do środowiska, które mogą potencjalnie powodować poważne problemy zdrowotne organizmu ludzkiego (Yusuf i in., 2022). Wyróżniamy 7 grup najczęściej wykorzystywanych tworzyw sztucznych: poliuretan (PUR), polietylen (PE), poliamid (PA), politereftalan etylenu (PET), polistyren (PS), polichlorek winylu (PVC) oraz polipropylen (PP) (Mermer i in., 2026).

Na skutek takich procesów jak ścieranie mechaniczne bądź biodegradacja, tworzywa sztuczne mogą fragmentować się na mniejsze cząstki, zwane mikroplastikami (MP) oraz nanoplastikami (NP) (Alimi i in., 2018; Oliveira i in., 2019). MP i NP klasyfikuje się ze względu na ich wielkość: NP mierzą mniej niż 1000 nm, a MP mniej niż 5 mm (Frias i Nash, 2019). Za najbardziej niebezpieczne uważane są NP (Browne i in., 2013). Mikro/nanoplastiki (MNP) dzieli się na pierwotne i wtórne (Naz i in., 2024). MP pierwotne to proszki i mikrogranulaty polimerowe, które obecne są m.in. w kosmetykach czy chemii gospodarczej. Ich dodanie ma poprawić właściwości fizykochemiczne. Mogą być także wykorzystywane jako wektory zapachowe, wektory środków nawilżających czy innych środków aktywnych (Samsonowska i Kaszuba, 2022). MP wtórne powstają na skutek degradacji czy fragmentacji tworzyw polimerowych (Samsonowska i Kaszuba, 2022).

Mikroplastiki wykryto w glebie, wodzie oraz powietrzu i wykazano, że mają negatywny wpływ na środowisko (Sarkar i in., 2023). MP wykryto ponadto w owocach morza (rybach i skorupiakach), warzywach, drobiu, zwierzętach lądowych, ssakach oraz w organizmie człowieka (Bansal, 2026). Mikro- i nanotworzywa sztuczne powodują znaczne zanieczyszczenia zbiorników wodnych, w tym także wody pitnej (Brancaleone i in., 2024; Naz i in., 2024). Szacuje się, że mikroplastik wtórny stanowi 70-80% mikroplastiku znajdującego się w morzach i oceanach (Samsonowska i Kaszuba, 2022). Tworzywa sztuczne na dużą skalę zanieczyszczają grunty, rzeki i oceany (Thompson i in., 2009). MP i NP mogą przedostawać się do środowiska bezpośrednio ze ściekami przemysłowymi lub zrzutami z gospodarstw domowych, w tym także z produktami czyszczącymi, kosmetykami czy włóknami syntetycznymi (Oliveira i in., 2013; Frias i Nash, 2019; Oliveira i in., 2019; Barria i in., 2020). Zanieczyszczenie gleby cząstkami

jest powodowane najczęściej zastosowaniem osadów ściekowych i kompostu z bioodpadów, ściółkowaniem tworzyw sztucznych, czy osadzaniem się w atmosferze. Obecność MP w glebie szkodzi materii organicznej gleby oraz wpływa na aktywność drobnoustrojów i bakterii (Bansal, 2026). Zwierzęta wodne mogą spożywać mikroplastik ze względu na jego wielkość oraz podobieństwo do zooplanktonu (Fernández i in., 2020). MP hamują zdolność zatrzymywania wody w glebie oraz zmniejszają dostępność składników odżywczych m.in. azotu (N), czy fosforu (P) (Bansal, 2026). Połknięte przez zwierzęta tworzywa sztuczne mogą przenosić do ich organizmów zanieczyszczenia i dodatki chemiczne, przez co zwiększają ich bioakumulację i bioamplifikację (Hammer i in., 2012). Zakażenie człowieka przez MP następuje poprzez spożycie skażonej żywności lub wody, wdychanie powietrza zawierającego mikroplastiki, a także wchłanianie przez skórę skażonej wody, kosmetyków czy innych produktów higieny osobistej (Bansal, 2026). Badania prowadzone w Niemczech przez Instytut Roberta Kocha wykryły mikroplastiki w przypadku 97% próbek krwi i moczu u dzieci w wieku od 3 do 17 lat (Samsonowska i Kaszuba, 2022). Kolejne badania wykonane z inicjatywy WWF przez Uniwersytet w Newcastle w Australii udokumentowały, że do organizmu ludzkiego co tydzień trafia do 5 g mikroplastiku (Samsonowska i Kaszuba, 2022). Badania z zakresu ekotoksykologii wykazały, że spożywanie mikroplastiku może być dramatyczne w skutkach i powodować m.in. uszkodzenie narządów, tkanek, komórek, organelli komórkowych i błon komórkowych (Anguissola i in., 2014; Chae i in., 2018; Pitt i in., 2018; Khan i in., 2024). Tworzywa sztuczne mogą doprowadzać również do problemów z reprodukcją i do ogólnego osłabienia, a także do śmierci organizmów (Khan i in., 2024). Wykazano ponadto, że u ludzi MP mogą powodować uszkodzanie narządów, zaburzenie gospodarki hormonalnej oraz mogą przenosić toksyczne substancje chemiczne (Ansari i in., 2025). Tworzywa sztuczne powodują także skutki epigenetyczne, doprowadzając do nieprawidłowej segregacji chromosomów czy uszkodzeń DNA. Wpływają ponadto na stres oksydacyjny i zmiany w ekspresji genów (Tang, 2025).

Naturalna degradacja tworzyw sztucznych jest procesem długotrwałym (Brebu, 2020). Może zajmować nawet do 1000 lat (Welden, 2020). Środowiskowa degradacja tworzyw polimerowych może zachodzić w wyniku kilku procesów: fizycznych, chemicznych i biologicznych. Może zachodzić także przez ich kombinację. Degradacja ta zachodzi pod wpływem czynników, takich jak temperatura, powietrze,

wilgotność, mikroorganizmy, światło, promieniowanie wysokoenergetyczne, czynniki chemiczne bądź naprężenia mechaniczne. Degradacja prowadzi do nieodwracalnych zmian (Brebu, 2020). Większość polimerów syntetycznych znajdujących się w tworzywach sztucznych nie ulega rozkładowi pod wpływem czynników środowiskowych takich jak woda, powietrze, światło słoneczne bądź pod wpływem działalności drobnoustrojów (Stachurek, 2012). Na wszystkie materiały polimerowe w różnym stopniu wpływają wyżej wymienione czynniki, lecz szybkość zachodzących procesów odróżnia materiały ulegające degradacji środowiskowej od materiałów niedegradowalnych (Brebu, 2020). Coraz większe ilości odpadów polimerowych znajdujących się w środowisku sprawiły, że część mikroorganizmów zaczęła wykorzystywać je jako źródło energii i węgla (Szczyrba i in., 2022). Określeniem „polimery biodegradowalne” nazywamy polimery ulegające degradacji biotycznej, czyli wywołanej działaniem czynników biologicznych, a więc organizmów żywych oraz mikroorganizmów i ich enzymów. Działanie mikroorganizmów prowadzi do rozkładu złożonych związków organicznych przy użyciu enzymów do prostych cząsteczek. W biodegradacji całkowitej końcowymi produktami są związki nieorganiczne (Stachurek, 2012). W warunkach tlenowych następuje intensywna produkcja biomasy, CO₂ i H₂O przez mikroorganizmy. Natomiast w warunkach beztlenowych przede wszystkim dochodzi do niszczenia plastiku przez mikroorganizmy, a produkcja biomasy, CO₂, H₂O i CH₄ schodzi na dalszy plan (Shah i in., 2008). W celu ułatwienia mikroorganizmom rozkładu polimerów często wymagana jest obróbka wstępna. Celem obróbki jest zmniejszenie łańcucha polimerów i modyfikacje polegające na zmniejszeniu hydrofobowości, co umożliwia tworzenie biofilmu lub wprowadzenie grup karbonylowych, bądź hydroksylowych, a te są podatne na działanie enzymów mikroorganizmów (Szczyrba i in., 2022). W pierwszym etapie biodegradacji następuje osadzenie mikroorganizmów na powierzchni polimeru. Biodegradacja jest możliwa dzięki enzymom wydzielanym przez mikroorganizmy, które prowadzą do fragmentacji głównego łańcucha polimerów na mniejsze jednostki (Szczyrba i in., 2022). Mikrobiologiczna biodegradacja wymaga utworzenia na powierzchni polimeru specyficznego biofilmu. Kolonizacja powierzchni polimeru wpływa na jej właściwości i może umożliwić rozwój biofilmu. W kolejnym etapie dochodzi do fragmentacji tworzyw sztucznych, na mniejsze cząstki, które mogą być asymilowane przez mikroorganizmy, a to doprowadza do rozwoju biomasy (Szczyrba i in., 2022). Ta bioasymilacja polimerów, polegająca na przyswajaniu przez środowisko produktu degradacji polimeru jest bardzo

istotna w ochronie środowiska (Szostak-Kotowa, 1997; Szlezyngier, 2000; Foltynowicz i Jakubiak, 2002; Stachurek, 2012). Szybkość biodegradacji zależy od kilku właściwości środowiskowych, tj. pH, temperatury czy wilgotności, a także od właściwości samych polimerów, m.in. ciężaru cząsteczkowego, zawartości fazy krystalicznej oraz amorficznej, stopnia rozwinięcia powierzchni właściwej, czy stopnia porowatości (Stachurek, 2012). Z uwagi na problem ze składowaniem odpadów i zanieczyszczaniem środowiska, zdolność do biodegradacji jest pożądaną cechą wśród tworzyw polimerowych (Stachurek, 2012). Do oceny postępu biodegradacji w warunkach laboratoryjnych stosuje się kilka technik pomiarowych, takich jak: pomiar masy utraconej przez polimer, pomiar hydrofobowości tworzywa, metody obrazowe, m.in. mikroskopia skaningowa (SEM) do oceny powierzchni polimeru, a także oznaczanie składu chemicznego tworzywa przy użyciu spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (Szczyrba i in., 2022).

Z uwagi na negatywny wpływ tworzyw sztucznych na środowisko oraz potencjalną zdolność organizmów do ich biodegradacji, naukowcy odkryli szereg gatunków, które mają zdolność do naturalnego przetwarzania tworzyw polimerowych. Wykazano, że *Penicillium simplicissimum* YK zdolny jest do biodegradacji polietylenu (Yamada-Onodera i in., 2001). Niektóre gatunki owadów, szczególnie w stadium larwalnym, mogą także odgrywać rolę w biodegradacji (Mallar, 2020; Bilal i in., 2021). Jest to możliwe dzięki mikrobiocie panującej w jelitach owadów, która jest zdolna do tworzenia biofilmu na cząsteczkach polimerów oraz wytwarzania enzymów, które prowadzą do fragmentacji polimerów na związki mniej toksyczne (Mallar, 2020). Dwa szczepy bakterii, *Enterobacter asburiae* YT1 i *Bacillus* sp. YP1, wyizolowane z jelit larw mącznika indyjskiego *Plodia interpunctella*, są zdolne do degradacji polietylenu (PE) (Yang i in., 2014). Obecnie najlepiej scharakteryzowanym mikrobiomem jelitowym owadów zdolnych do rozkładu tworzyw sztucznych jest mikrobiom *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) (Yang i in., 2015; Yang i in., 2015). Osobniki tego gatunku były w stanie przetrwać, spożywając tylko polistyren (PS). W ich jelitach dochodziło do rozkładu długołańcuchowych cząsteczek PS (Yang i in., 2015). Większość PS została przekształcona w CO₂ (47,7%). Wykazano także, że mikrobiom jelitowy jest niezbędny do degradacji PS, gdyż *T. molitor* poddane antybiotykoterapii utraciły zdolności depolimeryzacji (Yang i in., 2015). Ponadto udowodniono, że larwy tego gatunku mogą żywić się PS i PE (Bulak i in., 2021). Wykazano, że jest to możliwe, z uwagi na obecność

w jelitach bakterii z rodziny Enterobacteriaceae (Peng i in., 2019) i *Exiguobacterium* sp. szczep YT2 w ich mikroflorze jelitowej (Bulak i in., 2021; Mitra i Das, 2023). Degradacja PVC jest możliwa dzięki bakteriom z rodzin Streptococcaceae, Spiroplasmataceae, Enterobacteriaceae i Clostridiaceae (Peng i in., 2020). PP jest degenerowany w wyniku obecności *Kluyvera* sp. (Yang i in., 2021). Kolejnym przykładem organizmu, który może przetrwać, spożywając PS jako jedyne źródło pożywienia, jest *Zophobas morio* z rzędu Coleoptera i rodziny Tenebrionidae (Miao i Zhang, 2010; Yang i in., 2020). Zdolność tego gatunku do degradacji PS została zahamowana przez supresję antybiotykową mikroflory jelitowej, co potwierdza znaczenie mikrobioty w procesach biodegeneracji (Yang i in., 2020). PS ulega degradacji za pomocą *Pseudomonas aeruginosa* (Kuan i in., 2022), *Enterobacter* sp. i *Hafnia* sp. (Hafniaceae) (Burgos i in., 2024) oraz *Leminorella* (szczep P2) (Hosseini i in., 2024). Degradacja PE jest możliwa dzięki *Pseudomonas aeruginosa* (Kuan i in., 2022) i *Citrobacter* (szczep P5) (Hosseini i in., 2024). PP jest degradowany przez *Citrobacter* sp. i *Enterobacter* sp. (Yang i in., 2021), a także przez *Bacillus* (szczep P6) (Hosseini i in., 2024). Larwy *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) zjadały piankę polistyrenową (PS), a badanie mikrobiomu wykazało związek *Acinetobacter* sp. ze spożyciem PS (Wang i in., 2020). Kolejny gatunek, nad którym prowadzono badania związane z biodegradacją plastików to *Achroia grisella*. Wstępne badania wykazały, że larwy *A. grisella* mają zdolność do degradacji polietylenu o dużej gęstości (HDPE) oraz do zakończenia cyklu życiowego po karmieniu HDPE (Kundungal i in., 2019). Ponadto udokumentowano przypadki, w których larwy tego gatunku wykorzystują jako substancje odżywcze materiał wykonany z PE (Mallar, 2020). Na tę chwilę niestety nie ma opublikowanych badań, które jednoznacznie wskazałyby szczep bakterii odpowiedzialny za ten proces (Ali i in., 2023). Badania dotyczące potencjalnej roli mikroorganizmów jelitowych larw *Corcyra cephalonica* w biodegradacji polietylenu o małej gęstości (LDPE) polegały na karmieniu larw roztworem antybiotyku, a następnie larwy umieszczano w kontakcie z foliami LDPE. Jako grupę kontrolną traktowano larwy, które nie były karmione roztworem antybiotyku. Larwy karmione antybiotykiem strawiły 21%, natomiast larwy, które nie były karmione antybiotykiem, wykazywały 25% utratę masy folii LDPE. Wynik ten świadczy, że mikroorganizmy jelitowe nie są jedynymi, które biorą udział w biodegradacji LDPE, a równie ważną rolę mogą stanowić enzymy trawienne (Kesti i Thimmappa, 2019). Z uwagi na zanieczyszczenia środowiska, ślimak *Achatina fulica* wchłania pokarm zawierający tworzywa sztuczne podczas poruszania się po

powierzchni gleby lub roślin. Badania wykazały, że *A. fulica* ma zdolność depolimeryzacji i biodegradacji polistyrenu. Po spożyciu PS wzrosła liczba mikroorganizmów z rodzin Enterobacteriaceae, Sphingobacteriaceae i Aeromonadaceae. Wyniki te świadczą o powiązaniu mikroorganizmów jelitowych z biodegradacją PS (Song i in., 2020). Opisano także zdolność kilku gatunków skąposzczetów do spożywania i degradacji tworzyw sztucznych. *Eisenia fetida* jest zdolna do biodegradacji PE (Allakuliyeva i in., 2024), a także HDPE poprzez tworzenie związków karbonylowych i alkenów, chemicznych wskaźników rozpadu łańcucha polimeru (Santana i in., 2023). Dżdżownice mogą rozkładać LDPE, z uwagi na obecność takiej mikroflory jak *Bacillus gaemokensis* szczep SSR01 i *B. gaemokensis* i szczep SSR01 (Ragu Prasath i in., 2024). Niektóre gatunki bezkręgowców morskich także mają zdolność do rozkładu tworzyw sztucznych. Gatunek *Perinereis vancaurica* z uwagi na swój mikrobiom zawierający bakterie *Acinetobacter johnsonii*, *Brevibacterium casei* i *Ruegeria arenilitoris*, ma zdolność do trawienia PS. Zdolności do trawienia PE mają dodatkowo takie gatunki jak: *Strongylocentrotus nudus*, *Patiria pectinifera*, *Mizuhopecten yessoensis* które rozkładają tworzywa sztuczne dzięki obecności enzymów trawiennych (Istomina i in., 2024). Larwy barciaka większego, *Galleria mellonella* także mogą biodegradować tworzywa sztuczne. Wykazano zdolność larw do trawienia PE i PS, przy czym dieta oparta na tych polimerach kształtowała ich mikrobiom, a bakterie *Bacillus*, *Serratia* były istotnie związane z dietą PE i PS (Lou i in., 2020). Zdolność larw *G. mellonella* do biodegradacji PE została potwierdzona również w badaniu Bombelli i in. (2017). Zdolność do biodegradacji PE jest realizowana dzięki mikrobiocie jelitowej, głównie *Enterobacter* sp. szczep D1 (Zhang i in., 2020). Ponadto wykazano, że larwy *G. mellonella* są także zdolne do biodegradacji PP, przede wszystkim dzięki obecności *Bacillus cereus* (Nyamjav i in., 2023).

Temat dotyczący wpływu mikroplastiku (PP) na ultrastrukturę organów i procesy śmierci komórkowej jest niezwykle aktualny i wpisuje się w nurt współczesnej toksykologii środowiskowej, z uwagi na wszechobecność plastików, mikroplastików, czy nanoplastików w łańcuchu pokarmowym zwierząt. Jak dotąd niewiele prac badawczych ukazywało jednak zmiany na poziomie ultrastrukturalnym, czy zmiany parametrów cytotoksyczności po spożywaniu tworzyw sztucznych, co stanowi lukę badawczą, którą wypełniają niniejsze badania.

4.1.2 Cytotoksyczność

Cytotoksycznością komórkową określa się zdolność pewnych substancji do niszczenia lub uszkodzania żywych komórek (Çelik, 2018). Pojęcie cytotoksyczności odnosi się do szeregu zmian zachodzących w komórkach i tkankach, pod wpływem różnych stresorów (Mermer i in., 2026). Proces ten ma zdolność do tworzenia uszkodzeń w komórkach docelowych, co prowadzi do zaburzeń metabolizmu, a nawet śmierci (Abbas i in., 2014). W odpowiedzi na działanie poszczególnych ksenobiotyków mechanizmem pośredniczącym w indukowaniu cytotoksyczności jest np. powstanie stresu oksydacyjnego, spowodowane nadmiernym tworzeniem reaktywnych form tlenu (ROS) w organizmach żywych (Sies i in., 2017). Gdy poziom ROS przekracza potencjał oksydacyjny komórek, dochodzi do zjawiska zwanego stresem oksydacyjnym. Stres oksydacyjny może doprowadzać do uszkodzeń składników komórkowych, a nawet do aktywacji śmierci komórkowej, zarówno nekrozy, jak i programowej śmierci komórkowej, czyli apoptozy (PCD). Poziom ROS wzrasta podczas stresu oksydacyjnego, przy obecności mikroorganizmów patogennych, czy podczas działania związków toksycznych (Dmitrieva i in., 2024). Podwyższone poziomy ROS przyczyniają się do oksydacyjnych, nieodwracalnych uszkodzeń DNA, białek czy lipidów błonowych (Sies i in., 2017; Jomova i in., 2023). Dlatego ważne jest, aby aktywować mechanizmy równoważące negatywne skutki ROS, a tym samym utrzymać homeostazę organizmu (Mermer i in., 2026).

Cytotoksyczność przejawia się w indukowaniu poszczególnych szlaków śmierci komórkowej, z których wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje: apoptozę i nekrozę (Galluzzi i in., 2018). Jednak parametrami cytotoksyczności będą także procesy czy mechanizmy uruchamiane w komórkach w celu ochrony ich przed skutkami działania danego stresora. Już na początku lat 90. XX w. odkryto, że proces obumierania komórek jest procesem niezwykle skomplikowanym, ale też ważnym w przypadku np. procesów rozwojowych. Zaczęto wyróżniać genetycznie kontrolowaną, programową śmierć komórki oraz niekontrolowaną, nieprogramową śmierć komórki (Blagosklonny, 2000; Bursch i in., 2000; Bursch, 2004). Śmierć nieprogramowa jest procesem przypadkowym i nieodwracalnym tzn. ostatecznym. Charakteryzuje się przerwaniem błony cytoplazmatycznej, co doprowadza do lizy komórkowej (nekroza). Zmiany te mogą być powodowane czynnikami zewnętrznymi tj. mechanicznymi, termicznymi czy chemicznymi. Zwykle dotyczą większej liczby sąsiadujących ze sobą komórek (Bursch i

in., 2000). Programowana śmierć komórki to uporządkowany proces, eliminacji chorych, wadliwych, uszkodzonych, zakażonych lub zbędnych komórek (Rudnicka i in., 2011). Odgrywa ważną rolę w zachowaniu homeostazy organizmu i rozwoju tkanek. Zapewnia równowagę między proliferacją a eliminacją szkodliwych komórek, co umożliwia utrzymanie homeostazy w tkankach czy narządach.

Apoptoza jest także niezwykle ważna w procesach takich jak embriogeneza, gdzie umożliwia niszczenie niepożądanych komórek, ale także w kontekście terapeutycznym, śmierć komórkowa eliminuje wadliwe komórki, wspomagając prawidłowe funkcjonowanie komórek i doprowadzając do poprawy ogólnego stanu organizmu (Chaudhry i in., 2024). Zgodnie z *Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD), wyróżniamy kilka typów śmierci komórkowej nie tylko w oparciu o morfologię, ale przede wszystkim na podstawie mechanizmów molekularnych (Galluzzi i in., 2018). Komórki apoptotyczne ulegają obkurczeniu, ich chromatyna staje się skondensowana, a DNA ulega fragmentacji. Dochodzi do tworzenia tzw. „ciałek apoptotycznych” zawierających krótkie (200 pz) odcinki DNA. Makrofagi eliminują te ciała, zabezpieczając komórkę przed rozwojem reakcji zapalnej (charakterystycznej dla nekrozy) (Kerr i in., 1972; Hordyjewska i Pasternak, 2005). Apoptoza może aktywować różne szlaki biochemiczne w zależności od rodzaju komórki oraz bodźca. Najlepiej opisane szlaki to: szlak wewnętrzny, związany z mitochondrium, w którym czynniki cytotoksyczne uszkadzają DNA, bądź organelle, a to prowadzi do zwiększenia przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej (MOMP) (Kroemer i in., 2009), a także szlak zewnętrzny, zależny od receptorów błony komórkowej, takich jak cząsteczki z rodziny TNF (Rudnicka i in., 2011). Oba szlaki prowadzą do depolaryzacji błony mitochondrialnej, uwolnienia cytochromu C i aktywacji kaspaz, czyli proteaz cysteinowych, niszczących poszczególne białka (Clarke, 1990; Donepudi i in., 2003; Chipuk i Green, 2005). Wszystkie kaspazy są syntetyzowane jako proenzymy (formy nieaktywne), które w wyniku proteolitycznego cięcia są formowane jako aktywne kaspazy. Indukcja kaspaz ma kaskadowy charakter. Do tworzenia ciałek apoptotycznych i degradacji cząstek komórkowych prowadzi aktywacja kaspaz wykonawczych (Rudnicka i in., 2011). W szlaku wewnętrznym apoptozy, udział biorą także białka z rodziny Bcl-2, które składają się zarówno z członków proapoptotycznych, jak i sprzyjających przetrwaniu (Singh i in., 2019). W celu wykrywania apoptozy stosuje się techniki mikroskopowe, z wykorzystaniem odpowiednich barwników, techniki

histochemiczne, cytometrię przepływową, detekcję potencjału błonowego mitochondriów, testy immunoenzymatyczne ELISA, a także Western-blot (Rudnicka i in., 2011).

Nekroza jest rodzajem śmierci komórkowej, która charakteryzuje się pęcznieniem komórki, kondensacją chromatyny, a ostatecznie prowadzi do lizy komórki wraz z jej jądrem komórkowym, a zawartość komórki wylewa się do macierzy pozakomórkowej, co doprowadza do powstania reakcji zapalnej (Rudnicka i in., 2011; D'Arcy, 2019). Dodatkowo wyróżniamy nekroptozę (nekrozę zaprogramowaną genetycznie), która podobnie jak apoptoza indukowana jest przez receptory, ale w sytuacji, gdy kaspazy są zablokowane, komórka wchodzi na szlak, prowadzący do lizy błony komórkowej (Pasparakis i Vandenabeele, 2015).

Kolejnym typem śmierci komórkowej jest autofagia, która w przeciwieństwie do apoptozy i nekrozy nie jest jednoznacznie określana jako śmierć komórkowa, a może pełnić także rolę szlaku przeżycia komórek. W sytuacjach stresowych, dochodzi do degradacji białek cytoplazmatycznych bądź eliminacji organelli. Podczas homeostazy poziom autofagii w komórkach jest na niskim poziomie (Baehrecke, 2005; Rudnicka i in., 2011). Proces ten charakteryzuje się zamykaniem nadmiarowych lub nieprawidłowo zbudowanych białek, materiałów zapasowych lub uszkodzonych organelli w podwójnie obłonionej wakuoli tzw. autofagosomie. Autofagosom następnie ulega fuzji z lizosomem tworząc autolizosom, w którym zamknięte struktury/substancje/organelle ulegają degradacji i trawieniu (Cao i Klionsky, 2008). W warunkach ograniczonej dostępności substancji odżywczych, autofagia może działać jako mechanizm przetrwania umożliwiający trawienie materiałów zapasowych zgromadzonych na terenie cytoplazmy komórek (Rudnicka i in., 2011). Od tzw. progu cytotoksyczności, rozumianego jako intensywność bodźca w stosunku do zdolności adaptacyjnych komórki, zależy aktywowany rodzaj śmierci komórkowej (Fulda i in., 2010). Przy niskim stresie lub w odpowiedzi na niewielkie uszkodzenia, komórka uruchamia mechanizmy „naprawcze” wchodząc np. w proces autofagii lub aktywując systemy naprawy DNA. Procesy te odpowiadają za cytoprotekcję (mechanizm ochronny) i mają na celu przywrócenie homeostazy organizmu (Kroemer i in., 2010). W sytuacji średniego stresu, gdzie uszkodzenia mogą być zbyt rozległe, aby mechanizmy naprawcze mogły być wystarczające, uruchamiana jest najczęściej apoptoza. Komórka wówczas nadal posiada zapasy ATP, które są potrzebne do energochłonnych procesów enzymatycznych (Elmore,

2007). Natomiast przy wysokim stresie, uszkodzenia struktur komórkowych są obszerne i gwałtowne, najczęściej zachodzą pod wpływem czynników zewnętrznych. Mechanizmy naprawcze są niewystarczające i rozpoczyna się nekroza, co wiąże się z lizą błony komórkowej i uwolnieniem mediatorów stanu zapalnego (Proskuryakov i in., 2003). Możliwość dokładnego pomiaru cytotoksycznego jest cennym źródłem wiedzy na temat związków potencjalnie niebezpiecznych dla organizmów żywych (Li i in., 2015). Analizy cytotoksyczności są także wskaźnikiem oceny biologicznej wzrostu, podziałów czy morfologii komórek, po zastosowaniu danej substancji potencjalnie szkodliwej (Çelik, 2018).

Substancje toksyczne mogą aktywować na poziomie komórkowym, poza opisanymi powyżej mechanizmami, także procesy związane z uruchomieniem enzymów antyoksydacyjnych (np. katalaza, dysmutaza, peroksydaza itp.), czy innych związków neutralizujących wolne rodniki (np. glutation) (Sies i in., 2017). Aktywowane mogą być także liczne białka, w tym białka opiekuńcze HSP (Kourtis i Tavernarakis, 2011), defensyny i inne (Yang i in., 2004); zmianom będą ulegały poziom ATP, stosunek ADP/ATP i inne (Hardie, 2011).

4.1.3 *Galleria mellonella* - charakterystyka gatunku

Barciak większy (*Galleria mellonella*) należy do rzędu Lepidoptera, rodziny omacnicowatych (Pyrilidae) (Iwański i Andrejko, 2022). Osobniki tego gatunku charakteryzują się szybkim wzrostem, wysoką płodnością, stosunkowo krótkim cyklem życia, niskim kosztem hodowli oraz łatwością pozyskania dużej liczby osobników (Iwański i Andrejko, 2022; Rost-Roszkowska i in., 2024). Hodowla tego gatunku nie wymaga także specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego (Tsai i in., 2016). Jest gatunkiem kosmopolitycznym. Jego obszar występowania zależy od występowania pszczoł miodnych (Kwadha i in., 2017). W regionach tropikalnych i subtropikalnych odnotowano znaczne szkody i ustalono, że *G. mellonella* powoduje spadek populacji dzikich pszczoł miodnych (Mermer i in., 2026). Gatunek ten opisano po raz pierwszy w kolonii *Apis cerana*, a jego występowanie pokrywa się z gospodarką pszczelarską w różnych krajach, gdyż szkodnik ten może znaleźć się w ulach powodując tzw. zjawisko galeriozy. *G. mellonella* jest typowym owadem holometabolicznym (Wojda i in., 2020). Owady przechodzą przez cztery stadia rozwojowe - jajo, larwa, poczwarka, stadium

dorosłe (imago). Jaja mają kolor od białego do jasnoróżowego, gąsienice są natomiast kremowobiałe i mogą mierzyć od 1 do 23 mm (Jorjão i in., 2018). Wymiary jaj kształtują się następująco: długość od 0,44 do 0,47 mm i szerokość od 0,29 do 0,39 mm (Swamy, 2008; Ellis i in., 2013; Hosamani i in., 2017; Kwadha i in., 2017; Desai i in., 2019; Wojda i in., 2020). Larwy wykluwają się najczęściej rano, w godzinach między 08:30 a 11:00 (Hosamani i in., 2017; Desai i in., 2019; Wojda i in., 2020) z jaj, które samice złożyły w ulach, a następnie zaczynają żerować (Shaik i in., 2017). Larwy w naturze odżywiają się pyłkiem i woskiem pszczelim, przyczyniając się do dużych strat w ulach (Fasasi i Malaka, 2006; Ellis i in., 2013). Taka dieta daje im dużą ilość energii, lecz mało białka (Kwadha i in., 2017). Jak wykazały badania Jindra i Sehnal, (1989) białko niezbędne jest do wytwarzania kokonu. W sytuacji, gdy ilość białka spadnie poniżej określonego poziomu, dochodzi do zahamowania jego tworzenia. Średnia optymalna temperatura rozwoju larw tej ćmy wynosi 29–33°C (Wojda i in., 2020). Większość autorów wykazuje, że etap larwalny *G. mellonella* dzieli się na 7 stadiów larwalnych (L1-L7) (Sehnal, 1966; Anderson i Mignat, 1970; Swamy, 2008; Ellis i in., 2013; Desai i in., 2019). W stadium larwalnym L1 larwa jest biała i bardzo mała (średnia długość wynosi 0,81 mm) (Desai i in., 2019). Podczas przechodzenie przez kolejne stadia rozwojowe organizmy wykazują szarobiały kolor, a od stadium larwalnego L3 ciało zaczyna wyraźnie gęstnieć (Wojda i in., 2020). Podczas stadium larwalnego nie wykształcają się zewnętrzne cechy, które mogłyby określić płeć osobnika dorosłego (Kwadha i in., 2017). Charakterystykę poszczególnych stadiów larwalnych, uwzględniając ich wymiary (w mm) oraz czas trwania (w dniach), zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka biometryczna i czasu rozwoju larw *Galleria mellonella* w poszczególnych stadiach larwalnych

Numer stadium larwalnego	Długość ciała larwy	Szerokość ciała larwy	Czas trwania stadium
L1	~0,81 mm	~0,29 mm	~4,08 dnia
L2	~2,10 mm	~0,44 mm	~5,72 dnia
L3	~5,86 mm	~1,11 mm	~5,28 dnia
L4	~8,78 mm	~1,99 mm	~6,96 dnia
L5	~14,24 mm	~2,03 mm	~6,76 dnia
L6	~19,58 mm	~2,54 mm	~7,64 dnia
L7	~23,88 mm	~3,55 mm	~8,40 dnia

Źródło: opracowanie własne na podstawie Desai i in., 2019

Etap przedpoczwarki następuje, gdy gąsienica przestaje żerować, lecz nadal wykazuje pewną ruchliwość, w czasie tworzenia kokonu (Jorjão i in., 2018). Kokon chroni larwy, a następnie poczwarki przed pszczołami robotnicami oraz pasożytami. Jego budowa trwa 2,25 dnia. Podczas gdy wewnątrz kokonu pozostaje miękkie, zewnętrzna część ulega ztwardnieniu (Wojda i in., 2020). Po etapie przedpoczwarki, następuje etap poczwarki, w którym organizmy są ciemnoczerwonobrazowe i unieruchomione w kokonach (Jorjão i in., 2018). W zależności od temperatury oraz wilgotności, okres poczwarki może trwać od 8 dni do nawet 50 dni (Wojda i in., 2020). Od etapu poczwarki do osobnika dorosłego, ćmy nie żerują. Aktywność osobników dorosłych występuje w nocy, a samice mogą składać 50–150 jaj. Mniejszą liczbę jaj składają pojedyncze samice w warunkach laboratoryjnych (Fasasi i Malaka, 2006). Samce ćmy są mniejsze i jaśniejsze niż samice (Jorjão i in., 2018). Z uwagi na to, że narządy gębowe u osobników dorosłych są zdegenerowane, ich okres życia nie jest długi i szacuje się go na ok. od 5 do 30 dni, a samce żyją dłużej od samic (El-Sawaf, 1950; Wojda i in., 2020). W zależności od warunków otoczenia, takich jak: temperatura, wilgotność i dostępność pożywienia, całkowity okres rozwoju od momentu złożenia jaj do pojawienia się osobników dorosłych waha się w przedziale od 32 dni do 93 dni (Kumar i Khan, 2018). *G. mellonella*, ze względu na niezwykle podobieństwo wrodzonej odpowiedzi immunologicznej do odpowiedzi immunologicznej u kręgowców, a także na znacznie tańsze i pozbawione problemów natury etycznej badania, jest organizmem wykorzystywanym w licznych

analizach (Ramaraio i in., 2012; Tsai i in., 2016). Wrodzona odpowiedź immunologiczna tego gatunku składa się z 2 głównych części: komórkowej i humoralnej (Tsai i in., 2012). W odpowiedzi komórkowej uczestniczą komórki zwane hemocytami. Wyróżniamy 6 różnych typów: prohemocyty, plazmatocyty, komórki ziarniste, koagulocyty, sferulocyty i enocytoidy (Tsai i in., 2012). Komórki znajdujące się w hemolimfie mogą doprowadzać do fagocytozy lub opłaszczania drobnoustrojów. Odpowiedź humoralna obejmuje produkcję lizozymu i małych peptydów o właściwościach przeciwbakteryjnych (Ramaraio i in., 2012). Uważa się, że proces fagocytozy u ssaków i owadów jest bardzo podobny, w obu przypadkach biorą udział zarówno plazmatocyty, jak i komórki ziarniste (Tojo i in., 2000). Kolejnym przykładem wykorzystania osobników *G. mellonella* są badania dotyczące ich zdolności do trawienia tworzyw sztucznych (Bombelli i in., 2017). Autorzy zaobserwowali, że pozostawienie larw barciaka większego na ok. 40 minut w plastikowej torebce powodowało, że zaczęły pojawiać się w niej uszkodzenia wynoszące $2,2 \pm 1,2$ otworów na osobnika na godzinę (Bombelli i in., 2017). Podobne wyniki wykazywała praca Rost-Roszkowska i in. (2024), w której obserwowano oznaki spożycia woreczków PP po 24 h i 48 h ekspozycji larw na PP. Dodatkowo zważono woreczki przed i po 24 h oraz 48 h eksperymentu, co wykazało, że masa woreczka po 24 h od punktu początkowego spadła o 6 mg, natomiast po 48 h od punktu początkowego o 9 mg (Rost-Roszkowska i in., 2024). Gąsienice w naturze żywią się wyłącznie plastrami miodu, które zbudowane są z wosku pszczelego. Wosk pszczeli składa się z mieszaniny związków lipidowych, w tym alkanów, alkenów, kwasów tłuszczowych i estrów. Zarówno w wosku pszczelim, jak i w PE, najczęstszym wiązaniem jest wiązanie węglowodorowe $\text{CH}_2\text{--CH}_2$ (Bombelli i in., 2017). Biodegradacja wosku pszczelego najprawdopodobniej wymaga rozerwania tego samego typu wiązań chemicznych, które występują w PE (Bombelli i in., 2017; Wojda i in., 2020). Nie jest jednak do końca jasne, czy aktywność trawienia węglowodorów u *G. mellonella* pochodzi z samego organizmu lub z aktywności mikrobioty jelitowej i jej działalności enzymatycznej (Dickman, 1933; Bombelli i in., 2017). Doniesiono, że PE może ulegać degeneracji w wyniku aktywności *Enterobacter* sp. wyizolowanego z jelit gąsienic tego gatunku (Ren i in., 2019; Wojda i in., 2020). Ponadto, jak wykazują badania, dieta oparta na PE nie hamowała przepoczwarczenia, natomiast formy dorosłe były mniejsze niż larwy (Bulak i in., 2021). Inne badania wykazały zaś obecność zmian w obrębie komórek poszczególnych narządów po spożywaniu przez larwy tworzyw sztucznych (LeMoine i in., 2020). Wykazano także, że mikrobiom układu pokarmowego *G. mellonella* może brać udział w

degradacji także PP (Peydaei i in., 2021). Jednak większość prac skupiała się na degeneracji PE i jego ewentualnym wpływie na osobniki tego gatunku. Niewiele prac koncentrowało się jednak na zdolnościach do degeneracji PP i jej skutkach dla ultrastruktury narządów, przeżywalności, zdolności do reprodukcji, a także na aktywacji lub hamowaniu procesów śmierci komórkowej, a więc na szeroko rozumianej cytotoksyczności.

5. Cele badań i hipotezy badawcze

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie czy dieta bogata w polipropylen (PP) ma wpływ na aktywację określonych parametrów cytotoksyczności w wybranych narządach larw *G. mellonella*. PP to jedno z najczęściej wykorzystywanych komercyjnie tworzyw sztucznych, które jest uważane za toksyczne dla organizmów żywych. Istnieje wiele prac dotyczących możliwości degeneracji PE przez larwy *G. mellonella* i jego wpływu na ich rozwój. Jednak nadal niewiele prac skupia się na wpływie PP na przeżycie, rozrodczość, czy na występowaniu potencjalnych zmian w obrębie narządów/ tkanek. Tak więc nie wiadomo, czy spożywanie PP i związana z nim degradacja tego polimeru w organizmie gąsienic będzie miało negatywny wpływ na te organizmy, wywołując zmiany cytotoksyczne, czy będzie miało neutralny wpływ na cały organizm. To predysponowałoby te owady do wykorzystania ich w biodegradacji tworzyw sztucznych. Spożywany polimer ma bezpośredni kontakt z nabłonkiem jelita środkowego, jednak poprzez ten narząd PP mógłby negatywnie wpływać także na inne narządy. Ważne jest zatem opisanie dokładnych zmian w komórkach wspomnianego nabłonka, w szczególności na poziomie ultrastrukturalnym. Jak dotąd nie zbadano, jakie dokładnie organelle mogą być najbardziej narażone na wpływ spożytego PP oraz czy spożycie tego tworzywa będzie aktywowało procesy odpowiedzialne za przeżycie, czy ochronę komórek, tkanek, a w końcu całych narządów. Z uwagi na szereg cech *G. mellonella*, które sprawiają, że organizm ten jest wykorzystywany jako organizm modelowy w licznych badaniach toksykologicznych, ekotoksykologicznych czy rozwojowych, a także na globalny problem, jakim jest biodegradacja tworzyw sztucznych, których składowanie stanowi coraz większy problem, dalsze badania nad tym gatunkiem są uzasadnione i pożądane. W niniejszej rozprawie skupiono się więc na wykryciu potencjalnych zmian na poziomie ultrastrukturalnym w: **jelicie środkowym, ciele tłuszczowym oraz gruczole**

przédnym u larw karmionych woreczkami PP. Wybór tych narządów do eksperymentu wynika z ich kluczowej roli w procesach trawiennych, detoksykacyjnych oraz metabolicznych. Umożliwia także ogólną ocenę toksyczności i stanu fizjologicznego organizmu. Zatem wybór jelita środkowego, gruczołu przedniego i ciała tłuszczowego umożliwia ocenę wpływu diety opartej na polipropylenie na osobniki *Galleria mellonella*, co umożliwia zobrazowanie potencjalnej cytotoksyczności i stresu oksydacyjnego wywołanych dietą opartą na PP.

Analiza ultrastrukturalna wykorzystująca transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) miała **na celu** stwierdzenie, czy w wyniku spożywania plastiku i jego rozkładu w organizmie gąsienic dochodziło do pojawienia się zmian na terenie komórek wspomnianych narządów. Dodatkowo **celem badań** było zanalizowanie wybranych parametrów cytotoksyczności, takich jak aktywacja śmierci komórkowej, autofagii, proliferacji komórek, uszkodzeń DNA jądrowego, uruchamianie białek takich jak Bcl-2, czy kaspazy, a także zmiany w poziomie reaktywnych form tlenu (ROS), zmiany w potencjale błon mitochondriów, zmiany w cyklu komórkowym, czy zmiany w poziomie ATP. **Analiza wybranych parametrów cytotoksyczności w narządach gąsienic *G. mellonella* karmionych PP pozwoli ocenić potencjalną rolę tego gatunku w biodegradacji tworzyw sztucznych.**

Na podstawie dotychczasowego stanu wiedzy literaturowej, a także wcześniejszych badań, postawiono następujące hipotezy badawcze:

H1: Polipropylen wywołuje zmiany w komórkach wybranych narządów na poziomie ultrastrukturalnym;

H2: Pod wpływem karmienia zwierząt polipropylenem dochodzi do aktywacji procesów detoksykacyjnych w komórkach wybranych narządów;

H3: Jelito środkowe jest narządem, w którym zmiany cytotoksyczne zachodzą najintensywniej;

H4: Spożywanie PP przez larwy badanego gatunku wpływa na zmiany aktywności mitochondrialnej, poziomu ATP oraz/lub ROS;

H5: Pod wpływem karmienia zwierząt polipropylenem dochodzi do aktywacji procesów śmierci komórkowej w wybranych narządach;

H6: Polipropylen spożywany przez gąsienice wpływa na zmiany cyklu komórkowego oraz proliferację komórek w badanych narządach;

H7: Odmienne mechanizmy są uruchamiane w celu ochrony komórek po spożyciu przez larwy *G. mellonella* PP;

Aby zweryfikować pierwszą hipotezę wykorzystano analizy jakościowe polegające na wykryciu zmian, zaobserwowanych za pomocą wykonanych zdjęć jelita środkowego, ciała tłuszczowego i gruczołu przedniego w TEM.

Do weryfikacji hipotez od drugiej do siódmej zastosowano zarówno analizy ilościowe wykorzystujące cytometrię przepływową, luminometrię i analizy statystyczne wyników, jak i analizy jakościowe wykorzystujące mikroskopię konfokalną i fluorescencyjną.

6. Materiał badawczy i metodologia

6.1 Materiał badawczy

Materiał do badań stanowiły larwy barciaka większego *G. mellonella*. Materiał ten został pozyskany z laboratorium PAN w Warszawie. Do badań zostały wybrane jedynie osobniki w VII stadium larwalnym (L7).

6.1.1 Warunki hodowli

Dorośle osobniki *G. mellonella* hodowano w szklanych, szczelnie zamkniętych pojemnikach o pojemności 1 l w stałej temperaturze $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, o wilgotności $75 \pm 5\%$ i stałej ciemności. Na każdym szklanym pojemniku zawierającym hodowlę umieszczono materiał lniany, który ułatwiał składanie jaj przez samice. Dorośle samce i samice nie żerowały z powodu zdegenerowanego aparatu gębowego. Po złożeniu jaj, osobniki umierały. Złożone jaja zbierano i hodowano w szklanych pojemnikach na pożywce zawierającej mąkę pszenną, mąkę kukurydzianą, miód wielokwiatowy, mleko w proszku, otręby i glicerynę (Sehnal, 1966). Z jaj wykluwały się larwy w I stadium (L1), które

natychmiast zaczęły żerować na pożywce. W miarę rozwoju larw pożywkę zastępowano nową, o takim samym składzie, co miało na celu jedynie zapewnienie ciągłego dostępu do substancji odżywczych. Larwy hodowano aż do stadium L7, które to wykorzystywano do eksperymentów biologicznych. Stadium L7 było odróżniane od pozostałych na podstawie wielkości larwy. Przyjęto, że larwy ze stadium VII (L7) miały ok. 20-24 mm długości (Fasasi i Malaka, 2006; Desai i in., 2019).

6.1.2 Eksperyment

Wybrane osobniki stadium larwalnego L7 podzielono na cztery grupy (Ryc. 1):

G0-C – grupa kontrolna, zwierzęta hodowane w warunkach laboratoryjnych przy stałej temperaturze $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, wilgotności $75 \pm 5\%$, stałej ciemności w szklanych pojemnikach i karmione *ad libitum* medium opisanym przez Sehnala (1966);

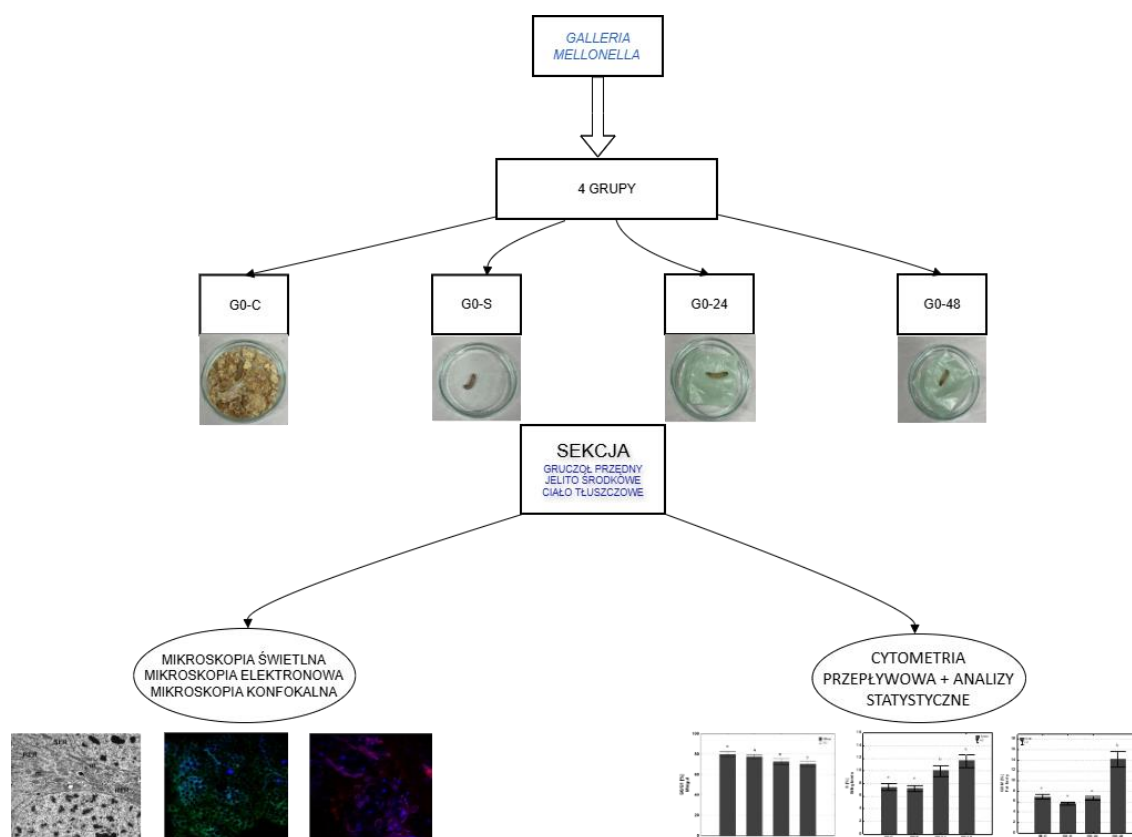
G0-S – zwierzęta hodowane w warunkach laboratoryjnych przy stałej temperaturze $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, wilgotności $75 \pm 5\%$, stałej ciemności w szklanych pojemnikach i głodzone przez 24 h;

G0-24 – zwierzęta hodowane w warunkach laboratoryjnych przy stałej temperaturze $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, wilgotności $75 \pm 5\%$ i stałej ciemności, uprzednio głodzone przez 24 h, a następnie hodowane w szalkach Petriego z woreczkami PP o wymiarach 3 cm × 3 cm przez 24 h;

G0-48 – zwierzęta hodowane w warunkach laboratoryjnych przy stałej temperaturze $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, wilgotności $75 \pm 5\%$ i stałej ciemności, uprzednio głodzone przez 24 h, a następnie hodowane na szalkach Petriego z woreczkami PP o wymiarach 3 cm × 3 cm przez 48 h (Ryc. 1).

Głodzenie osobników w grupach G0-24 oraz G0-48 przed eksperymentem miało na celu oczyścić układ pokarmowy zwierząt z wcześniej spożytego pokarmu, a także zapobiec jego ewentualnemu wpływowi na wynik eksperymentu. Grupa G0-S miała zobrazować, czy brak pokarmu może powodować u larw zmiany na poziomie komórkowym/ ultrastrukturalnym oraz czy takie same zmiany nie będą pojawiały się u osobników karmionych PP. To wskazywałoby, że pomimo spożywania PP osobniki głodują, a ewentualne zmiany będą wywołane właśnie głodzeniem, a nie rozkładającym się tworzywem sztucznym.

Z uwagi na fakt, że stadium L7 jest ostatnim przed przepoczwarzeniem, w ostatnich dniach tego stadium (siódmy i ósmy dzień), larwy przestają żerować, stają się nieaktywne, a ich metabolizm powoli przechodzi w stan przedpoczwarki (Fasasi i Malaka, 2006; Desai i in., 2019; Wojda i in., 2020; Rost-Roszkowska i in., 2024; Mermer i in., 2026). Eksperyment musiał zatem zostać tak zaplanowany, aby zdążyć przed pojawiającymi się zmianami w narządach, które spowodowane są wchodzeniem przez larwy w stadium poczwarki. Dlatego larwy, które były wykorzystywane do eksperymentów, pochodziły z trzeciego dnia stadium L7. W związku z tym analizy larw po 24 godzinach spożycia PP były przeprowadzane piątego dnia etapu L7 (24 h głodzenia + 24 h eksperymentu), a analizy larw po 48 godzinach spożycia PP były przeprowadzane szóstego dnia etapu L7 (24 h głodzenia + 48 h eksperymentu). Woreczki PP użyte do analiz zakupiono komercyjnie (Sarantis Polska SA). Do każdego eksperymentu wybierano osobniki z wszystkich czterech grup, a następnie poddawano sekcji, w celu izolacji: jelita środkowego, ciała tłuszczowego i gruczołu przedniego. Przed sekcją każdy osobnik został znieczulony chloroformem.



Ryc. 1 Schemat eksperymentu. Na podstawie Mermer i in., 2026, zmodyfikowano.

