



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

mgr Mariusz Wróbel

Biodegradacja mikroplastików przez mikroorganizmy pochodzące ze środowiska naturalnego i antropogenicznego

Promotor: dr hab. Tomasz Kowalkowski, prof. UMK
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Promotor pomocniczy: dr Sonia Szymańska,
Katedra Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń 2025

**Microplastics biodegradation by microorganisms
from natural and anthropogenic environments**

Podziękowania

Chciałbym wyrazić wdzięczność wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej dysertacji.

Na początku dziękuję mojemu Promotorowi, Panu dr. hab. Tomaszowi Kowalkowskiemu, prof. UMK, za możliwość przeżycia tej wspaniałej przygody, jaką były studia doktoranckie w Interdyscyplinarnej Szkole Doktoranckiej „Academia Copernicana”. Dziękuję za poświęcony czas oraz wsparcie merytoryczne.

Szczególne podziękowania kieruję do Promotora pomocniczego, Pani dr Soni Szymańskiej, za jej nieocenioną pomoc, czas poświęcony na planowanie eksperymentów, przygotowanie manuskryptów, bezcenne sugestie, możliwość konsultacji na każdym etapie, oraz dobre słowo i motywację w najcięższych momentach tej trudnej i wyboistej drogi.

Chciałbym również serdecznie podziękować Pani prof. dr hab. Katarzynie Hrynkiewicz, za życzliwość, cenne uwagi, czas poświęcony na konsultacje oraz opiekę merytoryczną podczas pisania manuskryptów i rozprawy doktorskiej.

Dziękuję także Pani prof. dr hab. Renacie Gdzale-Kopciuch za merytoryczny wkład w rozwój rozprawy doktorskiej i wszystkie wskazówki dotyczące jej pisania.

Dziękuję Pani dr Edycie Deji-Sikorze za merytoryczne wsparcie bioinformatyczne, które okazało się niezbędne przy pisaniu manuskryptu publikacji oraz dysertacji.

Dziękuję także Koleżankom i Kolegom z Katedry Mikrobiologii, dr Bliss Furtado, dr. Dariuszowi Laskowskiemu oraz dr Dominice Thiem, za każdą otrzymaną pomoc. Za wsparcie w sprawach technicznych/laboratoryjnych dziękuję Pani mgr Annie Walkowskiej oraz Panu mgr. Zbigniewowi Strzeleckiemu.

Chciałbym także podziękować Pani mgr Michalinie Górskiej, która wiele razy ratowała mnie z opresji w sprawach administracyjnych.

Na koniec chciałbym podziękować mojej Rodzinie, która nieustannie wspierała mnie i dopingowała podczas tego długiego przedsięwzięcia. Bez tego wsparcia nie byłoby mnie w miejscu, w którym jestem dzisiaj.

Projekt został sfinansowany ze środków *Universitas Copernicana Thoruniensis in Futuro*-
modernizacja Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w ramach Zintegrowanego Programu
Uczelni (Nr projektu: POWR.03.05.00-00-Z302/17-00 z dnia 08.12.2017 r.)

Spis treści

| | |
|---|----|
| Wykaz skrótów i oznaczeń | 7 |
| 1. Streszczenie w języku polskim | 9 |
| 2. Streszczenie w języku angielskim | 11 |
| 3. Wstęp | 13 |
| 4. Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej | 19 |
| 5. Cel badań | 20 |
| 6. Hipotezy badawcze | 21 |
| 7. Metodologia badań | 22 |
| 7.1 Przygotowanie materiału polimerowego..... | 23 |
| 7.2 Pobieranie prób środowiskowych | 23 |
| 7.3 Analiza parametrów fizykochemicznych prób wody..... | 24 |
| 7.4 Analiza parametrów fizykochemicznych materiału glebowego oraz osadu ściekowego | 24 |
| 7.5 Izolacja metagenomowego DNA | 25 |
| 7.6 Analiza bioinformatyczna | 25 |
| 7.7 Izolacja i selekcja mikroorganizmów degradujących polimery | 27 |
| 7.8 Identyfikacja mikroorganizmów degradujących polimery | 29 |
| 7.9 Spektrofotometryczna analiza biofilmu bakteryjnego | 30 |
| 7.10 Ocena zmian powierzchni polimerów z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej..... | 31 |
| 7.11 Analiza degradacji materiałów polimerowych za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera..... | 32 |
| 8. Wyniki | 36 |
| 8.1 Wyniki niepublikowane | 39 |
| 8.1.1 Struktura i różnorodność mykobiomów badanych środowisk | 39 |
| 8.1.2 Identyfikacja hodowlanych szczepów grzybów z mykobiomów badanych środowisk | 48 |

| | |
|--|-----|
| 8.1.3 Ocena wpływu mykobiomu na strukturę polimerów z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera | 51 |
| 9. Dyskusja końcowa | 57 |
| 9.1 Zależność między strukturą mikrobiomu a efektywnością procesu biodegradacji..... | 57 |
| 9.2 Polimery obecne w środowisku mogą selekcjonować mikroorganizmy zdolne do ich biodegradacji..... | 63 |
| 9.3 Zależność pomiędzy wydajnością biodegradacji polimerów a rodzajem mikroorganizmów (bakterie i grzyby) | 64 |
| 9.4 Ocena zmian strukturalnych polimerów przy wykorzystaniu FTIR oraz zmian na ich powierzchni za pomocą SEM | 66 |
| 10. Wnioski końcowe | 69 |
| 11. Bibliografia | 71 |
| 12. Publikacje..... | 84 |
| 12.1 P1 - Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation..... | 84 |
| 12.2 P2 - Microbial allies in plastic degradation: specific bacterial genera as universal plastic-degraders in various environments..... | 96 |
| S2 – Materiały uzupełniające (Supplementary) | 111 |
| 13. Dorobek naukowy..... | 127 |

Wykaz skrótów i oznaczeń

ANOSIM – nieparametryczny test statystyczny; analiza podobieństwa (ang. *analysis of similarities*)

CA – octan celulozy (ang. *cellulose acetate*)

CI – indeks karbonylowy (ang. *carbonyl index*)

FTIR – spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. *Fourier-transform infrared spectroscopy*)

GC-MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. *gas chromatography - mass spectrometry*)

GPC – chromatografia żelowa (ang. *gel permeation chromatography*)

HDPE – polietylen wysokiej gęstości (ang. *high – density polyethylene*)

ITS – wewnętrzna sekwencja łącznikowa podlegająca transkrypcji (ang. *internal transcribed spacer*)

LDPE – polietylen niskiej gęstości (ang. *low – density polyethylene*)

LEfSe – efekt liniowej analizy dyskryminacyjnej (ang. *linear discriminant analysis effect size*)

LLDPE – liniowy polietylen o niskiej gęstości (ang. *linear low – density polyethylene*)

MLE – metoda największej wiarygodności (ang. *maximum likelihood estimation*)

MN – materiał niepublikowany

M_n – średnia liczbowa masa cząsteczkowa (ang. *number average molecular weight*)

M_w – średnia wagowo masa cząsteczkowa (ang. *weight average molecular weight*)

NCBI – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej (ang. *National Center for Biotechnology Information*)

NGS – sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*)

NMDS – niemetryczne skalowanie wielowymiarowe (ang. *nonmetric multidimensional scaling*)

NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *nuclear magnetic resonance*)

OTU – operacyjna jednostka taksonomiczna (ang. *operational taxonomic unit*)

P1 – publikacja 1: Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation

P2 – publikacja 2: Microbial allies in plastic degradation: specific bacterial genera as universal plastic-degraders in various environments

PC – poliwęglan (ang. *polycarbonate*)

PCL – polikaprolakton (ang. *polycaprolactone*)

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

PE – polietylen (ang. *polyethylene*)

PHB – polihydroksymaślan (ang. *polyhydroxybutyrate*)

PLA – polilaktyd; poli(kwas mlekowy) (ang. *polylactic acid*)

PP – polipropylen (ang. *polypropylene*)

PVC – polichlorek winylu (ang. *polyvinyl chloride*)

S1, S2, S3 – oznaczenie prób materiału glebowego pobranego ze składowiska odpadów

SDS – dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*)

SEC – przewodność elektrolityczna właściwa (ang. *specific electrolytic conductivity*)

SEM – skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. *scanning electron microscopy*)

SG – oznaczenie próby osadu ściekowego

SL – oznaczenie próby materiału glebowego

TC – węgiel całkowity (ang. *total carbon*)

TN – azot całkowity (ang. *total nitrogen*)

TP – fosfor całkowity (ang. *total phosphorus*)

T_g – temperatura zeszklenia (ang. *glass transition temperature*)

T_m – temperatura topnienia (ang. *melting temperature*)

WR – oznaczenie próby wody rzecznej

XPS – rentgenowska spektroskopia fotoelektronów (ang. *X-ray photoelectron spectroscopy*)

1. Streszczenie w języku polskim

Rozwój technologii w ostatnich dekadach przyczynił się do gwałtownego wzrostu produkcji materiałów polimerowych, które znalazły zastosowanie niemal w każdej dziedzinie życia – od przemysłu, przez transport, budownictwo, aż po ochronę zdrowia. Ze względu na specyfikę tych związków ich recykling jest ograniczony, ponieważ podczas kolejnych cykli tracą one swoje pierwotne właściwości. Brak efektywnych i ekologicznych metod utylizacji polimerów wymusza konieczność poszukiwania nowych rozwiązań.

Szczególnym rodzajem zanieczyszczenia są mikroplastiki – cząstki o rozmiarach od 1 μm do 5 mm, powstające w wyniku technologicznego wytwarzania lub rozpadu większych fragmentów tworzyw. Dzięki niewielkim rozmiarom mikroplastiki mogą migrować w organizmach żywych nawet na poziomie komórkowym, co stanowi zagrożenie zarówno dla środowiska, jak i zdrowia ludzkiego. Ich obecność zaburza procesy metaboliczne, funkcje reprodukcyjne oraz wpływa na układ odpornościowy.

Degradacja mikroplastików za pomocą mikroorganizmów jest przedmiotem intensywnych badań naukowych. Dotychczasowe analizy koncentrują się głównie na biodegradacji polimerów takich jak polietylen (PE) i polipropylen (PP) przez pojedyncze szczepy mikroorganizmów.

Niniejsza rozprawa obejmuje badania nad izolacją mikroorganizmów – bakterii i grzybów – zdolnych do degradacji wybranych polimerów: PE, PP, polichlorku winylu (PVC), polilaktydu (PLA) oraz poliwęglanu (PC). Mikroorganizmy wyizolowano z materiału glebowego ze składowiska odpadów, osadu ściekowego oraz wody rzecznej. Izolację przeprowadzono autorską metodą, która zakładała inkubację sterylnego materiału polimerowego jako jedyne źródła energii dla mikroorganizmów w próbce. Identyfikację szczepów wykonano z wykorzystaniem klasycznych metod molekularnych (m.in. izolacja DNA, PCR, elektroforeza) oraz bioinformatycznych (analiza sekwencji). Do oceny biodegradacji użyto spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), umożliwiającej identyfikację zmian w strukturze polimerów, szczególnie w obszarze grup karbonylowych ($>\text{C}=\text{O}$). Dodatkowo, zastosowano skaningową mikroskopię elektronową (SEM), aby obserwować zmiany powierzchni mikroplastików i obecność biofilmu. W przypadku prób inkubowanych z mikrobiomem bakteryjnym przeprowadzono również

spektrofotometryczne oznaczenie ilości biofilmu. Ponadto przeprowadzona została analiza metagenomowa, co umożliwiło kompleksową ocenę różnorodności badanych mikrobiomów.

Wyniki badań potwierdziły zdolność wyizolowanych mikroorganizmów do biodegradacji wszystkich badanych polimerów. SEM wykazała różnice w powinowactwie mikroorganizmów do poszczególnych tworzyw. Analiza FTIR potwierdziła obecność grup karbonylowych w przypadku PVC, inkubowanego z materiałem glebowym i osadem ściekowym. Na widmach PE zaobserwowano z kolei formowanie się grup amidowych. Najmniejsze zmiany zaobserwowano dla PP, uznawanego za najbardziej odporny na biodegradację, choć odnotowano na jego powierzchni rozwinięty biofilm bakteryjny, a uzyskane widma potwierdziły rozpad długich łańcuchów polimerowych. W przypadku PLA i PC stwierdzono zmniejszenie ilości grup karbonylowych, co wskazuje na zaawansowanie procesu degradacji. Analiza metagenomowa potwierdziła hipotezę, że różnorodność mikrobiologiczna nie zawsze koreluje z efektywnością biodegradacji – kluczową rolę odgrywają szczepy związane z plastisferą.

Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność autorskiej metody izolacji i selekcji mikroorganizmów zdolnych do degradacji określonych polimerów, co otwiera nowe perspektywy w badaniach nad biodegradacją tworzyw sztucznych.

2. Streszczenie w języku angielskim

The development of technology in recent decades has led to a rapid increase in the production of polymeric materials, which are now used in almost every area of life, including industry, transportation, construction, and health care. However, the recycling of these compounds is limited, as they lose their original properties during successive cycles. The lack of efficient and environmentally friendly methods for polymer disposal necessitates the search for new solutions.

A specific type of pollution involves microplastics-particles ranging in size from 1 μm to 5 mm, which are formed either through technological processes or the breakdown of larger plastic fragments. Due to their small size, microplastics can migrate within living organisms, even at the cellular level, posing threats to both the environment and human health. Their presence disrupts metabolic processes, reproductive functions, and immune system activity.

Microplastic degradation by microorganisms has become a focus of intensive scientific research. Previous studies have primarily concentrated on the biodegradation of polymers such as polyethylene (PE) and polypropylene (PP) by single strains of microorganisms.

This dissertation presents research on the isolation of microorganisms-bacteria and fungi-capable of degrading selected polymers: PE, PP, polyvinyl chloride (PVC), polylactide (PLA), and polycarbonate (PC). Microorganisms were isolated from three different environments: soil from a landfill, sewage sludge, and river water. The isolation process employed an original method involving the incubation of sterile polymeric material as the sole energy source for the microorganisms present in the samples. Strain identification was conducted using classical molecular techniques (e.g.: DNA isolation, PCR, electrophoresis) and bioinformatics approaches (sequence analysis).

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used to assess biodegradation, allowing the identification of changes in polymer structure, particularly in the region associated with carbonyl groups ($>\text{C}=\text{O}$). Additionally, scanning electron microscopy (SEM) was employed to observe surface changes in the microplastics and the formation

of biofilms. For samples incubated with bacterial microbiomes, spectrophotometric measurements were performed to quantify biofilm formation. Furthermore, a metagenomic analysis was conducted, enabling a comprehensive assessment the diversity of the studied microbiomes.

The results confirmed the ability of the isolated microorganisms to biodegrade all the tested polymers. SEM analysis revealed differences in the affinity of microorganisms for various plastics. FTIR analysis identified the presence of carbonyl groups in PVC samples incubated with soil material and sewage sludge. The smallest changes were observed for PP, which is considered the most resistant to biodegradation; however, a well-developed bacterial biofilm was detected on its surface. For PLA and PC, a reduction in the number of carbonyl groups was noted, suggesting that the degradation process had progressed. Metagenomic analysis showed that microbial diversity does not always correlate with biodegradation efficiency, with plastisphere-associated strains playing a pivotal role.

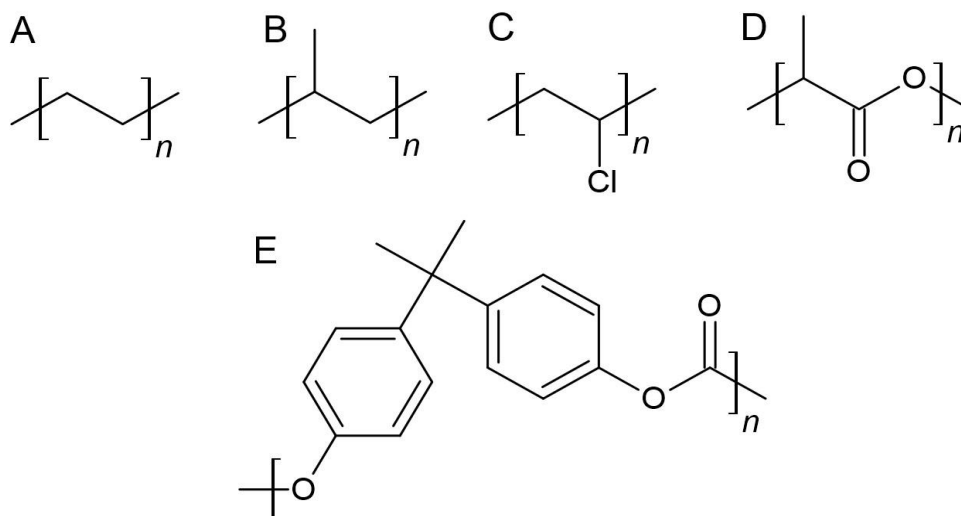
The results confirmed the ability of the isolated microorganisms to biodegrade all the polymers tested. SEM showed differences in the affinity of the microorganisms for the different plastics. FTIR analysis confirmed the presence of carbonyl groups in the samples.

3. Wstęp

Materiały polimerowe, dzięki swoim charakterystycznym właściwościom, takim jak trwałość, odporność chemiczna i fizyczna, plastyczność oraz stosunkowo niskie koszty produkcji, znajdują zastosowanie w niemal każdej dziedzinie przemysłu (Allwood i in., 2011). Dane opublikowane przez PlasticsEurope AISBL wskazują na dominację w produkcji polimerów takich jak: polietylen (PE), polipropylen (PP) oraz polichlorek winylu (PVC) (Nichterlein, 2022). Polimery te mają istotny wpływ na środowisko, głównie ze względu na brak efektywnych metod ich utylizacji, degradacji oraz recyklingu. Dynamiczny wzrost globalnej produkcji tworzyw sztucznych, a w konsekwencji zwiększona ilość generowanych odpadów, przyczynia się do intensyfikacji procesów degradacji środowiska. Szacuje się, że niemal 58% zanieczyszczeń związanych z tworzywami sztucznymi trafia bezpośrednio do ekosystemów, stanowiąc poważne zagrożenie dla ich stabilności (Chamas i in., 2020).