6.2 Metodyka pracy badawczej

6.2.1 Mikroskopia świetlna i transmisyjna mikroskopia elektronowa

Narządy wyizolowane od larw (jelito środkowe, ciało tłuszczowe oraz gruczoł przedny) z osobników wszystkich grup eksperymentalnych utrwalone w 2,5% glutaraldehydzie i 2% czterotlenku osmu, płukano w buforze fosforanowym (pH 7,4), odwodniono w szeregu alkoholowym i acetonie i zatopiono w żywicy epoksydowej (Epoxy Embedding Medium Kit; Sigma) zgodnie ze standardowym protokołem opisanym w pracach Rost-Roszkowska i in. (2020b, 2022). Po uzyskaniu półcienkich skrawków (0,8 μ m) barwiono je 1% błękitem metylenowym w 0,5% boraksie i analizowano w mikroskopie świetlnym Olympus BX60. Do kontrastowania ultracienkich skrawków (70 nm) wykorzystano standardową metodę (Rost-Roszkowska i in., 2020b; Poprawa i in., 2022). Ultracienkie skrawki analizowano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) Hitachi H500.

6.2.2 Analiza jakościowa – mikroskopia konfokalna

Do każdej poniższej metody wykorzystano po 5 osobników z każdej grupy badawczej. Narządy były wyizolowane, a następnie przygotowane zgodnie z poniższymi protokołami.

6.2.2.1 Dihydroetydyna (DHE) – barwienie komórek ROS-dodatnich

Dihydroetydyna (hydroetydyna, 5-etylo-5,6-dihydro-6-fenilo-3,8-diaminofenantrydyna) jest wykorzystywana do wykrywania i pomiaru reaktywnych form tlenu (ROS, *Reactive Oxygen Species*) w komórkach. Metoda ta umożliwia ocenę poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach. W celu detekcji lokalizacji komórek ROS-dodatnich w izolowanych narządach *G. mellonella* (jelito środkowe, ciało tłuszczowe, gruczoł przedny) wykorzystano mikroskopię konfokalną. Wyizolowane narządy z grup G0-C, G0-S, G0-24 i G0-48 poddano barwieniu bez utrwalania (barwienie przyżyciowe). Przygotowanie materiału do analizy przeprowadzono zgodnie z procedurami opisanymi w artykułach Rost-Roszkowska i in. (2020a, 2020b). Materiał inkubowano z 30 μ M DHE (Invitrogen) i barwiono DAPI (1 μ g/ml, 30 min, RT, w ciemności), a następnie analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV1000 i laserów argonowych: laser 405 nm (wykrywanie DAPI) i 559 nm (wykrywanie TMR) (Rost-Roszkowska i in., 2022).

6.2.2.2 LysoTracker Red (LTR) – znakowanie organelli i struktur komórkowych silnie kwaśnych

W analizie jakościowej wykorzystano czerwony barwnik fluorescencyjny, który selektywnie gromadzi się w organellach o niskim pH, takich jak lizosomy i autolizosomy, co umożliwia ich wybarwienie. Jest narzędziem do badania funkcji lizosomów oraz procesów związanych z autofagią. Wyizolowane bez utrwalania narządy inkubowano w odczynniku LysoTracker Red (1 μ g/ml, 30 min, RT, w ciemności), a następnie barwiono DAPI (1 μ g/ml, 30 min, RT, w ciemności) zgodnie z protokołem opisanym przez Rost-Roszkowska i in. (2020b) i badano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV1000 i laserów argonowych: laser 405 nm (wykrywanie DAPI) i 559 nm (wykrywanie TMR).

6.2.2.3 BODIPY – znakowanie materiałów lipidowych

BODIPY (4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indacen) jest stosowany do znakowania i wizualizacji lipidów. Narządy wyizolowane od zwierząt z wszystkich grup doświadczalnych, bez utrwalania, barwiono 20 µl/ml roztworem roboczym BODIPY (30 min, RT, w ciemności), przygotowanym zgodnie z protokołem producenta. Po przepłukaniu materiału w buforze TBS, był on dodatkowo barwiony odczynnikami DAPI w celu wizualizacji jąder komórkowych (1 µg/ml, 30 min, RT, w ciemności). Narządy badano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus FluoView FV1000 i laserów argonowych: laserów 405 nm (wykrywanie DAPI) i 559 nm (wykrywanie BODIPY).

6.2.2.4 TUNEL assay – detekcja apoptozy

Test TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red; Roche) to metoda służąca do wykrywania pęknięć w DNA, charakterystycznych dla apoptozy. Wyizolowane narządy utrwalano w 4% paraformaldehydzie przez 1 h w temperaturze pokojowej (RT), a następnie przygotowywano zgodnie z protokołem producenta i metodą opisaną w Poprawa i in. (2022). Po wybarwieniu narządów mieszaniną reakcyjną TUNEL znakowano je 1 µg/ml DAPI (30 min, RT) w celu wizualizacji jąder komórkowych. Materiał badano przy użyciu konfokalnego mikroskopu skaningowego Olympus FluoView FV3000. Zastosowano następujące lasery: 405 nm dla barwnika DAPI i 561 nm dla czerwonego barwnika TMR. Kontrole negatywne przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta.

6.2.2.5 Barwienie lizosomów CellLight-GFP

Barwienie umożliwia znakowanie lizosomów zielonym białkiem fluorescencyjnym (GFP). Barwienie lizosomów techniką CellLight jest kluczowe w badaniach nad autofagią, gdyż lizosomy są ostatecznym miejscem niszczenia materiału komórkowego w żywych komórkach. Wyizolowane od zwierząt z wszystkich grup doświadczalnych narządy bez utrwalania barwiono odczynnikami CellLight Lysosomes-GFP (Invitrogen, C10596) (24 h, RT, w ciemności) i przemywano buforem TBS (2 × 5 min, RT, w ciemności). Następnie narządy barwiono 1 µg/ml DAPI (30 min, RT, w ciemności). Materiał badano przy użyciu konfokalnego mikroskopu skaningowego Olympus

FluoView FV3000. Zastosowano następujące lasery: 405 nm dla barwnika DAPI i 488 nm dla barwnika GFP.

6.2.2.6 Barwienie JC-1

Barwnik JC-1 jest fluorescencyjnym markerem do oznaczania potencjału błony mitochondrialnej w komórkach żywych. Przygotowane narządy, które wyizolowano ze wszystkich grup, inkubowano w ciemności z 5 μ l 1,5 mM roztworu JC-1 w DMSO (99,97%, H₂O < 0,1%) (przez 20 min, RT, w ciemności) bez utrwalania. Następnie materiał przemyto kilkakrotnie buforem PBS. Jądra komórkowe znakowano 1 μ g/ml DAPI (30 min, RT, w ciemności). Materiał analizowano za pomocą konfokalnego mikroskopu skaningowego Olympus FluoView FV3000. Zastosowano następujące lasery: 405 nm dla barwnika DAPI oraz 488 nm dla barwnika JC-1.

6.2.2.7 Barwienie ThiolTracker Violet

ThiolTracker Violet jest powszechnie stosowany w analizie poziomu w komórkach zredukowanego glutationu (GSH) jako mechanizmu detoksykacji. Wykorzystywany jest do badania stresu oksydacyjnego w wyniku obserwacji zmian w obrębie poziomu wewnątrzkomórkowego GSH. Barwnik łączy się ze zredukowanym GSH, dając zieloną fluorescencję. Spadek poziomu zredukowanego GSH wiąże się ze zmniejszeniem intensywności fluorescencji i informuje o wzroście stresu oksydacyjnego. Uzyskane podczas sekcji narządy barwiono odczynnikami ThiolTracker Violet (10 μ M) zgodnie z protokołem producenta ([chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10095.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10095.pdf)) i DAPI (1 μ g/ml, 30 min, RT, w ciemności). Po przemyciu materiału PBS zbadano go za pomocą konfokalnego mikroskopu skaningowego Olympus FluoView FV3000. Zastosowano następujące lasery: 405 nm dla barwnika DAPI oraz 405 nm dla ThiolTracker Violet.

6.2.3 Analiza ilościowa – cytometria przepływowa

Po izolacji narządów: jelita środkowego, ciała tłuszczowego i gruczołu przędnego, materiał został poddany mechanicznej fragmentacji i homogenizacji w buforze PBS/TBS

przy użyciu homogenizatora mechanicznego (BEAD BUG MICROTUBE HOMOGENIZER) w celu otrzymania zawiesiny komórek (Rost-Roszkowska i in., 2020b; Poprawa i in., 2022). Dla każdej z poniższych metod wykorzystano po 5 osobników z każdej grupy badawczej (n=5).

6.2.3.1 Muse Oxidative Stress Kit

Zestaw Muse Oxidative Stress Kit (Merck Millipore, № MCH100111) służy do pomiaru stresu oksydacyjnego, umożliwia ilościowe pomiary komórek ROS-pozytywnych. Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta, a pomiary wykonano przy użyciu analizatora komórek Muse (Millipore) (Włodarczyk i in., 2019).

6.2.3.2 Muse Count & Viability Kit

Zestaw Muse Count & Viability Kit (Merck Millipore, nr MCH100102) umożliwia ilościową analizę liczby komórek żywych w tkance przy użyciu analizatora komórek Muse. Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta ([chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfndmkaj/https://welcome.cytexbio.com/hubfs/Ammis-and-Guava-Products/Muse-Count-&-Viability-Kit-RSP.pdf](https://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfndmkaj/https://welcome.cytexbio.com/hubfs/Ammis-and-Guava-Products/Muse-Count-&-Viability-Kit-RSP.pdf)).

6.2.3.3 Aneksyna V

Zestaw zawierający aneksynę V wykorzystywany jest w analizie ilościowej komórek żywych, będących we wczesnym i późnym etapie apoptozy, oraz komórek nekrotycznych. Zawierając dwa barwniki, aneksynę V sprzężoną z FITC oraz jodek propydydny (PI) umożliwia rozróżnienie komórek nekrotycznych (aneksyna V-FITC-/PI+) i komórek apoptotycznych (wczesna apoptoza: aneksyna V-FITC+/PI- lub późna apoptoza: aneksyna V-FITC+/PI+). Barwienie przygotowano zgodnie z protokołem (Rost-Roszkowska i in., 2020b; Mermer i in., 2026) i analizowano za pomocą cytometru przepływowego Beckman Coulter Instrument FC 500 z laserem argonowym o długości fali 488 nm.

6.2.3.4 Muse Multi-Color DNA Damage Kit

Muse Multi-Color DNA Damage Kit (Cytek, SKU MCH200107) umożliwia wykrywanie uszkodzeń DNA. Analizę ilościową przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w protokole producenta (<https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/muse-multi-color-dna-damage-kit-rsp.pdf>) i przeprowadzono przy użyciu analizatora komórek Muse.

6.2.3.5 Muse MultiCaspase Kit

Muse MultiCaspase Kit (Cytek, SKU MCH100109) służy do wykrywania aktywacji kaspaz i ich udziału w procesie śmierci komórkowej, dzięki któremu można różnicować komórki żywe kaspazo-negatywne, żywe/kaspazo-pozytywne, martwe/kaspazo-pozytywne i martwe/kaspazo-negatywne. Analizę ilościową przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w protokole producenta (<https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-MultiCaspase-Kit-QRC.pdf>), a pomiary wykonano z wykorzystaniem analizatora Muse.

6.2.3.6 Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit

Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit (Cytek, SKU MCH200105) umożliwia ilościową analizę komórek, w których dochodzi do aktywacji białka Bcl-2 przy wykryciu dwóch przeciwciał: anty-Bcl-2-PECy5 oraz anty-fosfo-Bcl-2 (Ser70) -Alexa Fluor 555. Procedurę barwienia i przygotowania materiału do analiz wykonano zgodnie z procedurą opisaną w protokole producenta (<https://cytekbio.com/products/muse-bcl-2-activation-dual-detection-kit?variant=40651391008804>). Pomiary wykonano przy użyciu analizatora komórek Muse.

6.2.3.7 Zestaw Muse Cell Cycle Kit

Muse Cell Cycle Kit (Cytek, SKU MCH100106) umożliwia ilościową analizę procentowej zawartości komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego: G₀/G₁, S, G₂/M. Wyizolowane narządy przygotowano do analizy przy użyciu cytometru

przepływowego MUSE zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta (<https://cytekbio.com/products/muse-cell-cycle-kit?variant=40651389927460>).

6.2.3.8 Stosunek ADP/ATP i zawartość ATP

Zestaw do badania żywotności komórek ApoSENSOR™ ATP Bioluminescence Assay Kit (BioVision, nr K254 i zestaw do badania bioluminescencji ApoSENSOR ADP/ATP Ratio Bioluminescence Assay Kit (BioVision, nr K255) zastosowano zgodnie z protokołami producenta. Oznaczenie zawartości ATP oparto na reakcji oksydacyjnej dekarboksylacji lucyferyny katalizowanej przez lucyferazę. Natężenie światła mierzone metodą luminometryczną przy długości fali 562 nm jest proporcjonalne do zawartości ATP w badanej próbce. Poziom ADP mierzono poprzez jego konwersję do ATP, którą wykryto za pomocą tej samej reakcji. Stężenie ATP w materiałach obliczono na podstawie krzywej standardowej, którą przygotowano przy użyciu standardu ATP dostarczonego w zestawie. Wyniki wyrażono jako $\text{nmol ATP} \cdot \text{mg}^{-1}$ białko.

Zawartość białka mierzono według Bradforda (1976), stosując jako standard albuminę bydlęcą (zawartość białka > 95%, Fluka).

6.2.3.9 Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem programu STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., USA). Przed wykonaniem analiz oceniono spełnienie założeń testów parametrycznych. Normalność rozkładu danych weryfikowano za pomocą testu Shapiro–Wilka, natomiast jednorodność wariancji oceniano testem Levene’a. W celu określenia wpływu badanych czynników na poziom analizowanych parametrów przeprowadzono jedno- i dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz w przypadku jednoczesnej analizy wielu zmiennych zależnych, wielowymiarową analizę wariancji (MANOVA). Po stwierdzeniu istotnego wpływu analizowanych czynników wykonano porównania *post hoc* z wykorzystaniem testów Tukey’a lub LSD (Least Significant Difference). Różnice pomiędzy grupą kontrolną i eksperymentalną oceniano za pomocą testu t-Studenta dla prób niezależnych. Zależności pomiędzy analizowanymi parametrami określano na podstawie analizy korelacji Pearsona oraz analizy regresji

wielokrotnej. Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Za istotne statystycznie uznawano różnice przy poziomie istotności $P < 0,05$.

W celu usystematyzowania opisanych technik, wszystkie zastosowane metody badawcze podsumowano w Tabeli 2.

Tabela 2. Zestawienie zastosowanych metod badawczych

Cel analizy	Zastosowane metody	Technika badawcza
Analiza ultrastrukturalna	• Barwienie skrawków półcienkich • Kontrastowanie skrawków ultracienkich	• Mikroskopia świetlna • Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)
Analiza śmierci komórkowej i uszkodzeń DNA	• Test TUNEL • Aneksyna V • Muse MultiCaspase Kit • Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit • Muse Multi-Color DNA Damage Kit	• Mikroskopia konfokalna • Cytometria przepływowa
Analiza stresu oksydacyjnego	• Dihydroetydyna (DHE) • ThiolTracker Violet • Muse Oxidative Stress Kit	• Mikroskopia konfokalna • Cytometria przepływowa
Analiza żywotności i cyklu komórkowego	• Muse Count & Viability Kit	• Cytometria przepływowa

	• Muse Cell Cycle Kit	
Analiza silnie kwaśnych struktur wewnątrzkomórkowych oraz lipidów	• LysoTracker Red (LTR) • CellLight-GFP • BODIPY	• Mikroskopia konfokalna
Analiza mitochondrialna oraz zmian w poziomie ATP	• Barwienie JC-1 • ApoSENSOR ATP / ADP/ATP Ratio Bioluminescence Assay Kit	• Mikroskopia konfokalna • Luminometria

Źródło: opracowanie własne

7. Wyniki i dyskusja

Rost-Roszkowska, M., Mermer, P., Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., Wrońska, A., Karnówka, O. (2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *The European Zoological Journal*, 91(1), 213–234. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>

W pierwszych etapach eksperymentu, oceniono, czy larwy *G. mellonella* są zdolne do trawienia woreczków polipropylenowych (PP). W tym celu zważono woreczki przed oraz po 24 h i 48 h eksperymentu, a także wykonano im zdjęcia przed rozpoczęciem i po zakończeniu eksperymentu. Zarówno waga, jak i obraz fotograficzny wskazywały, iż larwy badanego gatunku są zdolne do konsumpcji PP. Kolejnym etapem eksperymentu była ocena przeżywalności larw karmionych PP. W tym celu liczono osobniki dorosłe, które rozwinęły się z larw karmionych workami PP. Liczby te porównywano z liczbą osobników dorosłych, rozwijających się z larw karmionych standardową pożywką (zgodnie z Sehnał, 1966). Wyniki ukazały, że przeżywalność osobników jest wysoka i na zbliżonym poziomie w grupie eksperymentalnej i kontrolnej. Inne dane literaturowe także donoszą o zdolności spożycia przez larwy *G. mellonella* tworzyw sztucznych, w tym także PP. W artykule Barrionuevo i in. (2022) autorzy opisują różnicę w wadze próbek PP przed podaniem ich larwom, a następnie rejestrują ubytek ich masy po eksperymentcie,

wynikający z konsumpcji. Utratę masy wyrażano następnie w ujęciu procentowym. Autorzy monitorowali larwy aż do osiągnięcia przez nie stadium dorosłego. Ich badanie potwierdziło także wyniki przeżywalności larw. W ich analizie larwy mogły dojść do stadium poczwarki i przekształcić się w dorosłe ćmy.

W celu weryfikacji postawionej hipotezy badawczej **H1** dotyczącej wpływu diety opartej na PP na ultrastrukturę wybranych narządów larw *G. mellonella*, przeprowadzono analizy w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM). Analizy polegały na preparacji trzech narządów: jelita środkowego, gruczołu przedniego oraz ciała tłuszczowego i analizie zmian w ultrastrukturze komórek wspomnianych narządów. Porównywano zmiany w komórkach grup kontrolnych (G0-C oraz G0-S) wraz z ultrastrukturą komórek grup eksperymentalnych (G0-24 i G0-48). **Nabłonek jelita środkowego** badanego gatunku tworzony jest przez nabłonek wielorzędowy, w którym wyróżnić można komórki trawienne, kubkowe, endokrynowe oraz regeneracyjne (Rost-Roszkowska i in., 2024; El-Samad i in., 2025). W przypadku przeprowadzonego eksperymentu, w ultrastrukturze komórek tworzących nabłonek jelita środkowego w grupach G0-C oraz G0-S, nie wykazano różnic na poziomie ultrastrukturalnym. W grupach eksperymentalnych G0-24 oraz G0-48 zaobserwowano zwiększenie liczby struktur autofagicznych (autofagosomy, autolizosomy, ciała resztkowe) w szczytowej części cytoplazmy komórek trawiennych. Dodatkowo w grupie G0-48 zaobserwowano większą liczbę wakuol oraz struktur autofagicznych niż w grupie G0-24. Nie zaobserwowano natomiast innych zmian w obrębie cytoplazmy oraz organelli komórkowych. **Gruczoł przedni** to narząd parzysty zbudowany z trzech regionów: przedniego (ASG), środkowego (MSG) oraz tylnego (PSG). W ostatnim stadium larwalnym produkuje wydzielinę tworzącą kokon, w którym następnie rozwija się poczwarka. Zbudowany jest z dużych komórek poliploidalnych (Aidells i in., 1971). Do analizy w TEM gruczołu przedniego wykorzystano jego środkowy obszar (MSG). W ultrastrukturze komórek MSG grupy G0-S i G0-C nie zaobserwowano żadnych różnic. W grupie G0-24 w porównaniu z grupą kontrolną i głodzoną (G0-C i G0-S) zaobserwowano wzrost liczby struktur autofagicznych. W grupie G0-48 zaobserwowano sporadyczne wakuole o jasnym elektronowo wnętrzu i liczne autofagosomy. Innych zmian na poziomie ultrastrukturalnym nie wykazano. **Ciało tłuszczowe** *G. mellonella*, podobnie jak u innych przedstawicieli Lepidoptera, jest narządem o budowie płatowej, które tworzone jest w głównej mierze przez trofocyty (adipocyty) oraz sporadycznie

występujące między nimi oenocyty (Chobotow i Strachecka, 2013; Skowronek i in., 2021). W przypadku analizy ultrastrukturalnej ciała tłuszczowego, w grupach eksperymentalnych G0-24 i G0-48 nie wykazano zmian degeneracyjnych w porównaniu do grup kontrolnych (G0-C i G0-S). Wykazano jednak wzrost liczby struktur autofagicznych, zarówno w grupie G0-24, jak i w grupie G0-48. Przeprowadzone analizy ultrastrukturalne wskazują, że karmienie larw *G. mellonella* PP nie powoduje w organizmie ostrych zmian degeneracyjnych w badanych narządach. Analiza z wykorzystaniem TEM nie wykryła zmian o charakterze apoptotycznym, czy nekrotycznym w grupach eksperymentalnych, karmionych PP (G0-24 i G0-48). Te wyniki wskazują na odporność larw barciaka większego na spożywanie tworzyw sztucznych i ich wysoką tolerancję na ten ksenobiotyk. Wyniki te potwierdzają także wyniki innych badaczy, w których wykazano zdolność przez gąsienice barciaka większego do trawienia innych tworzyw sztucznych. Autorzy wskazali, że osobniki są w stanie przetrwać na diecie opartej jedynie na tworzywach sztucznych, w tym polietylenie (PE), czy polistyrenie (PS). Wykazali także, że taka dieta nie doprowadza do zwiększonej śmiertelności czy uszkodzeń komórkowych (Bombelli i in., 2017; Barrionuevo i in., 2022). Z badań przeze mnie przeprowadzonych wynika, że głównym mechanizmem ochronnym w badanych narządach był wyraźny wzrost liczby struktur autofagicznych oraz wzmożona wakuolizacja komórek. Liczba struktur autofagicznych oraz wakuolizacja były tym silniejsze, im większy był czas ekspozycji na PP (co było szczególnie widoczne w grupie G0-48). Autofagia to proces, który może być uruchamiany w odpowiedzi na różne stresory, w tym obecność ksenobiotyków, takich jak PP. Wartym podkreślenia jest fakt, że w grupie głodzonej (G0-S) nie pojawiły się żadne różnice na poziomie ultrastrukturalnym w porównaniu do grupy kontrolnej (G0-C). Wynik ten umożliwia wykazanie, braku związku intensyfikacji autofagii z deficytem substancji odżywczych. Wyniki wskazują, że wzrost intensywności autofagii jest podyktowany koniecznością ochrony organizmu w związku z trawieniem polipropylenu. Jelito środkowe, stanowi pierwszą barierę oraz główne miejsce trawienia i wchłaniania spożytego pokarmu. Wzrost liczby struktur autofagicznych w szczytowej części cytoplazmy komórek trawiennych tego narządu może świadczyć o zwiększonych procesach usuwania uszkodzonych organelli czy białek. Jak wykazano w innych badaniach na *G. mellonella*, kontakt z silnymi czynnikami stresowymi – ksenobiotyki, patogeny czy stres oksydacyjny, doprowadza do indukcji autofagii. Uruchomienie tego mechanizmu pozwala na usuwanie uszkodzonych struktur wewnątrzkomórkowych,

takich jak organelle czy białka i stanowi strategię obronną, która zapobiega obumarciu komórek (Kazek i in., 2020). Zwiększoną liczbę struktur autofagicznych odnotowano również w komórkach MSG gruczołu przedniego, co również może wskazywać na intensyfikację procesów ochronnych. Tę samą intensyfikację odnotowano w trofocytach ciała tłuszczowego. Ciało tłuszczowe owadów jest odpowiednikiem funkcjonalnym wątroby kręgowców. Stąd jest centrum metabolizmu energetycznego i detoksykacji (Lemoine i in., 2020). Zwiększenie liczby struktur autofagicznych w trofocytach i brak innych zmian zwyrodnieniowych, jak nekroza, umożliwia postawienie hipotezy, że komórki te radzą sobie ze stresem związanym ze spożyciem tworzyw sztucznych. Uruchomienie takich procesów, umożliwia przeżycie organizmom, co zaobserwowano u larw *G. mellonella* żerujących na polietylenie (Lemoine i in., 2020). Autofagia jest zatem sposobem na przetrwanie dla wielu organizmów znajdujących się w różnych sytuacjach stresowych, co potwierdzają liczne badania (Klionsky i Emr, 2000; Rost-Roszkowska i in., 2018; Rost-Roszkowska i in., 2019). Zebrane dane ultrastrukturalne sugerują, że konsumpcja PP może stanowić dla larw *G. mellonella* czynnik stresowy na poziomie komórkowym. Jednak gatunek ten posiada efektywne mechanizmy adaptacyjne (autofagię, wakuolizację), które umożliwiają osobnikom przetrwanie przy podaży PP i zabezpieczenie się przed zmianami nekrotycznymi. Analiza wpływu diety opartej na PP na ultrastrukturę głównych organelli *G. mellonella* stanowiło podstawę dla dalszych analiz, w których skupiono się na wpływie PP na procesy śmierci komórkowej, czy na zmiany poziomu ROS w komórkach, a tym samym na ewentualnej aktywacji stanu stresu oksydacyjnego.

W celu analizy silnie kwaśnych struktur wewnątrzkomórkowych oraz lipidów wykorzystano metody jakościowe - mikroskopię konfokalną (barwienie LysoTracker Red oraz barwienie odczynnikami BODIPY). Do oceny żywotności komórek zastosowano metody ilościowe - cytometrię przepływową (zestaw Muse Count & Viability Kit). W obrębie jelita środkowego, mikroskopia konfokalna potwierdziła obserwacje mikroskopii elektronowej. Zaobserwowano wzrost liczby struktur autofagicznych jako struktur silnie kwaśnych, przy czym wzrost intensywności emitowanych sygnałów z nich pochodzących był widoczny wraz ze wzrostem czasu ekspozycji na PP. W grupach G0-C i G0-S nie stwierdzono istotnych różnic. W obrębie gruczołu przedniego, mikroskopia konfokalna także wykazała wzrost sygnałów emitowanych przez silnie kwaśne organella w grupie G0-24, jednak w grupie G0-48, nastąpił spadek intensywności tych sygnałów. W grupach

G0-C i G0-S nie stwierdzono istotnych różnic. W przypadku ciała tłuszczowego wraz ze wzrostem czasu ekspozycji na PP także dochodzi do zwiększenia intensywności autofagii. Wykazano niewielki wzrost poziomu sygnałów emitowanych przez kwaśne struktury w grupie G0-S. Analiza z wykorzystaniem cytometrii przepływowej zobrazowała wysoki poziom żywotności komórek w grupach kontrolnych wszystkich analizowanych narządów. W obrębie ciała tłuszczowego oraz gruczołu przedniego zaobserwowano istotny spadek żywotności w grupach G0-48 w porównaniu z grupami G0-C i G0-S. Zależności tej nie wykazano dla jelita środkowego, a więc w tym narządzie poziom żywych komórek w grupie G0-24 był wyższy niż w grupie G0-C, natomiast w grupie G0-48 był zbliżony do grupy G0-C. Odsetek żywych komórek w grupie G0-S nie różnił się od grupy G0-C w przypadku gruczołu przedniego. Natomiast w jelicie środkowym i ciele tłuszczowym odsetek ten w grupie G0-S był zbliżony do grupy G0-24, nie zaś do G0-C. Uzyskane wyniki wskazują na złożoną, wysoce specyficzną dla danej tkanki reakcję larw *G. mellonella* na stres indukowany dietą opartą na PP. Dane literaturowe podkreślają, że spożycie plastiku ma wpływ na organizmy i może prowadzić do: stresu oksydacyjnego (spowodowanego nadmierną produkcją ROS), zmian w obrębie metabolizmu lipidów, zaburzeń w ich funkcjonowaniu, a także do aktywacji procesów związanych z autofagią (Kadac-Czapska i in., 2024; Kovacs i in., 2025; Wang i in., 2025). Otrzymane wyniki zarówno z analiz jakościowych, jak i ilościowych potwierdzają te doniesienia, ukazując zmiany mające miejsce po spożyciu PP.

Zgodnie z hipotezą badawczą **H2**, w obrębie wszystkich badanych organelli zaobserwowano wzrost intensyfikacji autofagii, co przyczynia się do detoksykacji tych narządów po spożyciu PP. Jelito środkowe stanowi pierwszą barierę kontaktu ze spożytym ksenobiotykiem (w tym przypadku PP), z tego powodu jest miejscem, w którym reakcje na uszkodzenia zachodzą w pierwszej kolejności. Zarówno mikroskopia konfokalna, jak i elektronowa wykazały w obrębie jelita środkowego wzrost liczby struktur autofagicznych i nasilenie emitowanych sygnałów kwaśnych organelli wraz z czasem ekspozycji na PP. Warte uwagi są również wyniki z cytometrii przepływowej, które ukazują niski odsetek martwych komórek. Wyniki te wraz z wynikami z analiz jakościowych sugerują, że w obrębie jelita środkowego dochodzi do silnej aktywacji autofagii, która zabezpiecza przed nekrozą. Z uwagi na to, można wnioskować, że autofagia w jelicie środkowym pełni funkcję silnie cytoochronną i adaptacyjną.

Silnie ochronna rola autofagii w jelicie środkowym, połączona z wysoką żywotnością komórkową wskazuje, że jelito jest narządem najbardziej chronionym ze wszystkich badanych. Zatem zgodnie z założeniem hipotezy badawczej **H3**, jelito środkowe *G. mellonella* może być traktowane jako narząd, w którym zmiany cytotoksyczne zachodzą najintensywniej, w celu ochronnym. Jak wiadomo, autofagia służy eliminacji m.in. uszkodzonych organelli, a to chroni komórki przed wejściem na szlak apoptozy czy nekrozy (Klionsky i Emr, 2000; Franzetti i in., 2012; Gunay i Goncu, 2021). Ciało tłuszczowe pełni głównie funkcję centrum metabolicznego i energetycznego u *G. mellonella*. W tym narządzie także zaobserwowano wzrost autofagii, jednak towarzyszył mu również znaczny spadek żywotności komórek, szczególnie w grupie G0-48 w porównaniu do grup kontrolnych. Podobne wyniki zaobserwowano także w innych danych literaturowych, gdzie wykazano, że spożywanie polimerów tworzyw sztucznych powoduje zaburzenie rezerw lipidowych (Zheng i in., 2024). Niewielki wzrost sygnałów emitowanych przez silnie kwaśne struktury obserwowany w grupie G0-S może być fizjologiczną odpowiedzią na brak pożywienia (lipofagia). Odsetek żywych komórek w grupie G0-S był jednak na wysokim poziomie, co zaprzecza hipotezie, jakoby deficyt żywieniowy mógł być odpowiedzialny za zmniejszoną żywotność komórek. Zatem ta zmniejszona żywotność komórek jest następstwem spożytego PP. Gruczoł przedny jest narządem, który nie jest w sposób bezpośredni zaangażowany w proces trawienia. Mikroskopia konfokalna wykazała początkowy wzrost sygnałów kwaśnych organelli (G0-24), po których nastąpił spadek ich intensywności w grupie G0-48. Analiza cytometryczna także wykazała spadek żywotności komórek w grupie G0-24 i G0-48. Sugeruje to, że w obrębie gruczołu przedniego mechanizmy obronne nie działają tak efektywnie jak w przypadku jelita środkowego. Początkowe nasilenie autofagii i zwiększenie sygnałów pochodzących od silnie kwaśnych struktur (po 24 h eksperymentu), mają chronić komórki narządu przed negatywnym skutkiem spożycia PP, jednak po 48 godzinach mechanizmy te stają się niewystarczające. W przypadku gruczołu przedniego, podobnie jak w przypadku ciała tłuszczowego, nie wykazano różnic w żywotności między grupą głodzoną (G0-S) a kontrolną (G0-C). Fakt ten wyklucza wpływ braku pokarmu na przeżywalność komórkową. Tak więc, podsumowując porównanie żywotności komórek z aktywacją autofagii, można stwierdzić, że przeprowadzone analizy ilościowe i jakościowe wykazały, że cytoochronna rola autofagii jest najskuteczniejsza w jelicie środkowym, w porównaniu z pozostałymi badanymi narządami. Wzrost liczby martwych komórek po 48 godzinach spożywania PP może być

jednak wywołany innymi czynnikami niż PP, a mianowicie fizjologicznymi zmianami zachodzącymi w ciele larw przed wejściem w stadium poczwarki. Badania, jak wspomniano wcześniej, prowadzono na ostatnim 7. stadium, trwającym około 8 dni (Desai i in., 2019; Wojda i in., 2020). Ważne więc było przeprowadzenie dalszych analiz związanych z analizą aktywacji konkretnego typu śmierci komórkowej, czego dotyczyły badania omawiane w kolejnej publikacji (Mermer i in., 2026).

W obrębie niniejszej publikacji opisano i omówiono także wyniki związane ze zmianami poziomu reaktywnych form tlenu w komórkach badanych narządów, co związane było z weryfikacją hipotezy badawczej **H4**. W tym celu wykorzystano techniki mikroskopii konfokalnej (barwienie odczynnikiem DHE) oraz cytometrii przepływowej (Muse Oxidative Stress Kit). Mikroskopia konfokalna w obrębie jelita środkowego wykazała występowanie sygnałów emitowanych przez komórki ROS+ wzdłuż całej jego długości, a także na całej powierzchni ciała tłuszczowego i gruczołu przedniego we wszystkich badanych grupach. Cytometria przepływowa potwierdziła obserwację mikroskopii konfokalnej. W jelicie środkowym poziom komórek ROS+ wzrósł w grupie G0-24, a następnie po 48 h eksperymentu spadł, przy czym poziom komórek ROS-pozytywnych był najniższy w grupach G0-C i G0-S. W gruczole przednim w obrębie grup G0-C, G0-S i G0-24 nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic, natomiast w grupie G0-48, poziom komórek ROS+ był najniższy. W przypadku ciała tłuszczowego, w grupach G0-S, G0-24 i G0-48, poziom komórek ROS+ był niższy niż w grupie G0-C. Analiza jakościowa i ilościowa poziomu komórek ROS+ ukazuje zróżnicowaną, odpowiedź w poszczególnych narządach. Wyniki te korelują z danymi literaturowymi, sugerującymi, że jelito środkowe jest najbardziej wrażliwe na ksenobiotyki (Leonard i in., 2009; Janek i in., 2019). Tak więc wyniki badań przeprowadzonych na *G. mellonella* wyraźnie wskazują, że jelito jako narząd pierwszego kontaktu, jest najbardziej narażone na uszkodzenia powodowane spożywanymi cząstkami tworzyw polimerowych i zachodzące w obrębie niego zmiany są najintensywniejsze. Badania z zakresu stresu oksydacyjnego wskazują, że początkowy wzrost ROS w organizmie narażonym na stres, indukuje enzymy: dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę (CAT), transferazę glutationową (GST). Te neutralizują nadmiar wytworzonych ROS, chroniąc tkankę przed nieodwracalnym uszkodzeniem (Ighodaro i Akinloye, 2018). Z przeprowadzonych analiz wyraźnie widać, że poziom ROS w badanych narządach spadał, a obniżenie poziomu ROS może wskazywać na zmiany zachodzące w mitochondriach, ponieważ mitochondria

są głównym miejscem powstawania ROS (Sarniak i in., 2016). Spadek poziomu komórek ROS+ może więc świadczyć o prawidłowo działających mechanizmach neutralizujących wolne rodniki.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy skłoniły mnie do przeprowadzenia dalszych analiz, których wyniki pozwoliły zweryfikować kolejne hipotezy badawcze.

Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>

W związku z wykazaniem w pierwszej publikacji (Rost-Roszkowska i in., 2024) wyników sugerujących, że u *G. mellonella* po spożyciu PP nie dochodzi do zmian degeneracyjnych w obrębie badanych narządów można wysnuć wniosek, że osobniki te mogą być potencjalnie wykorzystane jako organizmy do biodegradacji tworzyw sztucznych. Brak wyraźnych zmian w kluczowych organellach larw barciaka większego sugeruje, że organizmy te posiadają mechanizmy adaptacyjne, umożliwiające im zachowanie homeostazy komórkowej, nawet przy stałej podaży tworzywa sztucznego, co czyni je obiecującym modelem w badaniach nad biodegradacją tworzyw polimerowych (Bombelli i in., 2017).

W celu dodatkowej weryfikacji hipotezy badawczej **H2** wykonano barwienie ThiolTracker Violet w mikroskopie konfokalnym. Barwienie ThiolTracker Violet jest stosowane do wykrywania grup tiolowych, głównie do określania poziomu komórkowego zredukowanego glutationu (GSH) (Thermo Fisher Scientific) i jest opisywane jako mechanizm detoksykacji organizmu (**H2**). Barwienie ThiolTracker Violet wykazało wzrost poziomu zredukowanego glutationu (GSH) we wszystkich trzech narządach w grupach G0-24, jednak wraz z wydłużającym się czasem spożywania PP pojawił się jego spadek we wszystkich narządach (G0-48). GSH (γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) to przeciwutleniacz, który bierze udział w regulacji przepuszczalności błony mitochondrialnej. Zlokalizowany jest m.in. w mitochondriach (Ribas, 2014). Wysoki poziom zredukowanej formy GSH we wszystkich narządach w grupach G0-24 świadczy o aktywacji systemów obronnych i próbie neutralizacji ROS wytwarzanych w wyniku spożycia PP. GSH pełni funkcje fizjologiczne, ochronne, zabezpiecza komórki przed wolnymi rodnikami (Liu i in., 2022). Późniejszy spadek poziomu zredukowanej formy

GSH w grupach G0-48 może sugerować wyczerpanie jego rezerw i może przyczyniać się do wywołania stresu oksydacyjnego (Lushchak, 2011). Analiza stanu oksydacyjnego organów umożliwia poznanie informacji dotyczących kosztu adaptacji *G. mellonella* do obecności PP jako źródła pokarmu. Uzyskane wyniki wskazują, że choć morfologia tkanek na poziomie ultrastrukturalnym pozostaje relatywnie zachowana, spożycie PP może wpływać na gospodarkę oksydacyjną organizmu.

Dla dogłębnej weryfikacji hipotezy **H4** analizowano w mikroskopie konfokalnym struktury komórkowe wybarwione barwnikiem JC-1, a także poddano je analizie za pomocą cytometrii przepływowej. Obserwacja w mikroskopie konfokalnym z użyciem odczynnika JC-1 wykazała, że w obrębie ciała tłuszczowego i jelita środkowego wzrastała liczba zielonych sygnałów emitowanych przez nieaktywne mitochondria w grupach badawczych. Natomiast w obrębie gruczołu przedniego nie zaobserwowano zmian w emitowanych sygnałach. Wzrost liczby zielonych sygnałów jest związany ze zmianami w potencjale błonowym mitochondriów (Cossarizza i in., 1993). Brak wykazanych zmian w obrębie gruczołu przedniego może sugerować wysoką odporność metaboliczną tego narządu, jego powodem może być inna funkcjonalność organu oraz niższa ekspozycja na PP. Analizy mikroskopii konfokalnej z wykorzystaniem barwnika JC-1 pozwoliły wykazać depolaryzację błon mitochondrialnych w obrębie ciała tłuszczowego i jelita środkowego. Nie odnotowano zmian w gruczole przednim. Porównując wyniki opisanych powyżej badań, można stwierdzić, że wzrost poziomu komórkowego zredukowanego glutationu (GSH) po 24 godzinach od spożycia PP chroni mitochondria, lecz przy dłuższej ekspozycji na PP (G0-48) jego poziom spada, co sugeruje, że jest niewystarczający do ochrony mitochondriów przy dłuższym czasie narażenia na ksenobiotyk (Mari i in., 2009; Kozlov i in., 2024). W badaniach wykorzystano także luminometryczne oznaczanie poziomu ATP w badanych narządach. W przypadku ciała tłuszczowego poziom ATP uległ obniżeniu, w jelicie środkowym obniżenie ATP było statystycznie nieistotne, natomiast w gruczole przednim nie zaobserwowano żadnych zmian w obrębie tego parametru. Stres metaboliczny doprowadza do zmniejszenia poziomu ATP i wzrostu AMP w komórce (Polewska, 2012). Spadek poziomu ATP, szczególnie widoczny w obrębie ciała tłuszczowego, potwierdza, że PP indukuje deficyt energetyczny. Ciało tłuszczowe owadów stanowi centrum metaboliczne, będące odpowiednikiem ludzkiej wątroby i jest wysoce wrażliwe na zaburzenia homeostazy (Arrese i Soulages, 2010). Jednak pomimo obniżenia poziomu

ATP szczególnie w ciele tłuszczowym, stosunek ATP/ADP pozostał stabilny. Stosunek ten stanowi jeden z podstawowych parametrów charakteryzujących status energetyczny komórki.

Te pierwsze wyniki były podstawą do kolejnej, wnikliwej analizy cytotoksyczności pojawiającej się (lub nie) w organizmie po spożyciu tworzyw sztucznych. Wykonano zatem serię badań, aby dokładnie potwierdzić hipotezę badawczą **H5**. W tym celu wykonano analizę z użyciem odczynnika TUNEL w mikroskopie konfokalnym. Test TUNEL wykazał nieznaczny wzrost sygnałów jąder apoptotycznych w grupie G0-48 jelita środkowego na całej długości narządu. Spośród metod ilościowych dla weryfikacji hipotezy **H5**, wykorzystano zestaw Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Muse MultiCaspase Kit oraz Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit. Analizy za pomocą zestawu Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit wykazały najwyższy odsetek wczesnych zmian apoptotycznych w obrębie ciała tłuszczowego. W ciele tłuszczowym i gruczole przednim nie wykazano zmian w liczbie komórek późnoapoptotycznych po ekspozycji na PP. W gruczole przednim odsetek komórek nekrotycznych był najniższy w grupie G0-24, w ciele tłuszczowym odsetek tych komórek najniższy był w grupie G0-48. Nieco inaczej sytuacja wyglądała w jelicie środkowym. W obrębie tego narządu zaobserwowano znaczny wzrost liczby komórek późnoapoptotycznych w grupie G0-S, najwyższy odsetek komórek nekrotycznych występował w grupie G0-24. W przeciwieństwie do jelita środkowego, ciało tłuszczowe i gruczoł przedni wykazały znacznie mniejszą wrażliwość na PP. Analizy za pomocą zestawu Muse MultiCaspase Kit wykazały dla jelita środkowego najniższy odsetek komórek żywych w obrębie grupy G0-48, natomiast w przypadku gruczołu przedniego i ciała tłuszczowego w grupie G0-S. Najwyższy odsetek żywych komórek kaspazo-pozytywnych dla jelita środkowego także wykazano dla grupy G0-48, podczas gdy w ciele tłuszczowym najwyższy był w grupie G0-S. W gruczole przednim nie zaobserwowano zmian w obrębie poszczególnych grup. Wzrost liczby martwych komórek dodatnich pod względem kaspaz dla jelita środkowego był najwyższy w grupach G0-S i G0-48, w ciele tłuszczowym był najwyższy w grupie G0-S, natomiast dla gruczołu przedniego nie zaobserwowano zmian w obrębie poszczególnych grup. Odsetek komórek nekrotycznych w jelicie środkowym był najwyższy w grupie G0-S, natomiast w ciele tłuszczowym i gruczole przednim nie zaobserwowano zmian w poszczególnych grupach. Cytometria przepływowa umożliwiła także przeprowadzenie analizy aktywacji białka Bcl-2 w komórkach wybranych

narządów. Jak wiadomo białko to ma działanie antyapoptotyczne poprzez blokowanie białek proapoptotycznych jak np. Bax, Bak (Adams i Cory, 1998; Youle i Strasser, 2008). Jak się okazuje, w jelicie środkowym w grupie G0-24 oraz w ciele tłuszczowym w grupie G0-48 doszło do wzrostu liczby komórek Bcl-2-pozytywnych, co świadczy o uruchomieniu tego białka w celu ochrony komórek przed śmiercią (Youle i Strasser, 2008). W gruczole przednym nie zaobserwowano żadnych zmian związanych z aktywacją białka Bcl-2. Analizy za pomocą zestawów Muse MultiCaspase Kit oraz Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit dostarczają kluczowych informacji na temat molekularnej regulacji przeżywalności. Białka z rodziny Bcl-2 pełnią funkcję regulatorów szlaków zaangażowanych w apoptozę, hamując lub promując śmierć komórek (Reed, 1999). Obserwowany wzrost liczby komórek Bcl-2-pozytywnych w obrębie grupy G0-24 jelita środkowego i G0-48 ciała tłuszczowego sugeruje uruchomienie mechanizmów antyapoptotycznych. Nadekspresja białek Bcl-2 może hamować kaskadę kaspaz (Vaux i in., 1988; Youle i Strasser, 2008), co wyjaśnia, dlaczego pomimo obecności sygnałów apoptotycznych (reakcja TUNEL), nie dochodzi do masowej degeneracji tkanek. Najwyższy poziom komórek aktywnych pod względem kaspaz w grupie G0-48 w obrębie jelita środkowego, skorelowany z obecnością białka Bcl-2, sugeruje istnienie równowagi pomiędzy sygnałami śmierci komórkowej a przeżyciem organizmu. Dzięki temu zjawisku larwy *G. mellonella* mogą eliminować uszkodzone komórki przy jednoczesnym zachowaniu funkcjonalności organu.

Zastosowanie barwnika CellLight-GFP umożliwiło zaobserwowanie wzrostu siły sygnałów pochodzących z lizosomów wraz ze wzrostem ekspozycji na PP. Pomimo, że w pierwszej pracy wykorzystano barwienie LysoTracker Red, to wykorzystanie CellLight-GFP umożliwiło detekcję już tylko lizosomów aktywowanych w trakcie autofagii (LysoTracker Red barwi wszystkie silnie kwaśne struktury komórkowe). Jelito środkowe jest organem „pierwszego kontaktu” z pożywieniem, jest także głównym organem zaangażowanym w procesy trawienne, dlatego to właśnie tutaj zaobserwowano najbardziej dynamiczne zmiany cytotoksyczne. Zastosowanie testu TUNEL oraz barwienia CellLight-GFP pozwoliło na detekcję wczesnych sygnałów cytotoksycznego wpływu PP i stresu komórkowego. Niewielki wzrost sygnałów apoptotycznych oraz nasilenie aktywności lizosomów, zwiększające się wraz z czasem ekspozycji na PP sugeruje silniejszą autofagię (potwierdzenie wcześniejszych badań) skorelowaną ze

wzmoczoną aktywnością lityczną komórki. Jest to typowa odpowiedź obronna nabłonka jelitowego środkowego owadów na czynniki zewnętrzne (Rost-Roszkowska i in., 2018).

Aby zweryfikować hipotezę **H6**, zastosowano ilościową analizę liczby komórek badanych narządów będących w różnych fazach cyklu komórkowego: G0/G1, S oraz G2/M. W obrębie jelita środkowego zaobserwowano istotny wzrost liczby komórek znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego w grupach badawczych G0-24 i G0-48, w porównaniu do grupy kontrolnej. W przypadku ciała tłuszczowego odsetek komórek znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego był największy w grupie kontrolnej. W ciele tłuszczowym w grupie G0-48 odnotowano znaczny wzrost liczby komórek znajdujących się w fazie G2/M. W obrębie gruczołu przedniego, we wszystkich analizowanych grupach nie zaobserwowano istotnych różnic w ilości komórek znajdujących się w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Wzrost liczby komórek znajdujących się w fazie S w jelicie środkowym (grupy G0-24 i G0-48) wskazuje na wzrost intensywności syntezy DNA, co jest dowodem na aktywację proliferacji komórkowej (hipoteza **H6**). Zwiększenie liczby komórek w fazie S cyklu komórkowego wskazuje na intensyfikację procesów replikacji (Maya-Mendoza i in., 2010), a to na aktywację proliferacji komórek. Jak wiadomo organizm dąży do utrzymania homeostazy w narządach poprzez między innymi zwiększenie intensywności podziałów komórek (Hakim i in., 2010).

Analiza ilościowa cyklu komórkowego jest także istotna dla weryfikacji hipotezy badawczej **H7**, jest bowiem elementem dostarczającym wyniki na zróżnicowaną odpowiedź poszczególnych narządów larw *G. mellonella* z uwagi na spożywany przez organizmy PP. Zróżnicowany rozkład liczby komórek w poszczególnych fazach cyklu w obrębie jelita środkowego i ciała tłuszczowego sugeruje obecność odmiennych mechanizmów obronnych i adaptacyjnych. W przypadku jelita środkowego obserwujemy wzrost liczby komórek znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego. Dodatkowo wcześniejsze analizy potwierdziły aktywację białka Bcl-2 w komórkach jelita środkowego i wzrost poziomu komórkowego zredukowanego glutationu (GSH). Ocena uszkodzeń DNA za pomocą zestawu Muse Multi-Color DNA Damage Kit wykazała wzrost liczby komórek z całkowitymi uszkodzeniami DNA w grupie G0-24, jednak w grupie G0-48 nastąpił ich spadek do poziomu zbliżonego do grupy G0-C. Wynik ten świadczy o możliwości naprawy uszkodzeń wraz ze wzrostem czasu ekspozycji na PP. Omówione wyniki wskazują, że jelito środkowe jest organem, w którym zachodzą

intensywne i efektywne mechanizmy regeneracyjne. Uszkodzenia wywołane spożytym PP są naprawiane dzięki intensywnej proliferacji, hamowaniu zmian nekrotycznych oraz wydzielaniu antyoksydantów, które przeciwdziałają ROS i chronią przed stresem oksydacyjnym. Dodatkowo brak zmian w stężeniu ATP potwierdza energetyczną zdolność do sprostania kosztom naprawy komórkowej. W przypadku ciała tłuszczowego obserwujemy odmienne mechanizmy obronne. Wykazany wzrost liczby komórek w fazie G2/M świadczy o zahamowaniu podziałów mitotycznych. Wzrost liczby komórek w tej fazie często wynika z aktywacji tzw. checkpointu G2/M, który blokuje wejście w mitozę (Lockhead in., 2020). Zabezpieczenie przed wejściem w podział komórkowy może świadczyć o ochronie organu przed powielaniem błędów komórkowych w komórkach potomnych. Mechanizm ten umożliwia komórce naprawę błędów/uszkodzeń przed mitozą. Ocena uszkodzeń DNA za pomocą zestawu Muse Multi-Color DNA Damage Kit, podobnie jak w przypadku jelita środkowego także dostarczyła informacji o wzroście ilości komórek z całkowitymi uszkodzeniami DNA jedynie w grupie G0-24, w grupie G0-48 poziom uszkodzeń wrócił do wartości kontrolnych. Dodatkowo wydzielanie przeciwutleniaczy świadczy o zdolności do zapobiegania uszkodzeniom oksydacyjnym. W świetle wykazanych wyników, ciało tłuszczowe jest narządem, które zabezpiecza się przed negatywnymi skutkami PP i wchodzi w stan przetrwania komórki, zapobiegając powielaniu błędów do komórek potomnych podczas podziałów komórkowych. Zgodnie z obserwacjami innych autorów (Baihetiyaer i in., 2023; Kadac-Czapska i in., 2024) tworzywa sztuczne występujące w naturze mogą powodować nadmierne wytwarzanie ROS, doprowadzając do stanu stresu oksydacyjnego, czego następstwem mogą być uszkodzenia DNA, peroksydacja lipidów czy defekty lizosomalne. W przypadku gruczołu przedniego odnotowano jednak wzrost wydzielania antyoksydantów, które neutralizują ROS, przeciwdziałając wejściu w stan stresu oksydacyjnego. Test za pomocą zestawu Muse Multi-Color DNA Damage Kit nie wykazał wzrostu ilości komórek z całkowitymi uszkodzeniami DNA w grupach eksperymentalnych w porównaniu z grupami kontrolnymi. Brak obserwowanych uszkodzeń oraz zmian w obrębie mitochondriów i na poziomie ATP może wynikać z faktu, iż gruczoł przedni nie jest bezpośrednio zaangażowany w procesy trawienne i mogą na niego działać nieco mniejsze dawki PP niż na pozostałe organy. Dodatkowo, działające mechanizmy obronne zabezpieczają przed zmianami degeneracyjnymi. Biorąc pod uwagę powyższe, nie odnotowano zmian zwyrodnieniowych, nekrotycznych w obrębie badanych organów. PP oddziaływał na komórki narządów *G. mellonella*, jednak każdy z nich wykształcił

mechanizmy, przeciwdziałające negatywnym wpływom tego ksenobiotyku. Zachowana integralność organów dowodzi, że PP nie spowodował istotnych zmian na poziomie zarówno strukturalnym, jak i funkcjonalnym.

Mermer, P., Martyna, F., & Ostróżka, A. (2025). The use of insects, some land and marine invertebrates, in the biodegradation of plastic. *The European Zoological Journal*, 92(1), 1442–1458. <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2580744>

Z uwagi na coraz większy, globalny problem, jakim jest biodegradacja tworzyw sztucznych, naukowcy w celu walki z zanieczyszczeniami plastikiem zaczynają poszukiwać możliwości biodegradacji tworzyw polimerowych przez organizmy żywe. W artykule został ukazany zarys obecnego stanu wiedzy na temat zdolności poszczególnych gatunków do biodegradacji tworzyw sztucznych (takich jak PE, PS, PVC, PUR, PET i PP) ze szczególnym uwzględnieniem *G. mellonella*. W trakcie przeprowadzania badań dotyczących wpływu PP stanowiącego dietę dla gąsienic *G. mellonella* dokonano szczegółowej analizy danych literaturowych związanych z wykorzystaniem różnych organizmów w biodegradacji tworzyw sztucznych występujących w środowisku. Tak więc wyniki badań nad *G. mellonella* zostały przedstawione wspólnie z wynikami dla innych organizmów. W literaturze znaleźć można informacje na temat potencjału biodegradacji w obrębie różnych gatunków bezkręgowców w stosunku do właściwości danego tworzywa sztucznego. Jednak istotne są także zdolności trawienia tworzyw sztucznych przez zwierzęta bezkręgowce z uwagi na obecność mikrobiomu jelitowego bądź wyspecjalizowanych enzymów trawiennych. Wykazano, że zdolności do trawienia tworzyw sztucznych oprócz *G. mellonella* mają takie organizmy jak: *Zophobas morio*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Achroia grisella*, *Corcyra cephalonica*, *Achatina fulica*, *Eisenia fetida*, *Perinereis vancaurica*, *Strongylocentrotus nudus*, *Patiria pectinifera*, *Mizuhopecten yessoensis*. Wcześniejsze analizy opierające się na pomiarach wagi woreczków PP potwierdziły, że larwy barciaka większego są zdolne do trawienia PP. Te obserwacje potwierdzają także inni badacze w swoich publikacjach. Nyamjav i in. (2023) wykazał, że larwy *G. mellonella* są w stanie trawić PP z uwagi na obecność *Bacillus cereus* w swojej mikrobiocie jelitowej. Inny autor Bombelli i in. (2017) wykazał zdolność larw do trawienia polietylenu (PE). Za zdolność do trawienia PE miałby odpowiadać szczep D1 *Enterobacter* sp. (Zhang i in., 2020). Wykazano, że proces

trawienia tworzyw sztucznych zachodzi dwuetapowo: w pierwszej fazie osobniki mechanicznie rozdrabniają plastik poprzez aparat gębowy larw (np. *Z. morio*, *G. mellonella*), a z uwagi na obecność mikrobioty jelitowej następuje w kolejnym etapie enzymatyczna depolimeryzacja. W głównej mierze to właśnie mikrobiota jelitowa umożliwia organizmom trawienie tworzyw polimerowych. Do mikrobiomu, który umożliwia organizmom trawienie tworzyw sztucznych zaliczamy: *Pseudomonas aeruginosa* (Kuan i in., 2022), *Enterobacter* sp. i *Hafnia* sp. (Hafniaceae) (Burgos i in., 2024), *Citrobacter* (Octavia i in., 2023), *Enterobacter* sp. (Yang i in., 2021), *Kluyvera* sp. (Yang i in., 2021) i wiele innych. Dlatego to właśnie mikrobiom jelitowy odgrywa fundamentalną rolę w depolimeryzacji polimerów. Umożliwia on produkcję enzymów, które zdolne są do rozkładu złożonych struktur chemicznych tworzyw polimerowych na mniejsze cząstki. W związku z tym za zdolności do biodegradacji tworzyw sztucznych nie odpowiadają wyłącznie zwierzęta bezkręgowce, ale przede wszystkim ich pula mikrobiologiczna zawarta w przewodzie pokarmowym, zdolna do trawienia polimerów drogą enzymatyczną. Wyniki licznych badań wskazują jednak, że zdolność ta jest obciążona ryzykiem wystąpienia różnego rodzaju efektów toksykologicznych. Zgodnie z naszymi poprzednimi badaniami, a także badaniami innych autorów (Lu i in., 2016; Jin i in., 2018; Baihetiyaer i in., 2023), spożywanie przez osobniki żywe tworzyw sztucznych, może doprowadzać do stanu stresu oksydacyjnego przez nadmierne wytwarzanie ROS, czy nawet do stanów zapalnych. Niezwykle istotną kwestią może być także nie tylko rodzaj spożywanego tworzywa, ale także jego dawka. Zgodnie z koncepcją hormezy, niskie dawki toksycznych ksenobiotyków, mogą wywoływać paradoksalnie zamiast negatywnych, to pozytywne skutki, polegające np. na aktywacji mechanizmów obronnych organizmu (Cutler, 2013). Z uwagi na to, niższy poziom uszkodzeń w obrębie organów narażonych na tworzywa sztuczne, może wynikać właśnie z hormezy i w tym aktywnego systemu obrony, który uczestniczy w przeciwdziałaniu ROS i ochronie przed stresem oksydacyjnym. Publikacje licznych autorów rzeczywiście wskazują na zdolność organizmów żywych do spożywania polimerów. Jednak nie zawsze proces jest całkowity, czasem plastik jest jedynie zmniejszany do mniejszych cząstek, które w dalszym ciągu mogą funkcjonować w środowisku i zagrażać innym żyjącym organizmom (Peng i in., 2023). Z uwagi na to, konieczne są dalsze badania oceniające zdolności metaboliczne do degradacji tworzyw sztucznych przez poszczególne gatunki. Występujące różnice w zdolności gatunków do trawienia tworzyw polimerowych, jej szybkości czy efektywności mogą wynikać z wielu

czynników biologicznych. Należy podkreślić kilka z nich tj. budowa przewodu pokarmowego, mikrobiom występujący w jelitach (jego skład i ilość), tempo metabolizmu danego gatunku, strategię odżywiania, czy cykl życiowy. Przewagę w biodegradacji plastiku mogą mieć gatunki charakteryzujące się większym zróżnicowaniem mikrobiomu jelitowego pod kątem poszczególnych gatunków bakterii, z uwagi na szerszy wachlarz możliwości wykorzystania enzymów trawiennych, odpowiedzialnych za rozkład plastiku. Z tego powodu coraz więcej badań koncentruje się bardziej na składzie mikrobiologicznym przewodu pokarmowego aniżeli na samym gatunku bezkręgowca podczas analizy jego zdolności do biodegradacji. Dodatkowo ważną kwestią pozostaje sam wpływ tworzyw sztucznych na organizmy je spożywające. Wiele początkowych cech zwyrodnieniowych/ nekrotycznych może nie być widocznych gołym okiem i dla lepszego zrozumienia będzie wymagało bardziej wnikliwych analiz. Takie zmiany mogą wpływać nie tylko na pojedyncze osobniki, ale na całe ekosystemy, zmieniając zdolności adaptacyjne czy reprodukcyjne. Autorzy licznych publikacji wskazują, że długotrwałe spożycie tworzyw polimerowych może mieć negatywny wpływ na poziomie ultrastrukturalnym lub nawet molekularnym (Zheng i in., 2019; Mahmud i in., 2024). Dlatego badania nad potencjalnym wpływem tworzyw sztucznych na organizmy żywe powinny uwzględniać zarówno krótko- jak i długoterminowe skutki. W obliczu licznych, dostępnych badań, można wysnuć wniosek, że liczne zwierzęta bezkręgowce mogą odgrywać istotną rolę w biodegradacji plastiku i znacznie poprawić sytuację z masową nadprodukcją tworzyw sztucznych. Jednak procesy trawienia polimerów są niezwykle złożone i skomplikowane, dlatego należy dokładnie zbadać drogę biodegradacji, w którą zaangażowany jest nie tylko sam organizm, ale także cała jego mikrobiota wydzielająca enzymy trawienne. Następnym kluczowym zagadnieniem jest badanie wpływu spożycia tworzyw polimerowych przez zwierzęta bezkręgowce na ich ultrastrukturę komórkową czy uruchamianie procesów cytotoksyczności, które świadczyłyby o tym, czy produkty rozkładu danego tworzywa są szkodliwe, czy nie. W tym celu niezbędna jest analiza zarówno krótko- jak i długotrwałego wpływu spożycia tworzyw sztucznych na osobniki żywe, a tym samym na całe ekosystemy, do których należą. Pełne zrozumienie tych kluczowych mechanizmów może doprowadzić do bezpiecznego, biotechnologicznego rozwiązania problemów zanieczyszczenia środowiska tworzywami sztucznymi z wykorzystaniem organizmów żywych do biodegradacji.

8. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań mających na celu zweryfikowanie hipotez badawczych przedstawionych na wstępie niniejszego autoreferatu wyciągnięto następujące wnioski:

1. Zgodnie z hipotezą badawczą H1, wykazano, że spożycie przez larwy *G. mellonella* polipropylenu (PP) wywołuje zmiany na poziomie ultrastruktury komórki. Analiza w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) potwierdziła wzrost liczby struktur autofagicznych (autofagosomy, autolizosomy, ciała resztkowe) oraz liczby wakuol w komórkach badanych narządów.
2. Potwierdzono hipotezę badawczą H2. Po spożyciu PP dochodzi do aktywacji procesów detoksykacji komórkowej. Zaobserwowano wzrost intensywności autofagii i zwiększenie wakuolizacji komórki. Autofagia stanowi mechanizm przetrwania i spełnia rolę cytoochronną względem komórki, tworzy również strategię przetrwania, usuwając uszkodzone struktury i chroniąc komórki przed wejściem w nekrozę. W badanych narządach obserwowano także wzrost poziomu komórkowego zredukowanego glutationu (GSH). Jego obecność umożliwia neutralizację reaktywnych form tlenu (ROS). A zachowanie równowagi pomiędzy przeciwutleniaczami a ROS jest niezbędne do zachowania homeostazy organizmu.
3. Jelito środkowe jako narząd stanowiący pierwszą barierę dla PP, podlega najintensywniejszym zmianom cytotoksycznym, stanowi to potwierdzenie hipotezy badawczej H3. W obrębie tego organu zaobserwowano wzrost struktur autofagicznych, wakuolizację komórki i nasilenie sygnałów emitowanych z kwaśnych organelli.
4. Analizy dotyczące zmiany potencjału błony mitochondrialnej wykazały w ciele tłuszczowym i jelicie środkowym wzrost sygnałów emitowanych przez zdepolaryzowane, nieaktywne mitochondria. Istotnie statystyczny spadek stężenia ATP po spożyciu PP, obserwowano jedynie w ciele tłuszczowym. Stosunek ADP/ATP we wszystkich narządach był porównywalny do wartości kontrolnych. Dla jelita środkowego wykazano niewielki wzrost sygnałów emitowanych przez komórki ROS+. Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę badawczą H4, zgodnie z którą spożywanie PP przez larwy *G. mellonella*

wpływa na zmiany aktywności mitochondrialnej, poziomu ATP oraz ilości ROS.

5. Zgodnie z hipotezą badawczą H5, wykazano wzrost intensywności apoptozy wynikającej z konsumpcji PP, które świadczą o aktywacji procesów śmierci komórkowej. Jednak nadekspresja białka Bcl-2 doprowadza do hamowania kaskady kaspaz. Pozwala to na eliminację uszkodzonych komórek bez oznak nekrotycznych.
6. Zgodnie z hipotezą badawczą H6, wykazano, że PP wpływa na zmiany cyklu komórkowego w obrębie jelita środkowego i ciała tłuszczowego. W jelicie środkowym obserwowano wzrost liczby komórek znajdujących się w fazie S cyklu komórkowego, świadczący o wysokiej aktywności proliferacyjnej komórki. Natomiast w ciele tłuszczowym wzrost liczby komórek obserwowano w fazie G2/M. Gruczoł przedny nie wykazywał różnic w ilości komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego, wyniki grup eksperymentalnych były zbliżone do wyników grup kontrolnych.
7. W celu ochrony komórek poszczególnych narządów dochodzi do aktywacji odmiennych mechanizmów obronnych. Reakcja analizowanych narządów na PP zależy od pełnionej funkcji w organizmie. **Jelito środkowe** jest organem pierwszego kontaktu z PP i jest bezpośrednio zaangażowane w jego rozkład. Uszkodzenia komórkowe tworzone przez spożyty PP są niwelowane poprzez nasilenie autofagii, a także poprzez zwiększenie syntezy DNA w komórkach. Obecność PP w diecie prowadzi do wzrostu poziomu ROS, depolaryzacji mitochondriów oraz zwiększenia sygnałów apoptotycznych. Jednak silna aktywacja białek antyapoptotycznych Bcl-2 doprowadza do hamowania procesów nekrotycznych. W celu neutralizacji ROS dochodzi do nasilenia wydzielania przeciwutleniaczy. Organizm w odpowiedzi na ksenobiotyki doprowadza do nasilenia proliferacji komórek, co umożliwia zastępowanie uszkodzonych komórek nowymi. Brak spadku poziomu ATP wskazuje na zdolność pokrycia wydatków energetycznych na procesy naprawcze. Odminną strategię ochronną obserwowano w **ciele tłuszczowym**, stanowiącym centrum metabolizmu energetycznego i detoksykacji. W jego obszarze odnotowano wyraźny spadek ATP. W odróżnieniu od jelita środkowego, w obrębie ciała tłuszczowego nie obserwowano zwiększenia odsetka komórek w fazie S, tylko w fazie G2/M. Wzrost liczby komórek w

fazie G2/M może świadczyć o reakcji obronnej organu, chroniąc przed replikacją uszkodzonego DNA. Z wykonanych analiz wynika, że jelito środkowe jest w stanie bardziej efektywnie doprowadzać do regeneracji, podczas gdy ciało tłuszczowe wchodzi w stan przetrwania i zabezpiecza przed podziałami uszkodzonych komórek. **Gruzoł przedny** nie jest bezpośrednio zaangażowany w proces trawienia, tak więc brak jest wykazanych zmian na poziomie komórkowym, które związane byłyby ze spożywanym PP. Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę badawczą H7, dotyczącą uruchamiania odmiennych mechanizmów w celu ochrony komórek larw *G. mellonella*. Zdolności regeneracyjne jelita środkowego i umiejętności obronne ciała tłuszczowego świadczą o zdolności trawienia tworzyw sztucznych przez *G. mellonella* bez tworzenia zmian zwyrodnieniowych i predysponują ten gatunek do kolejnych badań, a może nawet do użycia jego osobników na skalę globalną.

9. Literatura

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2014. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier Health Sciences.
- Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. Science 281, 1322-1326.
- Aidells B, Lockshin RA, Cullin A-M. 1971. Breakdown of the silk glands of *Galleria mellonella*-Acid phosphatase in involuting glands. Journal of Insect Physiology 17(5), 857-869.
- Ali SS, Elsamahy T, Zhu D, Sun J. 2023. Biodegradability of polyethylene by efficient bacteria from the guts of plastic-eating waxworms and investigation of its degradation mechanism. Journal of Hazardous Materials 443, 130287.
- Alimi OS, Farner Budarz J, Hernandez LM, Tufenkji N. 2018. Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. Environmental Science & Technology 52(4), 1704-1724.

- Allakuliyeva G, Omadov A, Begmatov I, Misekova M, Nurmedova G, Serdarova S, Bashimova A. 2024. The role of red Californian earthworms (*Eisenia fetida*) in polymer waste decomposition. E3S Web of Conferences 563, 03062.
- Anderson MA, Mignat EC. 1970. The number of larval instars of greater wax moth *Galleria mellonella* with characters for identification of instars. Journal of the Georgia Entomological Society 5, 65-68.
- Anguissola S, Garry D, Salvati A, O'Brien PJ, Dawson KA, Hussain S. 2014. High content analysis provides mechanistic insights on the pathways of toxicity induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. PLoS One 9(9), e108025.
- Ansari I, Arora C, Verma A, Mahmoud AED, El-Kady MM, Rajarathinam R, Verma DK, Mahish PK. 2025. A Critical Review on Biological Impacts, Ecotoxicity, and Health Risks Associated with Microplastics. Water, Air & Soil Pollution 236(2), 88.
- Arrese EL, Soulages JL. 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. Annual Review of Entomology 55, 393-411.
- Baehrecke E. 2005. Autophagy: dual roles in life and death? Nature Reviews Molecular Cell Biology 6, 505–510.
- Baihetiyaer B, Jiang N, Li X, He B, Wang J, Fan X, Sun H, Yin X. 2023. Oxidative stress and gene expression induced by biodegradable microplastics and imidacloprid in earthworms (*Eisenia fetida*) at environmentally relevant concentrations. Environmental Pollution 323, 121285.
- Bansal OP. 2026. Microplastics in the Environment: Uptake, Bioaccumulation and Impacts on Plants, Animals and Humans Health: A Review. International Journal of Environment and Climate Change 16 (1), 432-445.
- Barría C, Brandts I, Tort L, Oliveira M, Teles M. 2020. Effect of nanoplastics on fish health and performance: A review. Marine Pollution Bulletin 151, 110791.
- Barrionuevo JMR, Martín E, Galindo Cardona A, Malizia A, Chalup A, de Cristobal RE, Monmany Garzia AC. 2022. Consumption of low-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene materials by larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae), impacts on their ontogeny. Environmental Science and Pollution Research 29, 68132-68142.

- Bilal H, Raza H, Bibi H, Bibi T. 2021. Plastic biodegradation through insects and their symbionts microbes: A review. *Journal of Bioresource Management* 8(4), 95-103.
- Blagosklonny M. 2000. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia* 14, 1502-1508.
- Bombelli P, Howe CJ, Bertocchini F. 2017. Polyethylene biodegradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology* 27(8), 292-293.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72(1-2), 248-254.
- Brancaleone E, Mattei D, Fuscoletti V, Lucentini L, Favero G, Frugis A, Gioia V, Lazzazzara M. 2024. Microplastic in Drinking Water: A Pilot Study. *Microplastics* 3(1), 31-45.
- Brebu M. 2020. Environmental Degradation of Plastic Composites with Natural Fillers- A Review. *Polymers* 12(1), 166.
- Browne MA, Niven SJ, Galloway TS, Rowland SJ, Thompson RC. 2013. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology* 23, 2388-2392.
- Bulak P, Proc K, Pytlak A, Puszka A, Gawdzik B, Bieganski A. 2021. Biodegradation of different types of plastics by *Tenebrio molitor* insect. *Polymers* 13(20), 3508.
- Burgos BR, Morales F, Morales-Vera R, Valdés C, Faundez JY, de Souza EP, Henrique-Silva F, Arencibia AD. 2024. Microbiological and physicochemical approach in the feeding of superworm (*Zophobas morio*) with petroleum-derived polymer diets. *Microorganisms* 12(11), 2118.
- Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Fröhwein U, Schulte-Hermann R. 2000. Programmed Cell Death (PCD): Apoptosis, Autophagic PCD, or Others? *Annals of the New York Academy of Sciences* 926, 1-12.
- Bursch W. 2004. Multiple cell death programs: Charon's lifts to Hades. *FEMS Yeast Research* 5(2), 101-110.
- Cao Y, Klionsky DJ. 2008. New insights into autophagy using a multiple knockout strain. *Autophagy* 4(8), 1073-1075.

- Çelik TA. 2018. Introductory Chapter: Cytotoxicity. In Cytotoxicity. InTech.
- Chae Y, Kim D, Kim SW, An Y. 2018. Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. *Scientific Reports* 8(1), 284.
- Chaudhry G, Zeenia, Safdar N, Begum S, Akim AM, Sung YY, Muhammad TST. 2024. Cytotoxicity assays for cancer drug screening: Methodological insights and considerations for reliable assessment in drug discovery. *Brazilian Journal of Biology* 84, 284409.
- Chipuk J, Green D. 2005. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 268-275.
- Chobotow J, Strachecka A. 2013. Morfologia i funkcje ciała tłuszczowego owadów z uwzględnieniem pszczoły miodnej *Apis mellifera* L. *Medycyna Weterynaryjna* 69, 712-715.
- Clarke PGH. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology* 181, 195-213.
- Cossarizza A, Baccarani-Conti M, Kalashnikova G, Franceschi C. 1993. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 197(1), 40-5.
- Cutler GC. 2013. Insects, insecticides and hormesis: Evidence and considerations for study. *Dose-Response* 11(2), 154-177.
- D'Arcy MS. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International* 43(6), 582-592.
- Desai AV, Siddhapara MR, Patel PK, Prajapati AP. 2019. Biology of greater wax moth, *Galleria mellonella*. On artificial diet. *Journal of Experimental Zoology India* 22, 1267-1272.
- Dickman R. 1933. Studies on the waxmoth *Galleria mellonella*, with particular reference to the digestion of wax by the larvae. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 3(2), 223-246.

- Dmitrieva VA, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV. 2024. What can reactive oxygen species (ROS) tell us about the action mechanism of herbicides and other phytotoxins? *Free Radical Biology and Medicine* 220, 92-110.
- Donepudi M, Sweeney A, Briand C, Grütter MG. 2003. Insights into the Regulatory Mechanism for Caspase-8 Activation. *Molecular Cell* 11(2), 543-549.
- El-Samad LM, Arafat EA, Aamer HA, Abu El-Saad AM, Hassan EH, Ali Al-Dakhil A, Augustyniak M, Aamer NA. 2025. Insights into the pathophysiological, molecular, and ultrastructural alterations induced by cadmium oxide nanoparticle toxicity in the midgut of *Galleria mellonella*. *Scientific Reports* 15, 41452.
- El-Sawaf SK. 1950. The life history of the greater wax moth (*G. mellonella*) in Egypt with special reference to the morphology of the mature larva (Lepidoptera: Pyralidae). *Bulletin de la Societe Fouad 1er d'entomologie* 34, 247-297.
- Ellis JD, Graham JR, Mortensen A. 2013. Standard methods for wax moth research. *Journal of Apicultural Research* 52, 1-17.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35(4), 495-516.
- Fasasi KA, Malaka SLO. 2006. Life cycle and impact of greater wax moth. *Galleria mellonella* L (Lepidoptera: Pyralidae), feeding on stored beeswax. *Nigerian Journal of Entomology* 23(1), 13-17.
- Fernández B, Santos-Echeandía J, Rivera-Hernández JR, Garrido S, Albentosa M. 2020. Mercury interactions with algal and plastic microparticles: comparative role as vectors of metals for the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Hazardous Materials* 396, 122739.
- Foltynowicz Z, Jakubiak P. 2002. Poli(kwas mlekowy) – biodegradowalny polimer otrzymany z surowców roślinnych. *Polimery* 47, 11-12.
- Franzetti E, Huang ZJ, Shi YX, Xie K, Deng XJ, Li JP, Li QR, Yang WY, Zeng WN, Casartelli M, Deng HM, Cappellosza S, Grimaldi A, Xia Q, Feng Q, Cao Y, Tettamanti G. 2012. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis* 17, 305-324.

- Frias JPGL, Nash R. 2019. Microplastics: finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin* 138, 145-147.
- Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology* 1, 214074.
- Galluzzi L, Vitale I, Aaronson S, et al. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation* 25(3), 486-541.
- Gunay B, Goncu E. 2021. Role of autophagy in midgut stem cells of silkworm *Bombyx mori*, during larval–pupal metamorphosis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 108(1), 21832.
- Hakim RS, Baldwin K, Smagghe G. 2010. Regulation of midgut growth, development and regeneration. *Annual Review of Entomology* 55, 593-608.
- Hammer J, Kraak MHS, Parsons JR. 2012. *Plastics in the Marine Environment: The Dark Side of a Modern Gift*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer, New York 220, 1-44.
- Hardie DG. 2011. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & Development* 25(18), 1895-1908.
- Hordyjewska A, Pasternak K. 2005. Apoptotyczna śmierć komórki. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 14(3), 545-554.
- Hosamani V, Hanumantha Swamy BC, Kattimani KN, Kalibavi CM. 2017. Studies on biology of greater wax moth (*Galleria mellonella* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6, 3811-3815.
- Hosseini FS, Asoodeh A, Ostad Movahed S, Makhdoumi A. 2024. An integrated approach for plastic polymer degradation by the gut bacterial resident of superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental Science and Pollution Research International* 31(50), 60359-60370.
- Ighodaro OM, Akinloye OA. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54(4), 287-293.

- Istomina A, Chelomin V, Mazur A, Zhukovskaya A, Karpenko A, Mazur M. 2024. Biodegradation of polyethylene in digestive gland homogenates of marine invertebrates. *PeerJ* 11, 17041.
- Iwański B, Andrejko M. 2022. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych* 71(3), 203-213.
- Janeh M, Osman D, Kambris Z. 2019. Comparative analysis of midgut regeneration capacity and resistance to oral infection in three disease-vector mosquitoes. *Scientific Reports* 9(1), 4556.
- Jin Y, Xia J, Pan Z, Yang J, Wang W, Fu Z. 2018. Polystyrene microplastics induce microbiota dysbiosis and inflammation in the gut of adult zebrafish. *Environmental Pollution* 235, 322-329.
- Jindra M, Sehnal F. 1989. Larval growth, food consumption, and utilization of dietary protein and energy in *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* 35(9), 719-724.
- Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. 2023. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology* 97(10), 2499-2574.
- Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi MLA, Prata MCA, Jorge AOC, Junqueira JC. 2018. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence* 9(1), 383-389.
- Kadac-Czapska K, Ośko J, Knez E, Grembecka M. 2024. Microplastics and Oxidative Stress-Current Problems and Prospects. *Antioxidants* 13(5), 579.
- Kazek M, Kaczmarek A, Wrońska AK, Boguś MI. 2020. *Conidiobolus coronatus* induces oxidative stress and autophagy response in *Galleria mellonella* larvae. *PLoS One* 15(2), e0228407.
- Kerr J, Wyllie A, Currie A. 1972. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-257.
- Kesti SS, Thimmappa SC. 2019. First report on biodegradation of low-density polyethylene by rice moth larvae, *Corcyra cephalonica* (Stainton). *The Holistic Approach to Environment* 9(4), 79-83.

- Khan A, Qadeer A, Wajid A, Ullah Q, Rahman SU, Ullah K, Safi SZ, Tichá L, Skaličková S, Chilala P, Bernatová S, Samek O, Horký P. 2024. Microplastics in animal nutrition: Occurrence, spread, and hazard in animals. *Journal of Agriculture and Food Research* 17, 101258.
- Klionsky DJ, Emr SD. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290(5497), 1717-1721.
- Kourtis N, Tavernarakis N. 2011. Cellular stress response pathways and ageing: intricate molecular relationships. *The EMBO Journal* 30(13), 2520-2531.
- Kovacs K, Bodis J, Vass RA. 2025. Microplastics, Endocrine Disruptors, and Oxidative Stress: Mechanisms and Health Implications. *International Journal of Molecular Sciences* 27(1), 399.
- Kozlov AV, Javadov S, Sommer N. 2024. Cellular ROS and antioxidants: physiological and pathological role. *Antioxidants* 13, 602.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Núñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. 2009. Classification of cell death on basis of morphological, biochemical and molecular criteria. *Cell Death & Differentiation* 16(1), 3-11.
- Kroemer G, Mariño G, Levine B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell* 40(2), 280-293.
- Kuan ZJ, Chan BKN, Gan SKE. 2022. Worming the circular economy for biowaste and plastics: *Hermetia illucens*, *Tenebrio Molitor*, and *Zophobas Morio*. *Sustainability* 14(3), 1594.
- Kumar G, Khan MS. 2018. Study of the life cycle of greater wax moth (*Galleria mellonella*) under storage conditions in relation to different weather conditions. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6(3), 444-447.
- Kundungal H, Gangarapu M, Sarangapani S, Patchaiyappan A, Devipriya SP. 2019. Efficient biodegradation of polyethylene (HDPE) waste by the plastic-eating lesser waxworm (*Achroia grisella*). *Environmental Science and Pollution Research* 26(18), 18509-18519.

- Kwadha CA, Ong'amo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT. 2017. The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Insects* 8(2), 61.
- LeMoine CMR, Grove H, Smith CM, Cassone B. 2020. A very hungry caterpillar: Polyethylene metabolism and lipid homeostasis in larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). *Environmental Science & Technology* 54(22), 14706-14715.
- Leonard EM, Pierce LM, Gillis PL, Wood CM, O'Donnell MJ. 2009. Cadmium transport by the gut and malpighian tubules of *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology* 92(3), 179-186.
- Li W, Zhou J, Xu Y. 2015. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (review). *Biomedical Reports* 3(5), 617-620.
- Liu T, Sun L, Zhang Y, Wang Y, Zheng J. 2022. Imbalanced GSH/ROS and sequential cell death. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 36, 22942.
- Lockhead S, Moskaleva A, Kamenz J, Chen Y, Kang M, Reddy AR, Santos SDM, Ferrell JE. 2020. The Apparent Requirement for Protein Synthesis during G2 Phase Is due to Checkpoint Activation. *Cell Reports* 32(2), 107901.
- Lou Y, Pererva E, Yang S-S, Lu B, Liu B, Ren N, Corvini PF-X, Xing D. 2020. Biodegradation of polyethylene and polystyrene by greater wax moth larvae (*Galleria mellonella* L.) and the effect of co-diet supplementation on the core gut microbiome. *Environmental Science & Technology* 54(5), 2821-2831.
- Lu Y, Zhang Y, Deng Y, Jiang W, Zhao Y, Geng J, Ding L, Ren H. 2016. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish and toxic effects in liver. *Environmental Science & Technology* 50(7), 4054-4060.
- Lushchak VI. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101(1), 13-30.
- Mahmud F, Sarker DB, Jocelyn JA, Sang Q-XA. 2024. Molecular and Cellular Effects of Microplastics and Nanoplastics: Focus on Inflammation and Senescence. *Cells* 13(21), 1788.
- Mallar CNR. 2020. A review on the role of insects and their gut microbiota in plastic biodegradation (Master's thesis). University of Innsbruck.

- Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling* 11, 2685-2700.
- Maya-Mendoza A, Olivares-Chauvet P, Shaw A, Jackson DA. 2010. S phase progression in human cells is dictated by the genetic continuity of DNA foci. *PLoS Genetics* 6(4), e1000900.
- Mermer P, Chajec Ł, Wilczek G, Student S, Wrońska AK, Homa J, Krpec K, Magiera K, Siwek D, Rost-Roszkowska M. 2025. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Scientific Reports* 15, 33911.
- Mermer P, Martyna F, Ostróżka A. 2025. The use of insects, some land and marine invertebrates, in the biodegradation of plastic. *The European Zoological Journal* 92(1), 1442-1458.
- Miao SJ, Zhang YL. 2010. Feeding and degradation effect on plastic of *Zophobas morio*. *Journal of Environmental Entomology* 32, 435-444.
- Mitra B, Das A. 2023. The ability of insects to degrade complex synthetic polymers. *Arthropods - New Advances and Perspectives* Intechopen.
- Naz S, Chatha AMM, Khan NA, Ullah Q, Zaman F, Qadeer A, Khan IM, Danabas D, Kiran A, Skalickova S, Bernatova S, Khan MZ, Horky P. 2024. Unraveling the ecotoxicological effects of micro and nano-plastics on aquatic organisms and human health. *Frontiers in Environmental Science* 12, 1390510.
- Nielsen TD, Hasselbalch J, Holmberg K, Strippel J. 2020. Politics and the plastic crisis: A review throughout the plastic life cycle. *WIREs Energy and Environment* 9, 360.
- Nyamjav I, Jang Y, Park N, Lee YE, Lee S. 2023. Physicochemical and structural evidence that *Bacillus cereus* isolated from the gut of waxworms (*Galleria mellonella* larvae) biodegrades polypropylene efficiently in vitro. *Journal of Polymers and the Environment* 31(10), 4274-4287.
- Octavia B, Rakhmawati A, Rachmani LD, Putra TD. 2023. Low-density polyethylene sheet biodegradation by *Tenebrio molitor* and *Zophobas morio* larvae and metagenome studies on their gut bacteria. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 24(2), 878-886.

- Oliveira M, Almeida M, Miguel A. 2019. A micro (nano) plastic boomerang tale: a never-ending story? *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 112, 196-200.
- Oliveira M, Ribeiro A, Hylland K, Guilhermino L. 2013. Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Ecological Indicators* 34, 641-647.
- Pasparakis M, Vandenabeele P. 2015. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 517(7534), 311-320.
- Peng B-Y, Sun Y, Zhang X, Sun J, Xu Y, Xiao S, Chen J, Zhou X, Zhang Y. 2023. Unveiling the residual plastics and produced toxicity during biodegradation of polyethylene (PE), polystyrene (PS), and polyvinyl chloride (PVC) microplastics by mealworms (*Tenebrio molitor*). *Journal of Hazardous Materials* 452, 131326.
- Peng BY, Chen Z, Chen J, Yu H, Zhou X, Criddle CS, Wu WM, Zhang Y. 2020. Biodegradation of polyvinyl chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Environment International* 145, 106106.
- Peng BY, Su Y, Chen Z, Chen J, Zhou X, Benbow ME, Criddle CS, Wu WM, Zhang Y. 2019. Biodegradation of polystyrene by dark (*Tenebrio obscurus*) and yellow (*Tenebrio molitor*) mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental Science & Technology* 53(9), 5256-5265.
- Peydaei A, Bagheri H, Gurevich L, de Jonge N, Nielsen JL. 2021. Mastication of polyolefins alters the microbial composition in *Galleria mellonella*. *Environmental Pollution* 280, 116877.
- Pitt JA, Trevisan R, Massarsky A, Kozal JS, Levin ED, Di Giulio RT. 2018. Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (*Danio rerio*): A case study with nanopolystyrene. *The Science of the Total Environment* 643, 324-334.
- Polewska J. 2012. Autofagia- mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 66, 921-936.
- Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Wilczek G, Student S, Leśniewska M, Rost-Roszkowska M. 2022. Ovaries and testes of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda) React differently to the presence of cadmium in the environment. *Scientific Reports* 12, 6705.

- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* 283(1), 1-16.
- Ragu Prasath A, Selvam K, Sudhakar C. 2024. Biodegradation of low-density polyethylene film by *Bacillus gaemokensis* strain SSR01 isolated from the guts of earthworm. *Environmental Geochemistry and Health* 46, 159.
- Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. 2012. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments* 70, 4392.
- Reed J. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17, 3225-3236.
- Ren L, Men L, Zhang Z, Guan F, Tian J, Wang B, Wang J, Zhang Y, Zhang W. 2019. Biodegradation of polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *The International Journal of Environmental Research and Public Health* 16(11), 1941.
- Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. 2014. Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology* 5, 151.
- Rost-Roszkowska M, Mermer P, Chajec Ł, Sosinka A, Wilczek G, Student S, Wrońska A, Karnówka O. 2024. Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *The European Zoological Journal* 91(1), 213-234.
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Leśniewska M, Student S. 2020. Effects of short- and long-term exposure to cadmium on salivary glands and fat body of soil centipede *lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda): histology and ultrastructure. *Micron* 137, 102915.
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Leśniewska M, Student S. 2019. Autophagy and apoptosis in the midgut epithelium of millipedes. *Microscopy and Microanalysis* 25(4), 1004-1016.
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymełka A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Skowronek M, Nadgórska-Socha A, Leśniewska M. 2020. Influence of soil contaminated with cadmium on cell death in the digestive epithelium of soil centipede

Lithobius forficatus (Myriapoda, Chilopoda). The European Zoological Journal 87(1), 242-262.

Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulska-Żymelka A, Wilczek G, Skowronek M, Student S, Leśniewska M. 2022. Hazards related to the presence of cadmium in food – Studies on the European soil centipede, *Lithobius forficatus*. Science of the Total Environment 845(1), 157298.

Rost-Roszkowska MM, Janelt K, Poprawa I. 2018. The role of autophagy in the midgut epithelium of Parachela (Tardigrada). Zoomorphology 137(4), 501-509.

Rudnicka KW, Szczęśna E, Miszczyk E, Mikołajczyk-Chmiela M. 2011. Apoptoza i autofagia – mechanizmy i metody detekcji. Postępy Biologii Komórki 38(2), 247-265.

Samsonowska K, Kaszuba A. 2022. Microplastic. Polimery 67(1), 28-33.

Santana RMC, Bitencourt JLD, Andrade MZ, Francisquetti EL, Souza LDA. 2023. Evaluation of composting and vermicomposting in the degradation of HDPE films. Congresso Brasileiro de Polímeros (17.: 2023: Joinville) [Anais (recurso eletrônico)]. São Paulo: ABPol.

Sarkar S, Diab H, Thompson J. 2023. Microplastic Pollution: Chemical Characterization and Impact on Wildlife. International Journal of Environmental Research and Public Health 20, 1745.

Sarniak A, Lipińska J, Tytman K, Lipińska S. 2016. Endogenne mechanizmy powstawania reaktywnych form tlenu (ROS). Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 70, 1150-1164.

Sehnal F. 1966. Critical study of the bionomics and biometrics of the wax moth *Galleria mellonella* reared under different conditions. Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie 174, 53-82.

Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnology Advances 26(3), 246-265.

Shaik HA, Mishra A, Sehnal F. 2017. Silk recycling in larvae of the wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). European Journal of Entomology 114, 61-65.

- Sies H, Berndt C, Jones DP. 2017. Oxidative Stress. Annual Review of Biochemistry 86, 715-748.
- Singh R, Letai A, Sarosiek K. 2019. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. Nature Reviews Molecular Cell Biology 20, 175-193.
- Skowronek P, Wójcik Ł, Strachecka A. 2021. Fat Body-Multifunctional Insect Tissue. Insects 12(6), 547.
- Song Y, Qiu R, Hu J, Li X, Zhang X, Chen Y, Wu WM, He D. 2020. Biodegradation and disintegration of expanded polystyrene by land snails *Achatina fulica*. Science of the Total Environment 746, 141289.
- Stachurek I. 2012. Problemy z biodegradacją tworzyw sztucznych w środowisku. Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Zarządzania Ochroną Pracy w Katowicach nr 1(8), 71-108.
- Swamy BCH. 2008. Bionomics and biometrics of greater wax moth (*Galleria mellonella* L.). Asian Journal of Biological Sciences 3, 49-51.
- Szczyrba E, Gąszczak A, Szczotka A, Pokynbroda T. 2022. Mikrobiologiczna degradacja tworzyw sztucznych. Prace naukowe IICh PAN 26, 49-71.
- Szlezynghier W. 2000. Tworzywa sztuczne, tom 1. Wydawnictwo Oświatowe FOSZE.
- Szostak-Kotowa J. 1997. Biodegradacja termoplastycznych tworzyw sztucznych stosowanych w opakowalnictwie. Zeszyty Naukowe/Akademia Ekonomiczna w Krakowie 487.
- Tang KHD. 2025. Genotoxicity of Microplastics on Living Organisms: Effects on Chromosomes, DNA and Gene Expression. Environments 12(1), 10.
- Thompson RC, Moore CJ, vom Saal FS, Swan SH. 2009. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 364(1526), 2153-2166.
- Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S. 2000. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Journal of Insect Physiology 46(7), 1129-1135.

- Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. 2016. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence* 7(3), 214-229.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-442.
- Wang Z, Wang Y, Zhang J, Feng G, Miao S, Lu R, Tian X, Ye Y. 2025. Antioxidant Intervention Against Microplastic Hazards. *Antioxidants* 14(7), 797.
- Wang Z, Xin X, Shi X, Zhang Y. 2020. A polystyrene-degrading *Acinetobacter* bacterium isolated from the larvae of *Tribolium castaneum*. *Science of the Total Environment* 726, 138564.
- Welden NA. 2020. The environmental impacts of plastic pollution. W: A. Buekens & T. M. Letcher (Red.). *Plastic waste and recycling. Environmental impact, societal issues, prevention, and solutions* 195-222. Academic Press.
- Włodarczyk A, Student S, Rost-Roszkowska M. 2019. Autophagy and apoptosis in starved and refed *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) midgut. *Canadian Journal of Zoology* 97, 294-303.
- Wojda I, Staniec B, Sulek M, Kordaczuk J. 2020. The greater wax moth *Galleria mellonella*: Biology and use in immune studies. *Pathogens and Disease* 78(9), ftaa057.
- Yamada-Onodera K, Mukumoto H, Katsuyaya Y, Saiganji A, Tani Y. 2001. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degradation & Stability* 72(2), 323-327.
- Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annual Review of Immunology* 22, 181-215.
- Yang J, Yang Y, Wu W-M, Zhao J, Jiang L. 2014. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental Science & Technology* 48(23), 13776-13784.
- Yang SS, Ding MQ, He L, Zhang CH, Li QX, Xing DF, Cao GL, Zhao L, Ding J, Ren NQ, Wu WM. 2021. Biodegradation of polypropylene by yellow mealworms (*Tenebrio molitor*) and superworms (*Zophobas atratus*) via gut-microbe-dependent depolymerization. *Science of the Total Environment* 756, 144087.

- Yang Y, Wang J, Xia M. 2020. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating superworms *Zophobas atratus*. *Science of the Total Environment* 708, 135233.
- Yang Y, Yang J, Wu W-M, Zhao J, Song Y, Gao L, Yang R, Jiang L. 2015. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 2. Role of gut microorganisms. *Environmental Science & Technology* 49(20), 12087-12093.
- Yang Y, Yang J, Wu W-M, Zhao J, Song Y, Gao L, Yang R, Jiang L. 2015. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests. *Environmental Science & Technology* 49(20), 12080-12086.
- Youle R, Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 47-59.
- Yusuf AA, Dankwa Ampah J, Soudagar MEM, Veza I, Kingsley U, Afrane S, Jin C, Liu H, Elfakhany A, Buyondo KA. 2022. Effects of Hybrid Nanoparticle Additives in N-Butanol/Waste Plastic Oil/Diesel Blends on Combustion, Particulate and Gaseous Emissions from Diesel Engine Evaluated with Entropy-Weighted PROMETHEE II and TOPSIS: Environmental and Health Risks of Plastic Waste. *Energy Conversion and Management* 264, 115758.
- Zhang J, Gao D, Li Q, Zhao Y, Li L, Lin H, Bi Q, Zhao Y. 2020. Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of the Total Environment* 704, 135931.
- Zheng PC, Li R, Lai KP, Zhang XX. 2024. Biological exposure to microplastics and nanoplastics and plastic additives: impairment of glycolipid metabolism and adverse effects on metabolic diseases. *Environmental Science and Pollution Research* 31(51), 60778-60791.
- Zheng T, Yuan D, Liu C. 2019. Molecular toxicity of nanoplastics involving oxidative stress and DNA damage. *Journal of Molecular Recognition* 32(11), e2804.

10. Prace naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego podstawę rozprawy doktorskiej

Rost-Roszkowska, M., **Mermer, P.**, Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., Wrońska, A., Karnówka, O. (2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. The European Zoological Journal, 91(1), 213–234. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>

IF: 1,4 MNiSW: 140pkt



Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae

M. Rost-Roszkowska, P. Mermer, Ł. Chajec, A. Sosinka, G. Wilczek, S. Student, A. Wrońska & O. Karnówka

To cite this article: M. Rost-Roszkowska, P. Mermer, Ł. Chajec, A. Sosinka, G. Wilczek, S. Student, A. Wrońska & O. Karnówka (2024) Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae, The European Zoological Journal, 91:1, 213-234, DOI: [10.1080/24750263.2024.2308529](https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>



© 2024 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 09 Feb 2024.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 1451



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 8 View citing articles [↗](#)

Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae

M. ROST-ROSKOWSKA^{1*}, P. MERMER¹, Ł. CHAJEC¹, A. SOSINKA¹, G. WILCZEK¹, S. STUDENT^{2,3}, A. WRÓŃSKA⁴, & O. KARNÓWKA¹

¹Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland,

²Faculty of Automatic Control, Electronics and Computer Science, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland,

³Biotechnology Center, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland, and ⁴Polish Academy of Sciences, Museum and Institute of Zoology, Warsaw, Poland

(Received 7 June 2023; accepted 8 January 2024)

Abstract

G. mellonella is a promising species for use in the biodegradation of plastics. It is easy to breed and has high resistance to diverse climatic conditions, which is particularly valuable when considering its potential application in the decomposition of plastics. Thus, it demonstrated the capacity for biodegradation of the most common types of plastics, such as polyethylene (PE) and polypropylene (PP). However, reports on whether consumed plastics or their decomposition products will adversely affect the structure and functioning of the internal organs are rather poor. The studies aimed to determine whether the consumption of PP by a greater wax moth larvae caused any ultrastructural changes in the organs of the animal's body, evaluate the survival rate of the animals, and describe their reproduction. Thus, this study provided an understanding of histological and ultrastructural changes caused, or not caused, by the PP diet. We investigated three organs – midgut, silk gland, and fat body – under PP consumption by *G. mellonella* caterpillars (7th instar larvae). The level of reactive oxygen species (ROS) in selected organs, as well as the ability of larvae to survive and undergo metamorphosis were also examined. The animals were divided into four groups: G0-C, G0-S, G0-24, and G0-48. The research used transmission electron microscopy (TEM), confocal microscopy, and flow cytometry. Our study showed that a diet containing PP did not affect internal organs at the ultrastructural level. Cells in the analyzed organs – midgut, silk gland, and fat body – showed no degenerative changes. An increase in the intensity of autophagy and cell vacuolization was noted, but they probably act as a survival pathway. These observations suggest that the final larval stage of the greater wax moth can potentially be applied in PP biodegradation.

Keywords: Polypropylene biodegradation, ultrastructure, midgut, fat body, autophagy, cell vacuolization

1. Introduction

Numerous xenobiotics in the environment or the consumed food affect the functioning of organisms or cause degenerative changes in their various organs. These changes can often lead to the organism's death (Wilczek et al. 2014; Zaffagnini & Martens 2016; Rost-Roszkowska et al. 2018, 2020a, 2020b, 2021, 2022; Augustyniak et al. 2020; Lipovšek et al. 2022; Ostróżka et al. 2022). Plastics consumed by animals will cause numerous

lethal effects, so cells in their tissues and organs will be damaged (Anguissola et al. 2014; Rodriguez-Seijo et al. 2017; Chae et al. 2018; Pitt et al. 2018; Jäms 2020). Plastics mainly consist of synthetic organic polymers, i.e., polyethylene, polypropylene (PP), polyvinyl chloride (PVC), poly(ethylene terephthalate) (PET), or polystyrene (PS). Numerous additives, such as dyes, stabilizers, and fillers, must also be added to the finished product. Most plastics are non-biodegradable or decompose very slowly.

*Correspondence: M. Rost-Roszkowska, Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, University of Silesia in Katowice, Bankowa 9, Katowice 40-007, Poland. Email: magdalena.rost-roszkowska@us.edu.pl

© 2024 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

Biodegradation occurs as a result of simultaneously operating factors related to the features of the natural environment, the presence of microorganisms, as well as properties of the polymers. Plastic can be degraded into microparticles (<5000 nm in diameter) and further into smaller fragments of nanoparticles (<100 nm in diameter) (Kik et al. 2020). They can accumulate in the soil, air, fresh waters, and marine environment, where they will affect organisms (Barnes et al. 2009; Thompson et al. 2009; Andrady 2011). Nanoplastics can even be transferred through the trophic chain (Andrady 2011; Mattsson et al. 2015; Sharma & Chatterjee 2017). Numerous *in vivo* and *in vitro* studies suggest that nanoparticles enter the body mainly via the alimentary and respiratory systems (Karpeta-Kaczmarek et al. 2016; Cox et al. 2019). Plastics, micro-, and nanoplastics cause significant mortality in animals, both invertebrates and vertebrates (Lee et al. 2013; Rodriguez-Seijo et al. 2017; Sharma & Chatterjee 2017). They damage numerous organs, tissues, cells, cell organelles, and cell membranes (Anguissola et al. 2014; Chae et al. 2018; Pitt et al. 2018) due to activating oxidative stress. Reactive oxygen species (ROS) are produced, causing a decrease in the viability of cells and damage to cell organelles (Azad & Iyer 2014; Schirrinzi et al. 2017).

PP is the second most common plastic material after polyethylene (PE). However, it differs from polyethylene in its ability to decompose (Jeon et al. 2021). Many studies indicate the possibility of using bacteria or fungi in the biodegradation of polyethylene (Yamada-Onodera et al. 2001; Bonhomme et al. 2003; Yang et al. 2014; Park & Kim 2019; Jeon et al. 2021), or polystyrene (Mor & Sivan 2008; Lou et al. 2020; Jeon et al. 2021). Meanwhile, little is known about the use of microorganisms in the biodegradation of PP (Auta et al. 2018; Skariyachan et al. 2018; Jeon et al. 2021). As it turns out, there are also insects whose digestive system contains a specific microbiome that facilitates the digestion of consumed plastics: the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* and tobacco beetle *Lasioderma serricorne* (Coleoptera) (Riudavets et al. 2007), rice mealworm (*Corcyra cephalonica*) (Lepidoptera), Indian meal moth (*Plodia interpunctella*) (Lepidoptera) (Bilal et al. 2021), the lesser wax moth (*Achroia grisella*) (Lepidoptera), superworm *Zophobas atratus* (Coleoptera) (Luo et al. 2021), yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) (Coleoptera) (Brandon et al. 2018; Yang et al. 2018, 2021; Ghatge et al. 2020; Peng et al. 2020), confused flour beetle (*T. confusum*), red flour beetle

(*T. castaneum*) (Bilal et al. 2021) and greater wax moth larvae *Galleria mellonella* (Lepidoptera) (Bombelli et al. 2017; Lou et al. 2020).

G. mellonella are insects characterized by fast growth, high fertility, and a relatively short life cycle. The structure and ultrastructure of different organs in this species were precisely described (Uwo et al. 2002; Büyükgüzel et al. 2013; Poyraz Tinartas et al. 2021). Thus, it is treated as a good model organism for histological, toxicological, biomedical, and microbiological studies before *in vivo* tests are available (Jorjão et al. 2018; Mikulak et al. 2018; Wojda et al. 2020). The caterpillars of the greater wax moth are well-known as a pest of honeycombs (Morse 1978). Due to the similarity of the chemical bonds present in the honeycomb and in polyethylene, the larvae of this species can consume products made of it (Bombelli et al. 2017; Wojda et al. 2020). *In situ* and *in vitro* studies revealed that *G. mellonella* enzymes and intestinal microbiota take part in polyethylene digestion (Bombelli et al. 2017; Khyade 2018; Kong et al. 2019; Lou et al. 2020; Bilal et al. 2021; Cassone et al. 2022). However, there are also reports that larvae of e.g. *G. mellonella* devoid of intestinal microflora successfully break down long-chain fatty acids found in waxes (Kong et al. 2019). It has been suggested that any metabolic mechanisms help caterpillars to obtain energy from polyethylene as a source of food (LeMoine et al. 2020). The participation of their salivary glands in polyethylene degradation was also reported (Peydaei et al. 2020). The microbial community of the digestive system of *G. mellonella* also participates in the degradation of PP (Peydaei et al. 2021). Some studies presented changes that appeared after the consumption of plastics by *G. mellonella* larvae in cells of their various organs, including the digestive system or the fat body (LeMoine et al. 2020; Cassone et al. 2022). However, it is still not known which organelles are targets of plastic degradation and if any survival mechanisms are activated to protect cells/tissues. Transmission electron microscopy enables to provide information if PP particles enter the cytoplasm of cells and are transferred to other organs as well as information regarding their electron density, size, or location (Dreaden et al. 2015; Behzadi et al. 2017). Thus, our research aimed to determine whether PP particles can be transferred into different organs from the midgut epithelium if the consumption of PP by greater wax moth (*G. mellonella*) larvae causes any changes at the ultrastructural level in the organs of the animal's body and to evaluate the survival rate of the animals and describe their reproduction.