Zanieczyszczenia powodowane przez tworzywa sztuczne stanowią poważny problem ze względu na brak bezpiecznych i skutecznych metod ich usuwania z otoczenia (Kibria i in., 2023). Nieustannie poszukuje się efektywnych strategii, które byłyby zgodne z założeniami przyjaznymi dla ekologii i zrównoważonym rozwojem (He i in., 2024; Viljakainen i Hug, 2021). Wykorzystanie mikrobiologicznej degradacji polimerów ma ogromny potencjał, ale niestety wiedza na temat tego zjawiska pozostaje wciąż bardzo ograniczona (Zurier i Goddard, 2021; Thakur i in., 2023).

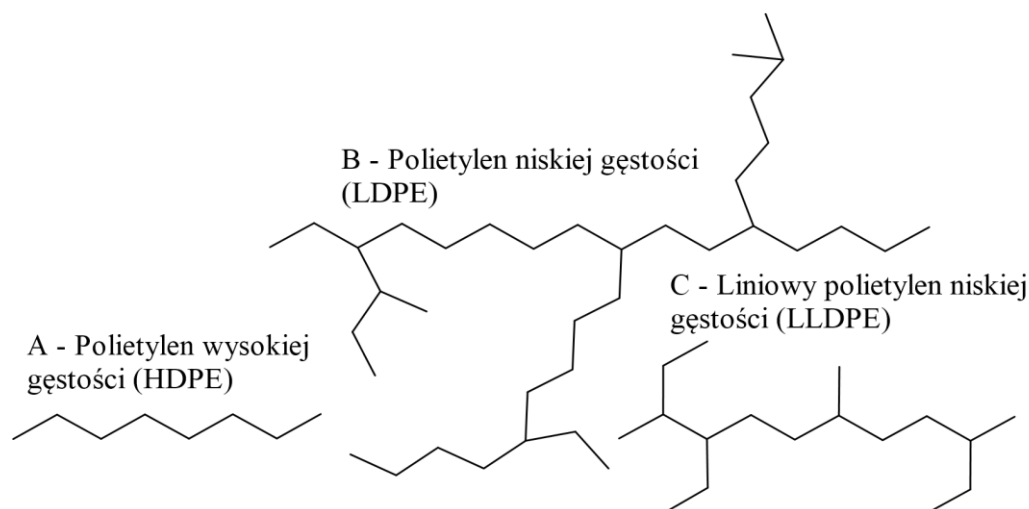
Wiadomo, że wydajność procesu degradacji polimerów jest związana z ich właściwościami oraz ich strukturą (Silva i in., 2023). Wśród czynników determinujących ten proces, największy wpływ ma hydrofilowość związku, powierzchnia, masa molowa, polidispersyjność, temperatura topnienia (T_m) i zeszklenia (T_g) oraz krystaliczność (Gupta i Kumar, 2007). Również stopień rozgałęzienia struktury polimeru i jego gęstość są istotne podczas procesu degradacji (Zhang i in., 2022a). Struktury badanych związków, reprezentujących różne grupy polimerów, przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Wzory strukturalne badanych polimerów: A – polietylen , B – polipropylen, C – polichlorek winylu, D – polilaktyd, E – poliwęglan.

Polimery ropopochodne należące do grupy poliolefin (tj. związków składających się wyłącznie z węgla i wodoru), takie jak PP i PE, które są jednymi z najczęściej stosowanych materiałów w przemyśle spożywczym, wyróżniają się wysoką odpornością na procesy biodegradacji (Monahan i in., 2020). Jest to związane z wyższymi energiami wiązań C-H lub C-C niż w przypadku związków, w których występują np. wiązania estrowe, jak ma to miejsce w poliestrach (Zhang i in., 2022a).

Polietylen jest termoplastem najczęściej stosowanym wśród polimerów w światowej gospodarce i przemyśle (Ghatge i in., 2020). Istnieje kilka form tego związku (rys. 2). Spośród trzech wyróżnionych, polietylen o wysokiej gęstości (HDPE) jest najbardziej stabilny (mniej krótkich rozgałęzień, co przekłada się na łatwe upakowanie w strukturze krystalicznej) i ma najwyższy stopień krystaliczności. Liniowy polietylen o niskiej gęstości (LLDPE) zawiera dużą liczbę krótkich rozgałęzień przy zachowaniu struktury liniowej, natomiast dla polietylenu o niskiej gęstości (LDPE) wysoki stopień rozgałęzienia skutkuje słabszymi oddziaływaniami międzycząsteczkowymi (Geyer i in., 2017; Graziano i in., 2019; Zhang i in., 2022b).



Rysunek 2. Konfiguracje różnych struktur PE: A – HDPE – struktura liniowa, brak rozgałęzień; B – LDPE, mała liczba długich rozgałęzionych łańcuchów; C – LLDPE – duża liczba krótkich rozgałęzień.

Zakłada się, że HDPE jest polimerem, który trudniej ulega degradacji niż jego analogi o niższej gęstości (LDPE lub LLDPE). Generalnie przyjmuje się, że dzięki wielokrotnemu rozgałęzieniu PP jest polimerem, który ulega rozkładowi w mniejszym stopniu niż PE (Zhang i in., 2022b). Badania Jeona i in. (2021) potwierdziły, że w określonych warunkach biodegradacja PE postępowała ponad dwa razy szybciej niż w przypadku PP. PVC z kolei jest uważany za polimer, który bardzo trudno ulega uszkodzeniom, głównie z powodu trwałej i odpornej na ścieranie struktury (Amass i in., 1998; Nyamjav i in., 2023; Xu i in., 2023). W niektórych badaniach biodegradacji tego związku stwierdzono, że jest on trwalszy niż LDPE (Ohtake i in., 1998; Xu i in., 2023). Kolejną grupą polimerów są poliestry, do których należą badane poliwęglany (PC) i kwas polimlekowy (PLA). Ten ostatni jest związkiem liniowym, który wykazuje zbliżone właściwości tradycyjnych, syntetycznych tworzyw sztucznych, zachowując przy tym pełną biodegradowalność (Nowak i Pająk, 2010). Warto zauważyć, że PLA rozkłada się na związki neutralne dla środowiska, tj. dwutlenek węgla i wodę (Farah i in., 2016). Biodegradowalność PC uzależniona jest od struktury. W przypadku poliwęglanów aromatycznych, obecność pierścieni benzenowych i czwartorzędowych atomów węgla ($-O-C(O)-O-$) bezpośrednio wpływa na ich znacznie niższą biodegradowalność. W poliwęglanach alifatycznych dostępność do grupy karbonylowej jest dużo łatwiejsza dla enzymów, dzięki czemu polimery te znacznie łatwiej ulegają biodegradacji (Artham i Doble, 2008). Jednak liczne badania potwierdzają, że proces rozkładu jest efektywniejszy

dzięki wykorzystaniu zarówno bakterii (Arefian i in., 2023; Goel i in., 2008), jak i grzybów (Artham i Doble, 2010; Bosch, 2001).

W wyniku rozpadu tworzyw sztucznych mogą powstawać mikroplastiki (Rashed i in., 2023), które są szczególnie niebezpieczne dla zdrowia ludzkiego. Mogą one prowadzić do zaburzeń metabolicznych, stresu oksydacyjnego, toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej, neurotoksyczności oraz wpływać na odpowiedź immunologiczną (Lee i in., 2023). Mikroplastiki to cząstki o wielkości od 1 do 5 000 μm , które powstają w wyniku procesów technologicznych (mikroplastiki pierwotne, obecne np. w pastach do zębów, czy środkach do oczyszczania twarzy) lub rozpadu większych tworzyw sztucznych (mikroplastiki wtórne) (Coppock i in., 2017; Luo i in., 2019). Cząstki te mają zdolność przenikania do biosfery oraz migracji w łańcuchu pokarmowym (Saeedi, 2024). Ich akumulacja w ekosystemach bezpośrednio i pośrednio zmienia strukturę mikrobiologiczną tych środowisk. Bezpośrednio, obecność mikroplastiku negatywnie wpływa na obieg węgla i azotu (Yadav i Kumar, 2023). Dodatkowa zawartość tych pierwiastków może powodować wzrost gatunków wykorzystujących mikroplastiki jako źródło energii, co w konsekwencji prowadzi do zaburzenia struktury całego mikrobiomu (Haque i Fan, 2023; MacLean i in., 2021). Yu i in. (2021) wykazali, że w glebie narażonej na działanie polistyrenu (PS), naturalna struktura mikrobiomu glebowego została zakłócona, przyczyniając się do wzrostu glonów na powierzchni gleby. Ponieważ mikroorganizmy są zdolne do kolonizowania powierzchni takich związków, mikroplastiki wpływają na zakres i szybkość rozprzestrzeniania się mikroorganizmów, w tym niebezpiecznych patogenów (Lear i in., 2021). Ponadto bardzo często mikroplastiki stają się nośnikami innych zanieczyszczeń środowiskowych, w tym metali ciężkich, co skutkuje zakłóceniem łańcuchów troficznych m.in. poprzez procesy biomagnifikacji (Guo i Wang, 2019; Kang i in., 2019). Poziom zanieczyszczenia mikroplastikami jest różny w zależności od środowiska. Składowiska odpadów i oczyszczalnie ścieków są uważane za najbardziej zanieczyszczone przez te związki, a ilość cząstek polimeru szacuje się na kilka do setek tysięcy na kilogram (Tun i in., 2022; Mahon i in., 2017; Zhang i Liu, 2018; Corradini i in., 2019). Zbiorniki słodkowodne charakteryzują się znacznie niższym poziomem tych zanieczyszczeń, a liczba wykrytych cząstek mikroplastiku jest kilkaset razy niższa niż we wspomnianych wcześniej składowiskach odpadów czy oczyszczalniach ścieków

(Schmidt i in., 2017a). Uważa się jednak, że ekosystem, taki jak gleba wysypiskowa lub osady ściekowe bogate w zanieczyszczenia polimerowe, wykazują wysoki potencjał obecności mikroorganizmów zdolnych do degradacji tworzyw sztucznych (Kelly i in., 2021; Lin i in., 2023). Prowadzone badania (Wróbel i in., 2023, Wróbel i in., 2024; MN) potwierdziły, że składowisko odpadów i oczyszczalnia ścieków są obiecującym źródłem mikroorganizmów o wysokim potencjale do degradacji różnych polimerów (w tym: PE, PP, PVC, PLA i PC). Co więcej, analiza porównawcza trzech różnych środowisk, z których pozyskano mikroorganizmy wykazała większą liczbę szczepów drobnoustrojów zdolnych do degradacji tworzyw sztucznych w materiale glebowym składowiska odpadów i oczyszczalni ścieków w porównaniu z wodą rzeczną (Wróbel i in., 2024, MN).

Biodegradacja tworzyw sztucznych jest procesem wieloetapowym i bardzo złożonym. Rozpoczyna się od tworzenia biofilmu, który jest częścią etapu biodeterioracji (Ellis i in., 2021). Etap ten obejmuje zmiany w strukturze chemicznej polimeru spowodowane aktywnością utleniających enzymów wydzielanych przez mikroorganizmy. Proces ten (w ostatniej fazie) związany jest także z powstawaniem kwasów karboksylowych i redukcją grup karbonylowych (Zhang i in., 2022b). W tę procedurę najczęściej zaangażowane są określone taksony drobnoustrojów (np. *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Arcobacter* lub *Cladosporium*), które mogą kolonizować powierzchnię tworzyw sztucznych i tworzyć biofilm zwany „plastisferą” (Zettler i in., 2013; McCormick i in., 2014; Sathiyabama i in., 2024). Kolejnym etapem jest hydroliza łańcuchów węglowych polimeru (biofragmentacja), w wyniku czego powstają produkty pośrednie, w tym długie łańcuchy związków alifatycznych. Etap ten wymaga również aktywności enzymów wydzielanych przez drobnoustroje (np. hydroksylazy, peroksydazy), jak to miało miejsce w przypadku tworzenia biofilmu (Zhang i in., 2022a). W trzecim etapie – bioasymilacji, fragmenty nowo powstałych związków (zazwyczaj od 10 do 50 atomów węgla) są metabolizowane przez mikroorganizmy (Restrepo-Florez i in., 2014). W końcowym etapie procesu biodegradacji – mineralizacji, transfer produktów hydrolizy odbywa się wewnątrz komórek mikroorganizmów, gdzie przy użyciu wybranych enzymów (m.in. hydroksylazy, hydroksygenazy, syntetazy, hydrolazy), są one wykorzystywane do tworzenia produktów takich jak dwutlenek węgla i woda (Mohanani i in., 2020).

Złożony, wieloetapowy charakter procesu biodegradacji wymaga zastosowania różnorodnych metod analitycznych, które pozwalają na precyzyjną charakterystykę zachodzących zmian na poszczególnych etapach tego procesu. Do charakterystyki zmian powierzchniowych badanych polimerów wykorzystuje się skaningową mikroskopię elektronową (SEM), która stosowana jest do analizy biofilmu powstającego w trakcie biodegradacji, jak i oceny powierzchni pod kątem pęknięć, pofałdowań czy mikrourazów (Wróbel i in., 2023; Zhang i in., 2022a). W pierwszym etapie omawianego procesu, a także na początku kolejnego, dochodzi do zmian strukturalnych związanych z występowaniem grup funkcyjnych nie tylko w samym polimerze, ale także w nowo powstałych substratach. Zmiany te badane są zazwyczaj przy wykorzystaniu spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) (Zhang i in., 2022a), rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronów (XPS) (Yang i in., 2014) czy spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) (Sarmah i Rout, 2018). W celu wyznaczenia masy cząsteczkowej (średniej wagowo - M_w i średniej liczbowo - M_n) polimerów na etapie biofragmentacji (gdzie łańcuchy polimerów ulegają skróceniu) bardzo często wykorzystuje się chromatografię żelową (GPC) (Montazer i in., 2020). Na etapie bioasymilacji nowopowstałe produkty określa się zazwyczaj przy wykorzystaniu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) (Yamada-Onodera i in., 2001). Dodatkowo etap ten czasami opisuje się, wyznaczając ilość suchej masy polimeru w danym podłożu. Ostatni etap – mineralizacja charakteryzowany jest poprzez wyznaczenie ilości wytworzonego CO_2 – np. z wykorzystaniem testu Sturm (Gyung Yoon i in., 2012).

Pomimo pojawienia się licznych badań na temat procesu biodegradacji tworzyw sztucznych, temat ten jest nadal niewyczerpany. Chociaż potwierdzona liczba mikroorganizmów zdolnych do degradacji tworzyw jest stosunkowo duża (436), to liczba szczepów o wysokim potencjale degradacyjnym jest znacznie większa (Gambarini i in., 2021). Zaproponowana metoda przesiewowa izolacji mikroorganizmów ze środowiska może być właściwą i efektywną strategią pozyskiwania nowych szczepów. Potwierdzają to między innymi wyniki uzyskane w niniejszej dysertacji, gdzie zidentyfikowane szczepy nie były wcześniej wykorzystane do degradacji materiałów polimerowych.

4. Wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Publikacja 1 (P1):

Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T., & Hrynkiewicz, K. (2023). Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation. *Microbiological Research*, 267, 127251. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127251> (IF=6,1; pkt. MNiSW=100)

Publikacja 2 (P2):

Wróbel, M., Deja-Sikora, E., Hrynkiewicz, K., Kowalkowski, T., & Szymańska, S. (2024). Microbial allies in plastic degradation: specific bacterial genera as universal plastic-degraders in various environments. *Chemosphere*, 363, 142933. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142933> (IF=8,1; pkt. MNiSW=140)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (tzw. Impact Factor – IF): 14,2

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: 240

5. Cel badań

Degradacja tworzyw sztucznych przez mikroorganizmy jest jednym z kluczowych zagadnień w kontekście ochrony środowiska i redukcji zanieczyszczeń plastikiem. Dlatego też nadrzędnym celem rozprawy doktorskiej było wyselekcjonowanie i identyfikacja mikroorganizmów zdolnych do degradacji polimerów, co może przyczynić się do opracowania bardziej efektywnych metod bioremediacji.

Kluczowym aspektem tych badań było nie tylko znalezienie odpowiednich mikroorganizmów, ale również zrozumienie chemicznych mechanizmów leżących u podstaw procesu degradacji. Zmiany strukturalne polimerów, takie jak pękanie łańcuchów polimerowych, utlenianie czy hydroliza, mogą znacząco wpływać na szybkość i efektywność biodegradacji. W celu dokładnego zbadania tych zmian, zastosowano zaawansowane techniki analityczne, takie jak spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), umożliwiającą identyfikację zmian w strukturze chemicznej tworzyw sztucznych, oraz skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), służąca do wizualizacji powierzchniowych modyfikacji materiałów.

Zrozumienie zależności między strukturą chemiczną polimerów, bioróżnorodnością mikrobiomów badanych środowisk a efektywnością procesów biodegradacji stało się możliwe dzięki:

- ✓ opracowaniu i wdrożeniu metody pozyskiwania oraz izolacji z prób środowiskowych mikroorganizmów, które są zdolne do degradacji polimerów (**P1, P2, materiał niepublikowany MN**),
- ✓ zbadaniu korelacji pomiędzy wydajnością procesu biodegradacji a rodzajem mikroorganizmu (bakterie i grzyby) (**P1**),
- ✓ ocenie zmian strukturalnych tworzyw sztucznych za pomocą FTIR i SEM w celu identyfikacji chemicznych modyfikacji związanych z biodegradacją (**P1, P2, MN**),
- ✓ zbadaniu korelacji między strukturą mikrobiomu a wydajnością procesu biodegradacji (**P2, MN**).