Thus, this study provided an understanding of histological and ultrastructural changes caused, or not caused, by the PP diet.

2. Material and methods

2.1. *Galleria mellonella* breeding

Adult specimens of *G. mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae), which were cultured in glass containers with a capacity of 1 liter at $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$, with a humidity of $75 \pm 5\%$ and constant darkness. Adult males and females do not eat food because they have their mouthparts backward. The glass containers contained linen material on which the females laid their eggs. After laying the eggs, adult individuals die. Eggs were placed in 1 L glass containers with a nutrient solution containing honey, powdered milk, wheat flour, bran, and glycerin (Sehnal 1966) because the larvae hatching from the eggs are small (about 1 mm long) and start to feed. Caterpillars of the 7th instar larvae, about 20 mm long (Fasasi & Malaka 2006), were selected for the study. The larvae were still feeding, and their size enabled us to collect them precisely for testing.

2.2. Analysis of survival

To test reproduction and survival, one hundred specimens of the last larval stage were collected and put into the 1 L containers (10 containers, 10 specimens per container). They were fed with PP bags (Sarantis Polska S.A.) *ad libitum* (without nutrient solution) for 4–5 days until pupation (**generation G0-P**). The number of adult specimens (**generation G1-P**) that emerged from pupae in each of 10 containers was counted ($n = 10$). As a control, 100 larvae were harvested and fed *ad libitum* with a standard nutrient solution (10 containers, 10 specimens per 1 container) (**generation G0-C**). Then, after pupation, the number of adults hatched from the pupa was counted ($n = 10$) (**generation G1-C**).

2.3. Experiment

For the evaluation of changes in the organs of the larvae fed with PP bags, individuals from the last larval stage (generation G0) were examined after 24 h and 48 h of the experiment. The last larval stage (L7) of *G. mellonella* lasts for about 7–8 days. However, before the pupation, the shrunk larva becomes inactive, entering the prepupa developmental stage (Fasasi & Malaka 2006; Desai et al. 2019; Wojda et al. 2020; Wronska et al. 2022). It occurs during the last 1–2 days of the L7 stage. Larvae collected on the third day

of the L7 stage were used for the experiment, then they were starved for 24 hours before the experiment to clean the digestive system of food debris and feces and to prevent any effect of previously eaten food. Thus, the experiment was scheduled for 24 (5th day of the L7 stage) and 48 h (6th day of the L7 stage). From the 7th day of the L7 stage, the control larvae gradually enter the prepupa stage. Time of the experiment cannot be longer (here, there was 24 h of fasting +24 h or 48 h of feeding with PP bags), as the changes appearing in the organs could be caused by the natural processes taking place in the development pattern, i.e., entering the pupal stage. The specimens were divided into the following experimental groups (Figure 1) according to experiments conducted on this species (Lou et al. 2020): **G0-C** – the control group, the animals reared in laboratory conditions in glass containers and fed *ad libitum* with the medium described by Sehnal (1966) (see: 2.1. Material); **G0-S** – the animals starved for 48 h **G0-24** – the animals cultured on Petri dishes with pieces of PP bags (3 cm × 3 cm) for 24 h; **G0-48** – the animals cultured on Petri dishes with PP bags (3 cm × 3 cm) for 48 h. Fasting animals (group **G0-S**) allowed checking whether the observed changes were caused by the lack of standard food, which was not provided to the animals during the PP diet. The PP bags that were bought commercially (Sarantis Polska S.A.) were weighed before the experiment and also after 24 hours and 48 hours.

Before the section was performed, the animals were anesthetized with chloroform. The following organs were isolated from animals: the midgut, the fat body, and the silk gland, according to Table I.

2.4. Methods

2.4.1. Light and transmission electron microscopy. Organs isolated from larvae of all experimental groups were fixed, washed, dehydrated, and embedded in epoxy resin (Epoxy Embedding Medium Kit; Sigma) according to the standard protocol described in our previous papers (Rost-Roszkowska et al. 2020b, 2022). After cutting the semi-thin sections (0.8 μm), they were stained with 1% methylene blue in 0.5% borax and examined using an Olympus B×60light microscope. Ultrathin sections (70 nm) after contrasting according to the standard method (Rost-Roszkowska et al. 2020b; Poprawa et al. 2022) were analyzed using the Hitachi H500 transmission electron microscope.

2.4.2. Qualitative analysis – confocal microscopy.

2.4.2.1. Dihydroethidium (DHE) – ROS-positive cell staining. Confocal microscopy was used in the

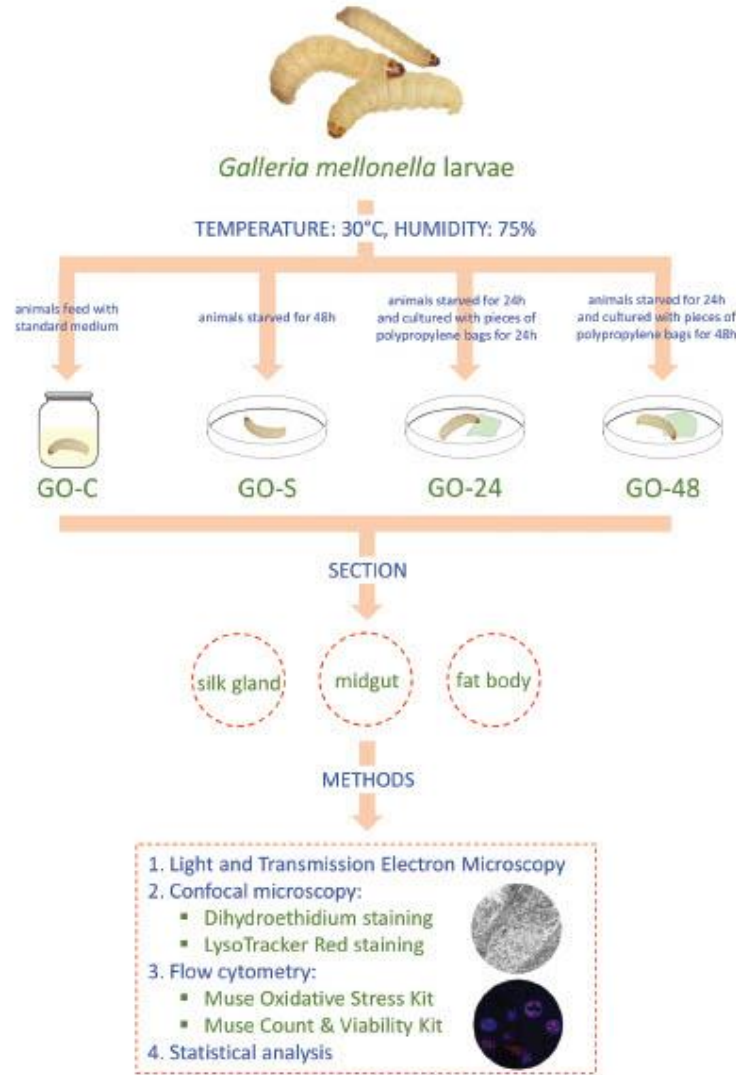


Figure 1. Diagrammatic representation of experiment on *G. mellonella* larvae.

Table I. Numbers of specimens of approximately caterpillars of the 7th larval stage of *G. mellonella* prepared for histological and immunohistological methods.

Experimental groups	TEM and LM	CM (5 specimens for each method, 2 methods)	FC (5 specimens for each method, 3 methods)
G0-C	10	10	15
G0-S	10	10	15
G0-24	10	10	15
G0-48	10	10	15

TEM – transmission electron microscope, LM – light microscope, CM – confocal microscope, FC – flow cytometry.

qualitative analysis of changes and localization of ROS-positive cells in organs (midgut, fat body, silk gland) isolated from *G. mellonella* larvae from groups G0-C, G0-S, G0-24, and G0-48. The isolated organs were subjected to the procedure without fixation (vital analysis). Preparation of the material for analysis was performed according to the procedures described in our previous articles (Rost-Roszkowska et al. 2020a, 2020b). Dihydroethidium (hydroethidine, 5-ethyl-5,6-dihydro-6-phenyl-3,8-diaminophenanthridine) is a dye commonly used to differentiate ROS+ and ROS- cells. It is oxidized by superoxide and is converted to ethidium/

2-hydroxyethidium. The material was incubated with 30 μ M DHE (Invitrogen) and DAPI staining (1 μ g/ml, 30 min, RT, in the dark) and eventually analyzed with an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope diode and argon lasers: 405 nm laser (detection of DAPI) and 559 nm (detection of TMR) (Rost-Roszkowska et al. 2022).

2.4.2.2. LysoTracker Red (LTR) staining – labeling acidic organelles. A red fluorescent dye that selectively accumulates in acidic organelles such as lysosomes and autolysosomes was used in the qualitative analysis. Isolated without fixation, organs (midgut, silk gland, and fat body) were incubated with LysoTracker Red (1 μ g/ml, 30 min, RT, in the dark) followed by DAPI staining (1 μ g/ml, 30 min, RT, in the dark) according to the protocol described by Rost-Roszkowska et al. (2020b) and examined using an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope and argon lasers: 405 nm laser (detection of DAPI) and 559 nm (detection of TMR).

2.4.2.3. BODIPY lipid probes. BODIPY (4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indacene) fluorophore incorporates natural lipids. Organs isolated from animals of all experimental groups without fixation were stained with 20 μ l/ml BODIPY working solution (30 min, RT, in the dark) prepared from BODIPY stock according to producer protocol (Molecular probes). After washing with TBS, the material was stained with DAPI solution (1 μ g/ml, 30 min, RT, in the dark). Organs were examined using an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope and argon lasers: 405 nm laser (detection of DAPI) and 559 nm

2.4.3. Quantitative analysis – flow cytometry. The dissected organs (midgut, fat body, silk gland) isolated from each experimental group were mechanically fragmented and homogenized to obtain the cell suspension according to the procedure presented in our previous paper (Rost-Roszkowska et al. 2020b; Poprawa et al. 2022).

2.4.3.1. Muse oxidative stress kit. Muse Oxidative Stress Kit (Merck Millipore, № MCH100111) enables quantitative analysis of the differentiated population of ROS- and ROS+ cells. The procedure was conducted according to the manufacturer's protocol, and the measurements were performed using the Muse Cell Analyzer (Millipore) (Włodarczyk et al. 2019).

2.4.3.2. Muse count & viability kit. Muse Count & Viability Kit (Merck Millipore, № MCH100102) stains viable (live cells) and non-viable cells (dead

or dying cells). It enables the quantitative analysis of cell count and viability using the Muse Cell Analyzer. The procedure was conducted according to the manufacturer's protocol, and the measurements and data were generated with the Muse Count & Viability Software Module.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed with STATISTICA 13 (software package system, version 13.0, <http://www.statsoft.com>). The significance of differences in the levels of analyzed parameters was assessed using the LSD test. The correlation of parametric values was based on Pearson's regression analysis using the multiple regression model. Results were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. PP bag measurements

After 24 and 48 hours of the experiment, the PP bags showed signs of consumption by the caterpillars (Figure 2(a,b)). Additionally, PP bags were weighed before and after the experiment. The weight of PP bags after 48 h of consumption significantly decreased to 9 mg compared start point, while after 24 hours of consumption weight of PP bags was 6 mg lower than at the beginning of the experiment (Figure 2(c)).

3.2. Analysis of survival of *G. mellonella* larvae fed with PP

Counting adult specimens (G1-C, G1-P experimental groups) that developed from larvae fed with PP bags (G0-P) and standard nutrients (G0-C) showed that the percentage of surviving individuals in both experimental groups was high and comparable (Figure 3).

3.3. Analysis of ROS+/ROS- cells in organs of *G. mellonella* larvae fed with PP

Confocal microscopy showed a slight increase in the strength of signals emitted by positive ROS cells in the midgut after 24 and 48 hours of PP consumption (Figure 4(a,d,g,i)). However, in the silk gland and fat body, the strength of the signals emitted by ROS + cells slightly decreases with increasing consumption of PP (Figure 4(b,c,e,f,h,i,k,l)). No changes were observed between G0-C and G0-S animals.

The quantitative analysis using dihydroethidium (DHE) for *G. mellonella* larvae revealed a diverse distribution of ROS in all experimental groups

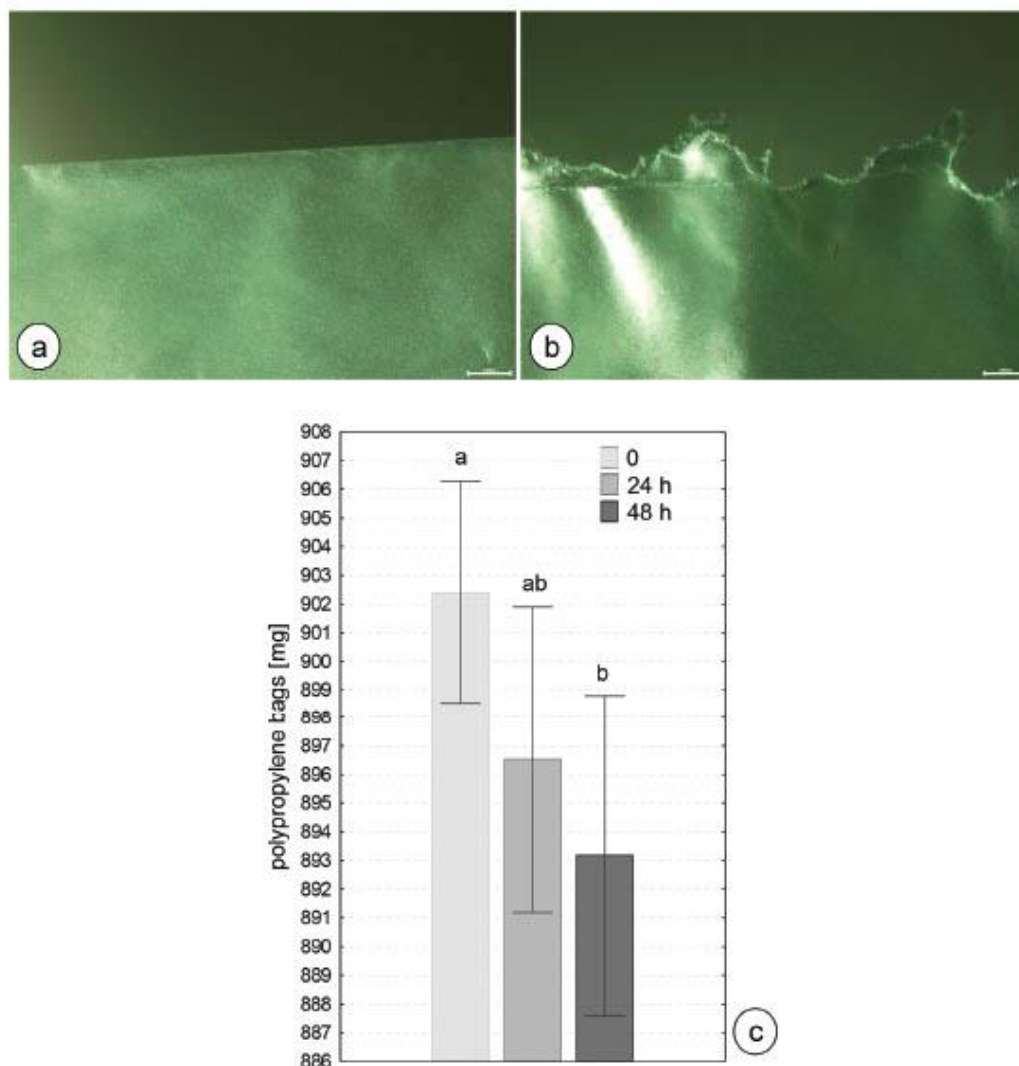


Figure 2. (a) A fragment of the polypropylene bag before the experiment. (b) A fragment of the propylene bag after 48 h of the experiment. (c) Weight of polypropylene bags [mg] (mean $\pm$ SD) in analyzed experiment time points: 0 – start point, after 24 h and 48 h of polypropylene bags consumption. Different letters (a, b) indicate significant differences among groups within organs (Tukey test, $p < 0.05$; $n = 5$).

depending on the period of exposure to PP and type of organ. The quantitative analysis showed $2.6\% \pm 0.19$, $13.0\% \pm 1.65$, and $4.0\% \pm 1.35$ ROS positive cells (ROS+) in the midgut, silk glands, and fat body of control individuals, respectively (Figure 4(m)). After 24 h fed of PP, the percentage of ROS+ cells in the midgut strongly increased, nearly 3-fold compared to the control group ($p = 0.03$), but after 48 h fed on this xenobiotic, the percentage of ROS+ cells in this organ was only 2-fold higher than in the control ($p = 0.61$) (Figure 4(m)). The opposite relationships were

observed for the other organs. After 48 h of PP feeding the number of ROS+ cells in the silk gland was 4-fold lower ($p = 0.001$), while in the fat body nearly 20-fold lower ($p = 0.01$) than in the complementary control group. Generally, the signals from the fat body cells were the weakest, compared with signals from the silk gland and midgut cells after PP exposure. The starvation (G0-S) did not cause a significant change in the number of viable cells in the midguts and silk glands compared with the control group while the percentages of viable cells in the fat body of these specimens were significantly lower

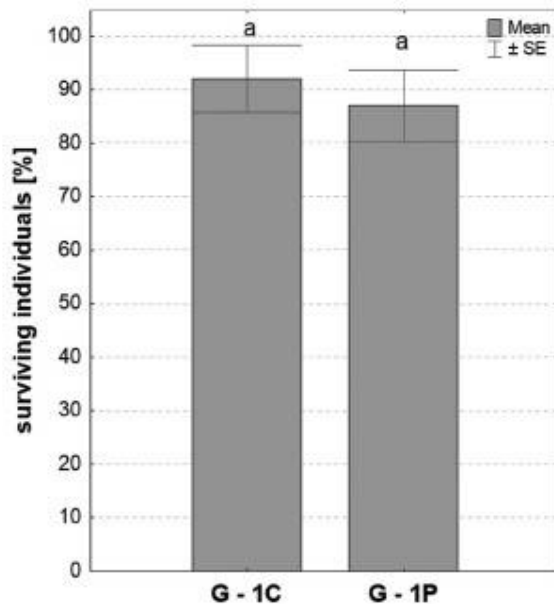


Figure 3. The surviving individuals of generations G1-C and G1-P (mean $\pm$ SE) presented as a percentage of the initial population of the tested insects; same letters (a) indicate homogeneous groups (Student's *t*-test, $p < 0.05$, $n = 10$).

than in control animals ($p = 0.03$) but similar to G0-24 and G0-48 groups (Figure 4(m)).

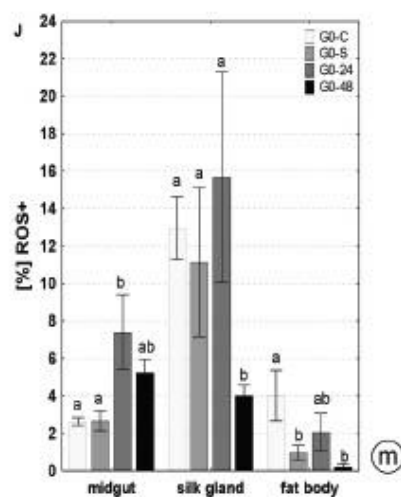
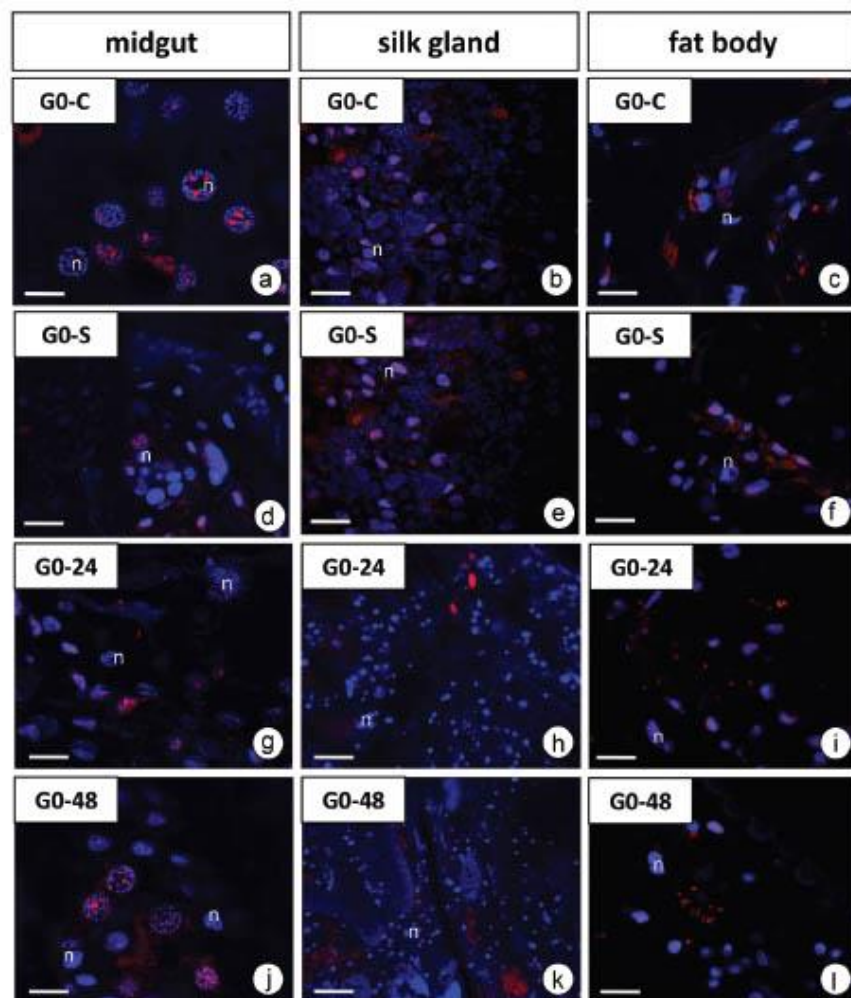
3.4. Ultrastructure of cells in organs of *G. mellonella* larvae fed with PP

3.4.1. Midgut epithelium. In the last instar of *G. mellonella*, the pseudostratified midgut epithelium is formed by digestive cells, goblet cells, regenerative cells (Figure 5(a)), and endocrine cells. In individuals of the G0-C control group, the apical cytoplasm had numerous mitochondria, cisterns of rough endoplasmic reticulum, and single autophagic structures (Figure 5(b,c)). Two types of secretion were observed: merocrine (Figure 5(b)), and apocrine (Figure 5(c)). The perinuclear cytoplasm was rich in mitochondria, cisterns of rough endoplasmic reticulum (RER) and glycogen granules, while only some cisterns of the smooth endoplasmic reticulum (SER) were present (Figure 5(d)). The basal cytoplasm was represented by a well-developed membranous labyrinth, numerous mitochondria, cisterns of RER, and glycogen granules (Figure 5(e)). The main feature of goblet cells was the electron-lucent cavity with distinct cytoplasmic projections possessing mitochondria. The oval nucleus was surrounded by numerous mitochondria, cisterns of RER, and sporadic autophagic structures (Figure 5

(a,f)). The cytoplasm of regenerative cells that form regenerative nidi was poor in organelles (Figure 5(a, g)). Endocrine cells were recognized by numerous droplets with storage material (not shown). In fasted individuals (G0-S group), midgut epithelial cells showed the same ultrastructure as in the control specimens (G0-C group) (Figure 5(h-i)).

In animals from experimental group G0-24, no changes were observed in the cytoplasm of regenerative cells, goblet cells, and endocrine cells. An increase in the number of autophagic structures was observed in the apical cytoplasm of digestive cells, while no other alterations were detected in their cytoplasm (Figure 6(a-c)). In the cytoplasm of digestive cells in the midgut epithelium of animals from the G0-48 experimental group, numerous vacuoles with electron-lucent content appear, and the autophagy is more intense than in the G0-24 experimental group. Degeneration of the remaining organelles in all cytoplasmic regions was not observed (Figure 6(d-f)). Vacuoles and autophagic structures (autophagosomes, autolysosomes, residual bodies) were also detected in the cytoplasm of the goblet (Figure 6(d)) and regenerative cells (Figure 6(g)). No alterations appeared in the cytoplasm of endocrine cells (not shown). Confocal microscopy confirmed the increase in autophagy intensity. Along with the longer consumption of PP, the strength of signals emitted by strongly acidic structures increased (Figure 9(a,d,g,j)).

3.4.2. Silk gland. While the entire silk gland was used for quantitative analysis, the middle region (MSG) of this organ was used for TEM analysis. Cells of MSG in larvae from the G0-C group possessed a cytoplasm rich in cisterns of RER as well as mitochondria. The majority of mitochondria were distended with a small amount of mitochondrial crista and the electron-lucent matrix. The lobular-shaped nucleus was located in the central part of the cell. Some spheres of storage material and sporadic autophagic structures were present (Figure 10). The apical cell membrane formed numerous cytoplasmic projections protruding into the gland lumen (Figure 7(a-b)). The ultrastructure of the cells in MSG in specimens from the G0-S group did not show any differences compared to the controls (Figure 7(c,d)). After 24 h of feeding (G0-24 experimental group) with PP, apart from the numerous autophagosomes observed, no changes at the ultrastructural level were detected (Figure 7(e,f)), while in G0-48 experimental group sporadic vacuoles with electron-lucent content and numerous autophagosomes appeared (Figure 7(g-h)). A confocal microscope revealed an increase in the signals emitted by acid structures in the G0-24



experimental group, while they decreased after 48 h of feeding on PP (Figure 9(b,e,h,k)).

3.4.3. Fat body. The entire cytoplasm of trophocytes which form the fat body in the last instar larva of *G. mellonella* (G0-C) contains large spheres of storage material (Figure 10) with different electron densities. The lobular nucleus contained small amounts of heterochromatin distributed evenly throughout the nucleoplasm. In the vicinity of the nucleus, mitochondria and cisterns of RER and individual autophagic structures could be observed (Figure 8(a-b)). In starved animals (G0-S experimental group) numerous spheres with the heterogenous material were observed (Figure 8(c-d)). Feeding animals with PP bags (G0-24 and G0-48 experimental groups) did not cause any degenerative changes in organelles of trophocytes, but an increase in the number of autophagic structures was detected (Figure 8(e-h)). A confocal microscope revealed a slight increase in the level of signals emitted by acid structures in the G0-S animals, while it was distinct in trophocytes of G0-24 and G0-48 experimental groups (Figure 9(c,f,i,l)).

3.5. Cell count and viability in organs of *G. mellonella* larvae fed with PP

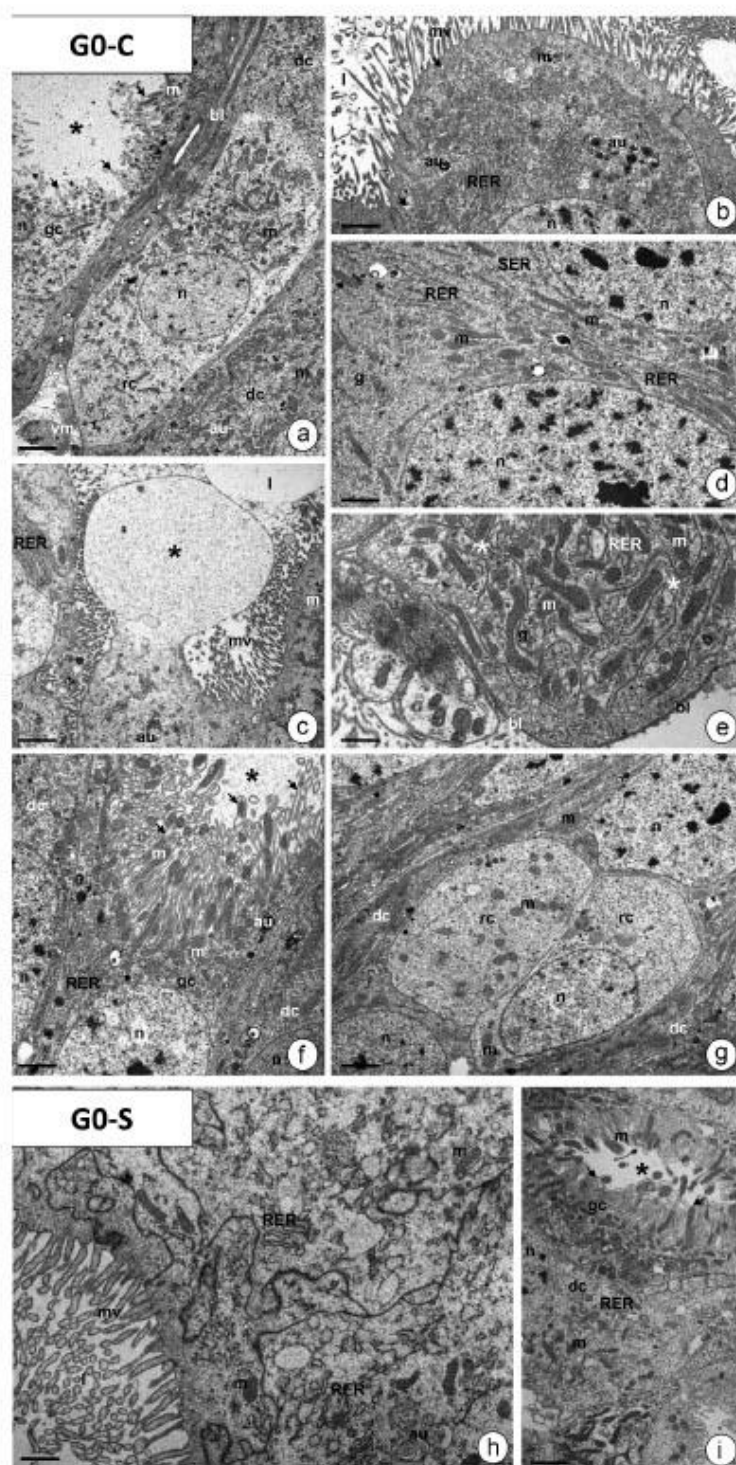
The average percentages of viable cells were high in all analyzed organs of control individuals: midgut ($74.5\% \pm 1.74$), silk glands ($96.6\% \pm 0.64$), and fat body ($94.4\% \pm 0.59$). 48 hours of PP feeding caused a significant decrease in the number of viable cells in the silk gland and fat body compared to the control group (23%, $p = 0.0001$; 65%, $p = 0.0001$), respectively, and exposed for 24 hours (8%, $p = 0.01$; 58%, $p = 0.0001$, respectively) (Figure 11). Exposure to PP per 48 h did not cause a significant change in the number of viable cells in the midgut, while the percentage of viable cells in the midgut of individuals after 24-hour exposure to PP was significantly higher than in the control group (at 18%, $p = 0.0001$) (Figure 11). The starvation (G0-S) did not cause a significant change in the number of viable cells in the silk glands compared with control group, while the percentages of viable cells in the

midguts and fat bodies of individuals were similar to group G0-24 (Figure 11). There were statistically significant correlations between the level of viability cells and the percentage of ROS+ cells in the midgut and fat body in foraging individuals

4. Discussion

Plastics in the environment decompose into micro- and nanoplastics, and such small particles can easily pass through the cellular barrier, which is constituted by cell membranes. Ultrastructural analysis of different nanoparticles reveals that they interact with the cell surface and could enter cells by endocytosis (Behzadi et al. 2017). In the cytoplasm, they resemble electron-dense granules or flocculent-granular patches (Købler et al. 2014; Karpeta-Kaczmarek et al. 2016). Different cell types may react differently to internalize the same NP (Xia et al. 2008; dos Santos et al. 2011). Numerous microorganisms in the digestive system of some animals can break down plastics such as PP, PE, and PS (Bonhomme et al. 2003; Yang et al. 2014; Huerta Lwanga et al. 2018; Auta et al. 2018; Skariyachan et al. 2018; Park & Kim 2019; Lou et al. 2020; Jeon et al. 2021). However, whether these plastics or their decomposition products will induce any changes in the ultrastructure of cells in different organs has not been thoroughly described. In our research, we evaluated, for the first time, the ability of PP-fed larvae to undergo metamorphosis and develop. We found that, regardless of whether *G. mellonella* larvae were fed with a standard diet or with PP bags, the number of adults that developed was comparable. A decrease in the survival of individuals or a decrease in the number of offspring after feeding on plastic has been described in, e.g., soil (Rodriguez-Seijo et al. 2017), marine (Messinetti et al. 2018), and freshwater invertebrates (Rehse et al. 2016; Schür et al. 2019; Huang et al. 2022). Larvae of *T. molitor* are able to survive when they eat polystyrene in comparison to starvation (Yang et al. 2018; Matyja et al. 2020). In addition, the survival rate of animals fed with polystyrene and supplemented with oatmeal was similar to controls (Matyja et al. 2020). It has been reported that adding certain supplements such as proteins or vitamins to the PP

Figure 4. 3D representation of the DHE and DAPI staining of organs in *G. mellonella* larvae. (a-l) Confocal microscope. ROS-positive cells (red), nuclei (n, blue). (a-c) G0-C experimental group. (d-f) G0-S experimental group. (g-i) G0-24 experimental group. (j-l) G0-48 experimental group. (a, i) Scale bar = 11 μ m. (b, e) Scale bar = 26 μ m. (c, f, i, l) Scale bar = 16 μ m. (d, g) Scale bar = 15 μ m. (h, k) Scale bar = 28 μ m. (m) Flow cytometry. Percentage of ROS positive cells (ROS+) (mean $\pm$ SD) in the midguts, silk glands, and fat bodies of *G. mellonella*. Different letters (a, b) indicate significant differences among groups within organs (LSD, $p < 0.05$; $n = 5$).



diet affected the development and growth of larvae in this species (Morales-Ramos et al. 2010; Matyja et al. 2020). Collectively, studies on *T. molitor* demonstrated that changes in the development of polystyrene-fed larvae make it difficult to complete the larval life cycle. This means that *T. molitor* larvae probably are not suitable for use in polystyrene biodegradation (Matyja et al. 2020). However, some research revealed that plastics do not affect the development or survival of invertebrates (Bruck & Ford 2018; Pflugmacher et al. 2020; Scopetani et al. 2020; Weber et al. 2018). Studies on *G. mellonella* showed that a polyethylene and polystyrene diet does not affect the short-term growth of its larvae (LeMoine et al. 2020; Lou et al. 2020). In this study, caterpillars of the greater wax moth were fed only with the PP diet to view changes that could be caused by plastic. Plastic-fed animals did not receive a standard nutrient solution. Therefore, in order to exclude the influence of lack of food on the described processes, we also examined animals completely deprived of food (G0-S group). Because of the fact that larvae could develop normally, we concluded that feeding *G. mellonella* with PP will not damage the cells in the larvae's organs. Thus, we decided to analyze whether any changes appeared in different organs of *G. mellonella* caterpillars that could help elucidate their survival possibility.

The numerous xenobiotics that are toxic to cells and tissues will cause an increase in the level of reactive oxygen species (ROS). While low levels of ROS are required for the proper functioning of cells and numerous cellular mechanisms, high levels of ROS will activate proliferation, cell differentiation, or even cell death (oxidative stress) or the mechanisms leading to their neutralization (Zhou et al. 2014; Oropesa et al. 2017; Tarnawska et al. 2019; Włodarczyk et al. 2019; Rost-Roszkowska et al. 2021, 2022). The number of ROS-positive cells in the *G. mellonella* larvae midgut increased after 24 h of the experiment. After 48 hours, a decrease in the

number of these cells could be observed compared to the 24-hour experiment, but the level was still higher than in the control specimens. In the silk gland, after 24 h, an increase and then a strong decrease in the level of ROS in the cells of this organ were observed. On the other hand, in the fat body, the number of positive ROS cells decreased regardless of the duration of PP consumption. This proves that the midgut is the most sensitive to this xenobiotic or its decomposition products, protecting other internal organs (Leonard et al. 2009; Janeh et al. 2019). The decrease in the level of ROS in the cells of the other two organs may be related to the activation of ROS-neutralizing mechanisms. ROS act as a kind of enhancer, the work of which is to intensify unfavorable changes in cells to provide a faster response from the whole organism. The best example is the activation of several enzyme proteins involved in maintaining cellular energy homeostasis. Thanks to this, it can slow down anabolic processes, while accelerating the secretion of energy in catabolic transformations (Li & Marbán 2010). Changes in the ROS level may indicate changes taking place in cellular organelles, especially mitochondria, nuclei, lysosomes, or Golgi complexes (Sokolova 2004; Auten & Davis 2009; Hödl et al. 2010; Repnik & Turk 2010; Jiang et al. 2011; Faron et al. 2015; Zorova et al. 2018; Rost-Roszkowska et al. 2021). In addition, different organs and their cellular organelles in the animal body may react differently to the same stressor (Rost-Roszkowska et al. 2020a, 2020b, 2022; Dziewiecka et al. 2020; Poprawa et al. 2022). Thus, describing changes in the ultrastructure of different organs in *G. mellonella* larvae fed with PP should explain whether the increase or decrease of ROS-positive cells is connected with degenerative/regenerative processes. The decrease in the ROS level after 48 hours of the experiment may also be associated with intensively occurring autophagy. In all three analyzed organs – midgut, silk gland, and fat body – no degenerative

Figure 5. The midgut epithelium of *G. mellonella* 7th instar larva. (a–g) Control animals (G0–C). TEM. (a) Fragment of the midgut epithelium with digestive cells (dc), goblet cell (gc), and regenerative cell (rc). Mitochondria (m), nuclei (n), goblet cell cavity (star), cytoplasmic projections of the goblet cell (arrows), basal lamina (bl), visceral muscles (vm), autophagic structures (au). Scale bar = 2.9 µm. (b–c) the apical cytoplasm of digestive cells. Microvilli (mv), mitochondria (m), cisterns of RER (RER), nucleus (n), midgut lumen (l), autophagic structures (au), apocrine secretion (star), exocrine secretion (arrows). (b) Scale bar = 1.7 µm. (c) Scale bar = 1.8 µm. (d) Perinuclear cytoplasm in digestive cells. Mitochondria (m), cisterns of RER (RER) and SER (SER), nuclei (n), and glycogen granules (g). Scale bar = 1.4 µm. (e) Basal cytoplasm in the digestive cell with the distinct membranous labyrinth (arrows) surrounded by mitochondria (m), glycogen granules (g), and cisterns of RER (RER). Basal lamina (bl). Scale bar = 0.6 µm. (f) the goblet cell (gc) with the cavity (star) and cytoplasmic projections (arrows) filled with mitochondria (m). Cisterns of RER (RER), autophagic structures (au), nucleus (n), digestive cells (dc). Scale bar = 0.9 µm. (g) a fragment of the regenerative nidi with regenerative cells (rc). Nucleus (n), mitochondria (m), digestive cells (dc). Scale bar = 1.5 µm. (h–i) Fasted animals (G0–S). (h) Fragment of apical regions in digestive cells. Mitochondria (m), cisterns of RER (RER), midgut lumen (l), autophagic structures (au). Scale bar = 0.7 µm. (i) a fragment of goblet cell (gc) with the cavity (star) and cytoplasmic projections (arrows) filled with mitochondria (m). Digestive cell (dc), nucleus (n), cisterns of RER (RER). Scale bar = 1 µm.

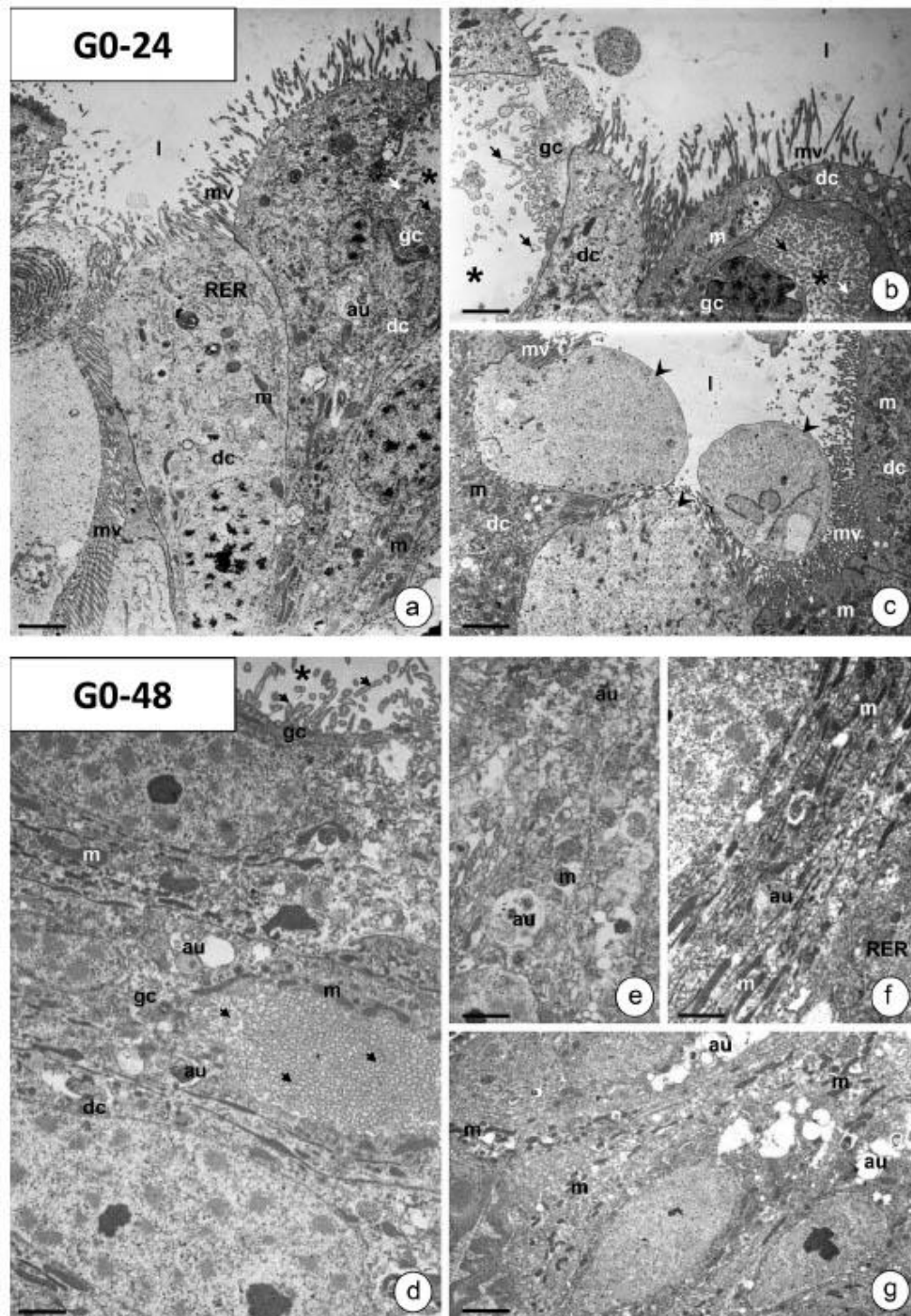


Figure 6. The midgut epithelium of *G. mellonella* 7th instar larva in experimental groups G0-24 (a-c) and G0-48 (d-g). TEM. Digestive cells (dc), goblet cells (gc), mitochondria (m), microvilli (mv), cytoplasmic projections of goblet cells (arrows), cisterns of RER (RER), autophagic structures (au), goblet cell cavity (stars), apocrine secretion arrowhead), midgut lumen (l). (a) Scale bar = 2.3 μ m. (b) Scale bar = 1.9 μ m. (c) Scale bar = 2.9 μ m. (d) Scale bar = 1.1 μ m. (e) Scale bar = 1.5 μ m. (f) Scale bar = 1.3 μ m. (g) Scale bar = 1.7 μ m.

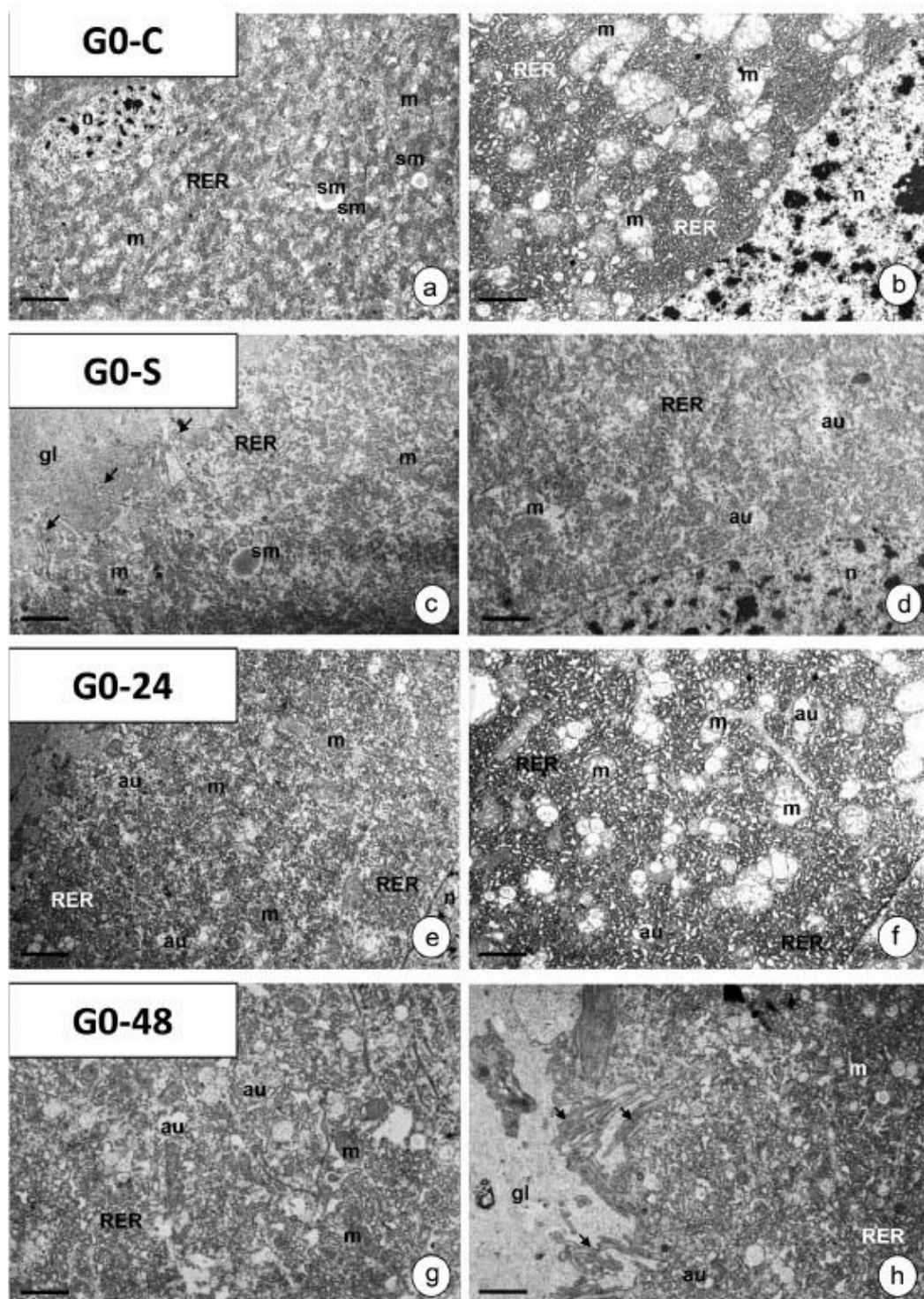


Figure 7. Middle region of silk gland (MSG) in *G. mellonella* 7th instar larva in experimental groups G0-C (a-b), G0-S (c-d), G0-24 (e-f), and G0-48 (g-h). TEM. Mitochondria (m), nuclei (n), cisterns of RER (RER), autophagic structures (au), storage material (sm), cytoplasmic projections (arrows), gland lumen (gl). (a) Scale bar = 3.4 μ m. (b) Scale bar = 1.3 μ m. (c) Scale bar = 1 μ m. (d) Scale bar = 0.8 μ m. (e) Scale bar = 0.9 μ m. (f) Scale bar = 1.1 μ m. (g) Scale bar = 1 μ m. (h) Scale bar = 1.2 μ m.

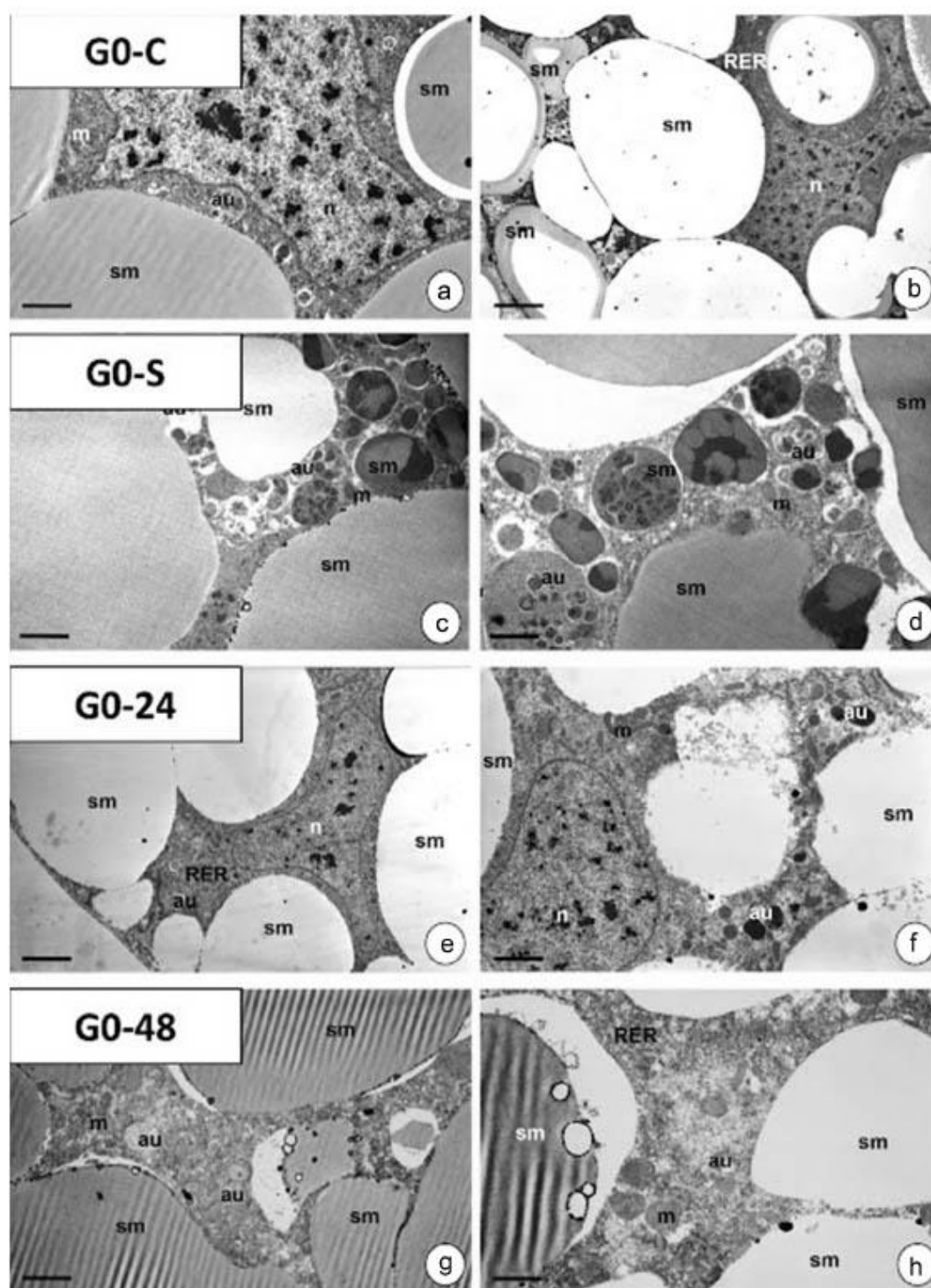


Figure 8. Fat body of *G. mellonella* 7th instar larva in experimental groups G0-C (a-b), G0-S (c-d), G0-24 (e-f) and G0-48 (g-h). TEM. Mitochondria (m), nuclei (n), cisterns of RER (RER), autophagic structures (au), storage material (sm). (a) Scale bar = 1.3 μ m. (b) Scale bar = 3.4 μ m. (c) Scale bar = 1.3 μ m. (d) Scale bar = 1 μ m. (e) Scale bar = 2.2 μ m. (f) Scale bar = 1.4 μ m. (g) Scale bar = 2.4 μ m. (h) Scale bar = 1.2 μ m.