6. Hipotezy badawcze

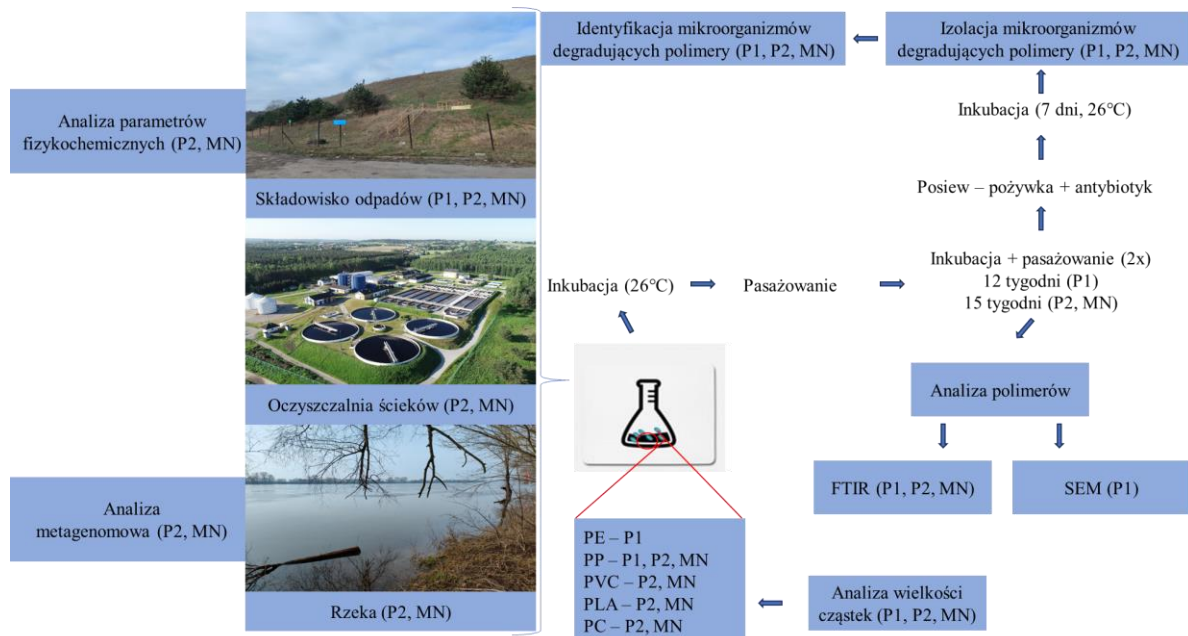
Współczesne badania nad degradacją polimerów i ich wpływem na środowisko stają się coraz bardziej istotne z powodu rosnącego problemu zanieczyszczenia plastikiem. Polimery, takie jak polipropylen (PP), polietylen (PE), polichlorek winylu (PVC), polilaktyd (PLA) oraz poliwęglan (PC), wykazują różne właściwości chemiczne i fizyczne, co wpływa na tempo ich rozkładu w środowisku. Proces degradacji tych materiałów jest również złożony i zależy od interakcji z różnymi mikroorganizmami, w tym bakteriami i grzybami. Dodatkowo, środowiska zanieczyszczone mikroplastikami, jak gleba ze składowisk odpadów czy osady ściekowe, mogą mieć zmienioną strukturę mikrobiologiczną, co wpływa na bioróżnorodność i funkcjonowanie ekosystemów. W tym kontekście kluczowe jest zrozumienie, jak różnorodność mikrobiomu wpływa na zdolność degradacji polimerów oraz czy określone mikroorganizmy, charakterystyczne dla tzw. plastisfery, są obecne w tych środowiskach.

Niniejsze badania mają na celu zweryfikowanie poniższych hipotez dotyczących zależności między rodzajem polimeru i mikroorganizmów, poziomem zanieczyszczenia mikroplastikami a strukturą mikrobiomu i procesami degradacji.

- ✓ Proces degradacji polimeru zależy od rodzaju polimeru (PP, PE) oraz rodzaju obecnych mikroorganizmów (bakterii lub grzybów) (**P1**).
- ✓ Środowiska o wyższym zanieczyszczeniu mikroplastikami, takie jak materiał glebowy składowiska odpadów lub osady ściekowe, cechują się niższą bioróżnorodnością mikrobiomu bakteryjnego i mykobiomu (**P2, MN**).
- ✓ Alfa różnorodność mikrobiologiczna badanych środowisk jest pozytywnie skorelowana z poziomem degradacji badanych polimerów (**P2, MN**).
- ✓ Badane elementy ekosystemu zawierają podobne taksony drobnoustrojów specyficzne dla plastisfery (**P2, MN**).
- ✓ Metoda selektywnej izolacji pozwala na wyodrębnienie z różnych środowisk bakterii i grzybów zdolnych do degradacji polimerów, w tym również przedstawicieli taksonów o niskiej liczebności (**P2, MN**).

7. Metodologia badań

Koncepcja pracy przedstawiona w formie schematu na rysunku 3, zakładała pozyskanie hodowlanych szczepów bakterii i grzybów zdolnych do degradacji wybranych polimerów (PP, PE, PVC, PLA, PC). Selekcja mikroorganizmów polegała na inkubacji mikroplastików (stanowiących jedyne źródło energii dla bakterii i grzybów) z materiałem biologicznym pobranym z trzech środowisk w różnym stopniu zanieczyszczonych plastikami (materiał glebowy ze składowiska odpadów, osad z oczyszczalni ścieków (skratki) oraz woda z rzeki). Każda matryca została przebadana pod kątem określenia parametrów fizykochemicznych, a także zbadano ich skład taksonomiczny.



Rysunek 3. Projekt doświadczenia.

Izolację mikroorganizmów rozpoczęto od przygotowania mieszaniny zawierającej konkretne rodzaje tworzyw z odpowiednio rozcieńczonym materiałem środowiskowym i antybiotykami, pozwalającymi ukierunkować hodowlę celem pozyskania określonego rodzaju mikroorganizmu. Etap inkubacji trwający odpowiednio 12 (**P1**) i 15 (**P2, MN**) tygodni zakończony został selekcją przeżywalnych mikroorganizmów, na podstawie ich różnic morfologicznych kolonii. Dokonano także identyfikacji wszystkich uzyskanych szczepów. Do oceny zmian na powierzchni badanych tworzyw sztucznych wykorzystano skaningową mikroskopię elektronową (**P1**), natomiast do oszacowania zaawansowania

procesu wykorzystano FTIR (**P1**, **P2**, **MN**). Techniki i metody wykorzystane w poszczególnych zadaniach badawczych zestawiono w tabeli 1.

7.1 Przygotowanie materiału polimerowego

W badaniach wykorzystano tworzywa w formie mikroplastiku. Wyjściowym produktem były polimery w postaci granulek (polietylen (PE), polipropylen (PP), polichlorek winylu (PVC), polilaktyd (PLA) i poliwęglan (PC)) otrzymane z Katedry Chemii Fizycznej i Fizykochemii Polimerów Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W pierwszym etapie, gdzie badano PE i PP (**P1**), wykorzystano granulaty polimerowy o średnicy w przedziale 1,35 – 1,80 mm. Trzydzieści jednorodnych granulek PE i PP umieszczono w 100 ml kolbach stożkowych zawierających 20 ml 0,85% NaCl, które sterylizowano przez 15 minut w temperaturze 120°C. W drugim etapie polimery PP, PVC, PLA i PC (**P2**, **MN**) zmielono przy użyciu komercyjnego młynka (Biomix 2500 W; USA) wykorzystując do chłodzenia ciekły azot. Rozmiary cząstek oceniono przy użyciu analizatora wielkości cząstek Malvern Mastersizer 2000 (Wielka Brytania). Ich wielkość wahała się w przedziale od 20 µm (frakcja około 20%) do 50-800 µm (frakcja 80%). Następnie do 100 ml kolb stożkowych zawierających 20 ml 0,85% NaCl dodano po 200 µl tak przygotowanych polimerów i sterylizowano przez 10 minut w temperaturze 120°C. Tak przygotowane mieszaniny poddano inokulacji odpowiednio przygotowanym materiałem środowiskowym.

7.2 Pobieranie prób środowiskowych

Jako mikrobiom służący do inokulacji polimerów (**P1**) wykorzystano materiał glebowy pochodzący ze składowiska odpadów komunalnych. Próby materiału pobrano jesienią 2019 r. ze składowiska należącego do Miejskiego Przedsiębiorstwa Oczyszczania Sp. z o.o. w Toruniu (53.056242 N, 18.645329 E). Trzy próby materiału glebowego (S1, S2, S3), zostały pobrane z głębokości około 20 cm, z miejsc oddalonych od siebie nie więcej niż 30 metrów, przy użyciu sterylnych narzędzi. Każda próba została pobrana do oddzielnego worka w celu uniknięcia zanieczyszczenia i natychmiast przetransportowana do laboratorium, gdzie została wykorzystana do przygotowania serii rozcieńczeń.

Próby środowiskowe do etapu drugiego (**P2, MN**) pobrano w drugim tygodniu maja 2020 r. Na tym etapie wykorzystano trzy matryce: materiał glebowy pochodzący ze składowiska odpadów komunalnych, osad ściekowy (skratki) oraz wodę rzeczną. Próby materiału glebowego (SL) pobrano z głębokości około 35 cm ze składowiska odpadów komunalnych w Toruniu (53.0501532 N 18.6505457 E). Próby osadu ściekowego (SG) zostały dostarczone z oczyszczalni ścieków w Grudziądzu (53.5312204 N 18.7935916 E). Próby wody (WR) pobrano do sterylnych szklanych butelek (o łącznej objętości 3 l) z głębokości około 20 cm z Wisły (53.0035672 N 18.5649681 E) w Toruniu. W laboratorium z każdej próby środowiskowej (SL, SG i WR) przygotowano po trzy próby laboratoryjne. Zostały one wykorzystane do innego rodzaju badań, w tym (1) analizy fizykochemicznej, (2) analizy metagenomowej oraz (3) do inokulacji badanych polimerów mikrobiomem środowiskowym w celu analizy ich struktury oraz do wyselekcjonowania hodowlanych mikroorganizmów degradujących polimery.

7.3 Analiza parametrów fizykochemicznych prób wody

Odczyn pH mierzono za pomocą pH-metru CP-551 (Elmetron, Polska). Przewodność elektrolityczną właściwą (SEC) w temperaturze 20°C i 25°C oznaczono metodą konduktometryczną za pomocą konduktometru CPC-401 (Elmetron, Polska). Stężenie ortofosforanów (PO_4^{3-}) wyznaczono metodą chromatograficzną z wykorzystaniem chromatografu jonowego Thermo Scientific Dionex Aquion (Thermo Fisher Scientific, USA). Stężenie fosforu całkowitego (TP), azotu całkowitego (TN), azotu organicznego N_{org} , azotu azotanowego (N-NO_3), azotu azotynowego (N-NO_2) i azotu amonowego (N-NH_4) oznaczono za pomocą spektrofotometrii UV-VIS stosując spektrofotometr firmy Merck (Spectroquant Prove 100, Niemcy) przy użyciu zestawów testowych. Statystycznie istotne różnice w wartościach zmiennych między próbkami analizowano przy użyciu ANOVA z wykorzystaniem testu *post-hoc* HSD Tukeya.

7.4 Analiza parametrów fizykochemicznych materiału glebowego oraz osadu ściekowego

pH mierzono za pomocą miernika Elmetron CP-551 pH (Elmetron, Polska) w ekstrakcie wodnym (pH- H_2O) i 1 M chlorku potasu (pH-KCl) przy stosunku materiału glebowego do roztworu 1:2,5 na podstawie metodyki według van Reeuwijk (2002).

Parametry takie jak węgiel całkowity (TC) i azot całkowity (TN) oznaczono przy użyciu mikroanalizatora Vario Macro Cube CHN/CHNS (Elementar, Niemcy). Stężenie węgla wapnia (CaCO_3) oznaczono metodą objętościową z wykorzystaniem aparatu Scheiblera (Polska) zgodnie z metodą Pansu i Gautheyrou (2006). Fosfor całkowity (TP) oznaczono kolorymetrycznie przy użyciu metody Bleck'a z modyfikacjami, jak opisał to Gebhardt (1982) za pomocą spektrofotometru Rayleigh UV-1601 (Rayleigh Instruments Ltd., Wielka Brytania). Stężenie azotu azotanowego (N- NO_3), azotu azotynowego (N- NO_2) i azotu amonowego (N- NH_4) w ekstraktach wodnych oznaczono przy stosunku materiał glebowy-woda 1:2,5 metodą kolorymetryczną. Stężenie wyznaczono za pomocą spektrofotometru Merck Spectroquant Prove 100 z wykorzystaniem zestawów testowych opartych na metodach van Reeuwijk (2002). Statystycznie istotne różnice w wartościach zmiennych między próbkami analizowano za pomocą ANOVA i testu *post-hoc* Tukeya HSD.

7.5 Izolacja metagenomowego DNA

Metagenomowe DNA wyizolowano przy użyciu zestawu Soil DNA Purification Kit (EURx, Polska) zgodnie z procedurą producenta. Dla każdego środowiska uwzględniono pięć powtórzeń biologicznych. W przypadku materiału glebowego i osadu ściekowego, do każdej izolacji wykorzystano 250 mg materiału środowiskowego. Izolację DNA z wody poprzedził etap filtracji przez sterylne filtry z membraną z octanu celulozy (CA) o wielkości porów $0,22\ \mu\text{m}$ (Chemland, Polska). Filtry zostały pocięte w sterylnych warunkach na mniejsze fragmenty, które posłużyły do izolacji DNA. Ilość i jakość DNA oceniono spektrofotometrycznie (UV-Vis NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA). Biblioteki fragmentów genu V3-V4 16S rRNA (bakterie) oraz regionu ITS (grzyby) dla analizowanych próbek zostały przygotowane i zsekwencjonowane przez firmę Novogene Co, (Chiny) przy użyciu technologii Illumina NovaSeq 6000 (głębokość sekwencjonowania wynosiła od 84,3% do 91,1% dla genomu bakteryjnego oraz od 92,3% do 98,2% dla genomu grzybów). Surowe dane zostały dostarczone w formacie FASTQ.

7.6 Analiza bioinformatyczna

Analizy metagenomowe przeprowadzono w oparciu o tabelę operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTU) skonstruowanych na poziomie podobieństwa 97% oraz tabelę przypisania taksonomicznego, które zostały dostarczone przez firmę Novogene Co.

(Pekin, Chiny). W analizie mykobiomów użyto biblioteki `plyr` programu R do określenia, w jakim stopniu liczba sekwencji uzyskanych w każdej próbce odzwierciedla rzeczywistą bioróżnorodność mikroorganizmów w badanych środowiskach. W celu wykonania analiz różnorodności alfa i beta, liczebności OTU zostały znormalizowane przy użyciu liczby sekwencji odpowiadającej próbce z najmniejszą liczbą sekwencji. Bogactwo gatunkowe (Sobs), nieparametryczny estymator bogactwa gatunkowego (Chao1) i wskaźnik różnorodności Shannona-Wienera w próbach zostały obliczone za pomocą QIIME (wersja 1.9.1) i oprogramowania R (wersja 4.0.3). Istotność różnic w różnorodności alfa pomiędzy analizowanymi środowiskami obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa. Diagramy Venna zostały utworzone w programie R (wersja 4.0.3) za pomocą funkcji `VennDiagram`. Różnorodność beta określono za pomocą analizy podobieństwa ANOSIM w pakiecie `vegan` R i analizy głównych współrzędnych PCoA w pakiecie `ade4` R z zastosowaniem ważonej macierzy odległości `UniFrac` (Uniqueness Fraction). Wizualizacje wykonano stosując pakiet `ggplot2` R. Struktury taksonomiczne mykobiomów (10 najbardziej licznych taksonów) wykreślone na poziomie gromady i rodzaju zostały wyznaczone w programie `Perl` (wersja 5.26.2) za pomocą funkcji `SVG`. Taksony grzybów różnicujące analizowane środowiska zostały zidentyfikowane na podstawie analizy LEfSe przy użyciu pakietu `lefse` R. Przewidywane funkcje ekologiczne rodzajów grzybów najliczniej występujących w strukturze mykobiomów wyznaczono w oparciu o funkcję `FunGuild` zaimplementowaną w środowisku Python (wersja 2.7.15). Do identyfikacji korelacji pomiędzy parametrami fizykochemicznymi a strukturą mykobiomów zastosowano mapy ciepła wygenerowane na podstawie współczynnika korelacji Spearmana w programie R za pomocą pakietu `vegan`.

Analizy dla danych bakteryjnych przeprowadzono przy użyciu programu R (wersja 4.2.1) (R Core Team, 2023). Tabela została sprawdzona pod względem jakości, dodatkowo usunięto OTU powiązane z taksonami innymi niż bakterie (tj. archeony, chloroplasty, mitochondria, nieprzypisane królestwa). Tabela OTU została znormalizowana do równej głębokości względem próby o najniższej liczbie sekwencji (McMurdie i Holmes, 2014). Następnie obliczono wskaźniki różnorodności alfa (bogactwo gatunkowe Sobs, Chao1, ACE, wskaźnik Shannona-Wienera i odwrócony Simpson) i zastosowano test Kruskala-Wallisa z testem *post-hoc* Dunna i poprawką Bonferroniego w celu wskazania statystycznie istotnych różnic między stanowiskami badawczymi. Wyżej wymienione analizy zostały

przeprowadzone przy użyciu pakietu Phyloseq (McMurdie i Holmes, 2013). Najliczniejsze taksony na wykresach liczebności zostały zagregowane przy użyciu pakietu microbiome (Lahti i Shetty, 2012-2019). Struktury taksonomiczne mikrobiomów wykreślone na poziomie typu i rodzaju zostały połączone z drzewami odległości opartymi na wskaźniku niepodobieństwa Bray-Curtisa (BC) obliczonym za pomocą vegdist z pakietu vegan (Oksanen i in., 2022). Różnorodność beta oceniono za pomocą analizy podobieństwa (ANOSIM) w pakiecie vegan, a znaczącą różnicę osiągnięto, gdy spełnione były następujące warunki: $R > 0,3$ i $P < 0,05$. Rodzaje bakterii różniące się liczebnością w analizowanych środowiskach (biomarkery) zostały zidentyfikowane na podstawie analizy LEfSe przy użyciu pakietu microbiomeMarker (Cao i in., 2022). Niemetryczne skalowanie wielowymiarowe (NMDS) zostało wykonane przy użyciu metaMDS z pakietu vegan R. Zmienne środowiskowe połączono z wykresem porządkowania przy użyciu funkcji envfit. Istotność wektorów zmiennych sprawdzono po zastosowaniu poprawki Bonferroniego. Tylko zmienne z wartościami $p \leq 0,05$ pozostawiono na wykresie NMDS. Drzewo filogenetyczne sekwencji 16S rDNA dla izolatów środowiskowych i szczepów referencyjnych (T) uzyskanych z bazy danych NCBI Reference Material zostało wygenerowane przy użyciu metody największej wiarygodności (MLE) w oprogramowaniu MEGA X (Kumar i in., 2018).

7.7 Izolacja i selekcja mikroorganizmów degradujących polimery

Tę część doświadczenia rozpoczęto od przygotowania odpowiednich rozcieńczeń materiału środowiskowego w 0,85% roztworze NaCl. Dla etapu pierwszego (P1) przygotowano serię rozcieńczeń od 10^{-1} do 10^{-5} materiału glebowego pobranego ze składowiska odpadów. Do inokulacji wybrano dwa rozcieńczenia 10^{-3} i 10^{-5} . Dla każdego wariantu eksperymentalnego trzy sterylne kolby zawierające 0,85% NaCl, odpowiedni polimer (PP lub PE) i antybiotyk (100 mg/l nystatyny do selekcji bakterii i 40 mg/l tetracykliny do selekcji grzybów) zaszczepiono 1 ml odpowiedniego rozcieńczenia. Ostatecznie do selekcji mikroorganizmów na tym etapie wykorzystano 48 kolb z próbami materiału glebowego pobranego z trzech miejsc (S1, S2 i S3), uwzględniono: dwa rozcieńczenia (10^{-3} i 10^{-5}), dwa powtórzenia techniczne, dwa rodzaje mikroorganizmów (bakterie i grzyby). Dodatkowo przygotowano 4 próby kontrolne (polimer + antybiotyk, bez inokulacji). Próby inokulowane i kontrolne inkubowano przez

4 tygodnie w temperaturze 26°C z wytrząsaniem (PSU-20i Orbital Shaking Platform, Biosan, Łotwa; ruch orbitalny przy 120 obr./min). Po tym okresie zainicjowano trzy dodatkowe seryjne podhodowle, przenosząc 1 ml poprzedniej hodowli do świeżej kolby zawierającej 20 ml 0,85% NaCl i 30 sterylnych granulek PE lub PP. Pierwszą subkulturę inkubowano przez 12 tygodni, drugą przez 10 tygodni, a ostatnią przez 8 tygodni. Krok ten miał na celu wyeliminowanie mikroorganizmów, które wykorzystywały śladowe ilości węgla (C) i azotu (N) ze źródeł innych niż tworzywa sztuczne. Następnie z ostatniej subkultury wykonano w trzech powtórzeniach technicznych posiew lany z użyciem pożywki R2A (Difco) wzbogaconej nystatyną (100 mg/l) oraz podłoża PDA (Difco) z tetracykliną (Sigma, 40 mg/l). Szalki inkubowano następnie przez 7 dni w temperaturze 26°C. Na podstawie różnic morfologicznych kolonii, do identyfikacji na podstawie 16S/18S rRNA wybrano 27 mikroorganizmów.

W drugim etapie (**P2**, **MN**) dla każdej próby środowiskowej (SL, SG i WR) przygotowano 10-stopniową, 10-krotną serię rozcieńczeń w 0,85% NaCl. Z każdej serii wybrano dwa rozcieńczenia (SL - 10^{-6} i 10^{-9} , SG - 10^{-6} i 10^{-10} oraz WR - 10^{-1} i 10^{-4}) i wykorzystano je do inokulacji polimerów. Dla każdego wariantu eksperymentalnego trzy sterylne kolby zawierające 0,85% NaCl, mikroplastik i nystatynę (100 mg/l) zaszczepiono 1 ml odpowiedniego rozcieńczenia w celu selekcji bakterii (**P2**). Analogicznie przygotowano trzy sterylne kolby zawierające 0,85% NaCl, mikroplastik i mieszaninę czterech antybiotyków (tetracykliny, ampicyliny, streptomycyny oraz kanamycyny), które zainokulowano 1 ml rozcieńczonego materiału środowiskowego, aby móc w dalszym etapie wyizolować grzyby (**MN**). W sumie do selekcji mikroorganizmów degradujących tworzywa sztuczne wykorzystano 144 kolby (**P2**, **MN**). Przygotowano również próby kontrolne zawierające polimery i antybiotyki, ale bez rozcieńczonego materiału środowiskowego. Próby kontrolne inkubowano wraz z innymi próbami przez 5 tygodni w temperaturze 26°C z wytrząsaniem, z ruchem orbitalnym na poziomie 120 obr./min (PSU-20i Orbital Shaking Platform, Biosan, Łotwa). Po tym okresie inkubacji zainicjowano trzy dodatkowe seryjne podhodowle, przenosząc 1 ml poprzedniej hodowli do czystej kolby zawierającej 20 ml 0,85% NaCl i 200 µl badanego mikroplastiku. Pierwszą subkulturę inkubowano przez 15 tygodni, drugą przez 10 tygodni, a ostatnią przez 5 tygodni. Następnie 1 ml z subkultury hodowanej przez 5 tygodni wykorzystano

do wykonania (w trzech powtórzeniach technicznych) posiewu lanego na podłoża R2A (Difco) z nystatyną (Sigma, 100 mg/l) i PDA (Difco) z tetracykliną (Sigma, 40 mg/l) w celu wyhodowania bakterii i grzybów. Płytki inkubowano następnie przez 7 dni w temperaturze 26°C. Na podstawie wyraźnych różnic morfologicznych kolonii do identyfikacji w oparciu o sekwencję regionu 16S rRNA i ITS, wybrano odpowiednio 37 bakterii oraz 30 grzybów (**P2, MN**).

7.8 Identyfikacja mikroorganizmów degradujących polimery

Wybrane szczepy bakteryjne zidentyfikowano na podstawie sekwencjonowania genu 16S rRNA. Genomowe DNA wyizolowano przy użyciu zestawu Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx) (**P1**). Wybrane szczepy grzybów zidentyfikowano na podstawie sekwencjonowania regionu ITS (**P1, MN**). Genomowe DNA wyizolowano przy użyciu zestawu Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Polska). Izolację przeprowadzono zgodnie ze standardową procedurą podaną przez producenta ze zmodyfikowanym etapem elucji. Do izolacji DNA użyto 50 µl buforu elucyjnego, a nie jak zaleca producent 100-200 µl. Jakość i ilość wyizolowanego DNA oceniono spektrofotometrycznie (UV-VIS NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA). Uzyskane DNA wykorzystano jako matrycę do reakcji łańcuchowej polimerazy PCR. Do amplifikacji rybosomalnego DNA 16S użyto następujących starterów: 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') i 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Miller i in., 2013). Do amplifikacji PCR 18S rybosomalnego DNA użyto starterów: ITS1 (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') i ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White i in., 1990; Gardes i Bruns, 1993). Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu FirePol MasterMix 7.5 mM MgCl₂ (CytoGen, Polska). Warunki reakcji PCR były następujące: denaturacja wstępna - 3 min w 94°C, 35 cykli: denaturacja - 30 s w 94°C, przyłączenie starterów - 45 s w 50°C, wydłużanie - 1 min w 72°C i na koniec wydłużanie końcowe - 7 min w 72°C (DNA grzybów). Warunki dla bakteryjnego DNA były następujące: denaturacja wstępna - 2 min w 95°C, następnie 30 cykli: denaturacja - 1 min w 94°C, przyłączenie starterów - 1 min w 55°C i wydłużanie - 2 min w 72°C oraz wydłużanie końcowe - 5 min w 72°C. Obecność i wielkość produktów reakcji PCR wybarwionych za pomocą Simply Safe (EurX) oceniono przy użyciu 2,0% w/v żeli agarozowych. Produkty reakcji PCR oczyszczono przy użyciu zestawu PCR/DNA Clean-

Up Purification Kit zgodnie z protokołem producenta. Oczyszczone amplikony wysłano do sekwencjonowania przy użyciu odpowiednich starterów do identyfikacji bakterii (27F i 1492R) i grzybów (ITS1 i ITS4) w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk. Do opracowania sekwencji wykorzystano oprogramowanie Sequencher 5.1 (Gene Codes 20). Identyfikacji bakterii i grzybów dokonano w oparciu o porównanie zgodności uzyskanych sekwencji z sekwencjami referencyjnymi zdeponowanymi w bazach danych nukleotydów GenBank (w przypadku bakterii) i UNITE (dla grzybów). Do właściwej identyfikacji bakterii i grzybów wymagane było odpowiednio minimum 99 i 97% podobieństwa. Wszystkie uzyskane sekwencje DNA zostały przesłane do bazy GenBank.

Na etapie P2 wybrane szczepy bakteryjne zidentyfikowano na podstawie sekwencjonowania genu 16S rRNA, analogicznie jak poprzednio, wprowadzając kilka zmian. Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu Taq PCR Master Mix (2x) (Qiagen, Holandia) w następujących warunkach: denaturacja wstępna - 2 min w 94°C, następnie 30 cykli obejmujących denaturację - 30 s w 94°C, przyłączenie starterów - 30 s w 55°C, wydłużanie - 90 s w 72°C i końcowe wydłużanie - 5 min w 72°C. Obecność i wielkość produktów PCR oceniono przy użyciu 1% w/v żelu agarozowego barwionego Simply Safe (EURx, Polska). Analiza porównawcza otrzymanych sekwencji z sekwencjami zdeponowanymi w bazie National Center for Biotechnology Information (NCBI) pozwoliło na identyfikację wyselekcjonowanych bakterii. Do właściwego przypisania taksonomicznego bakterii wymagane było minimum 99% pokrycia i 99% podobieństwa. Wszystkie otrzymane sekwencje DNA zostały zdeponowane w GenBank (numery akcesyjne: PP107976-PP108007 i PP375082-PP375085).

7.9 Spektrofotometryczna analiza biofilmu bakteryjnego

Ocenę ilościową biofilmu wytworzonego przez bakterie na powierzchni polimerów wykonano po 8, 10 i 12 tygodniach inkubacji granulek polimerowych z mikrobiomem środowiskowym. Pobierano w tym celu po 10 granulek (5 kulek z każdego replikatu technicznego) polimeru dla każdego wariantu eksperymentu (dwa polimery: PP i PE; trzy próby materiału glebowego: S1, S2 i S3; dwa rozcieńczenia: 10^{-3} i 10^{-5}). Tworzenie biofilmu oszacowano zgodnie z metodą opisaną przez O'Toole'a i in. (1999) z niewielkimi modyfikacjami. Pobrane granulki delikatnie przepłukano wodą destylowaną i suszono

w temperaturze 60°C (45 min). Następnie komórki bakteryjne związane z granulkami barwiono fioletem krystalicznym (300 µl 0,5%) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Niezwiązany fiolet krystaliczny usunięto przez przepłukanie granulek wodą destylowaną, a przepłukane granulki suszono w temperaturze pokojowej. Barwnik z biofilmu rozpuszczano w 80% alkoholu etylowego, umieszczano na płytkach mikrotitracyjnych i badano wartości absorbancji przy długości fali 590 nm (Synergy HT Multi-Mode microplate reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

7.10 Ocena zmian powierzchni polimerów z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej

Do oceny wpływu mikroorganizmów na zmianę powierzchni badanych polimerów (PE i PP) wykorzystano jedną granulkę dla każdego badanego wariantu. W efekcie przebadano 144 granulki uwzględniając: dwa polimery (PP i PE), trzy próby materiału glebowego (S1, S2 i S3), dwa rozcieńczenia, (10^{-3} i 10^{-5}), dwa powtórzenia techniczne, dwa rodzaje mikroorganizmów (bakterie i grzyby) oraz trzy czasy inkubacji (8, 10 i 12 tygodni). Badania obejmowały również analizę wariantów kontrolnych (polimery nieinokulowane). Pobrane granulki kilkunastokrotnie przemywano roztworem azydki sodu (0,1%, Chempur, Polska), a następnie kilkakrotnie wodą destylowaną. Następnie próby zostały utrwalone w 2% glutaraldehydzie w buforze fosforanowym (pH 7,2) i odwodnione w alkoholu etylowym. Po utrwaleniu próby suszono w temperaturze pokojowej i pokrywano złotem poprzez napyłanie jonowe. Tak przygotowane próby zostały przebadane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (Quanta 3D FEG skaningowy mikroskop elektronowy SEM/FIB) w trybie emisji elektronów wtórnych z trybem wysokiej próżni przy napięciu 30 kV. Wpływ mikroorganizmów na powierzchnie granulek obserwowano przy powiększeniach 200×, 500×, 1000×, 5000×, 10 000× i 50 000× dla grzybów oraz 200×, 1000×, 5000×, 10 000× i 50 000× dla bakterii. Uzyskane obrazy analizowano poprzez porównanie granulek poddanych działaniu mikroorganizmów z granulkami kontrolnymi (warianty nieinokulowane).

7.11 Analiza degradacji materiałów polimerowych za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera

Polimery otrzymane po okresie 12, 10 oraz 8 tygodni inkubacji z materiałem glebowym (**P1**) przepłukano 0,1% roztworem azydku sodu (Chempur, Polska), a następnie kilkakrotnie przemyto wodą destylowaną. Uzyskany materiał poddano analizie IR. Próby w postaci granulek analizowano metodą spektroskopii w podczerwieni przy użyciu próżniowego spektrometru FT-IR Vertex 70v z mikroskopem Hyperion 1000/2000 (Bruker Optik). Próby inokulowane porównano z próbami kontrolnymi (do których nie dodawano materiału). Indeks karbonylowy (CI) został określony na podstawie metodyki opisanej w pracy Almond i in. (2020). CI obliczono jako średnią wartość pięciu losowych pasm otrzymanych po analizie pięciu różnych granulek PE lub PP. Obszar pasma obliczono za pomocą oprogramowania Bruker OPUS 7.0 FTIR.

Polimery otrzymane po 15 tygodniach inkubacji z materiałem środowiskowym (**P2**, **MN**) przemyto dodecylosiarczanem sodu (SDS) (Chempur, Polska), alkoholem etylowym i wodą destylowaną w celu usunięcia mikroorganizmów z ich powierzchni. Wyszuszone mikroplastiki analizowano za pomocą spektroskopii w podczerwieni przy użyciu próżniowego spektrometru FT-IR Vertex 70v z mikroskopem Hyperion 1000/2000 (Bruker Optics, USA). Widma dla wszystkich wariantów zarejestrowano w zakresie od 4000 do 400 cm^{-1} . Próby z tego samego wariantu inkubacji zestawiono z próbami kontrolnymi. Dla PVC, indeks karbonylowy (CI) został określony zgodnie z protokołem opisanym przez Yousif i in. (2015). W przypadku PP i CI, widma zostały określone w oparciu o metodologię Rouillon i in. (2016). CI dla PLA i PC zostały wyliczone zgodnie z naszą pracą (**P1**; Wróbel i in., 2023). CI obliczono jako średnią wartość z trzech widm uzyskanych po analizie trzech różnych prób każdego polimeru. Obszar pasma natomiast wyznaczono za pomocą oprogramowania Bruker OPUS 7.0 FTIR (Bruker, USA).