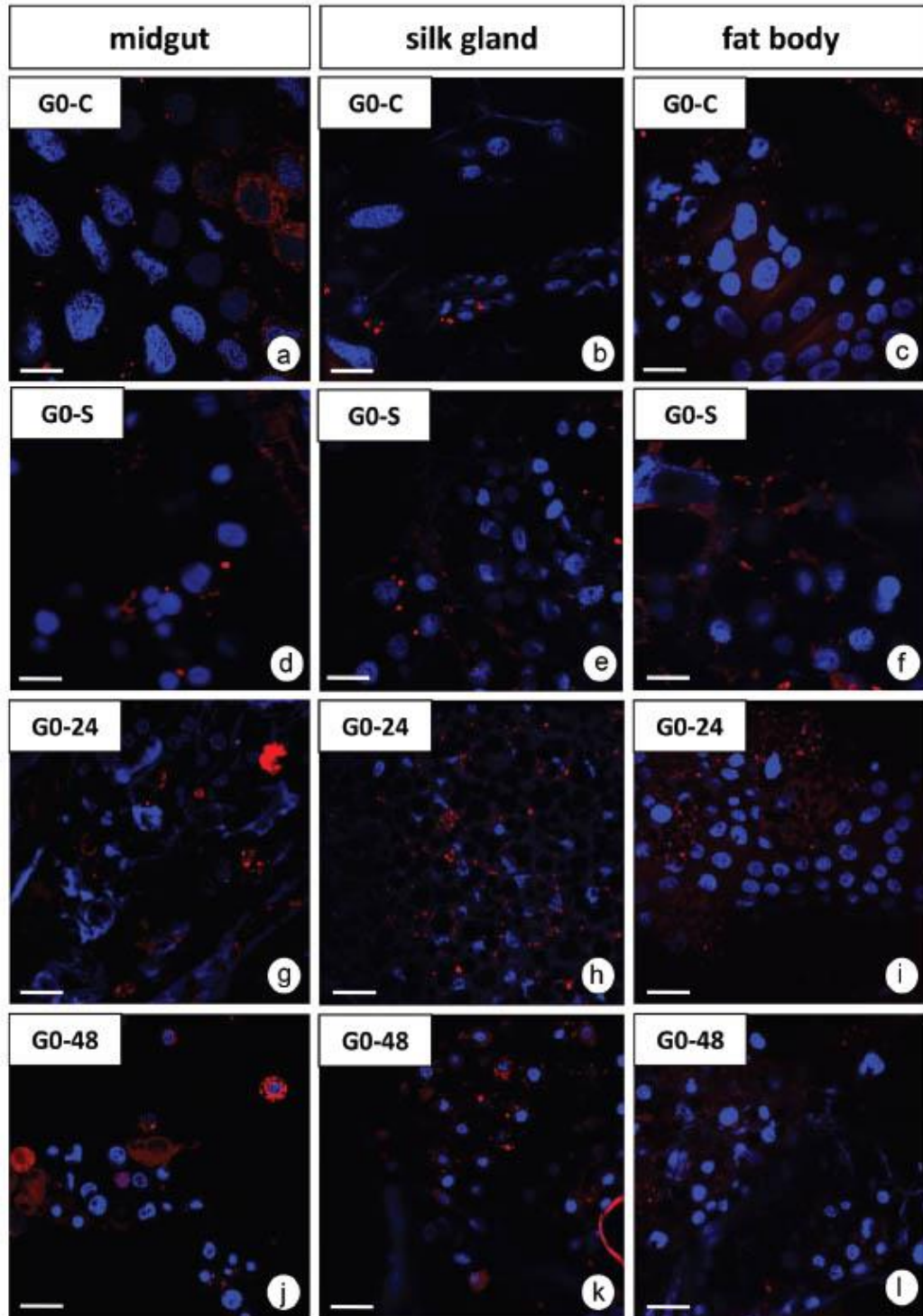


Figure 9. Autophagy in organs of 7th *G. mellonella* larvae: midgut, silk gland, and fat body. 3D representation of the accumulation of lysosomes and autolysosomes (red signals). Nuclei (blue signals). LysoTracker Red and DAPI staining. Confocal microscope. (a-c) G0-C group. (d-f) G0-S experimental group. (g-i) G0-24 experimental group. (j-l) G0-48 experimental group. (a, d) Scale bar = 10 μ m. (b, e) Scale bar = 14 μ m. (c, f) Scale bar = 12 μ m. (g, i, j, l) Scale bar = 13 μ m. (h, k) Scale bar = 18 μ m.

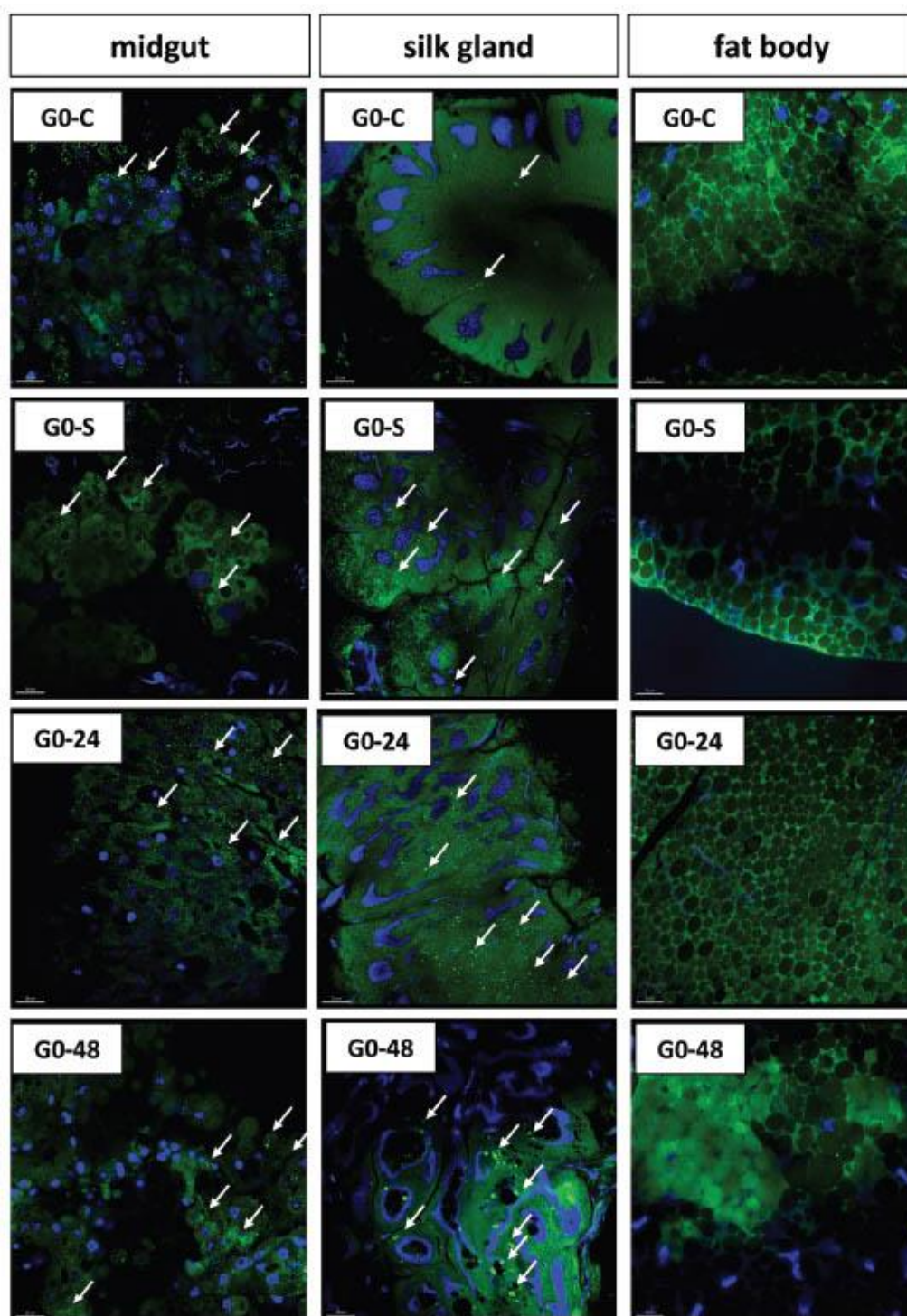


Figure 10. 3D representation of lipid accumulation (green signals, arrows) in organs of *G. mellonella* larvae: midgut, silk gland and fat body. Nuclei (blue signals). BODIPY and DAPI staining. Confocal microscope. G0-C, G0-S, G0-24 and G0-48 represent experimental groups described in methodology. Scale bar = 20 μ m.

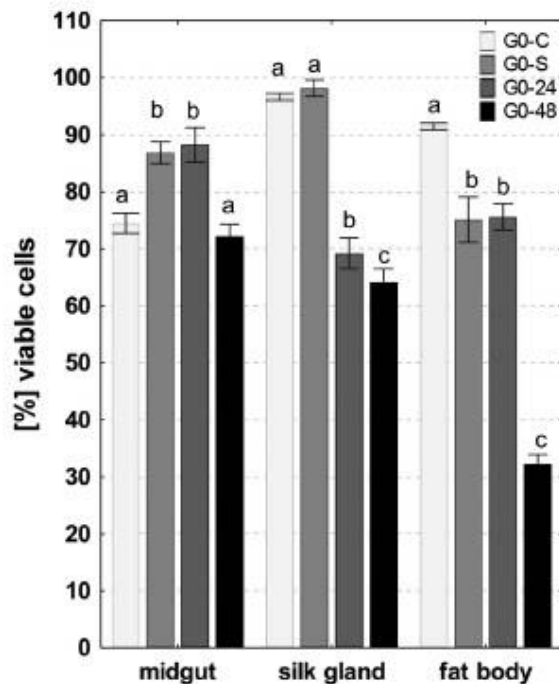


Figure 11. Percentage of viable cells (mean $\pm$ SD) in the midguts, silk glands, and fat bodies of *G. mellonella*. Different letters (a, b, c) indicate significant differences among groups within organs (LSD, $p < 0.05$; $n = 5$). Flow cytometry.

changes in cellular organelles were observed with the prolonged consumption of PP. Only an increase in the intensity of autophagy was observed, especially after 48 hours of PP consumption (midgut and fat body), or 24 hours of the experiment (silk gland). Induction of autophagy or its dysfunction is considered to be the effect of nanoplastics (NPs) on cellular functioning (Ma et al. 2011; Wang et al. 2017). As a result of autophagy, numerous toxic substances or damaged cell structures and organelles are degraded. After their enclosure in autophagosomes, and then the formation of autolysosomes, they are digested, and the processes of cell death (apoptosis, necrosis) are not activated. Thus, in this case, autophagy acts as a survival pathway (Klionsky & Emr 2000; Kourtis & Tavernarakis 2009; Franzetti et al. 2012; Gunay & Goncu 2021). Autophagy has been described in the midgut of many invertebrates as a process by which homeostasis is maintained in tissues and cells (Lipovšek & Novak 2016; Włodarczyk et al. 2017; Lipovšek et al. 2018; Rost-Roszkowska et al. 2018, 2019, 2020a, 2020b, 2022). The analysis of the G0-S group showed that autophagy in the studied species was not activated under the influence of the lack of a standard diet.

Thus, we can conclude that in *G. mellonella* larvae fed with PP, autophagy is intensified, which proves its protective role. Thus, no damaged or transformed organelles have been observed. However, in the analyzed larval organs, we also observed changes in the vacuolization of the cytoplasm. Irreversible vacuolization may be a symptom of necrosis as the cytopathological process begins. However, during transient vacuolization, the formation of vacuoles is caused by the balance of osmotic pressure among different cytoplasmic compartments and by water diffusion across organelle membranes (Aki et al. 2012; Shubin et al. 2016). It reversibly affects cell physiology and e.g., the cell cycle, proliferation, and cell migration (Morissette et al. 2008). While during transient necrosis, only acidic organelles are affected, the irreversible vacuolization may cause changes in the entire endosomal-lysosomal system as well as Golgi complexes (Shubin et al. 2016). Vacuolization was evident in the organs of the examined *G. mellonella* larvae fed with PP. Mainly after 48 h of PP consumption by caterpillars, an increase in the number of vacuoles with an electron-lucent interior (midgut and silk gland) was observed. Vacuoles and autophagic structures (autophagosomes, autolysosomes, residual bodies) also appeared in the cytoplasm of the goblet and regenerative cells of the midgut epithelium, whereas they were not detected (regenerative cells) or were sporadic (goblet cells) in the control animals. However, no degenerative changes in other organelles were observed. Hence, it is very likely that this process does not lead to the typically irreversible necrosis after PP ingestion. In addition, it may be confirmed by the fact of increasing the number of autophagic structures, which are strongly acidic. To confirm this, further qualitative and quantitative studies must analyze what specific type of cell death occurs in the organs of PP-consuming larvae.

The study of cell viability in the organs of *G. mellonella* larvae showed a decrease in the number of live cells in all analyzed organs after 48 h. However, it may be related to the physiological changes taking place in the caterpillar's body before its transformation into a pupa (Uwo et al. 2002; Tettamanti et al. 2007; Denton et al. 2012; Franzetti et al. 2012; Romanelli et al. 2016; Jorjão et al. 2018; Bonelli et al. 2019; Gunay & Goncu 2021). The study used 7th instar larvae of *G. mellonella*. On the 5th-6th day of this final instar the animals stop feeding before formation of the cocoon and pupation. Before the experiment, the larvae fasted for 24 h. The experiment was conducted for 48 h. After 72 h, we observed that the

larvae were preparing to transform and stopped eating. The analysis of the G0-S group confirmed that the fasting of animals had no effect of larval survival. Our research indicates that eating PP does not alter the cells of the larval organs. Despite the initially increasing level of ROS-positive cells, autophagy and cell vacuolization will protect organs against the effects of PP decomposition products. These results provide a positive sign for the future use of *G. mellonella* larvae in the biodegradation of plastics. However, it is necessary to carry out further research, especially regarding the activation of apoptosis and necrosis, or the triggered mechanisms that turn on enzymes such as dismutases, catalases, and even proteins responsible for cell protective functions. It is also necessary to conduct further research to count individuals in subsequent generations and analyze the structure and ultrastructure of internal organs in larvae of the next generations. Negative effects such as reduced growth, fertility, or degenerative changes of organs may lead to long-term population effects. In addition, after contact with the stressor, changes may appear in subsequent generations in different invertebrate species (Schür et al. 2019; Augustyniak et al. 2020; Babczyńska et al. 2020; Dziewięcka et al. 2020).

Conclusions

The histological studies on *G. mellonella* larvae fed with PP bags showed that the diet containing plastics did not affect internal organs at the ultrastructural level. Thus, cells in the three analyzed organs – midgut, silk gland, and fat body – showed no degenerative changes after consumption of PP. Autophagy and vacuolization probably act as survival pathways. However, more advanced studies must be conducted. These processes probably have an impact on the survival rate of the last larvae of the greater wax moth, making them a potentially useful organism in the biodegradation of plastics made of PP.

Acknowledgments

We are very grateful to Michalina Komandera (University of Silesia in Katowice, Poland) for her technical assistance and Richard Ashcroft (<http://www.anglopolonia.com/home.html>) for language correction.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

The study was financed by the National Science Centre, Poland, grant [MINIATURA 5 no. DEC-2021/05/X/NZ4/01732].

ORCID

M. Rost-Roszkowska  <http://orcid.org/0000-0001-7124-8423>

S. Student  <http://orcid.org/0000-0003-1812-5496>

References

- Aki T, Nara A, Uemura K. 2012. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. *Cell Biology and Toxicology* 28(3):125–131. DOI: 10.1007/s10565-012-9212-3.
- Andrady AL. 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 62(8):1596–1605. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2011.05.030.
- Anguissola S, Garry D, Salvati A, O'Brien PJ, Dawson KA, Hussain S. 2014. High content analysis provides mechanistic insights on the pathways of toxicity induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *PLoS ONE* 9(9): e108025. DOI: 10.1371/journal.pone.0108025.
- Augustyniak M, Tarnawska M, Dziewięcka M, Kafel A, Rost-Roszkowska M, Babczyńska A. 2020. DNA damage in *Spodoptera exigua* after multigenerational cadmium exposure – a trade-off between genome stability and adaptation. *The Science of the Total Environment* 745:1–10. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141048.
- Auta HS, Emenike CU, Jayanthi B, Fauziah SH. 2018. Growth kinetics and biodegradation of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment Mar. *Marine Pollution Bulletin* 127:15–21. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.11.036.
- Auten R, Davis J. 2009. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: The devil is in the details. *Pediatric Research* 66(2):121–127. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3181a9eafb.
- Azad N, Iyer AKV. 2014. Reactive oxygen species and apoptosis. In: Laher I, editor. *Systems biology of free radicals and antioxidants*. Berlin, Heidelberg: Springer. pp. 113–136. DOI: 10.1007/978-3-642-30018-9_15.
- Babczyńska A, Nowak A, Kafel A, Łozowski B, Rost-Roszkowska M, Tarnawska M, Augustyniak M, Sawadko M, Molenda A. 2020. Autophagy: A necessary defense against extreme cadmium intoxication in a multigenerational 2D experiment. *Scientific Reports* 10(1):21141. DOI: 10.1038/s41598-020-78316-z.
- Barnes DKA, Galgani F, Thompson RC, Barlas M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364:1985–1998. DOI: 10.1098/rstb.2008.0205.
- Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawarek MY, Dreaden EC, Brown D, Alkilany AM, Farokhzad OC,

- Mahmoudi M. 2017. Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chemical Society Reviews* 46 (14):4218. DOI: 10.1039/c6cs00636a.
- Bilal H, Raza H, Bibi H, Bibi T. 2021. Plastic biodegradation through insects and their symbionts microbes: A review. *JBM* 8(4):95–103. DOI: 10.35691/JBM.1202.0206.
- Bombelli P, Howe CJ, Bertocchini F. 2017. Polyethylene biodegradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology*: CB 27(8):R292–R293. DOI: 10.1016/j.cub.2017.02.060.
- Bonelli M, Bruno D, Caccia S, Sgambettera G, Cappelozza S, Jucker C, Tettamanti G, Casartelli M. 2019. Structural and functional characterization of *Hermetia illucens* larval midgut. *Frontiers in Physiology* 10:204. DOI: 10.3389/fphys.2019.00204.
- Bonhomme S, Cuet A, Delort A-M, Lemaire J, Sancelme M, Scott C. 2003. Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation & Stability* 81 (3):441–452. DOI: 10.1016/S0141-3910(03)00129-0.
- Brandon AM, Gao S-H, Tian R, Ning D, Yang S-S, Zhou J, Wu WM, Criddle CS. 2018. Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome. *Environmental Science and Technology* 52(11):6526–6533. DOI: 10.1021/acs.est.8b02301.
- Bruck S, Ford AT. 2018. Chronic ingestion of polystyrene micro-particles in low doses has no effect on food consumption and growth to the intertidal amphipod *Echinogammarus marinus*? *Environmental Pollution* 233:1125–1130. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.10.015.
- Büyükgüzel E, Büyükgüzel K, Snela M, Erdem M, Radtke K, Ziemnicki K, Adamski Z. 2013. Effect of boric acid on antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and ultrastructure of midgut and fat body of *Galleria mellonella*. *Cell Biology and Toxicology* 29(2):117–129. DOI: 10.1007/s10565-013-9240-7.
- Cassone BJ, Grove HC, Kurchaba N, Geronimo P, LeMoine CMR. 2022. Fat on plastic: Metabolic consequences of an LDPE diet in the fat body of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *Journal of Hazardous Materials* 425:127862. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127862.
- Chae Y, Kim D, Kim SW, An Y. 2018. Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. *Scientific Reports* 8(1):284. DOI: 10.1038/s41598-017-18849-y.
- Cox KD, Covernon GA, Davies HL, Dower JF, Juanes F, Dudas SE. 2019. Human consumption of microplastics. *Environmental Science and Technology* 53(12):7068–7074. DOI: 10.1021/acs.est.9b01517.
- Denton D, Chang T-K, Nicolson S, Shravage B, Simin R, Baehrecke EH, Kumar S. 2012. Relationship between growth arrest and autophagy in midgut programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death & Differentiation* 19(8):1299–1307. DOI: 10.1038/cdd.2012.43.
- Desai AV, Siddhapara MR, Patel PK, Prajapati AP. 2019. Biology of greater wax moth, on artificial diet. *Journal of Experimental Zoology, India* 22:1267–1272.
- dos Santos T, Varela J, Lynch I, Salvati A, Dawson KA, Schnur JM. 2011. Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines. *PLoS ONE* 6(9):e24438. DOI: 10.1371/journal.pone.0024438.
- Dreaden EC, Kong YW, Morton SW, Correa S, Choi KY, Shopshire KE, Renggli K, Drapkin R, Yaffe MB, Hammond PT. 2015. Tumor-targeted synergistic blockade of MAPK and PI3K from a layer-by-layer nanoparticle. *Clinical Cancer Research* 21(19):4410–4419. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0013.
- Dziewięcka M, Flasz B, Rost - Roszkowska M, Kędziorowski A, Kochanowicz A, Augustyniak M. 2020. Graphene oxide as a new anthropogenic stress factor - multigenerational study at the molecular, cellular, individual and population level of *Acheta domesticus*. *Journal of Hazardous Materials* 396:122775. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122775.
- Faron J, Bernas T, Sas-Nowosielska H, Klag J. 2015. Analysis of the behavior of mitochondria in the ovaries of the earthworm *Dendrobaena veneta* Rosa 1839. *PLoS ONE* 10(2):e0117187. DOI: 10.1371/journal.pone.0117187.
- Fasasi KA, Malaka SLO. 2006. Life cycle and impact of greater Wax Moth. *Galleria niellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), feeding on stored beeswax. *Nigerian Journal of Entomology* 23(1):13–17. DOI: 10.36108/NJE/6002/32.0130.
- Franzetti E, Huang ZJ, Shi YX, Xie K, Deng XJ, Li JP, Li Q-R, Yang W-Y, Zeng W-N, Casartelli M, Deng H-M, Cappelozza S, Grimaldi A, Xia Q, Tettamanti G, Cao Y, Feng Q. 2012. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut. *Apoptosis* 17 (3):305–324. DOI: 10.1007/s10495-011-0675-0.
- Ghatge S, Yang Y, Ahn JH, Hur H-G. 2020. Biodegradation of polyethylene: A brief review. *Applied Biological Chemistry* 63 (1):27. DOI: 10.1186/s13765-020-00511-3.
- Günay B, Goncu E. 2021. Role of autophagy in midgut stem cells of silkworm *Bombyx mori*, during larval-pupal metamorphosis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 108(1): e21832. DOI: 10.1002/arch.21832.
- Hödl E, Felder E, Chabicovsky M, Dallinger R. 2010. Cadmium stress stimulates tissue turnover in *Helix pomatia*: Increasing cell proliferation from metal tolerance to exhaustion in molluscan midgut gland. *Cell and Tissue Research* 341:159–171. DOI: 10.1007/s00441-010-0980-x.
- Huang C-H, Chu T-W, Kuo C-H, Hong M-C, Chen Y-Y, Chen B. 2022. Effects of microplastics on reproduction and growth of freshwater live feeds *Daphnia magna*. *Fishes* 7 (4):181. DOI: 10.3390/fishes7040181.
- Huerta Lwanga E, Thapa B, Yang X, Gertsen H, Salánki T, Geissen V, Garbeva P. 2018. Decay of low-density polyethylene by bacteria extracted from earthworm's guts: A potential for soil restoration. *The Science of the Total Environment* 624:753–757. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.144.
- Jáms IB. 2020. Estimating the size distribution of plastics ingested by animals. *Nature Communications* 11 (1):1234567890. DOI: 10.1038/s41467-020-15406-6.
- Janež M, Osman D, Kambris Z. 2019. Comparative analysis of midgut regeneration capacity and resistance to oral infection in three disease-vector mosquitoes. *Scientific Reports* 9 (1):4556. DOI: 10.1038/s41598-019-50994-4.
- Jeon J-M, Park S-J, Choi T-R, Park J-H, Yang Y-H, Yoon J-J. 2021. Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JY0216 isolated from soil grove. *Polymer Degradation & Stability* 191:109662. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2021.109662.
- Jiang Z, Hu Z, Zeng L, Lu W, Zhang H, Li T, Xiao H. 2011. The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: Is this organelle less significant than mitochondria? *Free Radic. Free Radical Biology & Medicine* 50(8):907–917. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.011.
- Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi MLA, Prata MCA, Jorge AOC, Junqueira JC. 2018. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence* 9 (1):383–389. DOI: 10.1080/21505594.2017.1397871.

- Karpeta-Kaczmarek J, Augustyniak M, Rost-Roszkowska M. 2016. Ultrastructure of the gut epithelium in *Acheta domesticus* after long-term exposure to nanodiamonds supplied with food. *Arthropod Structure & Development* 45(3):253–264. DOI: 10.1016/j.asd.2016.02.002.
- Khyade V. 2018. Review on biodegradation of plastic through waxworm (Order: Lepidoptera; Family: Pyralidae). *International Academic Journal of Economics* 5(01):84–91. DOI: 10.9756/IAJE/V5I1/1810008.
- Kik K, Bukowska B, Sicińska P. 2020. Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environmental Pollution* 262:114297. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114297.
- Klionsky DJ, Emr SD. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290(5497):1717–1721. DOI: 10.1126/science.290.5497.1717.
- Kobler K, Saber AT, Jacobsen NR, Wallin H, Vogel U, Qvortrup K, Mølhave K. 2014. FIB-SEM imaging of carbon nanotubes in mouse lung tissue. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 406(16):3863–3873. DOI: 10.1007/s00216-013-7566-x.
- Kong H, Kim H, Chung J, Jun J, Lee S, Kim H, Jeon S, Park S, Bhak J, Ryu C. 2019. The *Galleria mellonella* hologenome supports microbiota-independent metabolism of long-chain hydrocarbon beeswax. *Cell Reports* 26(9):2451–2465. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.02.018.
- Kourtis N, Tavernarakis N. 2009. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death & Differentiation* 16(1):21–30. DOI: 10.1038/cdd.2008.120.
- Lee Y, Park J, Ryu C, Gang KS, Yang W, Park Y-K, Jung J, Hyun S. 2013. Comparison of biochar properties from biomass residues produced by slow pyrolysis at 500°C. *Bioresour. Technol.* 148:196–201. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.135.
- LeMoine C, Grove H, Smith CM, Cassone B. 2020. A very hungry caterpillar: Polyethylene metabolism and lipid homeostasis in larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). *Environmental Science and Technology* 54(22):14706–14715. DOI: 10.1021/acs.est.0c04386.
- Leonard EM, Pierce LM, Gillis PL, Wood CM, O'Donnell MJ. 2009. Cadmium transport by the gut and malpighian tubules of *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands) 92(3):179–186. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.01.011.
- Li T-S, Marbán E. 2010. Physiological levels of reactive oxygen species are required to maintain genomic stability in stem cells. *Stem Cells* 28(7):1178–1185. DOI: 10.1002/stem.438.
- Lipovšek S, Leitinger G, Novak T, Janžekovič F, Gorgoń S, Kamińska K, Rost-Roszkowska M. 2018. Changes in the midgut cells in the European cave spider, *Meta menardi*, during starvation in spring and autumn. *Histochemistry and Cell Biology* 149:245–260. DOI: 10.1007/s00418-017-1623-z.
- Lipovšek S, Novak T. 2016. Autophagy in the fat body cells of the cave cricket *Troglophilus neglectus* Krauss, 1878 (Rhopidophoridae, Saltatoria) during overwintering. *Protoplasma* 253(2):457–466. DOI: 10.1007/s00709-015-0824-3.
- Lipovšek S, Novak T, Darioš B, Hofer F, Leitinger G, Letofsky-Papet I. 2022. Ultrastructure of spherites in the midgut diverticula and Malpighian tubules of the harvestman *Amileus aurantiacus* during the winter diapause. *Histochemistry and Cell Biology* 157:107–118. DOI: 10.1007/s00418-021-02046-0.
- Lou Y, Pererva E, Shan-Shan Y, Baiyun L, Bingfeng L, Nanqi R, Corvini PF-X, Defeng X. 2020. Biodegradation of polystyrene by greater wax moth larvae (*Galleria mellonella* L.) and the effect of co-diet supplementation on the core gut microbiome. *Environmental Science and Technology* 54(5):2821–2831. DOI: 10.1021/acs.est.9b07044.
- Luo L, Wang Y, Guo H, Yang Y, Qi N, Zhao X, Gao S, Zhou A. 2021. Biodegradation of foam plastics by *Zophobas atratus* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) associated with changes of the gut digestive enzymes activities and microbiome. *Chemosphere* 282:131006. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131006.
- Ma X, Wu Y, Jin S, Tian Y, Zhang X, Zhao Y, Yu L, Liang X-J. 2011. Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment. *Agricultural Science & Technology Nano* 5(11):8629–8639. DOI: 10.1021/nm202155y.
- Matsson K, Ekvall MT, Hansson L-A, Linse S, Malmendal A, Cedervall T. 2015. Altered behavior, physiology, and metabolism in fish exposed to polystyrene nanoparticles. *Environmental Science and Technology* 49(1):553–561. DOI: 10.1021/es5053655.
- Matyja K, Rybak J, Hanus-Lorenz B, Wróbel M, Rutkowski R. 2020. Effects of polystyrene diet on *Tenebrio molitor* larval growth, development and survival: Dynamic energy budget (DEB) model analysis. *Environmental Pollution* 264:114740. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114740.
- Messinetti S, Mercurio S, Parolini M, Sugni M, Pennati R. 2018. Effects of polystyrene microplastics on early stages of two marine invertebrates with different feeding strategies. *Environmental Pollution* 237:1080–1087. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.11.030.
- Mikulak E, Gliniewicz A, Przygodzka M, Solecka J. 2018. *Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies. *Przegląd Epidemiologiczny* 72(1):57–73.
- Mor R, Sivan A. 2008. Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *Biodegradation* 19(6):851–858. DOI: 10.1007/s10532-008-9188-0.
- Morales-Ramos JA, Rojas MG, Shapiro-Ilan DI, Tedders WL. 2010. Developmental plasticity in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae): Analysis of instar variation in number and development time under different diets. *Journal of Entomological Science* 45(2):75–90. DOI: 10.18474/0749-8004-45.2.75.
- Monisette G, Lodge R, Marceau F. 2008. Intense pseudotransport of a cationic drug mediated by vacuolar ATPase: procainamide-induced autophagic cell vacuolization. *Toxicology & Applied Pharmacology* 228(3):364–377. DOI: 10.1016/j.taap.2007.12.031.
- Morse RA. 1978. Honey bee pests, predators and diseases. Ithaca: Comstock Publishing/Cornell University Press.
- Oropesa AL, Floro AM, Palma P. 2017. Toxic potential of the emerging contaminant nicotine to the aquatic ecosystem. *Environmental Science and Pollution Research* 24(20):16605–16616. DOI: 10.1007/s11356-017-9084-4.
- Ostróžka A, Tiffert Z, Wilczek G, Rost-Roszkowska M. 2022. Can insecticide-free clean water regenerate the midgut epithelium of the freshwater shrimp after dimethoate treatment? *Micron* 155:103162. DOI: 10.1016/j.micron.2021.103162.
- Park SY, Kim CG. 2019. Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site. *Chemosphere* 222:527–533. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.159.

- Peng B-Y, Chen Z, Chen J, Yu H, Zhou X, Criddle CS, Wu W-M, Zhang Y. 2020. Biodegradation of polyvinyl chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Environment International* 145:106106. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106106.
- Peydaei A, Bagheri H, Gurevich L, de Jonge N, Nielsen JL. 2020. Impact of polyethylene on salivary glands proteome in *Galleria mellonella*. *Comparative Biochemistry & Physiology Part D, Genomics & Proteomics* 34:100678. DOI: 10.1016/j.cbd.2020.100678.
- Peydaei A, Bagheri H, Gurevich L, de Jonge N, Nielsen JL. 2021. Mastication of polyolefins alters the microbial composition in *Galleria mellonella*. *Environmental Pollution* 280:116877. DOI: 10.1016/j.envpol.2021.116877.
- Pflugmacher S, Huttunen JH, Von Wolff MA, Penttinen OP, Kim YJ, Kim S, Mitrovic SM, Esterhuizen-Londt M. 2020. *Enchytraeus crypticus* avoid soil spiked with microplastic. *Toxics* 8(1):10. DOI: 10.3390/toxics8010010.
- Pitt JA, Trevisan R, Massarsky A, Kozal JS, Levin ED, Di Giulio RT. 2018. Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (*Danio rerio*): A case study with nanopolystyrene. *The Science of the Total Environment* 643:324–334. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.186.
- Poprawa I, Chajec Ł, Chachulski-Żymelka A, Wilczek G, Student S, Leśniewska M, Rost-Roszkowska M. 2022. Ovaries and testes of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda) react differently to the presence of cadmium in the environment. *Scientific Reports* 12:6705. DOI: 10.1038/s41598-022-10664-4.
- Poyraz Tınartas E, Goncu E, Koc K. 2021. Apoptotic and autophagic characteristics of perivisceral fat body remodeling of the greater wax moth *Galleria mellonella* and effects of juvenile hormone analog, fenoxycarb, on these processes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 107(1):e21780. DOI: 10.1002/arch.21780.
- Rehse S, Kloas W, Zar C. 2016. Zar short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere* 153:91–99. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.133.
- Repnik U, Turk B. 2010. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* 10(6):662–669. DOI: 10.1016/j.mito.2010.07.008.
- Riudavets J, Salas I, Pons MJ. 2007. Damage characteristics produced by insect pests in packaging film. *Journal of Stored Products Research* 43(4):564–570. DOI: 10.1016/j.jspr.2007.03.006.
- Rodriguez-Seijo A, Lourenço J, Rocha-Santos TAP, da Costa J, Duarte AC, Vala H, Pereira R. 2017. Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. *Environmental Pollution* 220:495–503. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.09.092.
- Romanelli D, Casarelli M, Cappellozza S, de Eguileor M, Tettamanti G. 2016. Roles and regulation of autophagy and apoptosis in the remodelling of the lepidopteran midgut epithelium during metamorphosis. *Scientific Reports* 9(6):32939. DOI: 10.1038/srep32939.
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulski-Żymelka A, Leśniewska M, Student S. 2020a. Effects of short- and long-term exposure to cadmium on salivary glands and fat body of soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda): Histology and ultrastructure. *Micron* 137:102915. DOI: 10.1016/j.micron.2020.102915.
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulski-Żymelka A, Wilczek G, Skowronek M, Student S, Leśniewska M. 2022. Hazards related to the presence of cadmium in food – Studies on the European soil centipede, *Lithobius forficatus*. *Science of the Total Environment* 845(1):157298. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.157298.
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulski-Żymelka A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Skowronek M, Nadgórska-Socha A, Leśniewska M. 2020b. Influence of soil contaminated with cadmium on cell death in the digestive epithelium of soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). *European Zoological Journal* 87(1):242–262. DOI: 10.1080/24750263.2020.1757168.
- Rost-Roszkowska M, Poprawa I, Chajec Ł, Chachulski-Żymelka A, Wilczek G, Wilczek P, Tamawska M, Student S, Leśniewska M. 2021. Effects of cadmium on mitochondrial structure and function in different organs: studies on the soil centipede *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda). *European Zoological Journal* 88(1):632–648. DOI: 10.1080/24750263.2021.1912199.
- Rost-Roszkowska M, Vilimová J, Tajovský K, Chachulski-Żymelka A, Sosinka A, Kszuk-Jendrysik M, Ostróžka A, Kaszuba F. 2019. Autophagy and apoptosis in the midgut epithelium of millipedes. *Microscopy and Microanalysis* 25:1004–1016. DOI: 10.1017/S143192761900059X.
- Rost-Roszkowska MM, Janelt K, Poprawa I. 2018. The role of autophagy in the midgut epithelium of Parachela (Tardigrada). *Zoomorphology* 37:501–509. DOI: 10.1007/s00435-018-0407-x.
- Schirini GF, Pérez-Pomeda I, Sanchis J, Rossini C, Farré M, Barceló D. 2017. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research* 159:579–587. DOI: 10.1016/j.envres.2017.08.043.
- Schür C, Zipp S, Thalau T, Wagner M. 2019. Microplastics but not natural particles induce multigenerational effects in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution* 113904. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113904.
- Scopetani C, Esterhuizen M, Cincinelli A, Pflugmacher S. 2020. Microplastics exposure causes negligible effects on the oxidative response enzymes glutathione reductase and peroxidase in the oligochaete *Tubifex tubifex*. *Toxics* 8:14. DOI: 10.3390/toxics8010014.
- Sehnal F. 1966. A critical study of the biome and biometry of the wax moth *Galleria mellonella* raised in varying conditions. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 174:53–82.
- Sharma S, Chatterjee S. 2017. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: A short review. *Environmental Science and Pollution Research* 24(27):21530–21547. DOI: 10.1007/s11356-017-9910-8.
- Shubin AV, Demidyuk IV, Komissarov AA, Rafieva LM, Kostrov SV. 2016. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget* 7(34):55863–55889. DOI: 10.18632/oncotarget.10150. PMID: 27331412; PMCID: PMC5342458.
- Skariyachan S, Patil AA, Shankar A, Manjunath M, Bachappanavar N, Kiran S. 2018. Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sp. and *Anerinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants polym. *Degradation and Stability* 149:52–68. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.01.018.
- Sokolova M. 2004. Cadmium effects on mitochondrial function are enhanced by elevated temperatures in a marine poikilotherm, *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae). *The Journal of Experimental Biology* 207(15):2639–2648. DOI: 10.1242/jeb.01054.
- Tarnawska M, Kafel A, Augustyniak M, Rost-Roszkowska M, Babczyńska A. 2019. Microevolution or wide tolerance?

- Level of stress proteins in the beet armyworm *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to cadmium for over 150 generations. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 178:1–8. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.04.017.
- Tettamanti G, Grimaldi A, Pennacchio F, de Eguileor M. 2007. Lepidopteran larval midgut during prepupal instar: Digestion or self-digestion? *Autophagy* 3(6):630–631. DOI: 10.4161/auto.4908.
- Thompson RC, Swan SH, Moore CJ, Vom Saal FS. 2009. Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 364:1973–1976. DOI: 10.1098/rstb.2009.0054.
- Uwo MF, Ui-Tei K, Park P, Takeda M. 2002. Replacement of midgut epithelium in the greater wax moth, *Galleria mellonella*, during larval-pupal moult. *Cell and Tissue Research* 308 (2):319–331. DOI: 10.1007/s00441-002-0515-1.
- Wang J, Yu Y, Lu K, Yang M, Li Y, Zhou X, Sun Z. 2017. Silica nanoparticles induce autophagy dysfunction via lysosomal impairment and inhibition of autophagosome degradation in hepatocytes. *International Journal of Nanomedicine* 12:809–825. DOI: 10.2147/IJN.S123596.
- Weber A, Scherer C, Brennholt N, Reifferscheid G, Wagner M. 2018. PET microplastics do not negatively affect the survival, development, metabolism and feeding activity of the freshwater invertebrate *gammarus pulex*. *Environmental Pollution* 234:181–189. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.11.014.
- Wilczek G, Rost-Roszkowska M, Wilczek P, Babczyńska A, Szulińska E, Sonakowska L, Marek-Swędziol M. 2014. Apoptotic and necrotic changes in the midgut glands of the wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) in response to starvation and dimethoate exposure. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 101:157–167. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.034.
- Włodarczyk A, Sonakowska L, Kamińska K, Marchewka A, Wilczek G, Wilczek P, Student S, Rost-Roszkowska M. 2017. The effect of starvation and re-feeding on mitochondrial potential in the midgut of *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca). *PLoS One* 12(3):e0173563. DOI: 10.1371/journal.pone.0173563.
- Włodarczyk A, Student S, Rost-Roszkowska M. 2019. Autophagy and apoptosis in starved and refed *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) midgut. *Canadian Journal of Zoology* 97:294–303. DOI: 10.1139/cjz-2018-0104.
- Wojda I, Staniec B, Sulek M, Kordaczuk J. 2020. The greater wax moth *Galleria mellonella*: Biology and use in immune studies. *Pathogens and Disease* 78(9):ftaa057. DOI: 10.1093/femspd/ftaa057.
- Wrońska N, Szlaur M, Zawadzka K, Lisowska K. 2022. The synergistic effect of triterpenoids and flavonoids—new approaches for treating bacterial infections? *Molecules* 27:847. DOI: 10.3390/molecules27030847.
- Xia T, Kovochich M, Liong M, Zink JJ, Nel AE. 2008. Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *Agricultural Science & Technology Nano* 2:85–96. DOI: 10.1021/nn700256c.
- Yamada-Onodera K, Mukumoto H, Katsuyaya Y, Saiganji A, Tani Y. 2001. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degradation & Stability* 72(2):323–327. DOI: 10.1016/S0141-3910(01)00027-1.
- Yang J, Yang Y, Wu W-M, Zhao J, Jiang L. 2014. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental Science & Technology* 48(23):13776–13784. DOI: 10.1021/es504038a.
- Yang L, Zhang Y, Kang S, Wang Z, Wu C. 2021. Microplastics in soil: A review on methods, occurrence, sources, and potential risk. *The Science of the Total Environment* 780:146546. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146546.
- Yang S-S, Brandon AM, Flanagan JCA, Yang J, Ning D, Cai S-Y, Fan H-Q, Wang Z-Y, Ren J, Benbow E, Ren N-Q, Waymouth RM, Zhou J, Criddle CS, Wu W-M. 2018. Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus): Factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle. *Chemosphere* 191:979–989. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.117.
- Zaffagnini G, Martens S. 2016. Mechanisms of selective autophagy. *Journal of Molecular Biology* 428(9):1714–1724. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.02.004.
- Zhou D, Shao L, Spitz DR. 2014. Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. *Advances in Cancer Research* 122:1–67.
- Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, Babenko VA, Zorov SD, Balakireva AV, Juhaszova M, Sollott SJ, Zorov DB. 2018. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry* 552:50–59. DOI: 10.1016/j.ab.2017.07.009.

Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. Student, S., Wrońska, A.K., Homa, J., Krpec, K., Magiera, K., Siwek, D., Rost-Roszkowska, M. (2026). Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Scientific Reports* 16, 3840. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>

IF: 3,9 MNiSW: 140pkt



OPEN Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene

P. Mermer¹, Ł. Chajec¹, G. Wilczek¹, S. Student^{2,3}, A. K. Wrońska⁴, J. Homa⁵, K. Krpec¹, K. Magiera¹, D. Siwek¹ & M. Rost-Roszkowska¹✉

Plastic waste, which pollutes water and soil and negatively impacts organisms, is currently a major ecological problem. Therefore, methods for its degradation are being sought, including biodegradation using various organisms to dispose of plastics. One invertebrate animal suspected of being used in plastic biodegradation is *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera). However, there is no data on whether plastics ingested by this insect's larvae will induce cytotoxic effects in cells, tissues, or organs, which would exclude this species from biodegradation. The aim of this study was to determine whether *G. mellonella* larvae, after consuming a popular plastic, polypropylene (PP), activate specific cytotoxic parameters. Larvae of the studied species were fed PP bags for 24 and 48 h. Control (G0-C) and starved (G0-S) individuals were also analyzed to determine whether cytotoxic effects could be attributed to factors such as a lack of normal food. Confocal microscopy and flow cytometry were changes, employed to investigate cell death processes, caspase and Bcl-2 protein activation, and mitochondrial alterations. The results of our studies suggest that *G. mellonella* may be considered as a potential candidate used in the biodegradation of PP.

Keywords Apoptosis, Cell death, Mitochondria, Caspase, Bcl-2, Cell cycle, Biodegradation

Global plastic production is increasing annually and is projected to double in the near future¹. Disposal of plastics and their associated accumulation in various environments are becoming a major problem, posing a serious threat to nature². The main advantages of plastics are their ease of processing, relative durability, and low price. However, their undeniable disadvantage is their long decomposition time³. Despite this durability, over the years, these products degrade into smaller fragments, creating micro- and nanoplastics^{4–6}. One widely used plastic is polypropylene (PP)⁷, which is employed in the manufacture of numerous consumer products, as well as in advanced technologies⁸. Regardless of size, plastics pose a threat to organisms due to their cytotoxic effects. Therefore, methods to rapidly degrade them are being explored. Many invertebrates can digest various types of plastics after ingestion, facilitated by microorganisms present in their digestive systems that produce enzymes capable of breaking the chemical bonds in plastics. These include insects from the orders Coleoptera, e.g. *Zophobas morio*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma serricorne*^{9–11}, and Lepidoptera, e.g. *Galleria mellonella*, *Achroia grisella*, *Corcyma cephalonica*, *Plodia interpunctella*^{12–15}; molluscs, e.g. *Achatina fulica*¹⁶; Oligochaeta, e.g. *Eisenia fetida*¹⁷; Polychaeta, e.g. *Perinereis vancaurica*¹⁸; and Echinodermata, e.g. *Strongylocentrotus nudus*, *Patiria pectinifera*¹⁹. The great wax moth (*Galleria mellonella*), particularly its larvae, is a promising candidate for plastic biodegradation^{20–22}. Its use depends on ensuring that the process does not disrupt the normal function of cells, tissues, or organs. *G. mellonella*, an insect of the order Lepidoptera²³ is a suitable model organism due to its short life cycle, high fertility, and rapid development^{24,25}. The greater wax moth naturally occurs in hives, causing significant problems for the beekeeping industry²⁶. These larvae can consume plastics due to the similarity of chemical bonds found in honeycomb and plastic^{20,27}. Literature data indicate

¹Faculty of Natural Sciences, Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland. ²Faculty of Automatic Control, Electronics and Computer Science, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland. ³Biotechnology Center, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland. ⁴Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland. ⁵Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Krakow, Poland. ✉email: magdalena.rost-roszkowska@us.edu.pl

that enzymes and the intestinal microbiome are mainly responsible for the digestion of polyethylene^{20,21,28–30}. Although *G. mellonella* larvae can digest plastics, it has an impact on their development and survival^{31–34}.

The toxicity of various xenobiotics is related to the development of inflammation in the body caused by, among other factors, oxidative stress resulting from excessive production of ROS. When ROS overwhelm antioxidant defenses, they can cause mutations, damage to cell organelles, or disorders in cell metabolism^{35–37}. Therefore, at the cellular level, various mechanisms must be activated to balance these changes, thereby maintaining homeostasis and protecting cells^{38–40}. Cytotoxicity refers to changes in cells and tissues that occur under the influence of various stressors. One way to assess the cytotoxicity of a substance is by measuring the activation of cell death (CD) processes. Two basic types of cell death can be distinguished: apoptotic CD dependent on caspases, and CD independent of caspases (autophagy and necroptosis)^{39,41–43}. In the case of apoptotic CD, there are two main pathways: the extrinsic or death receptor pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway^{44,45}. Apoptotic cells undergo numerous transformations and modifications, including protein cleavage, DNA damage, and the formation of apoptotic bodies⁴⁵. Caspases, i.e., cysteine proteases, which act as inactive proenzymes in many cells, play an important role in this process. When they are activated, they can activate subsequent procaspases, and the activation of their entire cascade leads, among other things, to the degradation of numerous cellular proteins and, consequently, rapid cell death^{43,44,46,47}. Proteins from the Bcl-2 family are also involved in apoptotic CD, but their activation during this process indicates the activation of the mitochondrial pathway^{48,49}.

Our previous studies on *G. mellonella* larvae fed with PP bags revealed that a diet containing plastics did not activate cell death of three internal organs (midgut, silk glands, and fat body) at the ultrastructural level. The activation of autophagy and vacuolization was detected as a probable survival pathway²². However, changes at the ultrastructural level could not be labeled when the cascade of different proteins/enzymes was activated⁵⁰. Considering the results of our preliminary studies on *G. mellonella* larvae, we aimed to determine whether a PP-based diet affects cytotoxic parameters such as cell death or cell cycle disorders. If PP in the insect's diet activates apoptosis, it is also important to determine whether the mitochondrial pathway is activated, which would allow for further research related to mitochondrial activity. These studies, therefore, continue our previous research, ultimately aimed at determining the potential use of the greater wax moth larvae in the biodegradation of polypropylene. Thus, it is crucial to determine how effectively and safely *G. mellonella* larvae break down plastic and whether this process can contribute to solving the problem of plastic pollution.

Materials and methods

Galleria mellonella culture

Adult specimens of *G. mellonella* were reared in glass, tightly closed containers with a capacity of 1 L at a constant temperature of 30 ± 0.5 °C, humidity of $75 \pm 5\%$, and constant darkness. Each glass culture container was covered with a linen material used to facilitate female egg-laying. After the adults laid eggs, they died, and the eggs were collected and reared. The laid eggs were placed in glass containers containing a nutrient material (wheat flour, corn flour, glycerin, honey, milk powder, and wheat bran)⁵¹. The medium was replaced with a new one as the larvae developed, maintaining the original composition of the medium. Then, the largest stage 7 (L7) larvae (ca. 20 mm) were selected for the experiment⁵².