Tabela 1. Zestawienie technik i metod wykorzystanych w poszczególnych zadaniach badawczych zaprezentowanych w publikacjach (P1, P2), jak i uwzględnionych w materiałach niepublikowanych (MN).

| Technika/metoda | Zakres badań | P1 | P2 | MN |
|--|--|----|----|----|
| Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) | Ocena zmian na powierzchni badanych polimerów - charakterystyka pod kątem pęknięć, mikrouszkodzeń, pofałdowań i obecności biofilmu. | X | | |
| Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) | Ocena zmian strukturalnych w tworzywach sztucznych - zmiany położenia i intensywności charakterystycznych pasm, ocena wartości indeksu karbonylowego (CI). | X | X | X |
| Analiza spektrofotometryczna | Ocena ilości i jakości wyizolowanego DNA przy użyciu Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, USA). | X | X | X |
| | Oszacowanie ilości biofilmu tworzącego się na powierzchni badanych polimerów (metoda opisana przez O'Toole'a z niewielkimi modyfikacjami). | X | | |
| Dyfrakcja laserowa | Określanie wielkości cząstek polimeru przed inkubacją z mikro- i mykobiomem (Malvern Mastersizer 2000). | X | X | X |
| Fizykochemiczna analiza prób środowiskowych - materiał glebowy i osad ściekowy | Oznaczenie węgla całkowitego (TC) i azotu całkowitego (TN) wykonano przy użyciu mikroanalizatora Vario Macro Cube CHN/CHNS (Elementar, Niemcy). | | | |
| | Oznaczenie stężenia azotu azotanowego (N-NO ₃), azotu azotynowego (N-NO ₂) i azotu amonowego (N-NH ₄) w ekstraktach wodnych metodą kolorymetryczną w stosunku gleba-woda 1:2,5 opartą na metodach van Reeuwijka (Van Reeuwijk, 2002). Wykorzystano spektrofotometr Merck Spectroquant Prove 100 (Merck, Niemcy) i zestawy testowe Merck. | | | |
| | Oznaczenie fosforu całkowitego (TP) kolorymetrycznie przy użyciu metody Bleck'a z modyfikacjami, zgodnie z opisem Gebhardta (Gebhardt, 1982) wykorzystując spektrofotometr Rayleigh UV-1601 (Rayleigh Instruments Ltd., Wielka Brytania). | | X | X |
| | Wyznaczenie pH za pomocą pH-metru Elmetron CP-551 (Elmetron, Polska) w ekstrakcie wodnym (pH-H ₂ O) i 1 M chlorku potasu (pH-KCl) w stosunku gleba:roztwór 1:2,5 na podstawie van Reeuwijk (Van Reeuwijk, 2002). | | | |
| | Oznaczenie zawartości węglanu wapnia (CaCO ₃) metodą objętościową przy użyciu aparatu Scheiblera (Polska) zgodnie z metodą Pansu i Gautheyrou (Pansu i Gautheyrou, 2006). | | | |

| | | | | |
|--|---|---|---|---|
| Fizykochemiczna analiza prób środowiskowych - woda | Wyznaczenie pH za pomocą pH-metru CP-551 (Elmetron, Polska). | | | |
| | Oznaczenie stężenia ortofosforanu (PO_4^{3-}) za pomocą chromatografu jonowego Thermo Scientific Dionex Aquion (Thermo Fisher Scientific, USA). | | | |
| | Określenie przewodności elektrolitycznej właściwej (SEC) w temperaturze 20°C i 25°C metodą konduktometryczną za pomocą konduktometru CPC-401 (Elmetron, Polska). | | X | X |
| | Oznaczenie zawartości fosforu całkowitego (TP), azotu całkowitego (TN), azotu organicznego N_{org} , azotu azotanowego (N-NO_3), azotu azotynowego (N-NO_2) i azotu amonowego (N-NH_4) za pomocą spektrofotometrii (spektrofotometr Merck Spectroquant Prove 100, przy użyciu zestawów testowych). | | | |
| Selekcja mikroorganizmów degradujących polimery | Selekcja mikroorganizmów polegała na inokulacji polimerów rozcieńczonymi próbkami środowiskowymi, ich inkubacji, wzroście na odpowiednich podłożach i selekcji szczepów na podstawie ich różnic morfologicznych. | X | X | X |
| Identyfikacja mikroorganizmów degradujących polimery | Izolacje DNA z bakterii przeprowadzono przy użyciu zestawu Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EurX, Polska). | X | X | |
| | Izolacje DNA z grzybów przeprowadzono przy użyciu zestawu Plant & Fungi DNA Purification Kit (EurX, Polska). | X | | X |
| | Izolacje bakteryjnego DNA amplifikowano metodą PCR przy użyciu starterów 27F i 1492R. | X | X | |
| | Izolacje DNA grzybów amplifikowano metodą PCR przy użyciu starterów ITS1 and ITS4. | X | | X |
| | Elektroforezę żelową przeprowadzono na 1%/2% w/v żelu agarozowym barwionym preparatem SimplySafe (EurX, Polska) w celu potwierdzenia obecności produktów PCR. | X | X | X |
| Analizy bioinformatyczne | Określenie różnorodności BETA za pomocą ANOSIM (pakiet vegan). | | | X |
| | Identyfikacja rodzajów mikroorganizmów różniących się liczebnością między badanymi środowiskami za pomocą LEfSe (microbiomeMarker). | | X | X |
| | Wygenerowanie drzewa filogenetycznego sekwencji 16S rDNA dla izolatów środowiskowych i szczepów typu bakteryjnego (T) uzyskanych z bazy danych NCBI Reference Material z wykorzystaniem MEGA X (metoda MLE). | | | |

| | | | | |
|-------------------------------|---|--|---|---|
| | Przeprowadzenie niemetrycznej wielowymiarowej analizy skalowania (NMDS) - użyto metaMDS (pakiet vegan). | | | |
| | Określenie różnorodności alfa z wykorzystaniem platformy QIIME (wersja 1.9.1) i oprogramowania R (wersja 4.0.3). Istotność różnic w różnorodności alfa pomiędzy analizowanymi środowiskami wyznaczona została za pomocą testu Kruskala-Wallisa. | | | X |
| | Określenie różnorodności alfa z wykorzystaniem pakietu Phyloseq. Do wskazania statystycznie istotnych różnic między lokalizacjami zastosowano Test Wilcoxon. | | | |
| Oprogramowanie | | | | |
| STATISTICA 12 | Wykonanie porównań między wariantami. ANOVA została użyta w połączeniu z testem post-hoc Tukeya. | | | |
| R 4.2.1 (R Core Team, 2023) | Opracowanie wyników analiz metagenomowych. | | X | |
| Bruker OPUS 7.0 FTIR software | Interpretacja widm FTIR. | | | X |
| Sequencher 5.1 | Składanie odczytów z sekwencjonowania. | | | X |
| Python 2.7.15 | Wyznaczenie przewidywanych funkcji ekologicznych w oparciu o funkcję FunGuild. | | | X |
| Perl 5.26.2 | Wyznaczenie struktur taksonomicznych za pomocą funkcji SVG. | | | X |
| R 4.0.3 | Utworzenie diagramów Venna przy wsparciu funkcji VennDiagram. | | | X |

8. Wyniki

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej koncentrowały się na selekcji mikroorganizmów z różnych ekosystemów, które wykazywały potencjał biodegradacji wybranych polimerów (PE, PP, PVC, PLA, PC). Prace eksperymentalne zostały podzielone na dwa etapy. Pierwszy etap (**P1**) dotyczył analizy zmian powierzchni i struktury dwóch polimerów – PE i PP (stosowanych w postaci granulatu o średnicy 1350 - 1800 μm) w wyniku 12-tygodniowego oddziaływania z myko- i mikrobiomem bakteryjnym pochodzącym z materiału glebowego składowiska odpadów zlokalizowanego w Toruniu (Miejskie Przedsiębiorstwo Oczyszczania Sp. z o.o.). Przeprowadzony eksperyment pozwolił na izolację i identyfikację łącznie 27 szczepów mikroorganizmów, wśród których znajdowało się 14 szczepów bakteryjnych i 13 szczepów grzybów. Spośród nich, 14 zostało wyizolowanych z wariantów z PE, natomiast pozostałe 13 z wariantem z PP. Najczęściej identyfikowanymi szczepami bakteryjnymi były *Priestia megaterium* (ok. 43%) i *Serratia marcescens* (ok. 71%) odpowiednio w przypadku prób z PE i PP. *Enterobacter* spp. zostały zidentyfikowane w obu wariantach polimerowych. Wśród wariantów inkubowanych z mykobiomem najczęściej identyfikowano gatunki *Aspergillus* (ok. 67%) i *Fusarium* (ok. 57%), odpowiednio w przypadku wariantów PP i PE. Zmiany na powierzchni polimerów w wyniku aktywności mikroorganizmów obserwowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Obrazy potwierdziły silnie rozwinięty biofilm, liczne pofałdowania powierzchni, mikropęknięcia lub mikrourazy w przypadku obu polimerów (rys. 2, **P1**). Najlepiej rozwinięte struktury biofilmu bakteryjnego zaobserwowano na powierzchni granulek PP, natomiast biofilm grzybowy intensywniej powstawał na PE. Obecność mikroorganizmów tworzących biofilm potwierdzono nie tylko za pomocą SEM, ale także spektrofotometrycznie (dla wariantów inkubowanych z mikrobiomem bakteryjnym). W zależności od rodzaju polimeru, liczba bakterii tworzących biofilm była różna, co bezpośrednio wpływało na zmierzoną wartość absorbancji. Im krótszy czas inkubacji, tym mniejsze różnice w zmierzonych wartościach parametrów dla dwóch polimerów. Wraz z wydłużeniem procesu inkubacji, liczba mikroorganizmów tworzących biofilm na plastisferze polipropylenowej znacznie wzrosła. W przypadku biofilmu wytworzonego

na powierzchni PE również zaobserwowano wzrost wartości absorpcji, ale zmiana ta nie była tak znacząca. Zmiany strukturalne w postaci spadku intensywności pasm wskazujących na obecność wiązań C-H oraz pojawienie się nowych, tlenowych połączeń, które bezpośrednio wskazywałyby na procesy degradacyjne, oceniono w oparciu o widma uzyskane przy wykorzystaniu FTIR. Największe zmiany zaobserwowano na widmie uzyskanym dla próby PE inkubowanym mykobiomem. W tym przypadku, poza spadkiem intensywności niektórych pasm, powstały dodatkowe piki o liczbie falowej 1659 cm^{-1} i 1632 cm^{-1} , co może wskazywać na początek procesów oksydacyjnych w badanym polimerze (prawie 10-krotny wzrost wartości CI). W próbach PP odnotowano jedynie spadki intensywności pasm charakterystycznych – wyższe dla prób inkubowanych z bakteriami oraz niższe dla prób z mykobiomem.

W drugim etapie realizacji projektu poszerzono zakres badań, poprzez zwiększenie liczby analizowanych środowisk z jednego do trzech (materiał glebowy ze składowisk odpadów, osady ściekowe i woda rzeczna), zwiększono również liczbę rodzajów polimerów z dwóch do czterech (PP, PVC, PLA i PC), dodatkowo przeprowadzone zostały analizy metagenomowe prób pobranych z badanych środowisk. Wyznaczono także parametry fizykochemiczne badanych środowisk, co pozwoliło na zbadanie zależności pomiędzy tymi parametrami a strukturą mikrobiomu bakteryjnego (**P2**). Skorzystano w tym celu z niometrycznej analizy skalowania wielowymiarowego (NMDS). Ze względu na wysoką liczbę wszystkich OTU (6767), wygenerowany diagram okazał się mało czytelny. Zawężono więc liczbę OTU do 200 najbardziej licznych, co nie wpłynęło na rozmieszczenie punktów reprezentujących badane środowiska i wektorów zmiennych środowiskowych w przestrzeni. Analiza ta wykazała, że na strukturę mikrobiomu bakteryjnego materiału glebowego największy wpływ miała zawartość N-NO₃ i N-NO₂, natomiast mikrobiom osadów ściekowych kształtowany był przez wysoką zawartość całkowitego azotu i fosforu. Zawartość jonów amonowych częściowo wpływała na mikrobiom wodny. Na podstawie danych literaturowych dotyczących obecności mikroplastiku w ekosystemach (Sekudewicz i in., 2021; Pol i in., 2022; Ng i in., 2018) założono, że wybrane środowiska będą różnić się poziomem obecności takich zanieczyszczeń. Składowisko odpadów i osad ściekowy uznawane są za bardziej zanieczyszczone polimerami, niż woda rzeczna. Analizy metagenomowe prób wszystkich

badanych środowisk wykazały (na podstawie liczby obserwowanych OTU, indeksu Shannona-Wienera, bioróżnorodności alfa), że struktura i różnorodność mikrobiomu bakteryjnego wody różni się statystycznie istotnie od struktury i różnorodności mikrobiomu materiału glebowego. Wartości obserwowanych OTU były największe dla wody, osiągając wartość około 3000, podczas gdy w pozostałych środowiskach oscylowały w okolicy 2500. Wartości kolejnych dwóch nieparametrycznych estymatorów (Chao1 oraz ACE) były zbliżone do wartości obserwowanych OTU (co jest wynikiem zarówno odpowiednio głębokiego poziomu sekwencjonowania oraz wskazuje na wysoki poziom pokrycia). Poziom bioróżnorodności alfa był stosunkowo wysoki dla wszystkich środowisk (wskaźnik Shannona-Wienera od 3,72 do 5,54). Najwyższym poziomem charakteryzował się mikrobiom bakteryjny wody, który różnił się istotnie statystycznie od dwóch pozostałych, co potwierdziło postawioną hipotezę badawczą. Wartość omawianego wskaźnika dla mikrobiomu bakteryjnego materiału glebowego oraz osadu ściekowego była na zbliżonym poziomie. Diagram Venna wykazał, że trzy badane środowiska, pod względem wspólnych OTU, były bardzo odmienne (1340 wspólnych OTU z 6767 ogółem). Porównanie parami wykazało większe podobieństwo między strukturą mikrobiomu bakteryjnego wody i osadów ściekowych (2312 wspólnych OTU). Badane mikrobiomy charakteryzowały się wysoką liczbą unikalnych OTU, natomiast środowiskiem z największą ich ilością okazała się woda rzeczna (1732). Analiza ANOSIM wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy próbkami badanych środowisk, natomiast analiza wewnątrzgrupowa wykazała wysokie podobieństwo między podpróbami danego środowiska. Struktury poszczególnych mikrobiomów bakteryjnych analizowano na kilku poziomach. Stwierdzono, że 14 najliczniejszych taksonów na poziomie rodzaju stanowiło ponad 99% całkowitej struktury mikrobiomu bakteryjnego. W przypadku gleby najliczniejsze okazały się Actinobacterie, podczas gdy w osadach ściekowych i wodzie dominowały Proteobacterie. Dodatkowo, podobnie jak w przypadku poprzednich badań (**P1**), wyselekcjonowano i zidentyfikowano bakterie degradowujące badane polimery (tym razem użyte w postaci drobno zmielonych granulek o wielkości 20 - 800 μm). Inkubacja materiałów polimerowych z badanym mikrobiomem środowiskowym przez okres pięciu tygodni pozwoliła na wyizolowanie i identyfikację 37 szczepów bakteryjnych. Najwięcej izolatów uzyskano z polimerów inokulowanych materiałem glebowym, natomiast najmniej

w przypadku tworzyw inkubowanych z wodą rzeczną. Wykazano również, że zdecydowana większość zidentyfikowanych bakterii należy do Proteobacteria, co jest zgodne z wynikami dostępnymi w literaturze naukowej. Znaleziono również uniwersalne bakterie wyizolowane z różnych środowisk, które zdolne są do degradacji różnych polimerów (np. PP, PLA, PC, PS, PE), takie jak *Pseudomonas aeruginosa* (Amobonye i in., 2021; Castro-Aguirre i in., 2018; Mouafo Tamnou i in., 2021; Wang i in., 2022). Wśród prób wzbogaconych PP najczęściej izolowanymi szczepami były *Stenotrophomonas acidaminiphila* i *Klebsiella aerogenes*. W przypadku PVC i PLA dominującymi gatunkami były *P. aeruginosa* i *Chryseobacterium candidae*. Z kolei w próbach PC najczęściej obserwowano bakterie takie jak *Microbacterium oxydans* i *C. candidae*. Na tym etapie, podobnie jak poprzednio (P1), do potwierdzenia zmian strukturalnych badanych polimerów wykorzystano FTIR. Na podstawie uzyskanych widm obliczono wartości indeksu karbonylowego (CI). Analiza FTIR PP nie wykazała zmian istotnych statystycznie w jego strukturze, natomiast w przypadku PVC zidentyfikowano dodatkowy pik o liczbie falowej około 1720 cm^{-1} dla wariantu inokulowanego materiałem glebowym. W przypadku PLA i PC zanotowano znaczne zmniejszenie intensywności dla charakterystycznych pasm (obszary grup karbonylowych), co znalazło również odzwierciedlenie w wartościach CI. Największe spadki wartości CI dla PLA oraz PC odnotowano w próbach inokulowanych osadem ściekowym, najmniejsze w próbach inokulowanych wodą z Wisły. Omawiane zmiany potwierdzają początkowe etapy procesów degradacji polimerów przez mikrobiom środowiskowy.

8.1 Wyniki niepublikowane

8.1.1 Struktura i różnorodność mykobiomów badanych środowisk

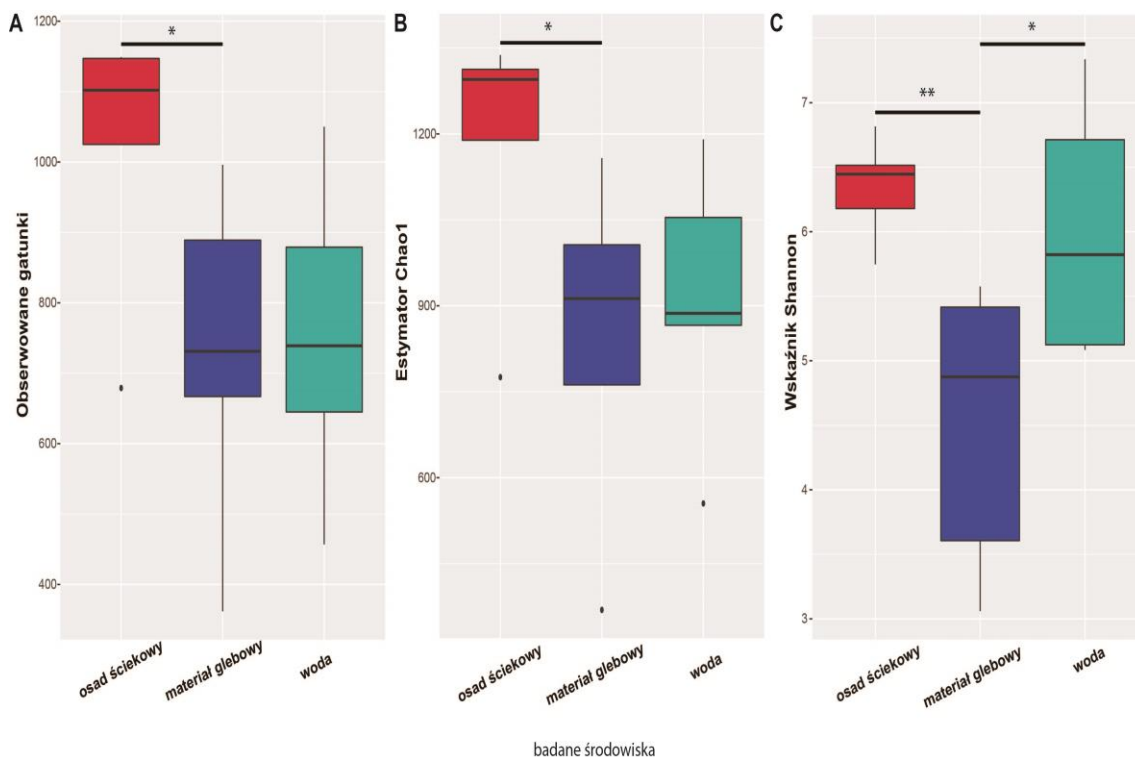
Parametry alfa różnorodności prób pochodzących z trzech badanych środowisk: osad ściekowy (SG), materiał glebowy pochodzący ze składowiska odpadów (SL) i woda rzeczna z Wisły (WR) uwzględniające bogactwo gatunkowe Sobs, wskaźnik różnorodności Shannona-Wienera i nieparametryczny estymator bogactwa gatunkowego Chao1 zostały zaprezentowane w Tabeli 2. Liczba zaobserwowanych OTU mieściła się w następujących przedziałach: 679-1149, 362-996, 457-1050 odpowiednio dla osadu ściekowego, materiału glebowego i wody rzecznej. Wartości estymatora Chao1 są nieznacznie wyższe od wartości Sobs co wskazuje na nieznaczne niedoszacowanie obecności gatunków rzadkich

w badanych próbach (Tabela 2). We wszystkich badanych podpróbach odnotowano wysokie bogactwo gatunkowe, jak i równomierność ich rozkładu o czym świadczy wartość wskaźnika różnorodności Shannona-Wienera > 5 (wyjątek stanowiły trzy podpróby materiału glebowego: SL2, SL3 i SL5) (Tabela 2).

Tabela 2. Alfa różnorodność (oznaczona na podstawie wskaźników Sobs i Shannona-Wienera oraz estymatora Chao1) prób pobranych z trzech badanych środowisk (osad ściekowy pobrany z oczyszczalni ścieków - SG, materiał glebowy pochodzący z wysypiska śmieci SL, woda rzeczna pobrana z Wisły - WR).

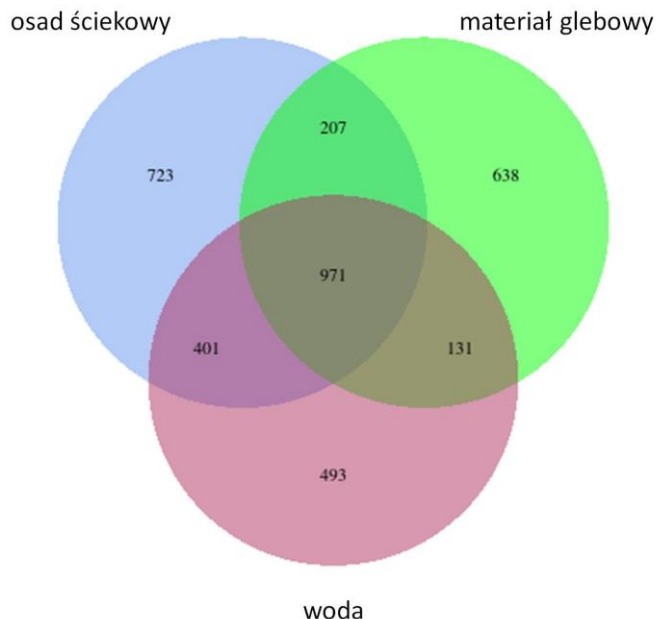
| Próba | Podpróby | Bogactwo gatunkowe Sobs | Nieparametryczny estymator bogactwa gatunkowego Chao1 | Wskaźnik różnorodności Shannona -Wienera |
|------------------|----------|-------------------------|---|--|
| osad ściekowy | SG1 | 679 | 775,46 | 5,747 |
| | SG2 | 1025 | 1189,02 | 6,514 |
| | SG3 | 1147 | 1337,52 | 6,816 |
| | SG4 | 1102 | 1294,98 | 6,180 |
| | SG5 | 1149 | 1312,66 | 6,446 |
| materiał glebowy | SL1 | 996 | 1157,56 | 5,575 |
| | SL2 | 731 | 762,13 | 4,875 |
| | SL3 | 362 | 369,37 | 3,060 |
| | SL4 | 889 | 1006,35 | 5,415 |
| | SL5 | 667 | 912,56 | 3,606 |
| woda rzeczna | WR1 | 457 | 555,11 | 5,084 |
| | WR2 | 645 | 866,09 | 5,124 |
| | WR3 | 879 | 1054,21 | 6,713 |
| | WR4 | 739 | 886,79 | 5,822 |
| | WR5 | 1050 | 1190,23 | 7,336 |

Analiza statystyczna alfa-różnorodności badanych środowisk wykazała istotne różnice pod względem obserwowanych OTU między mykobiomem osadu ściekowego a mykobiomem materiału glebowego. W tym pierwszym średnia wartość wskaźnika wynosiła 1020 (rys. 4A). W pozostałych przypadkach średnie wartości wyniosły 729 i 754 obserwowanych OTU odpowiednio dla materiału glebowego i wody rzecznej. Wartości estymatora Chao1 potwierdziły powyżej odnotowane różnice statystyczne między badanymi środowiskami, dodatkowo wartości te były zbliżone do wartości obserwowanych OTU co sugeruje wysokie pokrycie i odpowiednio głęboki poziom sekwencjonowania (rys.4B). Najniższą różnorodność zaobserwowano w materiale glebowym, zaś woda i osad ściekowy charakteryzowały się istotnie wyższymi wartościami estymatora (rys. 4C).



Rysunek 4. Porównanie różnorodności alfa w próbach pobranych z trzech środowisk (osad ściekowy pochodzący z oczyszczalni ścieków, materiał glebowy pobrany ze składowiska odpadów, woda rzeczna z Wisły). Bogactwo mikroorganizmów oszacowane zostało w oparciu o liczbę obserwowanych gatunków i wartość nieparametrycznego wskaźnika Chao1. Wskaźnik Shannona-Wienera wykorzystano do oceny różnorodności. Istotne różnice między wariantami obliczono za pomocą testu Kruskala-Wallisa i oznaczono gwiazdkami (wartości graniczne p były następujące: 0,05 *, 0,01 **). Przedstawiono wartości minimalne, maksymalne, mediany i przedziały międzykwartylowe.

W oparciu o diagram Venna (rys. 5) wykazano, że trzy badane środowiska nie były do siebie wysoce podobne, biorąc pod uwagę liczbę wspólnych OTU. Spośród 3564 zidentyfikowanych OTU, 971 było wspólnych dla prób materiału glebowego, osadów ściekowych i wody. Zestawianie badanych środowisk parami, wykazało wyższy stopień podobieństwa pomiędzy próbkami osadu ściekowego oraz wody (401 wspólnych OTU). Prawie dwukrotnie niższe podobieństwo zostało wykazane w przypadku próbek osadu ściekowego oraz materiału glebowego (207). Najniższy poziom podobieństwa został przypisany próbom wody i materiału glebowego (131 wspólnych OTU). Warto dodać, że każdy analizowany mykrobiom posiadał względnie wysoką liczbę unikalnych OTU, charakterystycznych dla danego środowiska (w osadzie ściekowym zidentyfikowano najwięcej unikalnych OTU – 723, w porównaniu do materiału glebowego i wody).



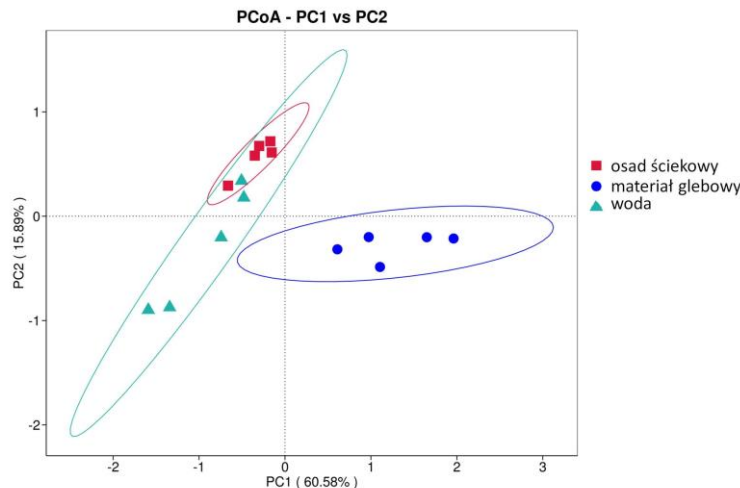
Rysunek 5. Diagram Venna przedstawiający wspólne i unikalne OTU dla trzech badanych środowisk (osad ściekowy, materiał glebowy pobrany ze składowiska odpadów, woda z Wisły).

Analiza ANOSIM wykazała statystycznie istotne różnice pomiędzy mykobiomami wszystkich analizowanych środowisk (tab. 3).

Tabela 3. Wyniki nieparametrycznego testu statystycznego ANOSIM. Dodatnia wartość R oznacza, że zmienność międzygrupowa jest uważana za znaczącą, podczas gdy ujemna wartość R sugeruje, że zmienność wewnątrzgrupowa jest większa niż zmienność międzygrupowa, a zatem nie ma znaczących różnic. Stopień ufności jest reprezentowany przez wartość P, której wartość mniejsza niż 0,05 sugeruje istotność statystyczną.

| Badana grupa | Wartość R | Poziom ufności |
|----------------------------------|-----------|----------------|
| osad ściekowy - materiał glebowy | 1,000 | 0,010 |
| osad ściekowy - woda | 0,516 | 0,013 |
| materiał glebowy - woda | 0,936 | 0,005 |

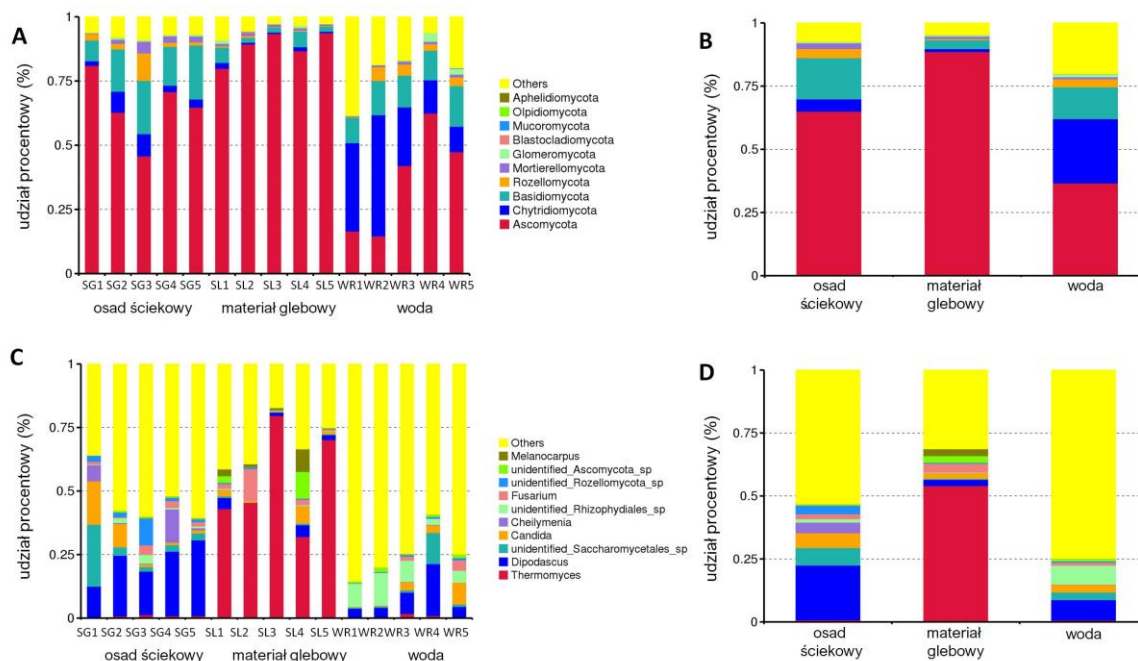
Porównując badane środowiska pod względem obserwowanych OTU, w oparciu o analizę głównych współrzędnych zaobserwowano, że struktura mykobiomu materiału glebowego była inna od pozostałych, natomiast struktury mykobiomów osadu ściekowego i wody z Wisły były do siebie bardziej podobne. Warto zaznaczyć, że podpróby wody charakteryzowały się wyraźnie większą wariancją (rys. 6).



Rysunek 6. Analiza głównych współrzędnych wykonana z zastosowaniem ważonej macierzy odległości UniFrac (Uniqueness Fraction). Wartości procentowe, umieszczone w opisach osi przedstawiają znaczną część zmienności (76,47%) wyjaśnionej przez główne osie – PC1 i PC2. Elipsy reprezentują 95% przedział ufności wokół środka grupy, wskazując zakres zmienności prób w danym środowisku.

Struktura mykobiomów badanych środowisk została przeanalizowana na dwóch poziomach taksonomicznych: gromady (rys. 7A i 7B) i rodzaju (rys. 7C i 7D). Na wykresach poniżej przedstawionych zostało 10 najbardziej licznych taksonów na dwóch omawianych poziomach. Grzyby należące do gromady Ascomycota dominowały w strukturach badanych mykobiomów materiału glebowego (88%), osadu ściekowego (65,0%) i wody (36,6%). Wśród bardzo często obserwowanych grzybów w mykobioomie osadu ściekowego i wody znalazły się również mikroorganizmy reprezentujące gromady Chytridiomycota (stanowiąc odpowiednio: 4,9% i 25,5%) oraz Basidiomycota (16,3% i 12,6%). Dystrybucja grzybów reprezentujących najbardziej liczne gromady obok Ascomycota w mykobioomie materiału glebowego była bardzo równomierna i tylko wyraźnie wyższy udział odnotowano dla przedstawicieli Basidiomycota (3,6%) (rys. 7B). Warto zaznaczyć, że w przypadku materiału glebowego i osadu ściekowego 10 najbardziej licznych taksonów reprezentowało ponad 92% struktury całego mykobiomu (odpowiednio 92,6% oraz 95,2%), podczas gdy dla wody stanowiły one blisko 79,9%. Na drugim badanym poziomie taksonomicznym 10 najliczniejszych taksonów stanowiło mniejszą część struktury badanych środowisk (rys. 7C i D). W przypadku prób materiału glebowego wyodrębnione rodzaje stanowiły blisko 69%, natomiast w przypadku prób osadu ściekowego było to niespełna 47%. Najslabiej reprezentowane było środowisko wody, gdzie 10 najbardziej licznych rodzajów grzybów stanowiło zaledwie nieco ponad 25%.

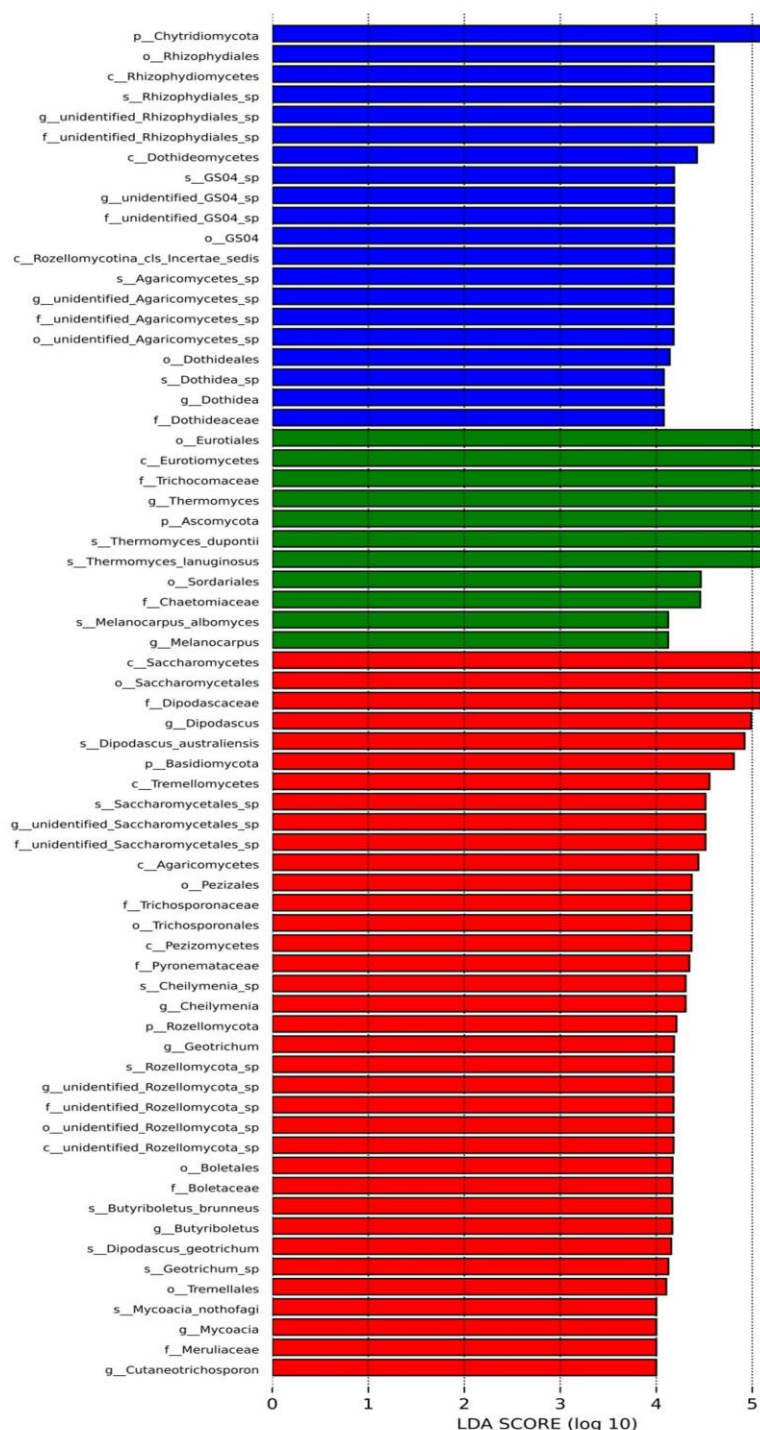
Do gatunków, których udział w środowisku wodnym i osadzie ściekowym był największy zaliczono *Dipodascus*, odpowiednio 8,1% i 21,7%. W przypadku Wisły podobny udział w strukturze mykobiomu miały niezidentyfikowane grzyby z rodzaju *Rhizophydiales*. Materiał glebowy natomiast zdominowany był przez grzyby z rodzaju *Thermomyces*, które stanowiły blisko połowę struktury tego mykobiomu (54,1%).



Rysunek 7. Struktura taksonomiczna mykobiomów analizowanych środowisk: osad ściekowy (SG1-SG5), materiał glebowy z wysypiska śmieci (SL1-SL5) i woda rzeczna z Wisły (WR1-WR5). Panele A i C przedstawiają względną liczebność taksonów w poszczególnych podpróbach (n = 5) na poziomie gromady (A) i rodzaju (C). Panele B i D przedstawiają średnie względną liczebność taksonów w środowiskach.