Experiment

On the third day of the seventh stage, larvae (L7) were selected for the experiment. The last larval stage (L7) of *G. mellonella* lasts about 7–8 days. Larvae were collected on the third day of the L7 stage, because on the seventh day of the L7 stage, the larvae slowly transition to the prepupal stage, become inactive, and stop feeding^{22,25,52–54}. Specimens collected for the experiment were first fasted for 24 h to prevent any potential influence of previously consumed food on the analysis results. Then, they were fed with PP bags (3 cm x 3 cm) for 24 and 48 h. Hence, analyses after 24 h of PP consumption were performed on larvae on the fifth day of the L7 stage, and analyses after 48 h of PP consumption were performed on larvae on the sixth day of the L7 stage. PP bags used for the analyses were purchased commercially (Sarantis Polska S.A.). The L7 stage larvae selected for the experiment were then divided into experimental groups, following the conducted experiment²²; G0-C – control group, animals bred in laboratory conditions at a constant incubator temperature of 30 ± 0.5 °C, humidity of $75 \pm 5\%$, constant darkness in glass containers and fed *ad libitum* with the medium described above; G0-S – animals bred in laboratory conditions at a constant incubator temperature of 30 ± 0.5 °C, humidity of $75 \pm 5\%$, constant darkness in glass containers, and starved for 24 h; G0-24 – animals bred in laboratory conditions at a constant incubator temperature of 30 ± 0.5 °C, humidity of $75 \pm 5\%$ and constant darkness, previously starved for 24 h and then cultured in Petri dishes with pieces of PP bags measuring 3 cm x 3 cm for 24 h; G0-48 – animals bred in laboratory conditions at a constant incubator temperature of 30 ± 0.5 °C, humidity of $75 \pm 5\%$ and constant darkness, previously starved for 24 h and then cultured in Petri dishes with PP bags measuring 3 cm x 3 cm for 48 h. Fasting the animals (G0-S group) allowed us to determine whether the observed changes were caused by the lack of standard food, which was not given to the animals during the PP diet, and prevented the possibility of the previously consumed food influencing the analysis results. Before sectioning, the animals were anesthetized with chloroform. The midgut, silk gland, and fat body were isolated from each individual and prepared for further analysis according to the protocols described below (Fig. 1).

Methods

Qualitative analysis by confocal microscopy

For each of the methods described below, 5 larvae from each experimental group were used.

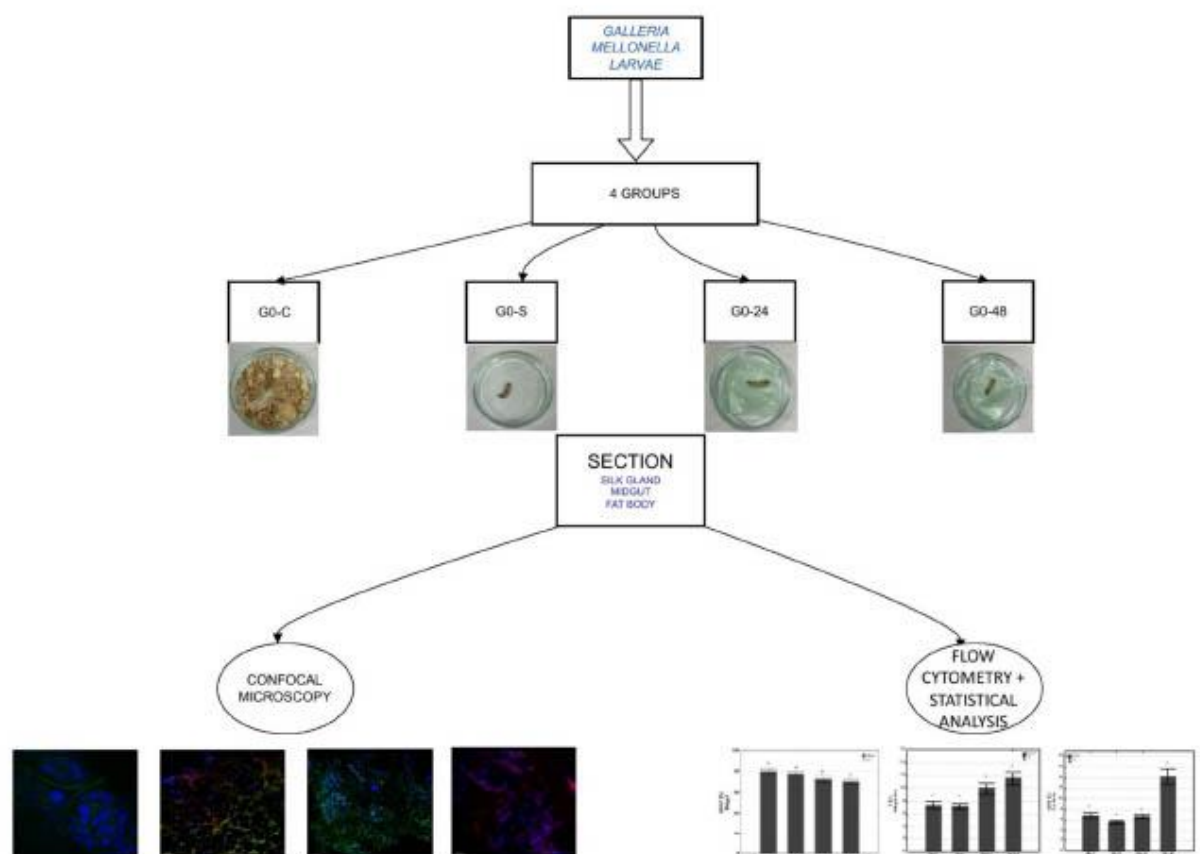


Fig. 1. Diagrammatic representation of the experiment on *G. mellonella*.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

The TUNEL assay (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red; Roche, Basel, Switzerland) is commonly used to investigate the nuclear DNA fragmentation that is characteristic of apoptosis. The isolated organs (midgut, silk glands, fat body) were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature (RT) and then prepared according to the manufacturer's protocol and the method described in our previous paper⁵⁵. After staining the organs with a TUNEL reaction mixture, they were labeled with 1 µg/mL DAPI (30 min, RT). The material was examined using an Olympus FluoView FV3000 confocal laser scanning microscope. The following lasers were used: 405 nm for the DAPI dye and 561 nm for the TMR red dye. Negative controls were conducted according to the producer's labeling protocol.

CellLight lysosomes-GFP staining

The staining enables the labeling of lysosomes, which are the final destination of the autophagic pathway, with green fluorescent protein (GFP) in live cells. Isolated from animals of all experimental groups, organs (midgut, silk glands, fat body) without fixation were stained with ready-to-use CellLight Lysosomes-GFP reagent (Invitrogen, C10596) (overnight, RT, in the dark) and washed with TBS (2 × 5 min, RT, in the dark). After staining the organs with CellLight Lysosomes-GFP, they were labeled with 1 µg/mL DAPI (30 min, RT, in the dark). The material was examined using an Olympus FluoView FV3000 confocal laser scanning microscope. The following lasers were used: 405 nm for the DAPI dye and 488 nm for the GFP dye.

JC-1 staining

JC-1 dye is usually used for the detection of changes in the mitochondrial membrane potential. The prepared organs (midgut, silk gland, fat body) that were isolated from all groups were incubated in the dark with 5 µL of 1.5 mM JC-1 solution in DMSO (99.97%, H₂O < 0.1%) for 20 min (RT, in dark) without fixation. Next, the material was washed several times with PBS. The nuclei were labeled with 1 µg/mL DAPI (30 min, RT, in dark). The material was visualized using an Olympus FluoView FV3000 confocal laser scanning microscope. Signals were collected in the range of 430–470 nm for DAPI and 500–600 nm and 570–670 nm for JC-1.

ThiolTracker violet staining

ThiolTracker Violet is commonly used for estimating the cellular level of reduced glutathione (GSH) as the mechanism of detoxification. The dye combines with reduced GSH to produce green fluorescence. Dissected organs were stained with ThiolTracker Violet (10 μ M) according to the manufacturer's protocol (chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgldefinmkaj/<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp10095.pdf>) and DAPI (1 μ g/mL, 30 min, RT, in the dark). After washing the material with PBS, it was examined using an Olympus FluoView FV3000 confocal laser scanning microscope. Signals were collected in the range of 430–470 nm for DAPI and 500–600 nm for ThiolTracker Violet.

Quantitative analysis by flow cytometry

The dissected organs (midgut, fat body, silk gland) isolated from each experimental group were mechanically fragmented and homogenized in cold PBS/TBS buffer using a mechanical homogenizer (BEAD BUG MICROTUBE HOMOGENIZER) to perform quantitative analyses. Then, the cell suspension was washed by centrifugation at 1500 rpm for 5 min, and the pellet was resuspended in 100 μ L of PBS^{40,56}. For each of the methods described below, and for statistical analyses, each tested sample corresponded to an organ from one individual ($n = 5$).

Annexin V

Quantitative measurement of viable, apoptotic, and necrotic cells in the midgut, silk glands, and fat body of *G. mellonella* was performed with the Annexin V-FITC (fluorescein isothiocyanate) Apoptosis Detection Kit (Abcam, No. ab14085) according to the manufacturer's protocols. Apoptotic cells, after staining with the FITC-labeled Annexin V, emit green fluorescence. The propidium iodide (PI) positive cells exhibit red fluorescence; thus, the distinction between necrotic cells (Annexin V-FITC-/PI+) and apoptotic cells (early apoptosis: Annexin V-FITC+/PI- or late apoptosis: Annexin V-FITC+/PI+) is enabled. Five microliters of Annexin V-FITC, 5 μ L of PI and 500 μ L of binding buffer were added to the previously prepared cell suspension (50 μ L of cell suspension in 100 μ L of PBS, pH 7.4) and incubated for 10 min. Then the samples were ready for acquisition using the Beckman Coulter Instrument FC 500 flow cytometer with a 488 nm argon laser. Results were expressed as the percentage of apoptotic (early and late) and necrotic cells⁵⁶.

Muse multi-color DNA damage kit

The Muse Multi-Color DNA Damage Kit (Cytek, SKU MCH200107) enables quantification of the percentage of negative cells (without DNA damage), ATM-activated cells, H2A.X-activated cells, and cells with DNA double-strand breaks. The quantitative analysis was conducted according to the procedure presented by the manufacturer's protocol (<https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/muse-multi-color-dna-damage-kit-rsp.pdf>) and analyzed using the Muse Cell Analyzer.

Muse multicaspase kit

The Muse MultiCaspase Kit (Cytek, SKU MCH100109) is applied to analyze live/caspase(-), live/caspase(+), dead/caspase(+), and dead/caspase(-) cells. Thus, the quantitative analysis of cell death processes (apoptosis and necrosis) as well as the participation of apoptotic caspases in the functioning of cells could be conducted. The quantitative analysis was conducted according to the procedure presented by the manufacturer's protocol (<https://welcome.cytekbio.com/hubfs/Amnis-and-Guava-Products/Muse-MultiCaspase-Kit-QRC.pdf>). The material was examined using the Muse Cell Analyzer.

Muse Bcl-2 activation dual detection kit

The Muse Bcl-2 Activation Dual Detection Kit (Cytek, SKU MCH200105) enables one to measure total and phosphorylated Bcl-2 protein using two antibodies: a phospho-specific anti-phospho-Bcl-2 (Ser70)-Alexa Fluor 555 and an anti-Bcl-2-PECy5 conjugated antibody. The quantitative analysis of inactivated cells, cells activated via phosphorylation, and non-expressing cells was conducted according to the procedure described in the manufacturer's protocol (<https://cytekbio.com/products/muse-bcl-2-activation-dual-detection-kit?variant=40651391008804>). The measurements were performed using the Muse Cell Analyzer.

Muse cell cycle kit

Muse Cell Cycle Kit (Cytek, SKU MCH100106) enables quantitative analysis of cells in different phases of the cell cycle: G_0/G_1 , S, G_2/M . Isolated intestines were prepared for analysis using the MUSE flow cytometer according to the protocol recommended by the manufacturer (<https://cytekbio.com/products/muse-cell-cycle-kit?variant=40651389927460>): fixation in 70% ethanol (24 h, on ice), washing in PBS, incubation in Muse Cell Cycle Reagent (30 min, room temperature, in dark), and finally examination using a Muse Cell Analyzer.

ADP/ATP ratio and ATP content

The ApoSENSOR™ ATP Cell Viability Bioluminescence Assay Kit (BioVision, No. K254 and ApoSENSOR ADP/ATP Ratio Bioluminescence Assay Kit (BioVision, No. K255) were used according to the manufacturer's protocols. Determination of ATP content was based on the reaction of oxidative decarboxylation of luciferin catalyzed by luciferase. Light intensity, measured by the luminometric method at a wavelength of 562 nm, is proportional to the ATP content in the examined sample. ADP level was measured by its conversion to ATP, which was detected using the same reaction. The concentration of ATP in materials was calculated based on the standard curve, which was prepared using the ATP standard provided in the kit. Results were expressed as nmol ATP · mg⁻¹ protein.

Protein content was measured according to Bradford (1976), using bovine albumin (protein content >95%, Fluka) as the standard.

Statistical analysis

The statistical analyses were conducted using the STATISTICA 13.3 software. The normality of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test. Levene's test was applied to check the homogeneity of variance. To evaluate the significance of differences in the levels of quantitative parameters across experimental groups, considering the studied organs and applied stress factors, the Tukey test was used ($P < 0.05$). Differences between control and experimental groups in terms of parameter levels were assessed using Student's *t*-test ($P < 0.05$). Additionally, to assess the significance of differences in parameter levels with respect to organ type and treatment across experimental groups, both one-way and two-way analyses of variance (ANOVA/MANOVA) were performed.

Results

Cell death caused by PP

The quantitative analysis connected with the cell death in *G. mellonella* organs revealed no statistically significant differences in the percentage of early apoptotic cells between groups in any of the analyzed organs, depending on the applied stressors (PP). Nevertheless, the highest percentage of early apoptotic changes was recorded in the fat body of *G. mellonella* larvae (Fig. 2A–C). In both the larval silk glands and the fat body, no significant differences were found in the percentage of late apoptotic cells after exposure to the applied stressors. However, in the midgut, a nearly twofold increase in the percentage of late apoptotic cells was observed under starvation conditions, and a threefold increase in the percentage of necrotic cells was recorded after 24-hour exposure to PP compared to the control group. The percentage of necrotic cells in the silk glands was lowest after 24-hour exposure to PP (G0-24), while in the fat body, the lowest level of this parameter was observed after 48-hour exposure to PP (G0-48) (Fig. 2B, C). The qualitative analysis (TUNEL assay) showed signals emitted by apoptotic cells along the entire length of the midgut epithelium, and throughout the silk gland and fat body. A slight increase in signals originating from apoptotic nuclei was noticeable in *G. mellonella* larvae from group G0-48 (Fig. 2D).

The lowest percentage of viable cells was recorded in the midgut of individuals exposed to PP for 48 h (G0-48). In this organ, the level of this parameter was more than three times lower compared to the other experimental groups, including the control (Fig. 3A). In contrast, a significant decrease in the proportion of viable cells was observed only in response to starvation (G0-S) in both the silk glands and the fat body of *G. mellonella* larvae, compared to the control (Fig. 3B, C). The highest percentage of caspase-positive viable cells—on average three times higher than in the control group—was observed in the midgut of individuals after 48-hour exposure to PP (Fig. 3A). In the larval midgut, starvation also led to a significant increase in the proportion of both caspase-positive dead cells and dead cells, by approximately tenfold and threefold, respectively, compared to the control (Fig. 3A). Additionally, the proportion of caspase-positive dead cells increased in this organ after 48 h exposure to PP (Fig. 3A). In the fat body, the highest percentage of caspase-positive viable cells was recorded under starvation conditions. This organ also showed a significant decrease in the percentage of caspase-positive dead cells compared to the control (Fig. 3C). No statistically significant differences were found between experimental groups in the silk glands in the percentages of caspase-positive viable cells, caspase-positive dead cells, or dead cells (Fig. 3B).

The highest percentage of Bcl-2-activated cells was observed in the midgut of *G. mellonella* larvae after 24-hour exposure to PP (G0-24). A significant increase in the proportion of Bcl-2-activated cells was also recorded in the fat body after 48-hour exposure to PP (G0-48), although these changes were approximately half as pronounced as those observed in the midgut. No significant differences were found in silk gland cells compared to the control group for this parameter (Fig. 4A). In the midgut, regardless of the type of stressor applied, the percentage of Bcl-2-inactivated cells was significantly lower than in the control, while the proportion of cells lacking Bcl-2 expression was significantly higher—almost twofold—across all experimental groups (Fig. 4B, C). The opposite pattern was recorded in the silk glands of analyzed larvae: in both starved and PP-exposed animals, the proportion of Bcl-2-inactivated cells was significantly higher, and the percentage of cells lacking Bcl-2 expression was significantly lower, compared to the control group (Fig. 4B, C). In the fat body, the observed changes were less pronounced and occurred only after 24-hour PP exposure. In this group, a significantly lower proportion of Bcl-2-inactivated cells and a correspondingly higher percentage of cells lacking expression were noted compared to the other experimental groups (Fig. 4B, C).

DNA damage in *G. mellonella* organs caused by PP

A significant increase in the percentage of cells with total DNA damage was observed in both the midgut and fat body of *G. mellonella*. In the PP-exposed groups (G0-24), DNA damage increased nearly twofold in the midgut and almost threefold in the fat body compared to the control, with overall changes reaching approximately fourfold relative to baseline levels. The lowest percentage of cells with total DNA damage was recorded in the silk gland cells of *G. mellonella* following starvation (G0-S) and PP exposure for 24 h (G0-24). These changes were statistically significant compared to both the control group and the group exposed to PP for 48 h (Fig. 5).

Relationship between ATP, GSH, and mitochondrial dysfunctions in *G. mellonella* organs caused by PP

The *G. mellonella* fat body was the only organ in which the applied stressor caused a statistically significant decrease in ATP concentration compared to the control, nearly fourfold. A similar trend was observed in midgut cells of the analyzed larvae; however, this change was not statistically significant. The ADP/ATP ratio remained comparable to control values regardless of the type of stressor applied or the organ analyzed (Fig. 6A,

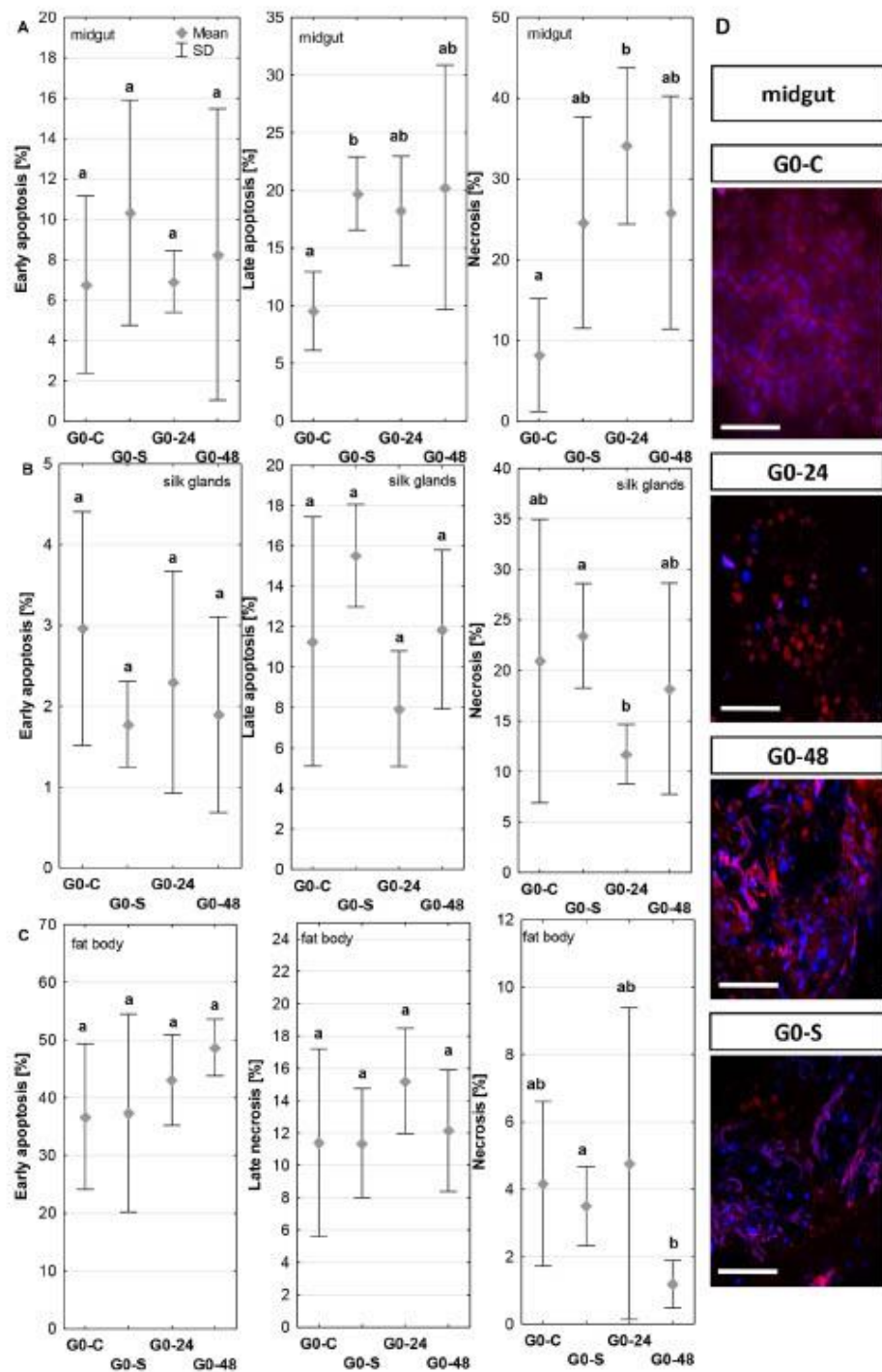


Fig. 2. (A–C) Quantitative analysis of cell death using Annexin V staining. Percentage of early apoptotic cells, late apoptotic cells, and necrotic cells in midgut (A), silk glands (B), and fat body (C) in individuals from control groups (G0-C) and subjected to starvation (G0-S) and exposed to polypropylene for 24 h (G0-24) or 48 h (G0-48) in cells of the analyzed organs. Different letters (a, b) indicate statistically significant differences among groups within each parameter and organ (Tukey's test, $p < 0.05$). (D) 3D representation of the TUNEL assay and DAPI staining of *G. mellonella* midgut. Confocal microscopy reveals the nuclei of apoptotic cells (red signals, indicated by arrows) and normal nuclei (blue signals). Scale bars = 18 μ m.

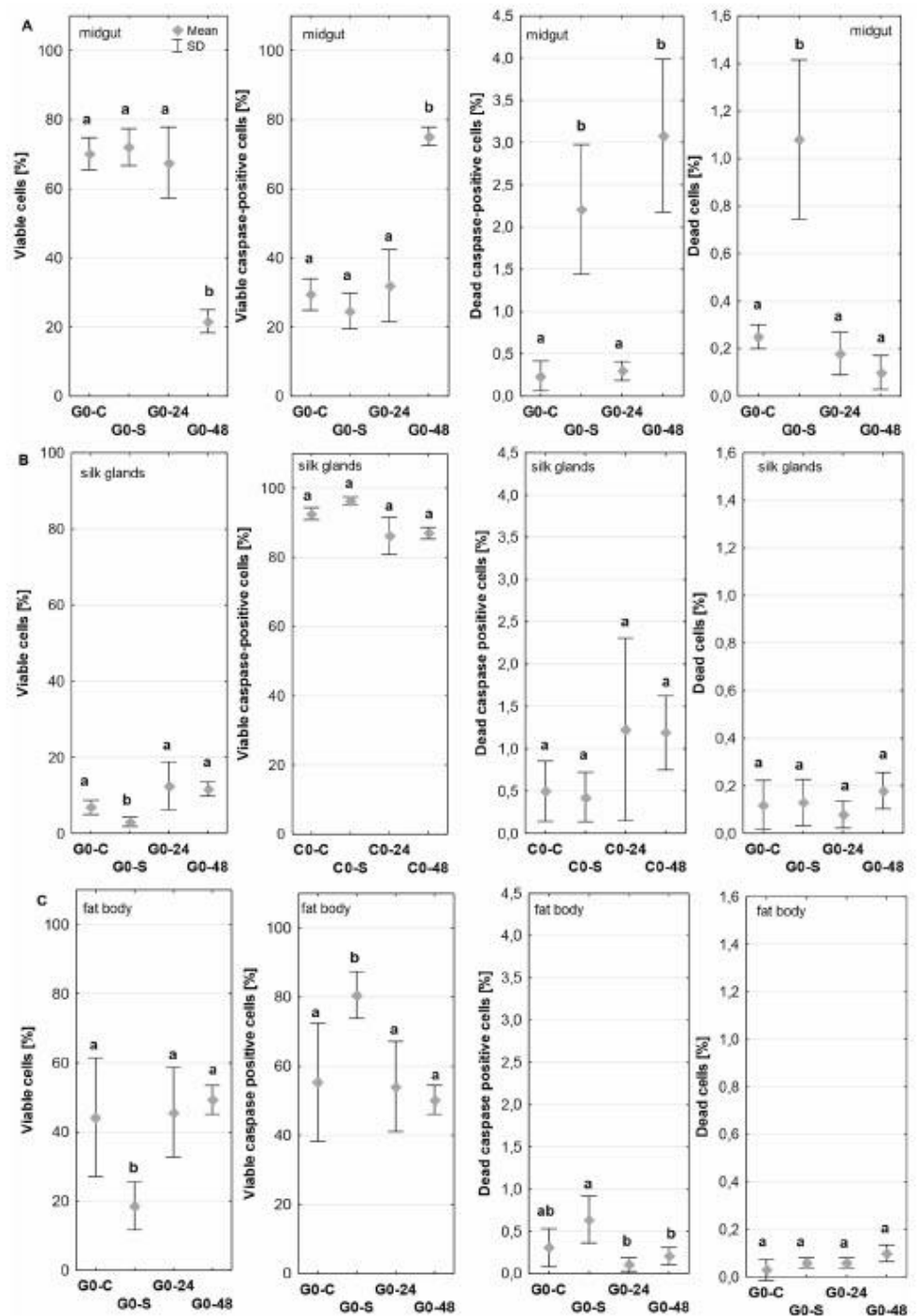


Fig. 3. The percentage of viable cells, viable caspase positive cells, dead caspase positive cells and dead cells in midgut (A), silk glands (B) and fat body (C) in individuals from control groups (G0-C) and subjected to starvation (G0-S) and exposed to polypropylene for 24 h (G0-24) or 48 h (G0-48) in cells of the analyzed organs. Different letters (a, b) indicate statistically significant differences among groups within each parameter and organ (Tukey's test, $p < 0.05$).

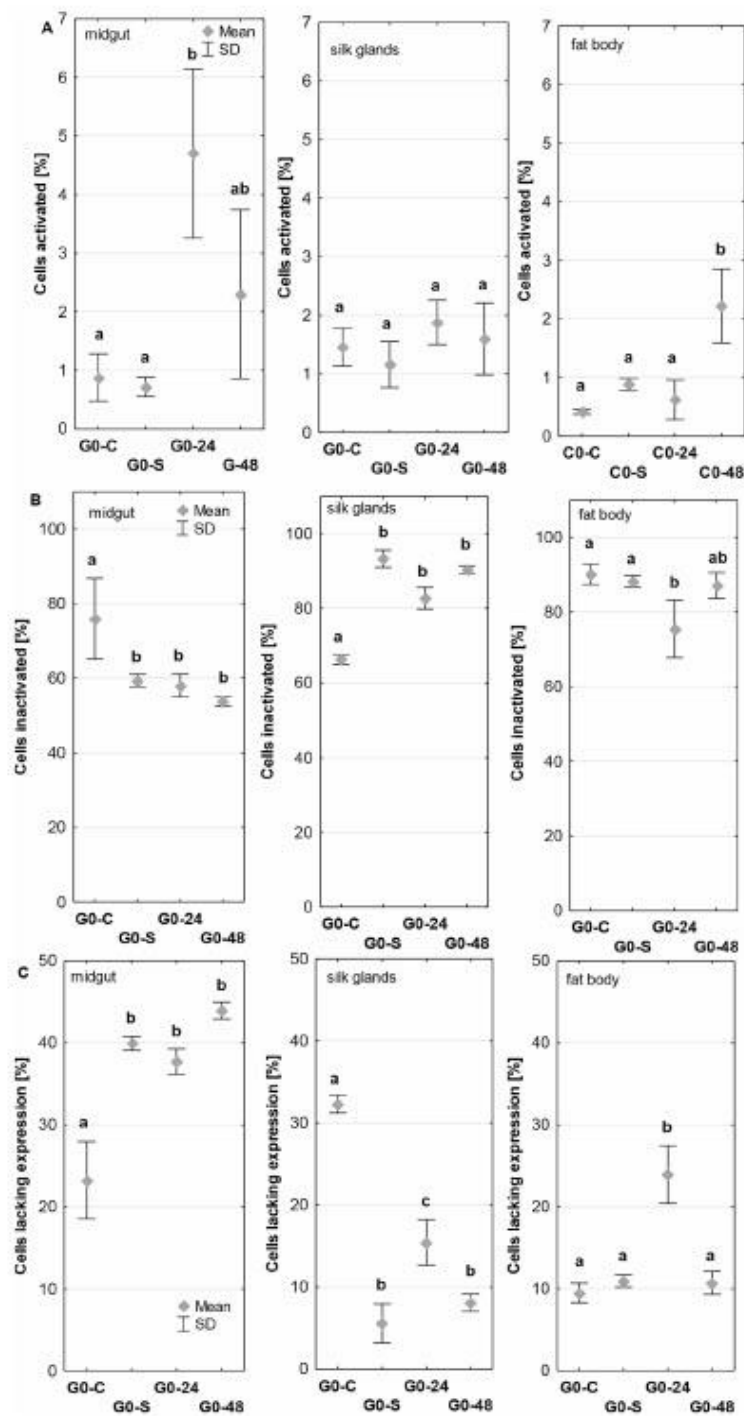


Fig. 4. The percentage of Bcl-2-cells activated (A), Bcl-2-cells inactivated (B), and cells lacking expression of Bcl-2 (C) in individuals from control groups (G0-C) and subjected to starvation (G0-S) and exposed to polypropylene for 24 h (G0-24) or 48 h (G0-48) in cells of the analyzed organs. Different letters (a, b, c) indicate statistically significant differences among groups within each parameter and organ (Tukey's test, $p < 0.05$).

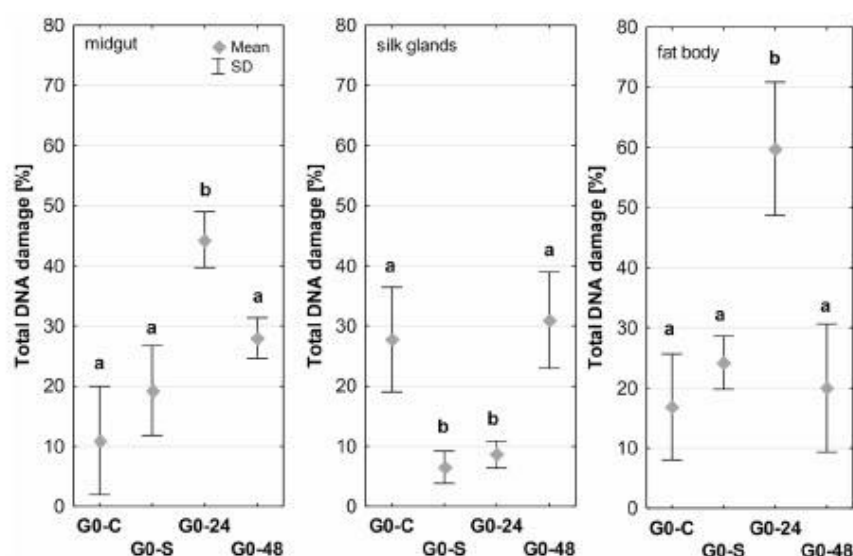


Fig. 5. The percentage of cells with total DNA damage in individuals from control groups (G0-C) and subjected to starvation (G0-S) and exposed to polypropylene for 24 h (G0-24) or 48 h (G0-48) in cells of the analyzed organs. Different letters (a,b) indicate statistically significant differences among groups within each parameter and organ (Tukey's test, $p < 0.05$).

B). Similarly, analysis using the JC-1 reagent showed that in the fat body and midgut, the number of green signals emitted by depolarized, inactive mitochondria increased (Fig. 6C). No changes were detected in the level of ATP and mitochondrial membranes in the silk gland of *G. mellonella*. ThiolTracker Violet staining revealed that the cellular level of reduced glutathione (GSH) increased after 24 h of PP consumption, while after 48 h it started to decrease in all analyzed organs (Fig. 7).

Lysosomes in *G. mellonella* organs after PP feeding

Confocal microscopy showed in all organs examined an increase in signals emitted by lysosomes with increasing time of PP consumption by *G. mellonella* larvae (Fig. 8).

Cell cycle in *G. mellonella* organs after PP feeding

A significant increase in the percentage of cells in the S phase, compared to the control, was observed in the midgut of larvae fed with PP for 24 h and 48 h (G0-24 and G0-48) (Fig. 9A). In contrast, the opposite trend was noted in the fat body, where the percentage of cells in the S phase in the corresponding experimental groups was nearly two-fold lower than in the control group. Moreover, after 48 h of PP exposure, a nearly two-fold increase in the percentage of cells in the G2/M phase was recorded in the fat body of larvae compared to the remaining experimental groups (Fig. 9C). In the case of the silk glands, the percentage of cells in the individual phases of the cell cycle remained at a comparable level regardless of the experimental group and was similar to the values observed in the control group (Fig. 9B).

Among the grouping variables analyzed—namely organ type (O) and treatment (SF)—treatment exhibited the strongest influence on the variability of the examined parameters within the experimental groups. In contrast, organ type showed the weakest effect on ATP levels, the ADP/ATP ratio, total DNA damage, and the quantitative changes associated with apoptosis and necrosis. For the remaining parameters, the significance of all variables—considered both individually and in interaction—was confirmed (Tables 1, 2 and 3, Supplementary material).

Discussion

Oxidative stress is a proapoptotic stimulus^{57,58}, which can lead to cell death^{59–62}. Apoptosis is a highly regulated process that is essential for maintaining tissue homeostasis⁶³. Several signaling pathways participate in the activation of this cell death, including the intrinsic (mitochondrial) and extrinsic (death receptor) pathways. Thus, the activation of caspases (e.g., caspase-3, 6, 7, 8, and –9) plays an essential role in apoptotic signaling cascades^{64–67}. However, the intrinsic pathway is regulated by the Bcl-2 protein family⁶⁸, which contains both pro- and anti-apoptotic family members. Anti-apoptotic members of the Bcl-2 family prevent MOMP, thereby inhibiting apoptosis rather than promoting cell proliferation^{67,69–72}. Necrosis is generally characterized as energy-independent cell death, caused by trauma or different stressors⁷³. Cell death in the *G. mellonella* midgut after 48 h of PP ingestion is not caused by oxidative stress, as ROS levels in the cells decrease. There is a significant increase in the number of cells undergoing apoptosis and necrosis, as well as the involvement of caspases in the cell death. In the case of a fat body, ROS levels are low³⁹, so oxidative stress and cell death activation do not occur, despite a slight increase in caspase levels. Apoptosis leads to, e.g., nuclear DNA damage^{74,75}, which activates various DNA repair mechanisms, including increased DNA synthesis^{76,77}. In the *G. mellonella* midgut, increased DNA damage

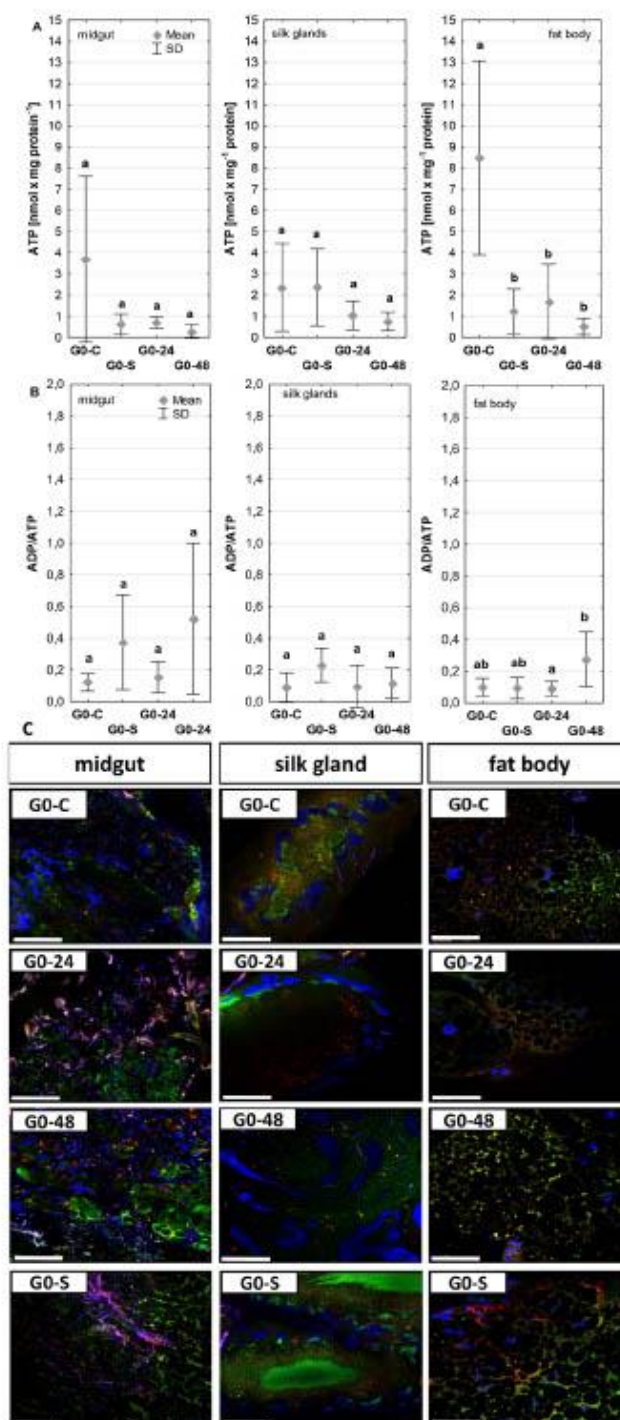


Fig. 6. (A,B) Quantitative analysis of ATP concentration (A) and ADP/ATP ratio (B) in individuals from control groups (G0-C) and subjected to starvation (G0-S) and exposed to polypropylene for 24 h (G0-24) or 48 h (G0-48) in cells of the analyzed organs. Different letters (a, b) indicate statistically significant differences among groups within each parameter and organ (Tukey's test, $p < 0.05$). (C) 3D representation of the localization of active mitochondria with the high membrane potential (red signals), inactive mitochondria with a low membrane potential (green signals), and nuclei (blue signals). JC-1 cationic dye, DAPI staining. Confocal microscope. Scale bars = 20 μm.

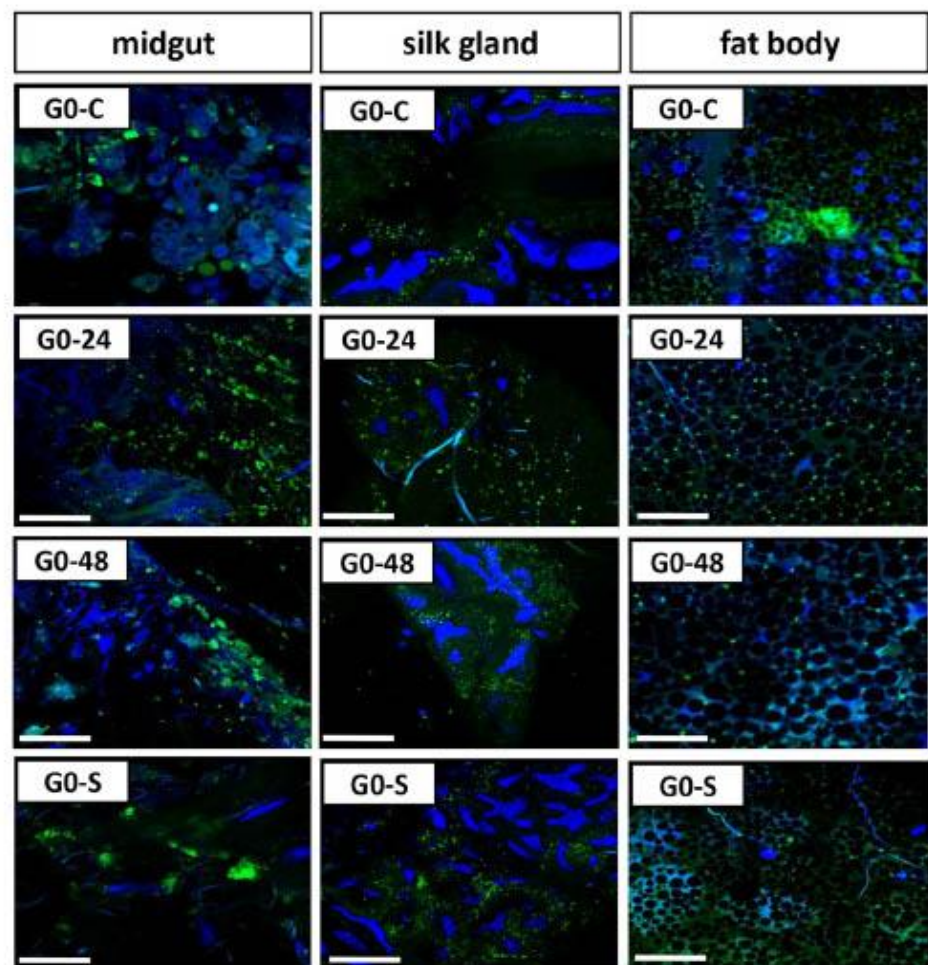


Fig. 7. 3D representation of ThiolTracker Violet and DAPI staining of *G. mellonella* midgut, silk gland, and fat body. Confocal microscopy revealed the cellular localization of reduced glutathione (GSH, green signals) and nuclei (blue signals). Scale bars = 17 μ m.

clearly activates DNA synthesis, which was observed with increasing PP consumption. However, in the fat body, although DNA damage occurs in the cell nuclei, DNA synthesis does not increase. In silk glands, the absence of DNA damage due to a PP diet does not activate DNA synthesis. Therefore, a clear relationship between cell death and DNA synthesis was observed, which constitutes a protective mechanism. Such a relationship is treated as an evolutionary link between cell cycle and cell death mechanisms^{78,79}.

In both organs, there is an increase in the level of the Bcl-2 protein, whose anti-apoptotic function is associated with mitochondria. Because mitochondrial damage occurs in both of these organs, it can be assumed that changes in mitochondrial outer membrane permeabilization may be related to insufficient levels of this protein^{67,72,80}. In the silk gland, although ROS levels initially increase and then decrease, cell death processes are not activated. Analysis of the relationship between cell death activation and oxidative stress levels in *G. mellonella* organs clearly shows that the consumption and digestion of PP by larvae does not affect the activation of cell death processes. However, mitochondria are damaged, which suggests the need for further research on the effect of PP in the diet of *G. mellonella* larvae on the functioning of these organelles.

Mitochondria are among the first organelles targeted by oxidative stress^{39,59,61,81–83}. They are the primary intracellular site of oxygen consumption and the major source of ROS^{84,85}. The low level of ROS generated under physiological conditions participates in signaling pathways. However, when the level of ROS increases according to toxic or pathological conditions, dysfunction of mitochondria occurs, or different cytotoxic processes are activated (e.g., cell proliferation, cell death)^{61,86–88}. Thus, different mechanisms can be activated to protect mitochondria and maintain a constant level of ATP. GSH (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) is one of the antioxidants that takes part in the regulation of mitochondrial membrane permeabilization. It is distributed in different cellular organelles and structures, including mitochondria⁸⁵. GSH can react with numerous free radicals, leading to the reduction of hydroxyl peroxide. Alternatively, GSH can enhance the activity of several antioxidative enzymes, thereby enabling the activation of the antioxidative machinery. Thus, GSH serves as

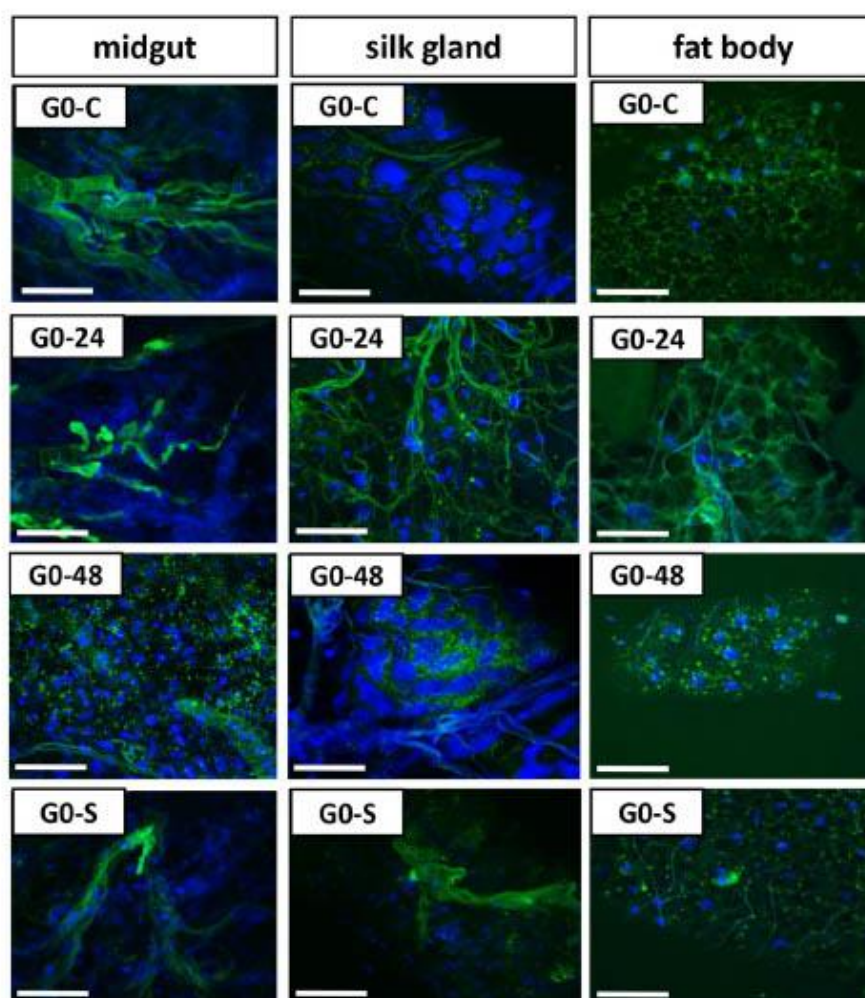


Fig. 8. 3D representation of the CellLight Lysosomes-GFP staining and DAPI staining of *G. mellonella* organs: midgut, silk gland, and fat body. Confocal microscopy shows lysosomes (green signals) and nuclei (blue signals). Midgut, scale bars = 19 μ m. Silk gland, scale bars = 15 μ m. Fat body, scale bars = 17 μ m.

a protective barrier for the mitochondria, preventing them from degenerating or becoming inactivated and, eventually, its death^{84,89–92}. Our previous studies on *G. mellonella* showed that the number of ROS-positive cells in the midgut epithelial cells and the silk gland increased after 24 h of the experiment. However, after 48 h, a decrease in the number of these cells was observed. In a fat body, the level of ROS decreased regardless of the duration of the PP diet²². The present study showed that ATP decreased significantly in the fat body and slightly in the intestine, which aligns with the observation of a greater number of inactive or damaged mitochondria with altered membrane potential. In both organs, GSH levels are elevated after 24 h of PP ingestion, but a decrease in GSH levels was observed after 48 h. This suggests that GSH levels after 24 h are sufficient to protect mitochondria and maintain ATP synthesis, but longer-term PP ingestion likely impairs GSH synthesis, which is insufficient to protect mitochondria^{84,85,88,93}. Increased GSH levels correlate with elevated ROS levels in the intestine and fat body in *G. mellonella*. When ROS levels decrease, GSH levels also decrease. Thus, GSH will contribute to reducing ROS levels in the midgut and fat body²², but it will be insufficient to protect mitochondria⁹⁴. In the silk gland, although ROS levels increase and then decrease, no changes in ATP levels or mitochondrial membranes were observed. This confirms previous studies²² reporting that this organ is less sensitive to oxidative stress. Another mechanism that protects against mitochondrial dysfunction is autophagy^{95,96}. This process is activated when different organelles (e.g., mitochondria) are damaged^{39,97–99}. To protect the cell from the accumulation of damaged structures, they are surrounded by phagophore membranes and enclosed in the autophagosome^{100,101}. Thus, autophagy prevents the cell from initiating degenerative processes^{40,61,102–105}. The increased number of strongly acidic structures²² and lysosomes (our studies), according to the prolonged time of PP consumption, suggests that this process in *G. mellonella* is also insufficient to protect mitochondria, as the number of these non-active or damaged organelles increases¹⁰⁶.

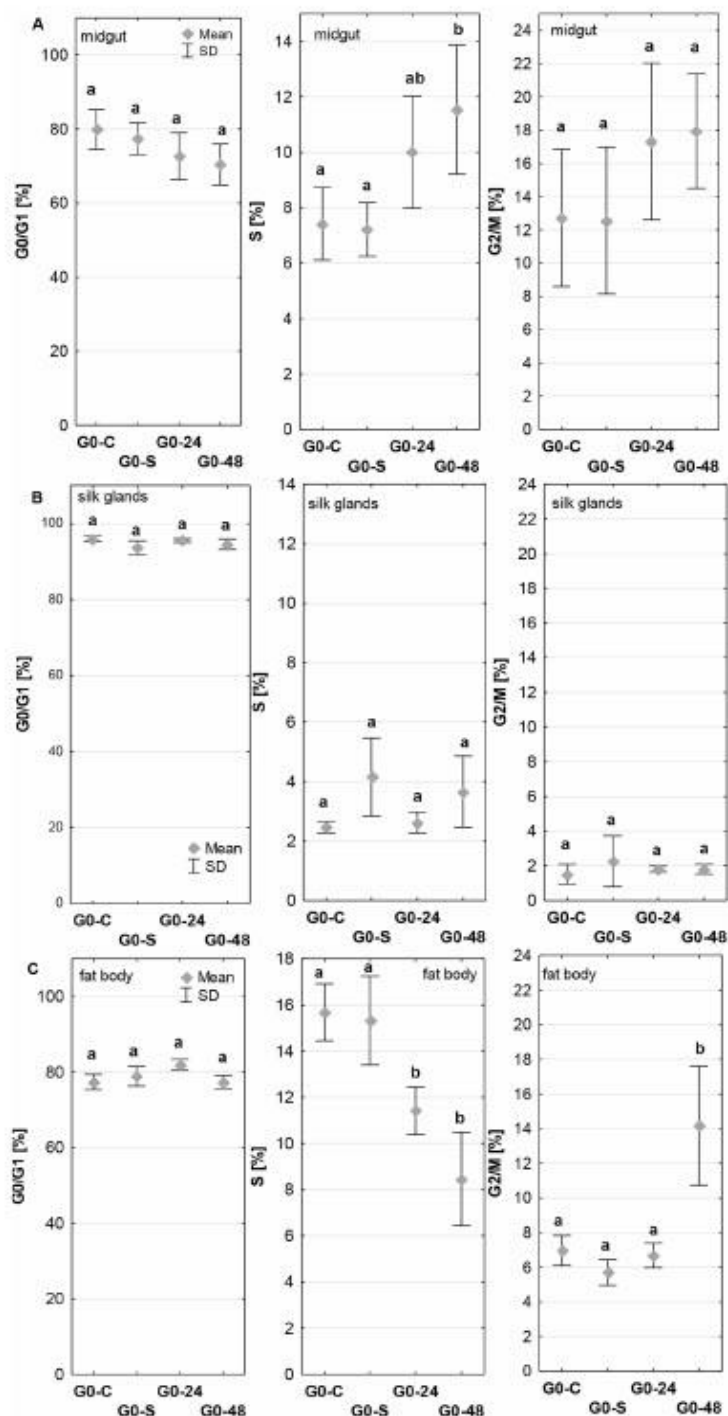


Fig. 9. The percentage of cells in phase G0/G1, S, and G2/M in individuals from control groups (G0-C) and subjected to starvation (G0-S) and exposure to PP for 24 h (G0-24) or 48 h (G0-48) in midgut (A), silk glands (B), and fat body (C). Different letters (a, b) indicate statistically significant differences among groups within each parameter and organ (Tukey's test, $p < 0.05$).