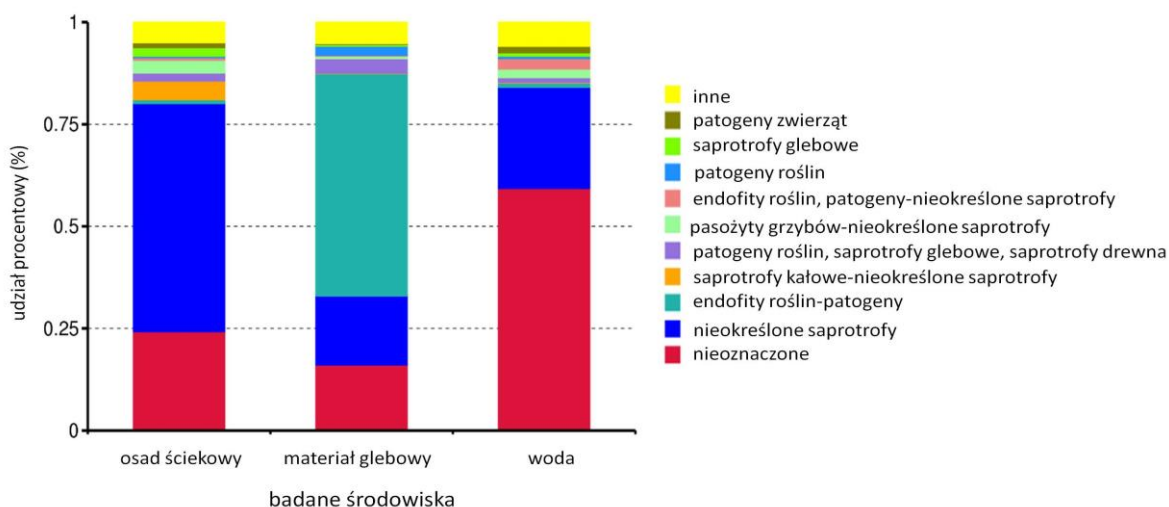
Analiza LEfSe, przy zastosowaniu progu filtrowania LDA (\log_{10}) > 4 pozwoliła na identyfikację 67 markerów OTU, które wykazywały największą zróżnicowaną liczebność w analizowanych środowiskach. Rodzaje specyficzne dla gleby obejmowały *Thermomyces* i *Melanocarpus*, natomiast grzyby z rodzaju *Mycoacia*, *Butyriboletus*, niesklasyfikowane *Rozellomycota*, *Geotrichum*, *Cheilymenia*, niesklasyfikowane *Saccharomycetales* czy *Dipodascus* były najbardziej charakterystyczne dla osadu ściekowego. Mykobiom wodny charakteryzował się obecnością niesklasyfikowanych *Rhizophydiales*, niesklasyfikowanych *Agaricomycetes*, niesklasyfikowanych *GS04* i *Dothidea* (rys. 8).

■ osad ściekowy ■ materiał glebowy ■ woda



Rysunek 8. Istotnie statystycznie biomarkery taksonomiczne specyficzne dla każdego badanego środowiska (osad ściekowy, materiał glebowy, woda rzeczna) i zidentyfikowane metodą LfSe (Linear Discriminant Analysis Effect Size) wykorzystującą analizę dyskryminacyjną (LDA). (Histogram pokazuje rodzaje grzybów najbardziej różnicujące badane środowiska. Pokazano taksony z wynikami LDA równymi i większymi niż 4.

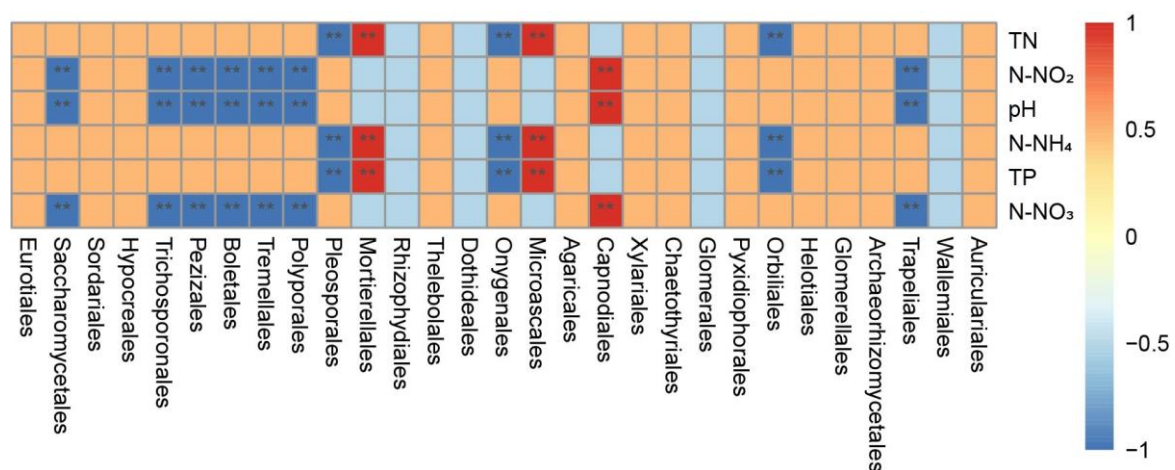
Wykorzystując bazę FunGuild, do taksonów grzybowych na poziomie rodzaju przypisano funkcje ekologiczne. W ten sposób wykonano profilowanie funkcjonalne mykobiomów badanych środowisk (rys. 9). Analiza funkcjonalna ujawniła częste występowanie saprotrofów kałowych, pasożytów grzybów oraz saprotrofów glebowych w osadzie ściekowym. W materiale glebowym, blisko 70% struktury mykobiomu zostało scharakteryzowane funkcjonalnie. Zdecydowana większość grzybów ($\approx 50\%$) zasiedlających to środowisko to endofity roślin będące ich patogenami. Dodatkowo często występowały tam patogeny roślin, patogeny glebowe i saprotrofy charakterystyczne dla gleby oraz drewna. W mykobiomie wody pobranej z Wisły często identyfikowane były patogeniczne endofity roślin, pasożyty grzybów, patogeny zwierząt oraz sprotrofy glebowe i drewna, niemniej jednak aż blisko 60% struktury mykobiomu nie zostało opisane funkcjonalnie (rys. 9).



Rysunek 9. Analiza funkcjonalna mykobiomów badanych środowisk (osad ściekowy, materiał glebowy ze składowiska odpadów oraz woda z Wisły) wykonana w oparciu o bazę FUNGuild. Profilowanie funkcjonalne obrazuje względny udział taksonów reprezentujących określone funkcje ekologiczne.

Zbadano korelację pomiędzy parametrami fizykochemicznymi badanych środowisk a występowaniem w mykobiomach grzybów reprezentujących określone rzędy. Wyniki zobrazowano na mapie ciepła (rys. 10). Wykazano ujemną korelację pomiędzy parametrami takimi jak stężenie $N-NO_2$ i $N-NO_3$ oraz pH a występowaniem grzybów należących do rzędów: *Saccharomycetales*, *Trichosporonales*, *Pezizales*, *Boletales*, *Tremellales*, *Polyborales*, *Trapeliales* i *Rozellomycota*. Pozytywną korelację z tymi

samymi parametrami wykazano dla *Capnodiales*. Dodatkowo odnotowano ujemną korelację pomiędzy obecnością grzybów zaliczanych do następujących rzędów: *Pleosporales*, *Onygenales* i *Orbitales* a TN, N-NH₄ i TP. Parametry te były pozytywnie skorelowane z występowaniem przedstawicieli rzędów *Mortierellales* i *Microascales* (fig. 10).



Rysunek 10. Mapa ciepła oparta na współczynniku korelacji Spearmana, przedstawiająca zależności między parametrami fizykochemicznymi a wybranymi rzędami grzybów charakterystycznymi dla trzech badanych środowisk.

8.1.2 Identyfikacja hodowlanych szczepów grzybów z mykobiomów badanych środowisk

Inkubacja materiału polimerowego w postaci drobno zmielonej z mykobiomami środowiskowymi przez okres 15 tygodni pozwoliła na izolację i identyfikację 30 szczepów grzybów (tabela 4).

Tabela 4. Identyfikacja szczepów grzybów wyizolowanych z mykobiomów materiału glebowego składowika odpadów, osadu ściekowego oraz wody rzecznej po 15-tygodniowym etapie inkubacji z wybranymi polimerami (PP, PVC, PLA, PC).

| Materiał badawczy | Polimer | Nazwa | Szczep | Liczba par zasad (pz) | Blast NCBI | Stożek pokrycia [%] |
|-------------------|---------|-----------|---------------------------------|-----------------------|--|---------------------|
| Materiał glebowy | PP | PP-SL-18 | <i>Galactomyces candidum</i> | 794 | <i>Galactomyces candidum</i> [JN974289] | 99,03 |
| | | PP-SL-9 | <i>Microdochium bolleyi</i> | 573 | <i>Microdochium bolleyi</i> [GU566298] | 100,00 |
| | PVC | PVC-SL-2 | <i>Cadophora luteo-olivacea</i> | 664 | <i>Cadophora luteo-olivacea</i> [HM116748] | 99,69 |
| | | PVC-SL-5 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 646 | <i>Fusarium oxysporum</i> [GU566205] | 99,82 |
| | | PVC-SL-7 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 781 | <i>Fusarium oxysporum</i> [GU566205] | 99,36 |
| | | PVC-SL-17 | <i>Fusarium</i> sp. CBS 119214 | 592 | <i>Fusarium</i> sp. CBS 119214 [EU552132] | 100,00 |
| | | PVC-SL-6 | <i>Galactomyces candidum</i> | 910 | <i>Galactomyces candidum</i> [JN974289] | 98,06 |
| | | PVC-SL-20 | <i>Penicillium</i> sp. F6 | 616 | <i>Penicillium</i> sp. F6 [GU566250] | 99,84 |
| | PLA | PLA-SL-24 | <i>Cadophora luteo-olivacea</i> | 675 | <i>Cadophora luteo-olivacea</i> [HM116748] | 99,40 |
| | | PLA-SL-29 | <i>Clonostachys rosea</i> | 598 | <i>Clonostachys rosea</i> [GU566253] | 100,00 |
| | | PLA-SL-8 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 570 | <i>Fusarium oxysporum</i> [GU566205] | 99,84 |
| | | PLA-SL-23 | <i>Galactomyces</i> sp. BPY-54 | 869 | <i>Galactomyces</i> sp. BPY-54 [DQ286062] | 99,27 |
| | | PLA-SL-3 | <i>Neosetophoma samarorum</i> | 611 | <i>Neosetophoma samarorum</i> [FJ427062] | 98,51 |

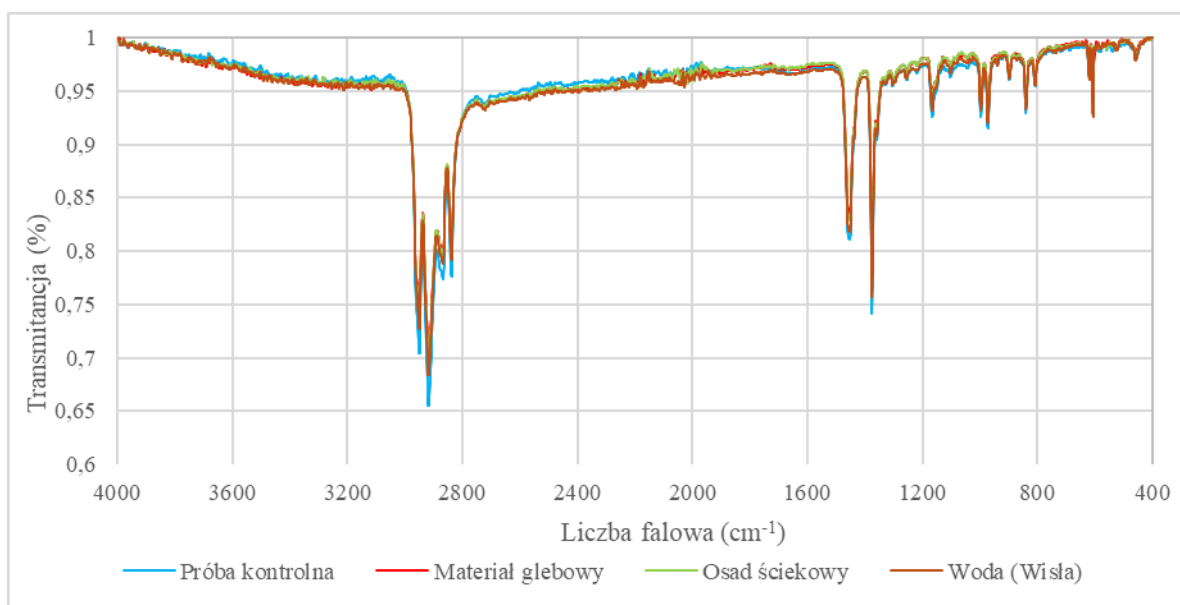
| | | | | | | |
|---------------|--------------|-------------|--------------------------------|------------------------------|---|---|
| | | PLA-SL-15 | <i>Trichoderma harzianum</i> | 652 | <i>Trichoderma harzianum</i> [GU566243] | 99,69 |
| | PC | PC-SL-13 | <i>Fusarium culmorum</i> | 576 | <i>Fusarium culmorum</i> [GU566271] | 99,82 |
| | | PC-SL-1 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 662 | <i>Fusarium oxysporum</i> [GU566205] | 99,65 |
| | | PC-SL-14 | <i>Microdochium bolleyi</i> | 674 | <i>Microdochium bolleyi</i> [AM502261] | 98,28 |
| | | PC-SL-10 | <i>Penicillium citrinum</i> | 614 | <i>Penicillium citrinum</i> [DQ681331] | 99,84 |
| | | PP | PP-SG-11 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 756 | <i>Fusarium oxysporum</i> [GU445369] |
| Osad ściekowy | PVC | PVC-SG-27 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 575 | <i>Fusarium oxysporum</i> [GU566205] | 99,48 |
| | | PVC - SG-19 | <i>Fusarium</i> sp. CBS 119214 | 592 | <i>Fusarium</i> sp. CBS 119214 [EU552132] | 100,00 |
| | PLA | PLA-SG-21 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 675 | <i>Fusarium oxysporum</i> [GU566205] | 99,32 |
| | | PLA-SG-28 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 648 | <i>Fusarium oxysporum</i> [GU566205] | 98,97 |
| | | PLA-SL-12 | <i>Fusarium</i> sp. 14018 | 575 | <i>Fusarium</i> sp. 14018 [EU750682] | 99,13 |
| | | PLA-SG-16 | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 707 | <i>Penicillium chrysogenum</i> [HQ026745] | 99,52 |
| | PC | PC-SG-25 | <i>Penicillium</i> sp. F6 | 732 | <i>Penicillium</i> sp. F6 [GU566250] | 100,00 |
| | Woda rzeczna | PP | PP-WR-26 | <i>Galactomyces candidum</i> | 796 | <i>Galactomyces candidum</i> [JN974289] |
| PVC | | PLA-WR-22 | <i>Fusarium culmorum</i> | 656 | <i>Fusarium culmorum</i> [GU566271] | 99,32 |
| PLA | | PLA-WR-31 | <i>Neosetophoma samarorum</i> | 634 | <i>Neosetophoma samarorum</i> [FJ427062] | 98,14 |
| PC | | PC- WR-32 | <i>Neosetophoma samarorum</i> | 633 | <i>Neosetophoma samarorum</i> [FJ427062] | 98,87 |

Środowiskiem, które dostarczyło najwięcej szczepów (~ 63%) z potencjałem do degradacji polimerów okazał się materiał glebowy pozyskany ze składowiska odpadów. Najmniej szczepów zdolnych do degradacji badanych polimerów wyizolowano z wody

rzecznej (~ 13%). PLA i PVC to tworzywa, które pozwoliły na pozyskanie największej liczby izolatów – odpowiednio 11 (~ 37%) i 9 (30%). Z drugiej strony, niekorzystnym źródłem energii dla grzybów okazał się PP (~13%). 15-tygodniowy okres inkubacji poskutkowało identyfikacją 4 szczepów grzybów zasiedlających ten polimer. Na 30 zidentyfikowanych szczepów grzybów składa się 8 taksonów na poziomie rodzaju. Do najliczniejszej grupy należały grzyby z rodzaju *Fusarium* spp., które stanowią 43% wszystkich izolatów. Zidentyfikowano czterech przedstawicieli z rodzaju *Penicillium* spp. (~13%), oraz stwierdzono obecność po trzy przypadki grzybów z rodzaju *Galactomyces* spp. i *Neosetophoma* spp. (po 10%). Najmniej liczne (po jednym szczepie) okazały się grzyby z rodzaju *Trichoderma* sp. oraz *Clonostachys* sp. (tabela 4).

8.1.3 Ocena wpływu mykobiomu na strukturę polimerów z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera

Analiza widm została oparta głównie na występowaniu pasm odpowiadających grupie karbonylowej (jej pojawieniu się lub zanikowi). Dodatkowo na podstawie widm stwierdzono, że zakres daktyloskopowy (ang. *fingerprint region*) dla poszczególnych polimerów nie uległ zmianie.