Conclusion

Analysis of the relationship between cell death activation and oxidative stress levels in *G. mellonella* organs clearly shows that the consumption and digestion of PP by larvae do not affect the activation of cell death processes. Autophagy, DNA synthesis, and GSH are involved in the survival pathway; however, they are not sufficient to

protect mitochondria. All the changes are most pronounced in the midgut, which is due to this organ's direct contact with PP, a component of the diet. All changes induced by starvation suggest that the presence of PP in the diet does not drive this process. In larvae consuming PP, mechanisms are activated to protect organ cells from the degradation products of PP. This suggests that *G. mellonella* can probably be used in the biodegradation of PP. Ultimately, we can conclude that laboratory-based feeding experiments provide valuable insights into biological responses to stressors, such as plastics, and they may reflect the behavioral adaptations present in the environment.

Data availability

All raw data used in this publication are held in Professor Rost-Roszkowska's repository (corresponding Author) and will be available upon request.

Received: 27 October 2025; Accepted: 23 December 2025

Published online: 07 January 2026

References

- Kik, K., Bukowska, B. & Sicińska, P. Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environ. Pollut.* 262, 114297 (2020).
- Lin, S., Zeng, L., Wang, H., Usman, M. & Hedvicakova, M. The effect of waste plastic on environmental degradation: a corporate perspective. *Pol. J. Environ. Stud.* 34, 203–211 (2024).
- Chamas, A. et al. Degradation rates of plastics in the environment. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 8, 3494–3511 (2020).
- Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E. & Svendsen, C. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: evaluating the current Understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Sci. Total Environ.* 586, 127–141 (2017).
- Phuong, N. N. et al. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environ. Pollut.* 211, 111–123 (2016).
- da Costa, J. P., Duarte, A. C. & Rocha-Santos, T. A. P. Microplastics – occurrence, fate and behaviour in the environment. In *Comprehensive Analytical Chemistry*. (Elsevier, 2017).
- Maddah, H. A. Polypropylene as a promising plastic: A review. *Am. J. Polym. Sci.* 6, 1–11 (2016).
- Hossain, M. T. et al. Research and application of polypropylene: a review. *Discover Nano.* 19, 2 (2024).
- Yang, S. S. et al. Biodegradation of polypropylene by yellow mealworms (*Tenebrio molitor*) and superworms (*Zophobas atratus*) via gut-microbe-dependent depolymerization. *Sci. Total Environ.* 756, 144087 (2021).
- Wang, Z., Xin, X., Shi, X. & Zhang, Y. A polystyrene-degrading *Acinetobacter* bacterium isolated from the larvae of *Tribolium castaneum*. *Sci. Total Environ.* 726, 138564 (2020).
- Riudavets, J., Salas, I. & Pons, M. J. Damage characteristics produced by insect pests in packaging film. *J. Stored Prod. Res.* 43, 564–570 (2007).
- Nyamjav, L., Jang, Y., Park, N., Lee, Y. E. & Lee, S. Physicochemical and structural evidence that *Bacillus cereus* isolated from the gut of waxworms (*Galleria mellonella* larvae) biodegrades polypropylene efficiently in vitro. *J. Polym. Environ.* 31, 4274–4287 (2023).
- Mallar, C. N. R. A review on the role of insects and their gut microbiota in plastic biodegradation. Master's thesis, (University of Innsbruck, 2020).
- Kesti, S. S. K. & Thimmappa, S. C. T. First report on biodegradation of low density polyethylene by rice moth larvae, *Corcyra cephalonica* (Stainton). *Holist. Approach Environ.* 9, 79–83 (2019).
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W. M., Zhao, J. & Jiang, L. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environ. Sci. Technol.* 48, 13776–13784 (2014).
- Song, Y. et al. Biodegradation and disintegration of expanded polystyrene by land snails *Achatina fulica*. *Sci. Total Environ.* 746, 141289 (2020).
- Thakur, B. et al. Enzyme-microplastic interaction induces oxidative stress in earthworms: a molecular Docking and toxicity study. *Discov. Soil.* 2, 43 (2025).
- Zhao, S. et al. Polystyrene-degrading bacteria in the gut Microbiome of marine benthic polychaetes support enhanced digestion of plastic fragments. *Commun. Earth Environ.* 5, 1 (2024).
- Istomina, A. et al. Biodegradation of polyethylene in digestive gland homogenates of marine invertebrates. *PeerJ* 11, e17041 (2024).
- Bombelli, P., Howe, C. J. & Bertocchini, F. Polyethylene biodegradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Curr. Biol.* 27, R292–R293 (2017).
- Lou, Y. et al. Biodegradation of polystyrene by greater wax moth larvae (*Galleria mellonella* L.) and the effect of co-diet supplementation on the core gut Microbiome. *Environ. Sci. Technol.* 54, 2821–2831 (2020).
- Rost-Roszkowska, M. et al. Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Eur. Zool. J.* 91, 213–234 (2024).
- Scoble, M. *Classification of the Lepidoptera* (Oxford University Press, 1995).
- Mikulak, E., Gliniewicz, A., Przygodzka, M. & Solecka, J. *Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies. *Przegl. Epidemiol.* 72, 57–73 (2018).
- Wojda, I., Staniec, B., Sulek, M. & Kordaczuk, J. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. *Pathog. Dis.* 78, ftaa057 (2020).
- Ellis, J. D., Graham, J. R. & Mortensen, A. Standard methods for wax moth research. *J. Apic. Res.* 52, 1–17 (2013).
- Peydaei, A., Bagheri, H., Gurevich, L., de Jonge, N. & Nielsen, J. L. Impact of polyethylene on salivary glands proteome in *Galleria mellonella*. *Comp. Biochem. Physiol. D Genomics Proteom.* 34, 100678 (2020).
- Khyade, V. Review on biodegradation of plastic through waxworm (Order: Lepidoptera; family: Pyralidae). *Int. Acad. J. Econ.* 5, 84–91 (2018).
- Kong, H. et al. The *Galleria mellonella* hologenome supports microbiota-independent metabolism of long-chain hydrocarbon beeswax. *Cell. Rep.* 26, 2451–2465 (2019).
- Peydaei, A., Bagheri, H., Gurevich, L., de Jonge, N. & Nielsen, J. L. Mastication of polyolefins alters the microbial composition in *Galleria mellonella*. *Environ. Pollut.* 280, 116877 (2021).
- LeMoine, C., Grove, H., Smith, C. M. & Cassone, B. A very hungry caterpillar: polyethylene metabolism and lipid homeostasis in larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). *Environ. Sci. Technol.* 54, 14706–14715 (2020).
- Cassone, B. J., Grove, H. C., Kurchaba, N., Geronimo, P. & LeMoine, C. M. R. Fat on plastic: metabolic consequences of an LDPE diet in the fat body of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). *J. Hazard. Mater.* 425, 127862 (2022).

33. Ruiz Barrionuevo, J. M., Martín, E. & Galindo Cardona, A. Consumption of low-density polyethylene, polypropylene, and polystyrene materials by larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae), impacts on their ontogeny. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 68132–68142 (2022).
34. Elmekawy, A., Elshehaby, M., Saber, S. & Ayaad, T. Evaluation of *Galleria mellonella* immune response as a key step toward plastic degradation. *J. Basic. Appl. Zool.* 84, 27 (2023).
35. Shvedova, A. A. et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* 66, 1909–1926 (2003).
36. Pitt, J. A., McKenney, C. L. & Gauthier, J. M. Maternal transfer of nanoplastics to offspring in zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Total Environ.* 643, 324–332 (2018).
37. Kostyuk, S. V. et al. Effects of functionalized fullerenes on ROS homeostasis determine their cytoprotective or cytotoxic properties. *Nanomaterials* 10, 1405 (2020).
38. Cocke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroğlu, M. & Lunec, J. Oxidative DNA damage mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17, 1195–1214 (2003).
39. Rost-Roszkowska, M. et al. Investigation of potential cytotoxicity of a water-soluble, red-fluorescent [70]fullerene nanomaterial in *Drosophila melanogaster*. *Nanotoxicology* 19, 1–16 (2024).
40. Gorol, H. et al. How does bisphenol A damage cells? Studies on the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *Eur. Zool. J.* 92, 390–409 (2025).
41. Morgan, M. A., Parsels, L. A., Parsels, J. D., Lawrence, T. S. & Maybaum, J. The relationship of premature mitosis to cytotoxicity in response to checkpoint abrogation and antimetabolite treatment. *Cell. Cycle* 5, 1983–1988 (2006).
42. Liu, S., Yao, S., Yang, H., Liu, S. & Wang, Y. Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis.* 14, 648 (2023).
43. Fernández-Lázaro, D., Sanz, B. & Seco-Calvo, J. The mechanisms of regulated cell death: structural and functional proteomic pathways induced or inhibited by a specific protein—a narrative review. *Proteomes* 12, 3 (2024).
44. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516 (2007).
45. Snigirevskaya, E. S. & Komissarchik, Y. Y. Ultrastructural traits of apoptosis. *Cell. Biol. Int.* 43, 728–738 (2019).
46. Thornberry, N. A. Caspases: a decade of death research. *Cell. Death Differ.* 6, 1023–1027 (1999).
47. Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312–1316 (1998).
48. Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3, 697–707 (1998).
49. Czabotar, P. E. & Garcia-Saez, A. J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 24, 732–748 (2023).
50. Taatjes, D. J., Sobel, B. E. & Budd, R. C. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem. Cell. Biol.* 129, 33–43 (2008).
51. Sehnal, F. A critical study of the biome and biometry of the wax moth *Galleria mellonella* Raised in varying conditions. *Z. Wiss. Zool.* 174, 53–82 (1966).
52. Fasasi, K. A. & Malaka, S. L. O. Life cycle and impact of greater wax moth *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) feeding on stored beeswax. *Niger J. Entomol.* 23, 13–17 (2006).
53. Desai, A. V., Siddhapara, M. R., Patel, P. K. & Prajapati, A. P. Biology of greater wax moth on artificial diet. *J. Exp. Zool. India* 22, 1267–1272 (2019).
54. Wronńska, N., Szlaur, M., Zawadzka, K. & Lisowska, K. The synergistic effect of triterpenoids and flavonoids—new approaches for treating bacterial infections? *Molecules* 27, 847 (2022).
55. Poprawa, I. et al. Ovaries and testes of *Lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda) React differently to the presence of cadmium in the environment. *Sci. Rep.* 12, 6705 (2022).
56. Rost-Roszkowska, M. et al. Effects of short- and long-term exposure to cadmium on salivary glands and fat body of soil centipede *lithobius forficatus* (Myriapoda, Chilopoda): histology and ultrastructure. *Micron* 137, 102915 (2020).
57. Kannan, K. & Jain, S. K. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7, 153–163 (2000).
58. Ryter, S. et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 49–89 (2007).
59. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462 (2014).
60. Wang, L. et al. Effects of cadmium on antioxidant and non-specific immunity of macrobrachium nipponense. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 224, 112651 (2021).
61. Rost-Roszkowska, M. et al. Hazards related to the presence of cadmium in food—studies on the European soil centipede *Lithobius forficatus*. *Sci. Total Environ.* 845, 157298 (2022).
62. Ostróżka, A., Chajec, L., Wilczek, G. & Rost-Roszkowska, M. Toxic effects of nickel on tolerance and regeneration in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 31, 180–205 (2024).
63. Menze, M. A., Fortner, G., Nag, S. & Hand, S. C. Mechanisms of apoptosis in crustacea: what conditions induce versus suppress cell death? *Apoptosis* 15, 293–312 (2010).
64. Kim, J. W., Choi, E. J. & Joe, C. O. Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP. *Oncogene* 19, 4491–4499 (2000).
65. Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A. & Catalano, A. The effects of cadmium toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 3782 (2020).
66. Mustafa, M. et al. Apoptosis: a comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, physiological significance and therapeutic implications. *Cells* 13, 1838 (2024).
67. Vogler, M. et al. The BCL2 family: from apoptosis mechanisms to new advances in targeted therapy. *Signal. Transduct. Target. Ther.* 10, 91 (2025).
68. Singh, R., Letal, A. & Sarosiek, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 20, 175–193 (2019).
69. Vaux, D. L., Cory, S. & Adams, J. M. Bcl-2 gene promotes Haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440–442 (1988).
70. Petros, A. M., Olejniczak, E. T. & Fesik, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 83–94 (2004).
71. Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W. & Bowden, N. A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell. Death Dis.* 10, 177 (2019).
72. Nguyen, D., Osterlund, E., Kale, J. & Andrews, D. W. The C-terminal sequences of Bcl-2 family proteins mediate interactions that regulate cell death. *Biochem. J.* 481, 903–922 (2024).
73. D'Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell. Biol. Int.* 43, 582–592 (2019).
74. Wang, J. DNA damage and apoptosis. *Cell. Death Differ.* 8, 1047–1048 (2001).
75. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078 (2009).
76. De Zio, D., Cianfanelli, V. & Ceconi, F. New insights into the link between DNA damage and apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 559–571 (2013).
77. Ruiz-Losada, M. et al. Coordination between cell proliferation and apoptosis after DNA damage in *Drosophila*. *Cell. Death Differ.* 29, 832–845 (2022).
78. Harper, J. W. & Elledge, S. J. The DNA damage response: ten years after. *Mol. Cell* 28, 739–745 (2007).
79. Loftus, L. V., Amend, S. R. & Pienta, K. J. Interplay between cell death and cell proliferation reveals new strategies for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 4723 (2022).

80. Kalkavan, H. & Green, D. R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell. Death Differ.* 25, 46–55 (2018).
81. Zorova, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* 552, 50–59 (2018).
82. Villalpando-Rodriguez, G. E. & Gibson, S. B. Reactive oxygen species (ROS) regulate different types of cell death by acting as a rheostat. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 9912436 (2021).
83. Rost-Roszkowska, M. et al. Cytotoxic effects of leachate from landfill tanks: A study on the model species *Drosophila melanogaster*. *Sci. Total Environ.* 992, 179956 (2025).
84. Mari, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C. & Fernández-Checa, J. C. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2685–2700 (2009).
85. Ribas, V., García-Ruiz, C. & Fernández-Checa, J. C. Glutathione and mitochondria. *Front. Pharmacol.* 5, 151 (2014).
86. Srinivasan, S. & Avadhani, N. G. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1252–1263 (2012).
87. Rost-Roszkowska, M. M., Vilimová, J., Tajovský, K., Šustr, V. & Ostróžka, A. Structure of the midgut epithelium in four dipterod species: histology, histochemistry and ultrastructure. *Arthropod Syst. Phylogeny* 79, 295–308 (2021).
88. Kozlov, A. V., Javadov, S. & Sommer, N. Cellular ROS and antioxidants: physiological and pathological role. *Antioxidants* 13, 602 (2024).
89. Mari, M. et al. Mitochondrial glutathione: recent insights and role in disease. *Antioxidants* 9, 909 (2020).
90. Franco, R. & Cidlowski, J. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell. Death Differ.* 16, 1303–1314 (2009).
91. Golbidi, S. et al. Glutathione administration reduces mitochondrial damage and shifts cell death from necrosis to apoptosis in ageing diabetic mice hearts during exercise. *Br. J. Pharmacol.* 171, 5345–5360 (2014).
92. Dawood, A. S. & Abaas, H. K. Histopathological study of the effect of glutathione in decreasing pathological changes induced by Estrogen in internal organs of albino mice. *Int. J. Health Sci.* 6, 1019–1034 (2022).
93. Chen, T. H., Wang, H. C., Chang, C. J. & Lee, S. Y. Mitochondrial glutathione in cellular redox homeostasis and disease manifestation. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 1314 (2024).
94. Zechmann, B. Subcellular roles of glutathione in mediating plant defense during biotic stress. *Plants* 9, 1067 (2020).
95. Caramés, B., López de Figueroa, P., Lotz, M. & Blanco, F. J. Autophagy activation protects from mitochondrial dysfunction in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartil.* 22, S135 (2014).
96. El Fissi, N. et al. Preventing excessive autophagy protects from the pathology of MtDNA mutations in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Commun.* 15, 10719 (2024).
97. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43, 67–93 (2009).
98. Yin, Z., Pascual, C. & Klionsky, D. J. Autophagy: machinery and regulation. *Microb. Cell.* 3, 588–596 (2016).
99. Rost-Roszkowska, M. M. et al. Autophagy and apoptosis in the midgut epithelium of millipedes. *Microsc. Microanal.* 25, 1004–1016 (2019).
100. Klionsky, D. J. & Emr, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717–1721 (2000).
101. Gunay, B. & Goncu, E. Role of autophagy in midgut stem cells of silkworm *Bombyx mori*, during larval-pupal metamorphosis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 108, e21832 (2021).
102. Klionsky, D. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222 (2016).
103. Klionsky, D. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 17, 1–382 (2021).
104. Ostróžka, A., Tiffert, Z., Wilczek, G. & Rost-Roszkowska, M. Can insecticide-free clean water regenerate the midgut epithelium of the freshwater shrimp after dimethoate treatment? *Mikron* 155, 103162 (2022).
105. Ostróžka, A. et al. Toxic effects of nickel on tolerance and regeneration in the freshwater shrimp *Neocaridina davidi*. *Eur. Zool. J.* 91, 180–205 (2024).
106. Tang, Y. et al. Autophagy protects mitochondrial health in heart failure. *Heart Fail. Rev.* 29, 113–123 (2024).

Acknowledgements

We thank Dr. Danuta Urbańska-Jasik (University of Silesia in Katowice, Poland) for her technical assistance and Richard Ashcroft (<http://www.anglopolonia.com/home.html>) for language correction.

Author contributions

PM – Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Visualization, Methodology; writing original draft. LC – Methodology; GW – Methodology; Validation; Visualization; SS – Visualization. AKW – Methodology. JH – Methodology; KK – Investigation. KM – Investigation. DS – Investigation. MRR – Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing—original draft; Writing—review & editing. All Authors reviewed the manuscript.

Funding

The article was co-funded by the project "JUŚT transition – Potencjał Uniwersytetu Śląskiego podstawą Sprawiedliwej Transformacji regionu" (FESL.10.25-IZ.01.0369/23-003). The project is implemented under the European Funds for Silesia 2021–2027. Program co-financed by the Just Transition Fund.

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.R.-R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2026

Mermer, P., Martyna, F., & Ostróżka, A. (2025). The use of insects, some land and marine invertebrates, in the biodegradation of plastic. *The European Zoological Journal*, 92(1), 1442–1458. <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2580744>

IF: 1,6 MNiSW: 140pkt



The use of insects, some land and marine invertebrates, in the biodegradation of plastic

P. Mermer, F. Martyna & A. Ostróżka

To cite this article: P. Mermer, F. Martyna & A. Ostróżka (2025) The use of insects, some land and marine invertebrates, in the biodegradation of plastic, The European Zoological Journal, 92:1, 1442-1458, DOI: [10.1080/24750263.2025.2580744](https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2580744)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2580744>



© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 18 Nov 2025.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 843



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tizo21>

The use of insects, some land and marine invertebrates, in the biodegradation of plastic

P. Mermer, F. Martyna and A. Ostróžka

Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland

ABSTRACT

Nowadays, environmental pollution caused by plastics, microplastics, and nanoplastics is an indisputable fact. The vast scale of plastic production, combined with the long period of spontaneous degradation (up to 1000 years) and the lack of effective methods of segregation, recycling, utilization, and degradation of waste, has led to continual growth in environmental pollution. This has been ongoing since the 1950s, when production on a global scale began. In addition to the visual aspect, microplastics have been shown to enter and accumulate within the food chain. The presence of microplastics in living organisms is not without consequence. The harmful effects of microplastics on numerous species of plants and animals, including humans, have been described. The detrimental impact has been demonstrated at the population and individual levels, i.e. at the level of behaviour, functioning, systems, organs, physiology, cell structure and function, and multiple aspects at the DNA level. Therefore, scientists are seeking alternative degradation methods, which include biodegradation. In this process, bacteria decompose the plastic and use it as an energy source for their metabolic processes. Unfortunately, these degradation processes are restricted to a narrow range of parameter values, and even then, their efficiency remains insufficient. Therefore, attention has been drawn to invertebrates that can also biodegrade plastics thanks to the appropriate microflora in their intestines. In biodegradation processes, the animal ingests plastic, breaks it down into microplastic, and then the plastic fragments are covered with biofilm. The actual biodegradation process involves the depolymerization of plastics by enzymes produced by bacteria. Due to the fact that most studies on plastic biodegradation have been published on insects, this review focuses only on selected insect species belonging to different taxa, but also presents other examples of land and marine invertebrates participating in this process. These animals biodegrade different types of plastics with different efficiency. However, due to the great potential of animals in this aspect, it is worth considering using them in the biodegradation of plastics globally, although this issue requires further research.

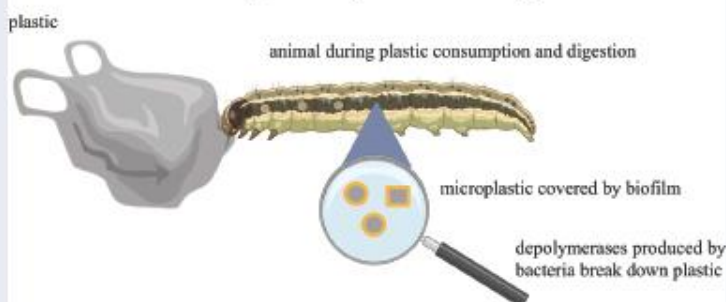
ARTICLE HISTORY

Received 17 April 2025
Accepted 22 October 2025

KEYWORDS

Invertebrates; plastics;
biodegradation; midgut;
depolymerisation

Schema of the biodegradation process involving insect larvae



Introduction

Plastics are synthetic polymers composed of long chains of monomers. Their properties are lightness, plasticity, elasticity, and corrosion resistance. These features have contributed to a significant increase

CONTACT A. Ostróžka  anna.ostrozka@us.edu.pl  Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, University of Silesia in Katowice, Bankowa 9, Katowice 40-007, Poland

© 2025 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

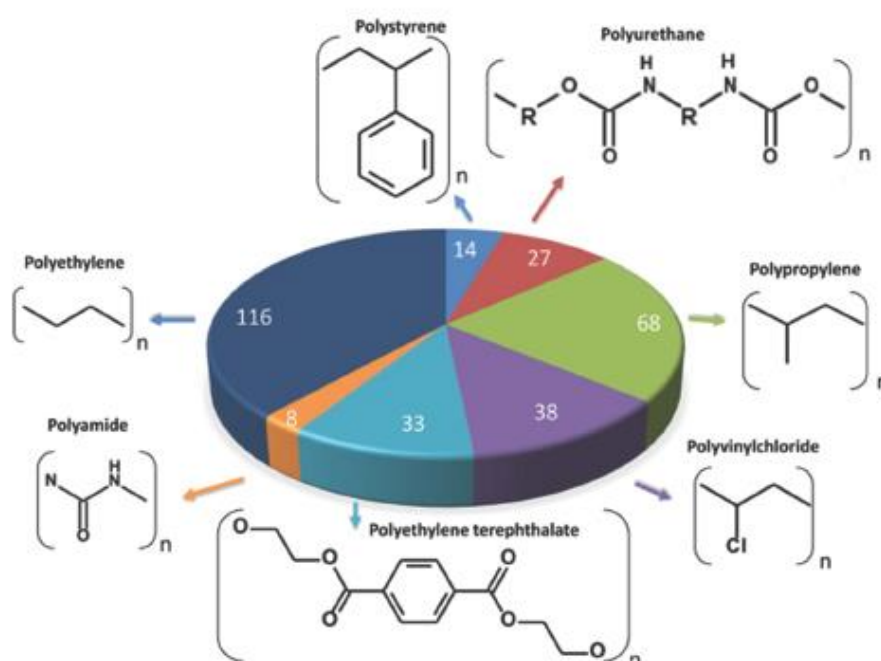


Figure 1. Main synthetic polymers globally produced in 2016. Numbers in the chart indicate the global annual production (millions of tons) of the specified synthetic polymer (Danso et al. 2019).

In the popularity of plastics, allowing them to be used in many areas of our lives and, consequently, widely used in the global economy (Zhang et al. 2021). Global plastic production began in the 1950s. At that time, the intensive development of plastics was also observed (Bilal et al. 2021). In 1950, 1.5 million tons of synthetic polymers were produced, and by 2017, this value had increased to 350 million tons of plastics produced annually (Welden 2020). Over the past 68 years, it has been recorded that 6.3 billion tons of plastic have been produced, and the current rate of plastic production is expected to double by 2038 (Bilal et al. 2021). Currently, due to low production costs and high demand, at least 350 million tons of plastic are produced annually in the world in the form of bottles, plastic bags, food packaging, and many others. Seven types of produced plastics have the most significant economic importance: polyurethane (PUR), polyethylene (PE), polyamide (PA), polyethylene terephthalate (PET), polystyrene (PS), polyvinyl chloride (PVC) and polypropylene (PP) (Figure 1) (Danso et al. 2019).

Plastic pollution and its effects

Plastics, introduced over 70 years ago, have become a major environmental issue. Despite large-scale recycling efforts (e.g. 8.4 million tons in Europe in 2016), much more ends up in landfills (16.7 million tons) (Welden 2020). Municipal waste streams are a major source, with plastic making up about 10%. Plastics pollute land, rivers (Thompson et al. 2009), groundwaters (Balestra et al. 2024), and oceans through sediment movement and improper waste disposal (Thompson et al. 2009).

Already in the 1960s, large plastic accumulations were found along shorelines (up to 100,000 m²), and now massive patches are present in oceans, particularly the South Pacific and Atlantic, covering up to 3.5 million km² (Thompson et al. 2009; Welden 2020). Some plastics sink and accumulate in deep-sea canyons, which are hard to monitor (Welden 2020).

Beyond environmental harm, plastic waste causes financial damage. For example, beach pollution on South Korea's Geoje Island cost \$29–37 million in tourism losses, and Brazilian beaches lost \$8.5 million (Welden 2020).

Table 1. Three forms in which plastics can be found in our environment, x – the dimensions of a piece of plastic.

Form of plastic	Macroplastic	Microplastic	Nanoplastic
Dimensions	$x > 5 \text{ mm}$	$5 \text{ mm} > x > 0.001 \text{ mm}$	$1000 \text{ nm} > x$

Plastics have also introduced new threats: **microplastics** (MP) and **nanoplastics** (Banerjee & Shelver 2021). MPs, sized 0.1 μm to 5 mm (EFSA - the European Food Safety Authority), come in two types: primary (deliberately produced, e.g. in cosmetics) and secondary (from degradation) (Shim et al. 2017; Samsonowska & Kaszuba 2022). Abiotic and biotic factors such as UV light and water accelerate their fragmentation into nanoplastics (having a size of up to 1000 nm or 100 nm) (Table 1) (Oliveira & Almeida 2019).

MPs, especially secondary ones (70–80%), spread easily and are found in all environments (Samsonowska & Kaszuba 2022). For example, they have been detected in the atmosphere, where they circulate and are deposited from the air (Brahney et al. 2021). In the cryosphere, microplastics were found in every Antarctic snow sample collected near Ross Island (Aves et al. 2022). In the marine environment, large amounts have been identified in deep-sea sediments, indicating billions of particles accumulating on the ocean floor (Barrett et al. 2020). Freshwater ecosystems, such as rivers and lakes worldwide, are also contaminated with MPs both in water and sediments (D'Avignon et al. 2022). Terrestrial systems are no exception, as soils show widespread contamination from sewage sludge, mulching, tire wear, and atmospheric deposition (Büks & Kaupenjohann 2020). Finally, MPs are present in drinking water, including both bottled and tap water (Danopoulos et al. 2020). Their characteristics influence how they move, collect toxins, and enter food chains (Bhagat et al. 2022; Samsonowska & Kaszuba 2022; Pyznar et al. 2023; Al-Zawaidah et al. 2024; Park et al. 2024). Research by the Robert Koch Institute in Germany showed that microplastics remain in human blood and urine for 3 years, and an average person may ingest 5 g of plastic weekly (University of Newcastle) (Samsonowska & Kaszuba 2022).

Microplastics affect freshwater algae by disrupting photosynthesis and DNA processes, and they accumulate in the organs of animals (Cong et al. 2025). They block digestive tracts, slow growth, and harm metabolism, reproduction, and organ function (Ansari et al. 2025; Cong et al. 2025).

In humans, MPs can damage organs, disrupt hormones, and carry toxic chemicals (Ansari et al. 2025). On a cellular level, they cause chromosome missegregation, DNA damage, oxidative stress, and gene expression changes (Tang 2025).

Degradation and biodegradation

Plastics undergo spontaneous degradation lasting for a long time (Brebu 2020), even up to 1000 years (Welden 2020). Environmental degradation of plastics can occur through many physical, chemical, and biological processes and combinations thereof. Abiotic factors, i.e. physical or chemical factors, include temperature (thermal degradation), light (photodegradation), air (oxidative degradation), water present in the environment (hydrolytic degradation), UV radiation, and mechanical stress. However, biotic factors include the activities of animals and microorganisms present in the environment or the digestive tract of animals. Both biotic and abiotic factors affect the external appearance and the physical and chemical properties of plastic, which, in the case of degradable plastics, may lead to their mineralization in further stages (Brebu 2020).

Without efficient methods to degrade plastics and spontaneous degradation taking up to 1,000 years, all plastics produced persist in the environment. As a result, the environmental mass of plastic waste increases every year, and its negative impact on the planet grows (Welden 2020). Therefore, there is an increasing demand for efficient, short-term methods of removing plastic waste from the environment (Brebu 2020). In addition to the popular recycling and disposal of plastics, biodegradation is being researched. It involves breaking down and using plastics as an energy source. Although bacteria and fungi are primary agents of biodegradation, various invertebrates also possess this capability (Mitra & Das 2023). Microbial biodegradation of plastics requires that the material be fragmented into sufficiently small pieces to pass through the cell membrane. Most synthetic polymers are too large to be directly absorbed by microorganisms, and therefore must first undergo depolymerization into smaller units- typically oligomers, dimers, or monomers- that can

be transported into microbial cells (Swift 1997), biodegraded (Goldberg 1995) and metabolized (Swift 1997). This size reduction is a prerequisite for further biochemical processing and is achieved through a combination of abiotic and biotic factors. For instance, swelling and cracking of the plastic by fungal hyphae or mechanical fragmentation by insect larvae facilitate access to the polymer (Shah et al. 2008). Once inside the cell, these smaller molecules are subject to enzymatic reactions that lead to mineralization and incorporation into cellular metabolic pathways.

The biodegradation process is influenced by various factors, including polymer properties, pretreatment methods, and the specific requirements of the degrading microorganism. Crucial polymer characteristics include molecular weight, spatial configuration, mobility, the presence of functional groups, and substituents (Artham & Doble 2008). Biodegradation typically proceeds through the activity of extracellular and intracellular depolymerases, which catalyse the breakdown of long polymer chains. Importantly, this process is rarely 100% efficient. Not all degradation products are fully mineralized or utilized in microbial life processes (Shah et al. 2008).

In aerobic conditions, microorganisms focus on intensive production of biomass, CO₂ and H₂O. However, in anaerobic conditions, microorganisms concentrate mainly on destroying plastic and, to a lesser extent, on producing biomass, CO₂, H₂O, and CH₄ (Shah et al. 2008). An example of a microorganism that can treat plastics as a carbon source is *Penicillium simplicissimum* YK, present in the soil environment and on leaves, capable of biodegrading polyethylene (Yamada-Onodera et al. 2001). Bacteria naturally present in the gut of *Galleria mellonella* larvae, such as *Bacillus* sp. YP1 and *Enterobacter asburiae* YT1, are capable of degrading the same material. This is not an isolated case, various invertebrate species have been shown to biodegrade plastics due to the activity of their intestinal microbiota (Yang et al. 2023).

The use of invertebrates in the biodegradation of selected plastics

The role of insects in the biodegradation of plastic

Due to increasing plastic, microplastic, and nanoplastic pollution, insects have attracted scientific interest for their potential role in biodegradation. Certain insect species, when fed exclusively on plastic, have demonstrated the ability to survive on this material. The larval stage is particularly significant. This is the most aggressive stage for feeding (Mallar 2020) and plays a key role in plastic degradation (Mallar 2020; Bilal et al. 2021). Recent reviews indicate that over 23 insect species across six orders have been reported to degrade plastics, mainly Coleoptera and Lepidoptera, and the number of identified plastivorous insects continues to increase as research expands (Boctor et al. 2024; Vital-Vilchis & Karunakaran 2025). Insect larvae mechanically fragment plastic through chewing, reducing it to micro- and nanoplastics. This facilitates the material's passage into the digestive system, where biodegradation can begin (Bilal et al. 2021). Within the gut, conditions are favourable for the growth of specific bacterial strains capable of forming biofilms on plastic particles and producing enzymes that depolymerize polymers into less toxic or metabolizable compounds. Thus, insect larvae contribute to plastic biodegradation not only through mechanical processing but also by creating a suitable environment for plastic-degrading gut microbiota (Mallar 2020).

Selected species of plastic-biodegrading insects

Zophobas morio

Zophobas morio belongs to the Coleoptera order and the Tenebrionidae family. Individuals occur mainly on decaying trees and leaf litter. The natural habitats of *Z. morio* are located in North America. Visually, this insect has an elongated, massive, black body that reaches 3–4 cm in length. However, the larvae are cream-coloured with brown fragments around the head and on the border of the segments; they have three pairs of legs and one barely visible pair of antennae (Figure 2(A,B)) (Kosewska et al. 2022). It has been demonstrated that insect larvae can utilize various plastics as a carbon source, owing to the presence of specific bacterial strains in their intestinal microbiota. For example: **polystyrene (PS)** is degraded with the aid of *Pseudomonas aeruginosa* (Kuan et al. 2022), *Enterobacter* sp. and *Hafnia* sp. (Hafniaceae) (Burgos et al. 2024), as well as *Leminorella* (strain P2) (Hosseini et al. 2024). **Expanded polystyrene (EPS)** is broken down by *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas* sp. (Mapfumo

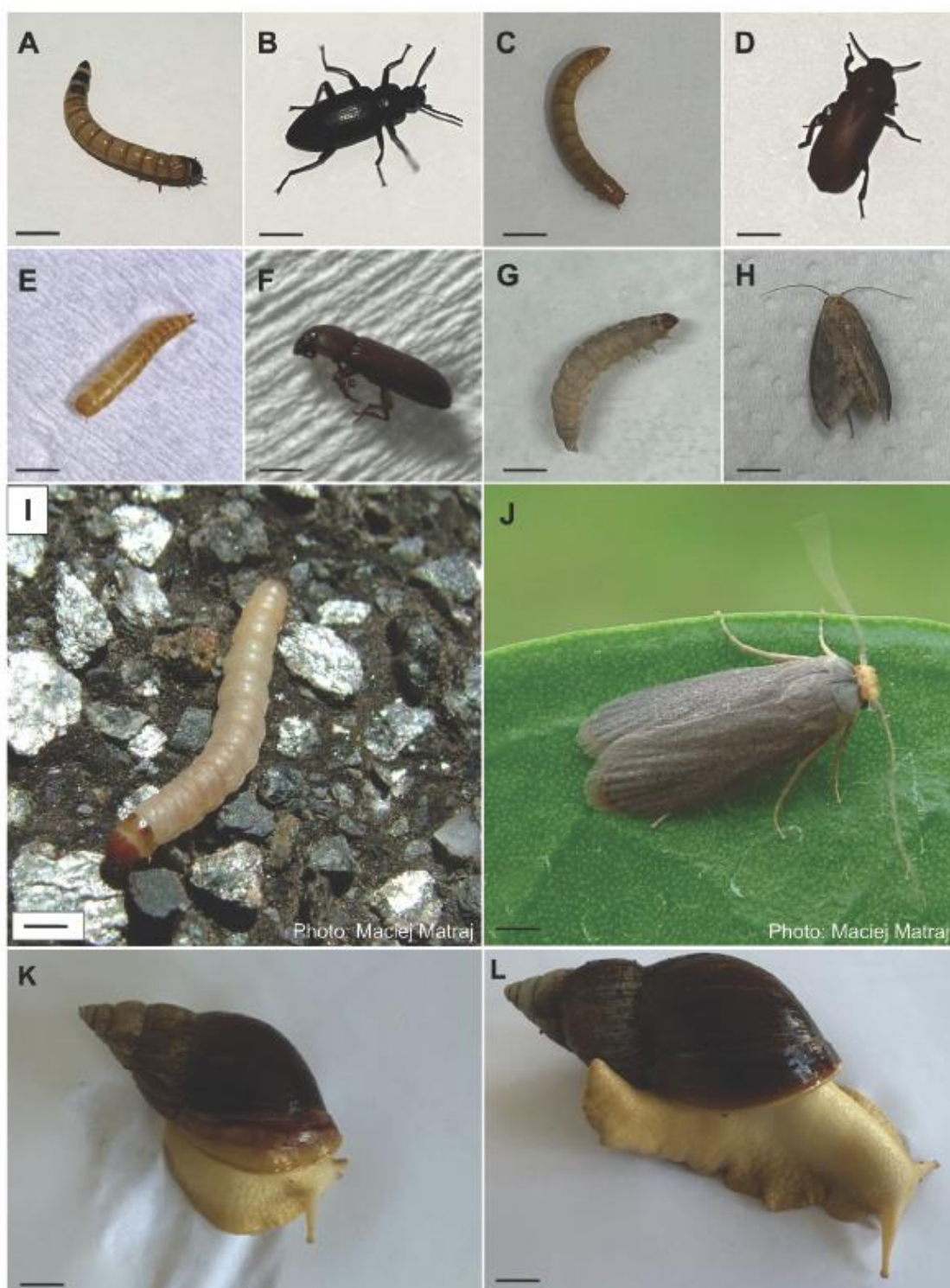


Figure 2. Insect specimens that biodegrade plastics: *Zophobas morio*: larva (a) and adult (b) (photo: Patrycja Mermer), *Tenebrio molitor* larva (c) and adult (d) (photo: Patrycja Mermer), *Tribolium* sp. larva (e) and adult (f) (photo: Anna Ostróžka), *Galleria mellonella* larva (g) and adult (h) (Fot. Patrycja Mermer) *Achroia grisella* larva (i) and adult (j) (photo: Maciej Matraj) *Achatina fulica* snail young (k) and adult (l) specimens. (photo: Anna Ostróžka). Scale bar: (a) 1 cm, (b) 0.83 cm, (c) 1 cm, (d) 0.56 cm, (e) 2 mm, (f) 1 mm, (g) 7.5 mm, (h) 7.2 mm, (i) 2.86 mm, (j) 1.83 mm, (k) 0.77 cm, (l) 1.79 cm.

et al. 2024). **Polyethylene (PE)** degradation is supported by *Pseudomonas aeruginosa* (Kuan et al. 2022) and *Citrobacter* (strain P5) (Hosseini et al. 2024). **Low-density polyethylene (LDPE)** is processed by *Citrobacter freundii*, Enterobacteriaceae, *Kluyvera*, and *Bacillus* spp (Urbanek et al. 2024; Burgos et al. 2024), as well as *Citrobacter* (Octavia et al. 2023). **Polypropylene (PP)** is utilized by *Citrobacter* sp. and *Enterobacter* sp. (Yang et al. 2021), and also by *Bacillus* (strain P6) (Hosseini et al. 2024). **Polyethylene terephthalate (PET)** degradation involves *Bacillus* (strain P9) (Hosseini et al. 2024).

Tenebrio molitor

The yellow mealworm *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) is a holometabolous insect, i.e. with complete metamorphosis. The Mediterranean basin is considered to be the place of origin of this invertebrate. It is currently widespread all over the world. *T. molitor* was historically considered a pest that affected grain storage and transport. Its life cycle has four forms: egg, larva, pupa, and imago (Figure 2(C,D)) (Moruzzo et al. 2021). Currently, the greatest hopes are placed on the larvae of *T. molitor* regarding the biodegradability of plastics, because it has been proven that these larvae can feed on PS and PE (Bulak et al. 2021). This is possible due to the presence of bacteria from the Enterobacteriaceae family (Peng et al. 2019) and *Exiguobacterium* sp. strain YT2 in their intestinal microflora (Bulak et al. 2021; Mitra & Das 2023). Moreover, *T. molitor* larvae can use objects made of PVC as an energy source. This is possible due to the presence of bacteria from the Streptococcaceae, Spiroplasmataceae, Enterobacteriaceae, and Clostridiaceae families (Peng et al. 2020), and the degradation of PP is possible due to the presence of *Kluyvera* sp (Yang et al. 2021).

Tribolium castaneum

Tribolium castaneum is a beetle species of Indo-Australian origin currently present worldwide (Ridley et al. 2011). It is an essential species in terms of ecological research. Research on the effects of grain protection products has been conducted on it for 60 years because it is one of the main pests occurring in wheat warehouses (Desharnais & Liu 1987). There are four stages in the life cycle of this beetle: egg, larva, pupa, and adult (Figure 2(E,F)). The larvae are light yellow and up to 4 mm long (Wang et al. 2020), and the adults are brown (Desharnais & Liu 1987). It was discovered that *T. castaneum* larvae could use PS as an energy source, and the bacterial strain present in the intestines, i.e. *Acinetobacter* sp. AnTc-1, is responsible for the biodegradation itself (Wang et al. 2020).

Galleria mellonella

The greater wax moth belongs to the Lepidoptera order. It is a ubiquitous pest of honey bees. Its presence in *Apis mellifera* and *Apis cerana* hives causes galleriosis, further resulting in the colony escaping from the nest. In tropical and subtropical regions, this insect causes significant damage, which is why *G. mellonella* is believed to be the main factor in the decline of wild honey bees. The insect's development includes an egg, seven larval stages, a pupa, and an adult (Figure 2(G,H)), and the time needed to complete the entire life cycle ranges from weeks to months and depends on many biotic and abiotic factors (Gulati & Kaushik 2004). The larvae of this invertebrate can feed on PE, which leads to its biodegradation (Bombelli et al. 2017). This process is carried out primarily by *Enterobacter* sp. strain D1 (Zhang et al. 2020). These larvae can also degrade PP due to the presence of *Bacillus cereus* (Nyamjav et al. 2023).

Achroia grisella

The lesser wax moth (*Achroia grisella*) comes from India and Argentina (Mallar 2020). Like *G. mellonella*, it threatens wild bee colonies because the larvae of *A. grisella* feeding on the combs drill linear tunnels lined with threads. As a result, their presence in the hives results in developmental defects of the brood and bees, specifically developmental defects of the abdomen. The lesser wax moth can also be found in apiary warehouses on combs, but this species does not generate significant losses. The disease it causes in hives is called fluke (Ciborowska 2021). *A. grisella* has four development stages: egg, larva, pupa and imago (Figure 2(I,J)). Since 2019, cases have been reported in which the larvae of this species use material made of PE as a food source (Mallar 2020). Unfortunately, no studies currently indicate a specific strain of bacteria inhabiting the larva's intestines that would be responsible for this process (Ali et al. 2023).

Corcyra cephalonica

The rice moth belongs to the order Lepidoptera, and its origin is attributed to Asia, from where it spread worldwide. Currently, it is one of the most prevalent pests of grains and stored agricultural products (Vincent et al. 2021). This species has four development stages: egg, larva, pupa and imago (Devi et al. 2013). The larval period lasts up to 36 days, after which the pupa stage occurs (Jagadish et al. 2010; Devi et al. 2013). Due to their destructiveness, *C. cephalonica* larvae were subjected to a diet based on **PE**, during which plastic consumption was observed, similar to the results obtained in studies with *G. mellonella*. However, experiments conducted using antibiotics and subsequent genetic tests on isolated bacteria from the larva's digestive tract did not indicate a specific species of bacteria responsible for the biodegradation of polyethylene. This is the reason for the theory that *C. cephalonica* larvae can carry out processes that allow polyethylene to be used as an energy source (Kesti & Thimmappa 2019). Figure 3 shows the list of selected insects capable of biodegrading plastic.

Selected other invertebrate species that biodegrade plastic

Achatina fulica

The giant African land snail (Figure 2(K,L)) is an invasive species of land snail native to eastern Africa. It is currently used as a commercial food source in Europe and Asia. This snail can be found mainly on the soil surface, in gardens or fields, where it mainly feeds. A herbivore, it obtains food using the radula (Song et al. 2020). The development of *A. fulica* begins when the egg hatches within 24 hours after it is laid. After hatching, the snail buries itself in the soil for about 15 days, eating its shell and absorbing sand. After this time, the snail comes to the surface and begins its growth, which slows down by the 6th month, and then it reaches sexual maturity. Adults reach up to 20 cm in length, and the average lifespan is 5 years (Pawson & Chase 1984). *A. fulica* began to be studied for the biodegradation of plastics because this snail absorbs food while moving on the surface of soil or plants. Microplastics are now present in virtually every environment, resulting in their unintentional ingestion alongside food. Studies have shown that microplastic fragments of **PET** can pass through the digestive tract of the land snail, where they undergo both physical and chemical degradation (Song et al. 2019). Further research demonstrated that *A. fulica* is also capable of feeding on **PS**. Through antibiotic treatments and genetic analyses, two bacterial families in its gut microbiota, Enterobacteriaceae and Sphingobacteriaceae, were identified as responsible for its plastic biodegradation capacity (Song et al. 2020).

Earthworms

Earthworms (Oligochaeta) comprise over 7,000 described species and display remarkable morphological and ecological diversity, allowing them to thrive in varied ecosystems- from tropical rainforests to arid soils. Their metameric, bilaterally symmetrical bodies and capacity for segmental regeneration support both efficient movement and resilience to environmental pressures. As simultaneous hermaphrodites, they also exhibit flexible reproductive strategies (Walia & Kaur 2024). Although microorganisms are the primary agents of organic matter decomposition, earthworms significantly influence this process. They contribute directly by ingesting organic material and associated microbes, and indirectly by shaping microbial community structure. Their presence has been linked to increased microbial biomass and activity in soil, indicating a stimulatory role in microbial-driven decomposition (Aira et al. 2007). Earthworms are able to degrade **low-density polyethylene (LDPE)**. *Bacillus gaemokensis* strain SSR01 and the *B. gaemokensis* strain SSR01 are responsible for this process (Ragu Prasath et al. 2024).

The earthworm *Eisenia fetida* has shown effectiveness in consuming **PE** film, plastic particles, and plastic ash, highlighting its potential role in the decomposition of polymer waste (Allakuliyeva et al. 2024). In the case of **high-density polyethylene (HDPE)**, degradation was confirmed by the formation of carbonyl compounds and alkenes, chemical indicators of polymer chain breakdown (Santana et al. 2023). Figure 4. shows the list of selected other invertebrates capable of biodegrading plastic.

A species of animal that biodegrades plastic	Taxonomic rank (Order)	Biodegradable plastic	Bacteria responsible for biodegradation	Literature
<i>Zophobas morio</i>	Coleoptera	PS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kuan et al. 2022
			<i>Enterobacter</i> sp., <i>Hafnia</i> sp. (<i>Hafniaceae</i>)	Burgos et al. 2024
			<i>Leminorella</i> (Strain P2)	Hosseini et al. 2024
		EPS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas</i> sp.	Mapfumo et al. 2024
			PE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<i>Citrobacter</i> (Strain P5)		Hosseini et al. 2024
		LDPE	<i>Citrobacter freundli</i> ; <i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Kluyvera</i> ; <i>Bacillus</i>	Urbanek et al. 2024, Burgos et al. 2024
			<i>Citrobacter</i>	Octavia et al. 2023
		PET	<i>Bacillus</i> (Strain P9)	Hosseini i inni 2024
		pp	<i>Citrobacter</i> sp. and <i>Enterobacter</i> sp.	Yang et al. 2021
<i>Bacillus</i> (Strain P6)	Hosseini i inni 2024			
<i>Tenebrio molitor</i>	Coleoptera	PS	<i>Exiguobacterium</i> sp strain YT2, <i>Enterobacteriaceae</i> family	Peng et al. 2019, Bulak et al. 2021, Mitra & Das 2023
		PE	<i>Enterobacteriaceae</i> family	Peng et al. 2019, Bulak et al. 2021
		PVC	<i>Streptococcaceae</i> , <i>Spiroplasmataceae</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Clostridiaceae</i> families	Peng et al. 2020
		PP	<i>Kluyvera</i> sp	Yang et al. 2021
		PS	<i>Acinetobacter</i> sp. AnTc-1	Wang et al. 2020
<i>Tribolium castaneum</i>	Coleoptera	PS	<i>Acinetobacter</i> sp. AnTc-1	Wang et al. 2020
<i>Galleria mellonella</i>	Lepidoptera	PE	<i>Enterobacter</i> sp. strain D1	Zhang et al. 2020
PP		<i>Bacillus cereus</i>	Nyamjav et al. 2023	
<i>Achroia grisella</i>		PE	currently unknown	Ali et al. 2023
<i>Corcyra cephalonica</i>		PE	no strain responsible for biodegradation was detected, probably degradation without the participation of bacteria	Kesti et al. 2019

Figure 3. List of selected insects capable of biodegrading plastic. (PS) - polystyrene, (EPS) - expanded polystyrene, (PE) - polyethylene, (LDPE) - low-density polyethylene, (PET) - polyethylene terephthalate, (PP) - polypropylene, (PVC) - polyvinyl chloride.

Selected marine invertebrate species that biodegrade plastic

Perineris vancaurica, a tropical and subtropical marine polychaete, inhabits surface sediments and plays an important ecological role as a benthic bioturbator (Vecchi et al. 2021; Xi et al. 2023). Its life activities include burrowing, constructing and maintaining galleries, and enhancing organic matter mineralization at the sediment-water interface. These behaviours contribute to sediment mixing and nutrient cycling in marine ecosystems, making it a key indicator species for environmental monitoring (Vecchi et al. 2021).

A species of animal that biodegrades plastic	Taxonomic rank (Phylum, Class)	Biodegradable plastic	Bacteria responsible for biodegradation/ or other mechanisms	Literature
<i>Achatina fulica</i>	Mollusca, Gastropoda	EPS	family Enterobacteriaceae, Sphingobacteriaceae, and Aeromonadaceae	Song et al. 2020
		PET	MFs passed through the digestive tract of snails and were physically and chemically degraded within the intestine	Song et al. 2019
<i>Eisenia fetida</i>	Annelida, Oligochaeta	PE	ability to consume and break down polyethylene particles	Allakuliyeva et al. 2024
		HDPE	formation of carbonyl compounds and alkenes, indicating polymer chain degradation	Santana et al. 2023
earthworms, no species given	Annelida, Oligochaeta	LDPE	<i>Bacillus gaemokensis</i> strain SSR01, The <i>B. gaemokensis</i> strain SSR01	Ragu Prasath et al. 2024

Figure 4. List of selected other invertebrates capable of biodegrading plastic. (EPS) - expanded polystyrene, (PET) - polyethylene terephthalate, (PE) - polyethylene, (HDPE) - high-density polyethylene, (LDPE) - low-density polyethylene.

Recent research suggests that its gut microbiome contributes to the degradation of **PS** in marine environments. It was shown that bacteria isolated from their digestive systems, *Acinetobacter johnsonii*, *Brevibacterium casei*, and *Ruegeria arenilitoris*, degrade polystyrene effectively (Zhao et al. 2024).

Marine invertebrates representing distinct feeding strategies were selected as model organisms in this study: the black sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) [Class: Echinoidea, Phylum: Echinodermata] as a herbivore, the starfish (*Patiria pectinifera*) [Phylum: Echinodermata; Class: Asteroidea; Order: Valvatida] as a carnivore, and the scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) [Phylum: Mollusca; Class: Bivalvia; Order: Pectinida] as a filter feeder. Digestive enzymes present in these marine invertebrates significantly contribute to the initial stages of **PE** biodegradation by promoting structural modifications of the polymer. Infrared spectroscopy analyses confirm alterations in the surface structure of **PE**, notably, the incorporation of functional groups such as carbonyl (C=O), ether (C–O–R), hydroxyl (C–OH), and carbon–carbon double bonds (C=C). Considering the presence of specialized symbiotic microbial communities within the digestive systems of these invertebrates, it is plausible that microbial enzymes also play a role in the degradation of plastic polymers (Istomina et al. 2024). Figure 5. shows the list of selected marine invertebrates capable of biodegrading plastic.

A species of animal that biodegrades plastic	Taxonomic rank (Phylum, Class)	Biodegradable plastic	Bacteria responsible for biodegradation/ or other mechanisms	Literature
<i>Perinereis vancaurica</i>	Annelida, Polychaeta	PS	<i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Brevibacterium casei</i> , and <i>Ruegeria arenilitoris</i>	Zhao i inni 2024
<i>Strongylocentrotus nudus</i>	Echinodermata, Echinoidea	PE	Enzymes of the digestive system	Istomina et al. 2024
<i>Patiria pectinifera</i>	Echinodermata, Asteroidea	PE	Enzymes of the digestive system	
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Mollusca, Bivalvia	PE	Enzymes of the digestive system	

Figure 5. List of selected marine invertebrates capable of biodegrading plastic. (PS) - polystyrene, (PE) - polyethylene.

Biodegradation of selected types of plastics by invertebrates

Biodegradation of polyethylene

As previously mentioned, a key step in the biodegradation of plastics is polymer depolymerization, the process by which the bonds between monomers within a polymer chain are broken (Montroll & Simha 1940). In the case of polyethylene (PE), which is currently the most widely used plastic in our economy, the polymer chain can be represented as $-\text{[CH}_2\text{-CH}_2\text{]}_n-$ (Ren et al. 2019). Based on this review, the following species are capable of biodegrading polyethylene: *Z. morio* (Kuan et al. 2022; Octavia et al. 2023; Burgos et al. 2024; Hosseini et al. 2024; Urbanek et al. 2024), *T. molitor* (Peng et al. 2019; Bulak et al. 2021), *G. mellonella* (Zhang et al. 2020), *A. grisella* (Ali et al. 2023), *C. cephalonica* (Kesti et al. 2019), *E. fetida* (Allakuliyeva et al. 2024; Ragu Prasath et al. 2024), *S. nudus*, *P. pectinifera*, *M. yessoensis* (Istomina et al. 2024). The efficiency of the biodegradation process and experimental conditions were described only in some articles. Studies on the biodegradation of PE by insect larvae have shown promising results, particularly for species such as *T. molitor*, *G. mellonella*, *A. grisella*, and *C. cephalonica*. In the case of *T. molitor*, a 58-day experiment involving 500 larvae demonstrated a 70% reduction in plastic mass, equating to 1.8 g of consumed PE. Alongside the material loss, morphological changes in the larvae were observed, including a 25% decrease in total body weight (approximately 0.021 g) and a 6% reduction in body length (0.157 cm). Notably, the polyethylene-based diet did not inhibit pupation, although the adult forms were smaller than the larvae (Bulak et al. 2021). *G. mellonella* larvae have also been shown to biodegrade polyethylene effectively. In a study where 100 larvae were placed inside a disposable bag and fed plastic for 12 hours, a material loss of approximately 92 mg was recorded (Bombelli et al. 2017). A separate, longer-term study (21 days) involving 150 larvae reported a more substantial plastic degradation- 1.95 g in total, accompanied by a decrease in larval body weight, similar to that observed in *T. molitor* (Lou et al. 2020). The same study investigated the impact of dietary supplementation on plastic degradation by adding beeswax to the polyethylene diet. This mixed diet resulted in a lower degradation rate (1.27 g of plastic loss), suggesting that the inclusion of beeswax reduces the larvae's reliance on polyethylene. However, this modification positively affected metamorphosis, as a greater proportion of larvae successfully developed into adults. In contrast, a diet consisting solely of plastic inhibited the developmental cycle and reduced the rate of pupation (Lou et al. 2020).

A. grisella larvae have also been studied for their potential in polyethylene degradation. In a 10-day experiment, 100 larvae were fed a diet based on low-density polyethylene (LDPE), a plastic commonly used in packaging due to its low chemical reactivity. Researchers observed visible holes in the material and a plastic mass loss averaging 2.96 mg per larva per day- approximately 2.96 g in total (Ali et al. 2023).

In the case of *C. cephalonica*, research focused on uncovering the mechanisms behind its plastic-degrading ability. Two groups of 25 larvae were tested: one exposed to antibiotics, the other not, each placed in separate LDPE containers. After 20 days, both groups exhibited similar levels of plastic mass loss, indicating that the microbial flora may not be solely responsible for degradation. Moreover, attempts to isolate specific bacterial strains responsible for plastic breakdown were unsuccessful, suggesting that the larvae themselves may possess inherent metabolic pathways enabling polyethylene utilization as an energy source (Kesti & Thimmappa 2019).

As mentioned earlier, not only the larvae but also the microorganisms inhabiting their digestive systems play a critical role in microplastic biodegradation. These microbes secrete enzymes capable of depolymerizing polyethylene, converting it into simpler compounds that enter the host's metabolic pathways. For example: in the digestive tract of *G. mellonella*, bacterial strains such as *Enterobacter* sp. D1, *Enterobacter asburiae* YT1, and *Bacillus* sp. YP1 have been isolated and shown to contribute significantly to PE degradation. These microorganisms form biofilms on polyethylene surfaces and degrade the polymer over a 31-day period (Ren et al. 2019; Bilal et al. 2021). Their enzymatic activity involves lipases, proteases, peroxidases, and the generation of hydrogen peroxide, all of which facilitate the breakdown of the polymer matrix (Mitra & Das 2023). Similarly, in *T. molitor*, a strain of *Kosakonia* has been isolated from the gut microbiota. It supports plastic degradation through the secretion of alkaline proteases, esterases, and hydrolases – enzymes capable of cleaving the bonds within polyethylene chains (Mitra & Das 2023).

Biodegradation of polystyrene

Polystyrene (PS) is a synthetic aromatic polymer composed of styrene monomers, with the general formula $-\text{[C}_6\text{H}_5\text{]}_n-$. It is primarily used in the production of packaging materials and thermal insulation products. Due to its hydrophobic nature, polystyrene is classified as a compound resistant to abiotic degradation. However, microbial biodegradation is possible through the action of extracellular and intracellular enzymes, including those produced by microorganisms residing in the digestive tracts of certain invertebrates. Among the various catabolic pathways for polystyrene, one predominates: following depolymerization, styrene is oxidized to phenylacetate, which is subsequently incorporated into the tricarboxylic acid (TCA) cycle (Ho et al. 2018). For microbial degradation to proceed efficiently, the plastic often must first be transformed into microplastic particles- a process facilitated mechanically by chewing, scraping, and ingestion by insect larvae or molluscs. Based on this review, several species have demonstrated the ability to biodegrade polystyrene: *Z. morio* (Kuan et al. 2022; Burgos et al. 2024; Hosseini et al. 2024), *T. molitor* (Peng et al. 2019; Bulak et al. 2021; Mitra & Das 2023), *T. castaneum* (Wang et al. 2020), *A. fulica* (Song et al. 2020), and the marine polychaete *P. vancaurica* (Zhao et al. 2024).

Insects

Among these species, *Z. morio*, *T. molitor*, and *T. castaneum* are insect larvae that have been extensively studied for their PS-degrading capabilities. In one experiment (Gan et al. 2021), *Z. morio* larvae were fed either a diet consisting solely of polystyrene or one supplemented with table sugar. In both groups, plastic mass loss was observed and normalized per gram of larval biomass. The larvae consuming only polystyrene showed a degradation rate of 1.04 mg PS per gram of larva per day, while the group receiving sugar exhibited a higher rate- 1.79 mg per gram per day. This enhanced degradation was attributed to the activity of *Pseudomonas aeruginosa* in the larval gut, which secretes various enzymes including monooxygenases, esterases, lipases, and cutinases (Kuan et al. 2022; Mitra & Das 2023). Similarly, *T. molitor* larvae have been shown to degrade polystyrene effectively. In a 58-day study involving 500 larvae fed Styrofoam, the mass of the plastic decreased from 2.6 g to 1.215 g, yielding a total loss of 1.385 g, which corresponds to a degradation rate of 2.77 mg per larva over the course of the experiment. However, a diet based solely on polystyrene was also found to inhibit metamorphosis (Bulak et al. 2021). The enzymes involved include alkaline proteases, esterases, and hydrolases, with *Exiguobacterium* strain YT2 identified as a key microorganism responsible for enzyme secretion (Bulak et al. 2021; Mitra & Das 2023). In the case of *T. castaneum*, a 60-day experiment with 400 larvae revealed the presence of *Acinetobacter* sp. AnTc-1, which facilitated PS degradation through unknown enzymatic pathways. The total degradation amounted to 12.14% of the plastic mass (Wang et al. 2020).

Molluscs

A. fulica, a terrestrial mollusc, has also been observed to biodegrade polystyrene, although no specific supporting bacteria have yet been identified. During a 28-day experiment, adult snails fed exclusively on PS created visible defects on the polymer surface- scratches and gouges up to 2 cm long and 2- 4 mm deep- caused by the radula's rasping motion. These mechanical disruptions led to the formation of microplastics, which were later recovered from the snail's faeces. The recovered fragments were smaller than 3 mm and exhibited signs of enzymatic modification, such as structural deformation. The average uptake rate of polystyrene by *A. fulica* was 18.5 mg per individual over the course of the study (Song et al. 2020).

Marine polychaetes

Evidence of polystyrene degradation has also been reported in *P. vancaurica*, a benthic marine polychaete. During a 30-day incubation experiment, degradation was observed during the passage of PS through the worm's digestive system. This led to the formation and accumulation of microplastics with a mean diameter of 0.6 ± 0.2 mm. Additionally, a slight decrease in PS mass (3.3- 3.7%) was recorded, along with alterations in chemical groups, thermal properties, and the formation of polystyrene metabolic intermediates. These changes were associated with bacterial activity in the gut (Zhao et al. 2024).

Biodegradation of polypropylene

Polypropylene (PP), discovered in 1954, owes its widespread use to its favourable physicochemical properties. It has the lowest density among commercial plastics, and exhibits high resistance to chemicals and temperature changes, making it suitable for manufacturing items such as trays, funnels, buckets, and equipment requiring repeated sterilization- especially in medical and laboratory contexts. It is synthesized through an addition polymerization reaction of propylene monomers, with the repeating unit $-(C_3H_6)_n-$ (Maddah 2016). Despite its advantages, polypropylene poses environmental concerns due to its tendency to fragment into microplastics and nanoplastics. Compared to polyethylene or polystyrene, relatively few studies describe its biodegradation by bacteria or insects, which suggests a higher resistance to biological decomposition. Based on this review, several species have demonstrated the ability to biodegrade polypropylene: *Z. morio* (Yang et al. 2021; Hosseini et al. 2024), *T. molitor* (Yang et al. 2021), *G. mellonella* (Nyamjav et al. 2023).

Galleria mellonella

Among the best-studied organisms capable of degrading polypropylene is *G. mellonella*. In a study by Rost-Roszkowska et al. (2024), larvae were divided into four groups: a control group fed a standard medium containing honey and powdered milk, a starved group deprived of food for 48 hours, and two experimental groups starved for 24 hours and then fed PP film for either 24 or 48 hours. A reduction in the plastic mass was observed in both experimental groups: 6 mg after 24 hours and 9 mg after 48 hours of exposure. These results suggest that the most intensive biodegradation occurs during the first 24 hours, after which the rate gradually declines. Importantly, despite the unusual nature of this diet, larval survival remained high (approx. 90%), and ultrastructural analyses of the midgut, silk gland, and fat body revealed no degenerative changes. The observed autophagy and cytoplasmic vacuolization in these tissues are thought to play a protective role (Rost-Roszkowska et al. 2024). The larvae's ability to process polypropylene is attributed to both their metabolic adaptability and the presence of gut microbiota, particularly *Bacillus cereus*, which secretes enzymes that facilitate the degradation process (Nyamjav et al. 2023).

Tenebrio molitor

T. molitor, known for its capacity to degrade various plastics, has also demonstrated the ability to biodegrade polypropylene. In a 35-day experiment conducted at 25°C, 300 larvae were divided into three groups: a control group and two experimental groups- one fed solely with PP and the other with a mixed diet of PP and wheat bran. In the PP-only group, a plastic mass loss of 96.1 mg was recorded, while in the mixed-diet group the loss increased by 69%, amounting to 161.6 mg. These results show that the presence of an additional organic substrate significantly enhances the rate of plastic degradation. In both groups, larval survival remained high (~90%), indicating that this species tolerates PP-based diets well. Microbial analysis of the larval gut revealed that *Kluyvera* sp. was the dominant bacterial strain associated with the biodegradation process in larvae fed solely on PP (Yang et al. 2021).

Zophobas morio

A similar experimental design was applied to *Z. morio*, using 250 larvae. Despite the smaller number of individuals, the larvae showed a strong capacity for polypropylene degradation. After 35 days, the group fed only with PP demonstrated a total plastic loss of 211.1 mg. In the mixed-diet group, this value increased by 40%, reaching 294.9 mg. These results are notable and were accompanied by a high survival rate (~90%) and no significant adverse effects. The gut microbiota of larvae fed exclusively on polypropylene was dominated by *Citrobacter* sp. and *Enterobacter* sp., both of which are believed to support the biodegradation process through enzymatic activity (Yang et al. 2021).

Biodegradation of polyvinyl chloride

Polyvinyl chloride (PVC) is a polymer widely used in industry and everyday products, yet it is highly resistant to both degradation and biodegradation due to its stable chemical structure (Sadat-Shojai & Bakhshandeh 2011).

One of the few known organisms capable of degrading PVC is the larva of *T. molitor*. In a 16-day experiment, 100 *T. molitor* larvae were fed a diet consisting solely of PVC. The survival rate under these conditions was approximately 80%. The larvae consumed an average of 36.62 mg of PVC per day per 100 individuals. According to the study's authors, the primary mechanism of PVC biodegradation involves depolymerization and oxidation of polymer-derived compounds, occurring within the larval digestive system (Peng et al. 2020). Although the specific bacterial strains responsible for this process have not yet been conclusively identified, several microbial families were observed to dominate the larval gut microbiota during the experiment, including Streptococcaceae, Spiroplasmataceae, Enterobacteriaceae, and Clostridiaceae (Peng et al. 2020).

Summary

This article presents a review of studies on plastic biodegradation involving selected species of insects, as well as other terrestrial and marine invertebrates. It outlines the current state of knowledge regarding plastics, their properties, types, global production scale, environmental impacts, effects on flora, fauna, and human health, disposal methods, and both abiotic and biotic degradation pathways.

Based on selected publications, representatives of various invertebrate taxa from different habitats and the mechanisms by which they are capable of degrading plastic were discussed. The largest number of studies focused on insects. In their case, biodegradation typically involves ingestion and mechanical fragmentation of plastic by larvae, followed by its processing in the digestive tract, where specific microorganisms (through the activity of depolymerases) break down the polymer. However, this is not the only mechanism; some studies also reported the involvement of digestive enzymes in plastic degradation.

The efficiency of biodegradation is closely linked to both the physicochemical properties of the plastic and the biological/physiological characteristics of the invertebrates, including their gut microbiota. These organisms show varying levels of plastic tolerance.

Although the reviewed studies include examples of experimental approaches and assessments of biodegradation effectiveness, significant challenges remain in comparing results across taxa. These challenges stem from the lack of standardized experimental conditions, such as the number of test organisms, the mass and shape of the plastic used, and experiment duration. Most studies were conducted under laboratory conditions, which do not reflect the complexity of natural environments, where plastics coexist with other pollutants, such as heavy metals. Some investigations were conducted in situ, but environmental variables may have influenced the outcomes. Others only briefly described biodegradation, focusing instead on different aspects.

Long-term studies examining the effects of plastic exposure and whether subsequent generations of organisms develop more efficient degradation mechanisms are needed. Additionally, more research is warranted on invertebrate groups other than insects, which currently dominate this field of study.

Plastic biodegradation involving invertebrates remains a highly promising area of research, yet one that requires further, more standardized investigation. The commercial use of animals in plastic biodegradation processes sounds promising, but aspects such as practical and ethical constraints—including scalability, species containment, and potential ecological consequences should be investigated and clearly described.

Acknowledgments

We thank Richard Ashcroft (<http://www.anglopolonia.com/home.html>) for language editing. We are also grateful to Prof. Magdalena Rost-Roszkowska for her support, and to Dr. Łukasz Chajec and Dr. Jacek Francikowski for providing the breeding facilities used to photograph the animals. We further thank Maciej Matraj for providing photographs of *Achroia grisella*. Graphical abstract created with BioRender.com.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing financial or personal interests.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

List of abbreviations used

PE	Polyethylene
LDPE	Low-Density Polyethylene
HDPE	High-Density Polyethylene
PET	Polyethylene Terephthalate
PP	Polypropylene
PS	Polystyrene
EPS	Expanded Polystyrene
PVC	Polyvinyl Chloride
MP	Microplastic

References

- Aira M, Monroy F, Domínguez J. 2007. Earthworms strongly modify microbial biomass and activity triggering enzymatic activities during vermicomposting independently of the application rates of pig slurry. *Science of the Total Environment* 385(1-3):252–261. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2007.06.031.
- Al-Zawaidah H, Ghosal S, Kozawa KH, Noll KE, Hospodsky D, Ghosal S. 2024. Mapping microplastic movement: A phase diagram to predict transport modes. *Environmental Science & Technology* 58(40):17979–17989. DOI: 10.1021/acs.est.4c08128.
- Ali SS, Elsamahy T, Zhu D, Sun J. 2023. Biodegradability of polyethylene by efficient bacteria from the guts of plastic-eating waxworms and investigation of its degradation mechanism. *Journal of Hazardous Materials* 443:130287. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.130287.
- Allakuliyeva G, Omadov A, Begmatov I, Misekova M, Nurmedova G, Serdarova S, Bashimova A. 2024. The role of red Californian earthworms (*Eisenia fetida*) in polymer waste decomposition. *E3S Web of Conferences* 563:03062. DOI: 10.1051/e3sconf/202456303062.
- Ansari I, Arora C, Verma A, Mahmoud AED, El-Kady MM, Rajarathinam R, Verma DK, Mahish PK. 2025. A critical review on biological impacts, ecotoxicity, and health risks associated with microplastics. *Water, Air, and Soil Pollution* 236(2):88. DOI: 10.1007/s11270-024-07731-z.
- Artham T, Doble M. 2008. Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromolecular Bioscience* 8(1):14–24. DOI: 10.1002/mabi.200700106.
- Aves AR, Revell LE, Gaw S, Ruffell H, Schuddeboom A, Wotherspoon NE, LaRue M, McDonald AJ. 2022. First evidence of microplastics in Antarctic snow. *The Cryosphere* 16(6):2127–2145. DOI: 10.5194/tc-16-2127-2022.
- Balestra V, Galbiati M, Lapadula S, Zampieri V, Cassarino F, Gajdošová M, Barzaghi B, Manenti R, Ficetola GF, Bellopede R. 2024. Microplastic pollution calls for urgent investigations in stygobiont habitats: A case study from classical karst. *Journal of Environmental Management* 356:120672. DOI: 10.1016/j.jenvman.2024.120672.
- Banerjee A, Shelver WL. 2021. Micro- and nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A review. *Science of the Total Environment* 755(Pt2):142518. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142518.
- Barrett J, Chase Z, Zhang J, Holl MMB, Willis K, Williams A, Hardesty BD, Wilcox C. 2020. Microplastic pollution in deep-sea sediments from the Great Australian bight. *Frontiers in Marine Science* 7:576170. DOI: 10.3389/fmars.2020.576170.
- Bhagat K, Barrios AC, Rajwade K, Kumar A, Oswald J, Apul O, Perreault F. 2022. Aging of microplastics increases their adsorption affinity towards organic contaminants. *Chemosphere* 298:134238. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2022.134238.
- Bilal H, Raza H, Bibi H, Bibi T. 2021. Plastic biodegradation through insects and their symbionts microbes: A review. *Journal of Bioresource Management* 8(4):95–103. DOI: 10.35691/JBM.1202.0206.
- Boctor J, Pandey G, Xu W, Murphy DV, Hoyle FC. 2024. Nature's plastic predators: A comprehensive and bibliometric review of plastivore insects. *Polymers* 16(12):1671. DOI: 10.3390/polym16121671.
- Bombelli P, Howe CJ, Bertocchini F. 2017. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology* 27(8):R292–R293. DOI: 10.1016/j.cub.2017.02.060.
- Brahney J, Mahowald N, Prank M, Cornwell G, Klimont Z, Matsui H, Prather KA. 2021. Constraining the atmospheric limb of the plastic cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(16):e2020719118. DOI: 10.1073/pnas.2020719118.
- Brebu M. 2020. Environmental degradation of plastic composites with natural fillers—a review. *Polymers* 12(1):166. DOI: 10.3390/polym12010166.
- Büks F, Kaupenjohann M. 2020. Global concentrations of microplastics in soils. *SOIL* 6(2):649–662. DOI: 10.5194/soil-6-649-2020.

- Bulak P, Proc K, Pytlak A, Puszka A, Gawdzik B, Bieganski A. 2021. Biodegradation of different types of plastics by *Tenebrio molitor* insect. *Polymers* 13(20):3508. DOI: 10.3390/polym13203508.
- Burgos BR, Morales F, Morales-Vera R, Valdés C, Faundez JY, de Souza EP, Henrique-Silva F, Arencibia AD. 2024. Microbiological and physicochemical approach in the feeding of superworm (*Zophobas morio*) with petroleum-derived polymer diets. *Microorganisms* 12(11):2118. DOI: 10.3390/microorganisms12112118.
- Ciborowska A. 2021. Zagrożenia w hodowli pszczoł-choroby i szkodniki pszczoły miodnej. Podlaski Ośrodek Doradztwa Rolniczego w Szepietowie 5–20. <https://odr.pl/wp-content/uploads/2021/12/pszczoły-srodek.pdf>.
- Cong Q, Ren Z, Zheng Y, Wang L, Lu H. 2025. Progress in the study of toxic effects of microplastics on organisms in freshwater environments and human health. *Water* 17(2):229. DOI: 10.3390/w17020229.
- D'Avignon G, Gregory-Eaves I, Ricciardi A. 2022. Microplastics in lakes and rivers: A review of their sources, fate, ecological effects, and potential solutions. *Environmental Reviews* 30(2):119–135. DOI: 10.1139/er-2021-0048.
- Danopoulos E, Twiddy M, Rotchell JM. 2020. Microplastic contamination of drinking water: A systematic review. *PLOS ONE* 15(7):e0236838. DOI: 10.1371/journal.pone.0236838.
- Danso D, Chow J, Streit WR. 2019. Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Applied & Environmental Microbiology* 85(19):e01095–19. DOI: 10.1128/AEM.01095-19.
- Desharnais RA, Liu L. 1987. Stable demographic limit cycles in laboratory populations of *Tribolium castaneum*. *The Journal of Animal Ecology* 56(3):885–906. DOI: 10.2307/4955.
- Devi MB, Devi N, Devi SR, Singh PR. 2013. Biology and morphometric of rice moth, *Corcyra cephalonica*. *Annals of Plant Protection Sciences* 21(1):87–89.
- Gan SKE, Phua SX, Yeo JY, Heng ZSL, Xing Z. 2021. Method for zero-waste circular economy using worms for plastic agriculture: Augmenting polystyrene consumption and plant growth. *Methods and Protocols* 4(2):43. DOI: 10.3390/mps4020043.
- Goldberg D. 1995. A review of the biodegradability and utility of poly(caprolactone). *Journal of Environmental Polymer Degradation* 3(2):61–68. DOI: 10.1007/BF02067481.
- Gulati R, Kaushik HD. 2004. Enemies of honeybees and their management—a review. *Agricultural Reviews* 25(3):189–200.
- Ho BT, Roberts TK, Lucas S. 2018. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: The microbial approach. *Critical Reviews in Biotechnology* 38(2):308–320. DOI: 10.1080/07388551.2017.1355293.
- Hosseini FS, Asodeh A, Ostad Movahed S, Makhdoomi A. 2024. An integrated approach for plastic polymer degradation by the gut bacterial resident of superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental Science and Pollution Research International* 31(50):60359–60370. DOI: 10.1007/s11356-024-35244-z.
- Istomina A, Chelomin V, Mazur A, Zhukovskaya A, Karpenko A, Mazur M. 2024. Biodegradation of polyethylene in digestive gland homogenates of marine invertebrates. *PeerJ* 12:e17041. DOI: 10.7717/peerj.17041.
- Jagadish PS, Nirmala P, Rashmi MA, Narayan Hegde J, Nangia N. 2010. Biology of rice moth, *Corcyra cephalonica* Stainton on foxtail millet. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 22(3):674–675.
- Kesti SSK, Thimmappa SCT. 2019. First report on biodegradation of low density polyethylene by rice moth larvae. *Corcyra Cephalonica* (Stainton) *The Holistic Approach to Environment* 9(4):79–83. DOI: 10.33765/thate.9.4.2.
- Kosewska O, Porzuc B, Przemieniecki SW. 2022. Multifaceted application of superworm (*Zophobas morio* F.) in the zero-waste circular economy approach. *Book of proceedings. XIII International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2022"*, 06–09 October, 2022, Jahorina.
- Kuan ZJ, Chan BKN, Gan SKE. 2022. Worming the circular economy for biowaste and plastics: *Hermetia illucens*. *Tenebrio Molitor*, and *Zophobas Morio* Sustainability 14(3):1594. DOI: 10.3390/su14031594.
- Lou Y, Pererva E, Yang SS, Baiyun L, Lu B, Liu B, Ren N, Corvini P-X, Xing D. 2020. Biodegradation of polystyrene by greater wax moth larvae (*Galleria mellonella* L.) and the effect of co-diet supplementation on the core gut microbiome. *Environmental Science and Technology* 54(5):2821–2831. DOI: 10.1021/acs.est.9b07044.
- Maddah HA. 2016. Polypropylene as a promising plastic: A review. *American Journal of Polymer Science* 6(1):1–11. DOI: 10.5923/j.ajps.20160601.01.
- Mallar CNR. 2020. A review on the role of insects and their gut microbiota in plastic biodegradation (Master's thesis). University of Innsbruck.
- Mapfumo E, Hemmerling D, Bukutu C, Acharya S, Paterson E, Nobert S, Golizeh M. 2024. Superworm (Coleoptera: Tenebrionidae, *Zophobas morio*) degradation of UV-pretreated expanded polystyrene. *FACETS* 9:1–15. DOI: 10.1139/facets-2023-0075.
- Mitra B, Das A. 2023. The ability of insects to degrade complex synthetic polymers. *Arthropods – New Advances and Perspectives Intechopen*. DOI: 10.5772/intechopen.106948.
- Montroll EW, Simha R. 1940. Theory of depolymerization of long chain molecules. *Journal of Chemical Physics* 8(9):721–726. DOI: 10.1063/1.1750807.
- Moruzzo R, Riccioli F, Espinosa Diaz S, Secci C, Poli G, Mancini S. 2021. Mealworm (*Tenebrio molitor*): Potential and challenges to promote circular economy. *Animals* 11(9):2568. DOI: 10.3390/ani11092568.
- Nyamjav I, Jang Y, Park N, Lee YE, Lee S. 2023. Physicochemical and structural evidence that *Bacillus cereus* isolated from the gut of waxworms (*Galleria mellonella* larvae) biodegrades polypropylene efficiently *in vitro*. *Journal of Polymers and the Environment* 31(10):4274–4287. DOI: 10.1007/s10924-023-02878-y.

- Octavia B, Rakhmawati A, Rachmani LD, Putra TD. 2023. Low-density polyethylene sheet biodegradation by *Tenebrio molitor* and *Zophobas morio* larvae and metagenome studies on their gut bacteria. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 24(2):878–886. DOI: [10.13057/biodiv/d240225](https://doi.org/10.13057/biodiv/d240225).
- Oliveira M, Almeida M. 2019. The why and how of micro (nano) plastic research. *Trends in Analytical Chemistry* 114:196–201. DOI: [10.1016/j.trac.2019.02.023](https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.023).
- Park JS, Yoo JW, Lee YH, Park C, Lee YM. 2024. Size- and shape-dependent ingestion and acute toxicity of fragmented and spherical microplastics in the absence and presence of prey on two marine zooplankton. *Marine Pollution Bulletin* 206:116768. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2024.116768](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116768).
- Pawson PA, Chase R. 1984. The life-cycle and reproductive activity of *Achatina fulica* (Bowdich) in laboratory culture. *The Journal of Molluscan Studies* 50(2):85–91. DOI: [10.1093/oxfordjournals.mollus.a065855](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.mollus.a065855).
- Peng BY, Chen Z, Chen J, Yu H, Zhou X, Criddle CS, Wu WM, Zhang Y. 2020. Biodegradation of polyvinyl chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Environment International* 145:106106. DOI: [10.1016/j.envint.2020.106106](https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106106).
- Peng BY, Su Y, Chen Z, Chen J, Zhou X, Benbow ME, Criddle CS, Wu WM, Zhang Y. 2019. Biodegradation of polystyrene by dark (*Tenebrio obscurus*) and yellow (*Tenebrio molitor*) mealworms (Coleoptera: Tenebrionidae). *Environmental Science and Technology* 53(9):5256–5265. DOI: [10.1021/acs.est.8b06963](https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06963).
- Pyznar M, Maszczyk P, Kiersztyn B, Dąbrowski K, Zebrowski ML, Lee JS, Babkiewicz E. 2023. The effect of planktivorous fish (juvenile *Perca fluviatilis*) on the taxonomic diversity of microplastic particles-colonized bacterial community. *European Zoological Journal* 90(1):414–430. DOI: [10.1080/24750263.2023.2217200](https://doi.org/10.1080/24750263.2023.2217200).
- Ragu Prasath A, Selvam K, Sudhakar C. 2024. Biodegradation of low-density polyethylene film by *Bacillus gaemokensis* strain SSR01 isolated from the guts of earthworm. *Environmental Geochemistry and Health* 46(5):159. DOI: [10.1007/s10653-024-01925-4](https://doi.org/10.1007/s10653-024-01925-4).
- Ren L, Men L, Zhang Z, Guan F, Tian J, Wang B, Wang J, Zhang Y, Zhang W. 2019. Biodegradation of polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16(11):1941. DOI: [10.3390/ijerph16111941](https://doi.org/10.3390/ijerph16111941).
- Ridley AW, Hereward JP, Daglish GJ, Raghu S, Collins PJ, Walter GH. 2011. The spatiotemporal dynamics of *Tribolium castaneum* (Herbst): Adult flight and gene flow. *Molecular Ecology* 20(8):1635–1646. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2011.05049.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05049.x).
- Rost-Roszkowska M, Mermer P, Chajec Ł, Sosinka A, Wilczek G, Student S, Wrońska A, Karnówka O. 2024. Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *European Zoological Journal* 91(1):213–234. DOI: [10.1080/24750263.2024.2308529](https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529).
- Sadat-Shojai M, Bakhshandeh GR. 2011. Recycling of PVC wastes. *Polymer Degradation & Stability* 96(4):404–415. DOI: [10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.12.001).
- Samsonowska K, Kaszuba A. 2022. Mikroplastik w środowisku naturalnym. *Polimery* 67(1):28–33. DOI: [10.14314/polimery.2022.1.4](https://doi.org/10.14314/polimery.2022.1.4).
- Santana RMC, Bitencourt JLD, Andrade MZ, Francisquetti EL, Souza LDA. 2023. Evaluation of composting and vermicomposting in the degradation of HDPE films. *Congresso Brasileiro de Polímeros (17.: 2023: Joinville) [Anais (recurso eletrônico)]*. São Paulo: ABPol.
- Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 26(3):246–265. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2007.12.005](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005).
- Shim WJ, Hong SH, Eo SE. 2017. Identification methods in microplastic analysis: A review. *Analytical Methods* 9(9):1384–1391. DOI: [10.1039/C6AY02558G](https://doi.org/10.1039/C6AY02558G).
- Song Y, Cao C, Qiu R, Hu J, Liu M, Lu S, Shi H, Raley-Susman KM, He D. 2019. Uptake and adverse effects of polyethylene terephthalate microplastics fibers on terrestrial snails (*Achatina fulica*) after soil exposure. *Environmental Pollution* 250:447–455.
- Song Y, Qiu R, Hu J, Li X, Zhang X, Chen Y, Wu WM, He D. 2020. Biodegradation and disintegration of expanded polystyrene by land snails *Achatina fulica*. *Science of the Total Environment* 746:141289. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.141289](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141289).
- Swift G. 1997. Non-medical biodegradable polymers: Environmentally degradable polymers. In: Domb A, Kost J, Wiseman D, editors *Handbook of biodegradable polymers*. Amsterdam: Harwood Academic. pp. 473–511.
- Tang KHD. 2025. Genotoxicity of microplastics on living organisms: Effects on chromosomes, dna and gene expression. *Environments* 12(1):10. DOI: [10.3390/environments12010010](https://doi.org/10.3390/environments12010010).
- Thompson RC, Moore CJ, Vom Saal FS, Swan SH. 2009. Plastics, the environment and human health: Current consensus and future trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1526):2153–2166. DOI: [10.1098/rstb.2009.0053](https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0053).
- Urbanek AK, Rybak J, Hanus-Lorenz B, Komisarczyk DA, Mirończuk AM. 2024. *Zophobas morio* versus *Tenebrio molitor*: Diversity in gut microbiota of larvae fed with polymers. *Science of the Total Environment* 952:176005. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2024.176005](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.176005).
- Vecchi S, Bianchi J, Scalici M, Fabroni F, Tomassetti P. 2021. Field evidence for microplastic interactions in marine benthic invertebrates. *Scientific Reports* 11(1):20900. DOI: [10.1038/s41598-021-00495-1](https://doi.org/10.1038/s41598-021-00495-1).
- Vincent A, Singh D, Mathew IL. 2021. *Coryca cephalonica*: A serious pest of stored products or a factitious host of biocontrol agents? *Journal of Stored Products Research* 94(2):101876. DOI: [10.1016/j.jspr.2021.101876](https://doi.org/10.1016/j.jspr.2021.101876).

- Vital-Vilchis I, Karunakaran E. 2025. Using insect larvae and their microbiota for plastic degradation. *Insects* 16(2):165. DOI: [10.3390/insects16020165](https://doi.org/10.3390/insects16020165).
- Walia SS, Kaur T, editors. 2024. Earthworms, their species, and biological features. In: *Earthworms and Vermicomposting*. Singapore: Springer; chap 3. pp. 17–36. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-981-99-8953-9>.
- Wang Z, Xin X, Shi X, Zhang Y. 2020. A polystyrene-degrading *Acinetobacter* bacterium isolated from the larvae of *Tribolium castaneum*. *Science of the Total Environment* 726:138564. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.138564](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138564).
- Welden NA. 2020. The environmental impacts of plastic pollution. *Plastic waste and recycling*. 195–222. Academic Press. DOI: [10.1016/B978-0-12-817880-5.00008-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817880-5.00008-6).
- Xi M, Zhang Q, Nie L, Xiong T, Yu Z. 2023. Quantitative comparison of clamworm (*Perinereis aibuhitensis*) and crab (*Macrophthalmus japonicus*) burrowing effects on nitrogen and phosphorus dynamics at the sediment-water interface. *Science of the Total Environment* 857:159559. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.159559](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159559).
- Yamada-Onodera K, Mukumoto H, Katsuyaya Y, Saiganji A, Tani Y. 2001. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degradation & Stability* 72(2):323–327. DOI: [10.1016/S0141-3910\(01\)00027-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00027-1).
- Yang SS, Ding MQ, He L, Zhang CH, Li QX, Xing DF, Cao GL, Zhao L, Ding J, Ren NQ, Wu WM. 2021. Biodegradation of polypropylene by yellow mealworms (*Tenebrio molitor*) and superworms (*Zophobas atratus*) via gut-microbe-dependent depolymerization. *Science of the Total Environment* 756:144087. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.144087](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144087).
- Yang XG, Wen PP, Yang YF, Jia PP, Li WG, Pei DS. 2023. Plastic biodegradation by in vitro environmental microorganisms and in vivo gut microorganisms of insects. *Frontiers in Microbiology* 13:1001750. DOI: [10.3389/fmicb.2022.1001750](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1001750).
- Zhang J, Gao D, Li Q, Zhao Y, Li L, Lin H, Bi Q, Zhao Y. 2020. Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of the Total Environment* 704:135931. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.135931](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135931).
- Zhang K, Hamidian AH, Tubić A, Zhang Y, Fang JK, Wu C, Lam PK. 2021. Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review. *Environmental Pollution* 274:116554. DOI: [10.1016/j.envpol.2021.116554](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116554).
- Zhao S, Liu R, Lv S, Zhang B, Wang J, Shao Z. 2024. Polystyrene-degrading bacteria in the gut microbiome of marine benthic polychaetes support enhanced digestion of plastic fragments. *Communications Earth & Environment* 5(1):162. DOI: [10.1038/s43247-024-01318-6](https://doi.org/10.1038/s43247-024-01318-6).

11. Oświadczenia autorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Załącznik nr 10
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Magdalena Rost-Roszkowska
Imię i nazwisko współautora publikacji

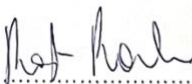
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Rost-Roszkowska, M., Mermer, P., Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., ... Karnówka, O. (2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *The European Zoological Journal*, 91(1), 213–234. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na projektowaniu metodologii badań, koordynowaniu prac badawczych, prowadzeniu nadzoru nad poprawnością przebiegu całego procesu badawczego i związanych z przygotowaniem manuskryptu do druku.



Podpis współautora publikacji

Katowice, 25.05.2026
miejscowość, data

Patrycja Mermer

imię i nazwisko kandydata

Uniwersytet Śląski
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afiliacja

OŚWIADCZENIE OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIE O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Oświadczam, że w pracy:

Rost-Roszkowska, M., Mermer, P., Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., ... Karnówka, O. (2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *The European Zoological Journal*, 91(1), 213–234. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

która wchodzi w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej, mój udział obejmował prowadzenie hodowli *Galleria mellonella*, przeprowadzanie eksperymentu, przygotowanie materiału badawczego, zebranie i analizę danych literaturowych, przeprowadzanie wszystkich analiz laboratoryjnych, interpretację uzyskanych wyników, pisanie oryginalnej wersji manuskryptu oraz jego wersji końcowej, a także opracowanie tablic zawierających dokumentację badań.

.....

.....
podpis

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Łukasz Chajec
Imię i nazwisko współautora publikacji

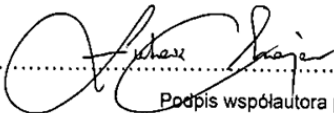
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Rost-Roszkowska, M., Mermer, P., Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., ... Karnówka, O. (2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *The European Zoological Journal*, 91(1), 213–234. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli *Galleria mellonella* w laboratoriach UŚ w Katowicach, przeprowadzeniu eksperymentu związanego z karmieniem larw badanego gatunku tworzywami sztucznymi oraz przygotowaniu materiału do analiz z wykorzystaniem TEM.


.....
Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W
POWSTAWIANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Agnieszka Sosinka

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Rost-Roszkowska, M., Mermer, P., Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., ...
Karnówka, O. (2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and
physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)
larvae. *The European Zoological Journal*, 91(1), 213–234.
<https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli *Galleria mellonella* w laboratoriach UŚ w Katowicach
oraz przygotowywaniu tablic z figurami prezentowanymi w pracy.


.....
Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Grażyna Wilczek

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Rost-Roszkowska, M., Mermer, P., Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., ... Karnówka, O.
(2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in
some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *The European Zoological
Journal*, 91(1), 213–234. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na przygotowaniu analiz statystycznych wyników badań, a także graficznym
przygotowaniu wyników do publikacji.



Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE
WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNY WKŁAD W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Gliwice, dnia 18.05.2026

Sebastian Student
Imię i nazwisko współautora publikacji

Politechnika Śląska w Gliwicach
Centrum Biotechnologii

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Rost-Roszkowska, M., Mermer, P., Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., ... Karnówka, O. (2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *The European Zoological Journal*, 91(1), 213–234. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na wykonaniu wizualizacji 3D narządów *G. mellonella* z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Analizowane metody to LysoTracker Red, Bodipy oraz dihydroetydyna (DHE).



.....
Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE
WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNY WKŁADZIE W POWSTAWIANIE
PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Anna Wrońska
Imię i nazwisko współautora publikacji

Muzeum i Instytut Zoologii
Polska Akademia Nauk
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Rost-Roszkowska, M., Mermer, P., Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., ... Karnówka, O.
(2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological changes in
some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *The European Zoological*
***Journal*, 91(1), 213–234. <https://doi.org/10.1080/24750263.2024.2308529>**
(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli *Galleria mellonella* oraz konsultacji dotyczących
przeprowadzenia eksperymentu.

Anna Wrońska

.....
Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Miejsce Ruch Śląska, dnia 26.05.2026

Oskar Karnówka
Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Rost-Roszkowska, M., Mermer, P., Chajec, Ł., Sosinka, A., Wilczek, G., Student, S., Wrońska, A.,
Karnówka, O. (2024). Consumption of polypropylene caused some ultrastructural and physiological
changes in some tissues of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. The European
Zoological Journal, 91(1), 213–234.

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli *Galleria mellonella* w laboratoriach UŚ w
Katowicach.

Oskar Karnówka
Podpis współautora publikacji

Załącznik nr 9
do pisma okólnego nr 2
Prorektora ds. nauki i finansów
z dnia 19 lutego 2024 r.

Katowice, 25.05.2026
miejscowość, data

Patrycja Mermer
imię i nazwisko kandydata

Uniwersytet Śląski
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afiliacja

OŚWIADCZENIE OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIE O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Oświadczam, że w pracy:

**Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026).
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

która wchodzi w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej, mój udział obejmował prowadzenie hodowli *Galleria mellonella*, prowadzenie eksperymentu, przygotowanie materiału badawczego, zebranie i analizę danych literaturowych, przeprowadzanie wszystkich analiz laboratoryjnych, interpretację uzyskanych wyników, pisanie oryginalnej wersji manuskryptu oraz jego wersji końcowej, opracowanie dokumentacji mikroskopowej, a także schematów oraz tablic zawierających dokumentację badań.

.....*Mermer Patrycja*.....
podpis

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Łukasz Chajec

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Afiliacja

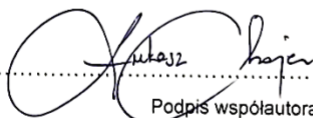
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026).
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli *Galleria mellonella* w laboratoriach UŚ w Katowicach, przeprowadzeniu eksperymentu związanego z karmieniem larw badanego gatunku tworzywami sztucznymi.


.....
Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Grażyna Wilczek

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Afiliacja

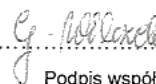
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026).
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na przygotowaniu analiz statystycznych wyników badań, a także graficznym przygotowaniu wyników do publikacji.



Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE
WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNY WKŁAD W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Gliwice, dnia 18.05.2026

Sebastian Student
Imię i nazwisko współautora publikacji

Politechnika Śląska w Gliwicach
Centrum Biotechnologii

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026).
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na wykonaniu wizualizacji 3D narządów *G. mellonella* z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. Analizowane metody to TUNEL, CellLight Lysosomes-GFP oraz JC-1.



.....
Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE
WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNY WKŁADZIE W POWSTAWIANIE
PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Anna Wrońska
Imię i nazwisko współautora publikacji

**Muzeum i Instytut Zoologii
Polska Akademia Nauk**
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026).
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli *Galleria mellonella* oraz konsultacji dotyczących przeprowadzenia eksperymentu.

Anne Wroniska

.....
Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Kraków, dnia 26.05.2026

Joanna Homa

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Jagielloński

Wydział Biologii

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

Zakład Immunologii Ewolucyjnej

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026).
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na przygotowaniu analiz ilościowych śmierci komórkowej z wykorzystaniem odczynnika Aneksyna V.



Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Kamila Krpec
Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026).
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli *Galleria mellonella* w laboratoriach UŚ w Katowicach, przeprowadzeniu eksperymentu związanego z analizą przeżywalności larw badanego gatunku pod wpływem spożywania tworzyw sztucznych.

.....
Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Katowice, dnia 18.05.2026

Karina Magiera

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Afiliacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli *Galleria mellonella* w laboratoriach UŚ w Katowicach, przeprowadzeniu eksperymentu związanego z analizą przeżywalności larw badanego gatunku pod wpływem spożywania tworzyw sztucznych.

.....*Karina Magiera*.....

Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Daria Siwek

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026).
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>**

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na prowadzeniu hodowli *Galleria mellonella* w laboratoriach UŚ w Katowicach, przeprowadzeniu eksperymentu związanego z analizą przeżywalności larw badanego gatunku pod wpływem spożywania tworzyw sztucznych.



Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNY WKŁAD W POWSTAWANIE
PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Magdalena Rost-Roszkowska
Imię i nazwisko współautora publikacji

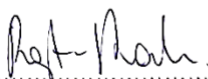
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

**Mermer, P., Chajec, Ł., Wilczek, G. et al. Interplay between different cytotoxic parameters in *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae fed with polypropylene. *Sci Rep* 16, 3840 (2026).
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-33911-w>**

Mój udział polegał na projektowaniu metodologii badań, koordynowaniu prac badawczych, prowadzeniu nadzoru nad poprawnością przebiegu całego procesu badawczego i związanych z przygotowaniem manuskryptu do druku.



Podpis współautora publikacji

Katowice, 25.05.2026
miejscowość, data

Patrycja Mermer

imię i nazwisko kandydata

Uniwersytet Śląski
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afiliacja

OŚWIADCZENIE OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIE O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Oświadczam, że w pracy:

Mermer, P., Martyna, F., & Ostróżka, A. (2025). The use of insects, some land and marine invertebrates, in the biodegradation of plastic. *The European Zoo/ogical Journal*, 92(1), 1442-1458. <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2580744>

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

która wchodzi w skład cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej, mój udział obejmował opracowanie koncepcji pracy, zebranie i analizę danych literaturowych, współudział w przygotowaniu manuskryptu oraz jego wersji końcowej, wykonanie części dokumentacji fotograficznej, a także opracowanie tablic zawierających fotografie.

..........
podpis

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE
PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Filip Martyna

Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Mermer, P., Martyna, F., & Ostróżka, A. (2025). The use of insects, some land and marine invertebrates, in the biodegradation of plastic. *The European Zoological Journal*, 92(1), 1442-1458. <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2580744>

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na częściowym przygotowaniu tekstu manuskryptu.

Filip Martyna
Podpis współautora publikacji

OŚWIADCZENIE

WSPÓŁAUTORA OSOBY UBIEGAJĄCEJ SIĘ O WŁASNYM WKŁADZIE W POWSTAWANIE PRACY

Miejsce Katowice, dnia 18.05.2026

Anna Ostróżka
Imię i nazwisko współautora publikacji

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Afilacja

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

Mermer, P., Martyna, F., & Ostróżka, A. (2025). The use of insects, some land and marine invertebrates, in the biodegradation of plastic. *The European Zoological Journal*, 92(1), 1442–1458. <https://doi.org/10.1080/24750263.2025.2580744>

(autorzy, rok wydania, tytuł, czasopismo lub wydawca, tom, strony)

Mój udział polegał na częściowym przygotowaniu tekstu manuskryptu oraz na przygotowaniu części dokumentacji fotograficznej.


.....
Podpis współautora publikacji

12. Dodatkowe osiągnięcia naukowe

Publikacje nie wchodzące w skład rozprawy doktorskiej i wystąpienia konferencyjne:

Mermer, P., Rost-Roszkowska, M., Wilczek, G., Chajec, Ł., Aleksa, A., Karnówka, O., Litarska, Ż., Przyborowska, K., Krpec, K., Siwek, D. The Effect of plastic consumption on the cell cycle of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) larvae. XXXV Konferencja Embriologiczna 20-23.05.2024, Katowice, poster naukowy.

Rost-Roszkowska M., **Mermer, P.**, Wilczek, G., Homa, J., Chajec, Ł., Wrońska, A., Student, S. Czy larwy *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) mogą być wykorzystywane w biodegradacji plastiku? XXXVI Konferencja Embriologiczna 19-22.05.2026, Toruń, współautor wystąpienia ustnego.

Bednarska-Czerwińska A, Smoleń-Dzirba J, Strychalska A, Sierka W, Wróblewska U, **Mermer P**, Masarczyk B, Jodłowiec-Lubańska N, Kokot A, Simka-Lampa K, et al. Comparison of Non-Invasive and Minimally Invasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy Using Samples Derived from the Same Embryo Culture. *Journal of Clinical Medicine*. 2025; 14(1):33. <https://doi.org/10.3390/jcm14010033>, współautor publikacji.

Bednarska-Czerwińska, A., Strychalska, A., Sierka, W., Simka-Lampa, K., Wróblewska, U., **Mermer, P.**, i in. (2023). A comparative analysis of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies using next-generation sequencing on spent culture media versus trophectoderm. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2023.11.004>, współautor publikacji.

Strychalska, A., Sierka, W., Kokot, A., Jodłowiec-Lubańska, N., Wróblewska, U., **Mermer, P.**, Simka-Lampa, K., Morawiec, E., Pudęko, A., Bednarska-Czerwińska, A. O-211. A comparative analysis of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies using next-generation sequencing on day 5 and day 6 spent culture media versus trophectoderm, *Human Reproduction*, Volume 38, Issue Supplement_1, June 2023, dead093.257, <https://doi.org/10.1093/humrep/dead093.257>. 39th Hybrid Annual Meeting of the ESHRE, Copenhagen- Denmark, 25-28 June 2023, współautor wystąpienia ustnego.

Strychalska, A., Sierka, W., Smolen-Dzirba, J., Kokot, A., Jodłowiec-Lubańska, N., Simka-Lampa, K., Wróblewska, U., **Piotrowska, P.**, Pudelko, A., Morawiec, E., Bednarska- Czerwińska, A., Palini, S. Does aneuploidy discordance between trophectoderm and spent culture medium suggest embryo mechanism, of self-correction? 55th European Human Genetics Conference, June 11-14, 2022, Vienna, Austria, współautor posteru naukowego.

Piotrowska, P., Urbisz, A., Małota, K., Sawadro, M. The level of oxidative stress markers in selected body tissues of an earthworm under physiological stress conditions. Seeing is Believing Imaging the Molecular Process of Life. 9-12.10.2019, Heidelberg, Niemcy, poster naukowy.

Dodatkowe aktywności naukowe:

W roku 2019 otrzymany grant Rektora UŚ dla najlepszych studentów.

Współautor i współwykonawca grantu badawczego 01.08.2020-30.07.2022 „niPGT-A realizacja badań i prac rozwojowych w celu wdrożenia na rynek nieinwazyjnej diagnostyki preimplantacyjnej aneuploidii” (Gyncentrum Sp. z o.o. grant UE 2482964,54PLN) nr projektu WND-RPSL.01.02.00-24-0477/19.

Uczestnictwo w warsztatach Kitazato Vittrification Workshop 23.05.2023, Walencja, Hiszpania.

Uczestnictwo w warsztatach Kitazato Vittrification Workshop 21.10.2024, Warszawa.

Uczestnictwo w webinarze „Unique andrology solutions for sperm separation” Cooper Surgical, 14.05.2025.

Uczestnictwo w Sympozjum Naukowym Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii, 24-25.10.2025, Warszawa.

Uczestnictwo w szkoleniu „Art in ART: Egg Donation Excellence” 17-18.04.2026, Praga, Czechy.

Członek Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii (PTMRiE) oraz Europejskiego Towarzystwa European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE).

Posiadam certyfikat embriologa klinicznego PTMRIE oraz ESHRE uznawany przez CESMA UEMS.