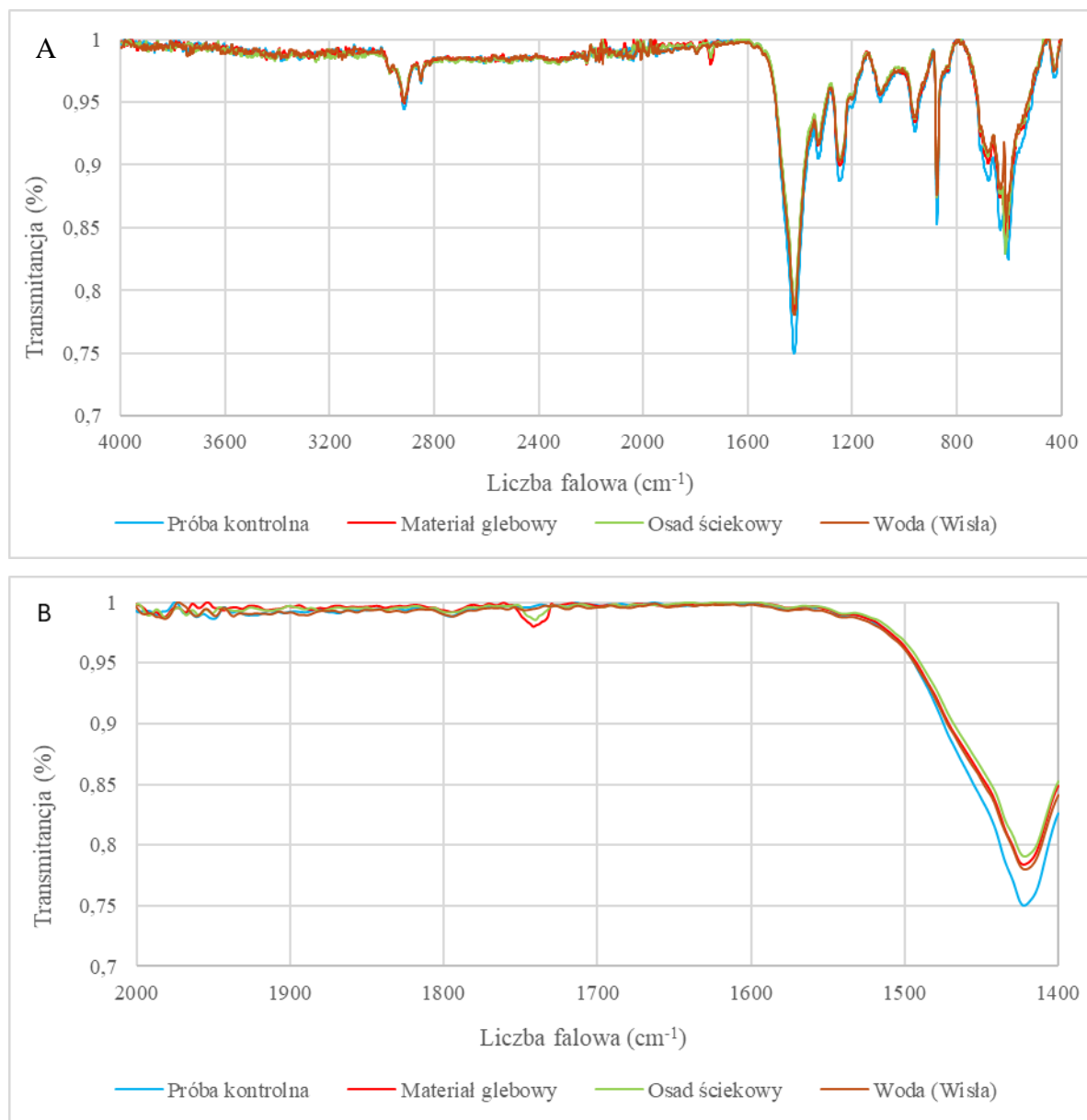


Rysunek 11. Reprezentatywne widma IR dla polipropylenu (PP), niepoddanego działaniu mykobiomu środowiskowego (kontrola, niebieska linia) i po 15 tygodniach inkubacji z mykobiomami z materiału glebowego składowiska odpadów (czerwona linia), osadów ściekowych (SG, zielona linia) i wody rzecznej (WR, brązowa linia).

W przypadku polipropylenu (rys. 11) nie zaobserwowano pojawienia się w żadnym z wariantów inkubacji dodatkowego pasma, które mogłoby wskazywać na procesy rozpadu tego polimeru. Oznacza to, że nie nastąpiły istotne zmiany w strukturze chemicznej PP, które byłyby związane z jego degradacją w obecności mikroorganizmów.

Dla wnikliwszej interpretacji otrzymanych widm, szczególną uwagę zwrócono na zakres wzdłuż pasma od 1400 cm⁻¹ do 2000 cm⁻¹, gdzie tych zmian obserwuje się najwięcej. W tym zakresie odnotowano niewielkie, ale zauważalne zmiany, sugerujące pewne interakcje między polimerem a mikroorganizmami. Zmiany te mogą obejmować nieznaczne modyfikacje w strukturze chemicznej, takie jak utlenianie czy niewielkie przesunięcia w lokalizacji pasm charakterystycznych dla grup metylowych lub etylowych.

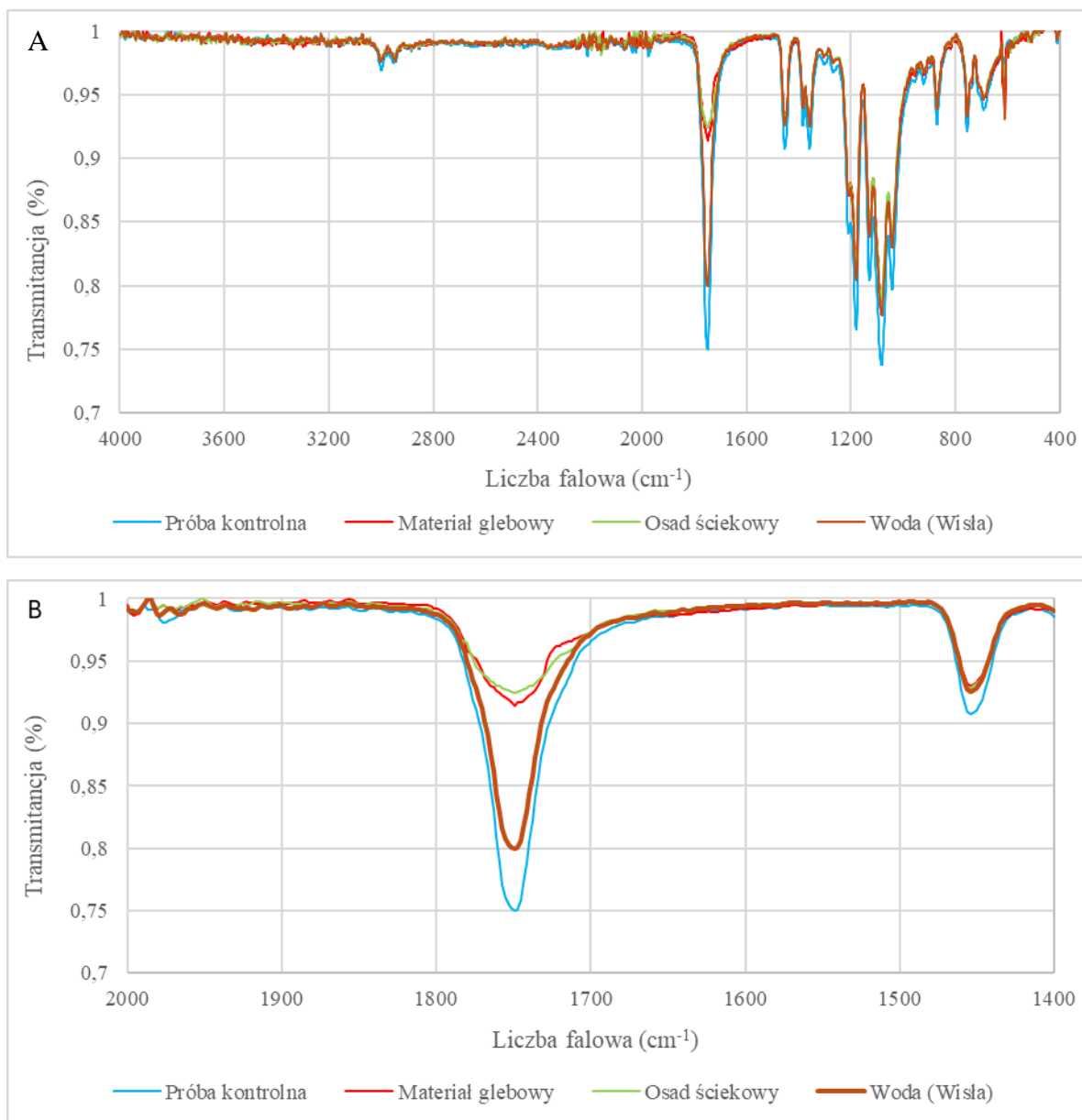
Brak wyraźnych nowych pasm sugeruje, że proces biodegradacji polipropylenu zachodzi w sposób ograniczony lub nieznaczny w analizowanych warunkach eksperymentalnych.



Rysunek 12. Reprezentatywne widma IR dla polichlorku winylu (PVC), niepoddanego działaniu mykobiomu środowiskowego (kontrola, niebieska linia) i po 15 tygodniach inkubacji z mykobiomami z materiału glebowego składowiska odpadów (czerwona linia), osadów ściekowych (SG, zielona linia) i wody rzecznej (WR, brązowa linia). Rysunek A przedstawia pełny zakres widma 4000-400 cm^{-1} , natomiast B obrazuje obszary najbardziej zróżnicowane względem próby kontrolnej.

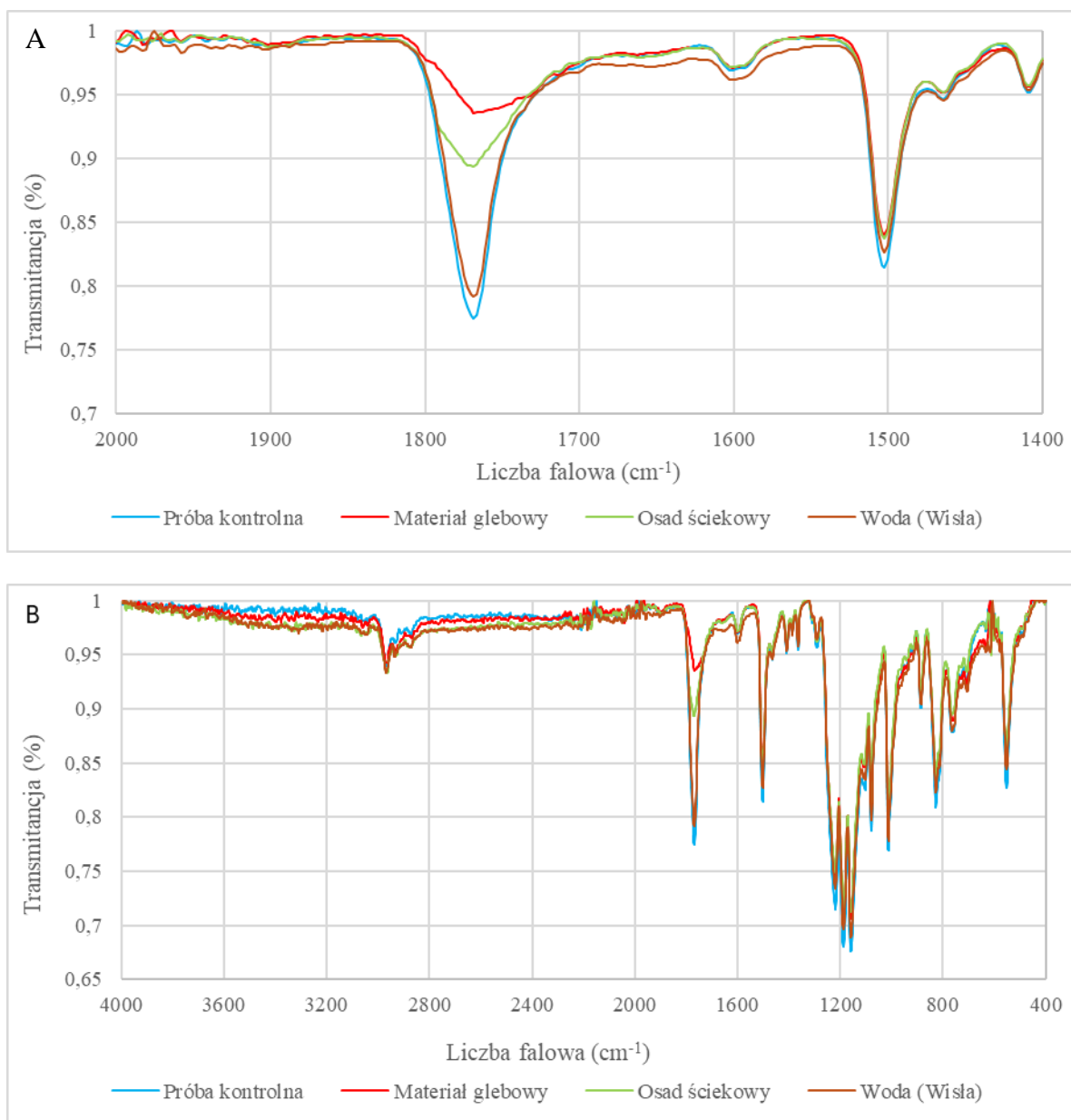
Dla wariantów PVC inkubowanych z materiałem glebowym oraz osadem ściekowym (rys. 12) zaobserwowano pojawienie się pasm w zakresie około 1740 cm^{-1} . Pasma w tym obszarze widma FTIR jest charakterystyczne dla grupy karbonylowej (C=O), która często pojawia się w wyniku utleniania lub innych procesów chemicznych

prowadzących do degradacji polimerów. Zmiany te mogą być związane z aktywnością mikroorganizmów, które w wyniku metabolizmu wytwarzają enzymy zdolne do rozkładu tworzyw sztucznych, co prowadzi do zmian w intensywności pików odpowiadającym grupie karbonylowej.



Rysunek 13. Wybrane widma IR dla polilaktydu (PLA) niepoddanego działaniu mykobiotu środowiskowego (kontrola, niebieska linia) i po 15 tygodniach inkubacji z mykobiotami z materiału glebowego składowiska odpadów (czerwona linia), osadów ściekowych (SG, zielona linia) i wody rzecznej (WR, brązowa linia). A – widmo w pełnym zakresie 4000-400 cm⁻¹. B – obrazuje obszary najbardziej różnicowane względem próby kontrolnej.

Analizując widma uzyskane dla PLA (rys. 13) największe zmiany w postaci zaniku pasma odpowiadającego drganiom rozciągającym C=O zaobserwowano dla wariantów inkubowanych z osadem ściekowym oraz z materiałem glebowym.



Rysunek 14. Wybrane widma IR dla poliwęglanu (PC), niepoddanego działaniu mykobiumu środowiskowego (kontrola, niebieska linia) i po 15 tygodniach inkubacji z mykobiumami z materiału glebowego składowiska odpadów (czerwona linia), osadów ściekowych (SG, zielona linia) i wody rzecznej (WR, brązowa linia). Rysunek A przedstawia widmo w pełnym zakresie 4000-400 cm⁻¹, rysunek B natomiast obrazuje obszary najbardziej zróżnicowane względem próby kontrolnej.

Pasma w obszarze badanego połączenia z tlenem uległy wypłaszczeniu (spadek w obu przypadkach o blisko 70%). Największe zmiany w postaci zaniku pasma

odpowiadającego drganiom rozciągającym C=O zaobserwowano dla wariantu inkubowanego z materiałem glebowym (rys. 14). Spadek intensywności tego pasma wyniósł prawie 74%. Najmniejsze zmiany zostały wywołane mykobiomem wody rzecznej.

Dodatkowo w oparciu o widma IR dla wariantów polimerów inkubowanych mykobiomem środowiskowym oszacowano, która grupa mikroorganizmów wywiera większy wpływ na strukturę polimerów. Uzyskane widma dla PP, PVC, PLA oraz PC analizowano pod kątem zmian w intensywności wybranego, charakterystycznego pasma, którego wzrost lub spadek może świadczyć o procesie biodegradacji (dla PP wybrano pasmo przy liczbie falowej około 1701 cm^{-1} , dla PVC wybrano pasmo przy liczbie falowej około 1720 cm^{-1} , dla PLA badano pasmo liczbie falowej około 1749 cm^{-1} , natomiast dla PC przeanalizowano pasmo o liczbie falowej około 1769 cm^{-1} ; pasma wybrano w oparciu o literaturę oraz wyniki własne zawarte w **P1** i **P2**). Uzyskane wartości są wartościami liczonymi względem średniej wartości intensywności pasma dla prób kontrolnych każdego wariantu środowiskowego oraz polimerowego (tabela 5).

Tabela 5. Procentowe wartości zmian intensywności wybranych pasm badanych polimerów.

| Materiał biologiczny | Polimer | Wartość zmiany względem próby kontrolnej $X_{\text{sr}} \pm \text{SD}$ [%] | |
|----------------------|---------|--|------------------|
| | | Bakterie | Grzyby |
| Materiał glebowy | PP | $0,24 \pm 0,02$ | $0,58 \pm 0,04$ |
| | PVC | $4,31 \pm 0,07$ | $1,70 \pm 0,52$ |
| | PLA | $30,20 \pm 0,80$ | $21,96 \pm 1,06$ |
| | PC | $16,63 \pm 1,81$ | $18,50 \pm 1,32$ |
| Osad ściekowy | PP | $0,05 \pm 0,02$ | $0,33 \pm 0,03$ |
| | PVC | $0,18 \pm 0,04$ | $1,10 \pm 0,09$ |
| | PLA | $33,95 \pm 1,39$ | $23,28 \pm 2,96$ |
| | PC | $18,39 \pm 0,36$ | $13,15 \pm 1,27$ |
| Woda rzeczna | PP | $0,76 \pm 0,19$ | $0,27 \pm 0,03$ |
| | PVC | $0,17 \pm 0,02$ | $0,20 \pm 0,08$ |
| | PLA | $22,08 \pm 3,55$ | $6,62 \pm 0,12$ |
| | PC | $15,55 \pm 2,57$ | $0,28 \pm 0,01$ |

Zaobserwowano, że największe zmiany intensywności badanych pasm PLA wywołały bakterie (niezależnie od badanego środowiska). Zmiany struktury

PP spowodowane badanym mikrobiomem nie były istotne statystycznie. Największy wpływ na strukturę PVC wywarł mikrobiom bakteryjny materiału glebowego, zaś PC był najefektywniej degradowany przez bakterie zasiedlające osad ściekowy i wodę z Wisły. Wśród analizowanych mykobiomów grzyby zasiedlające osad ściekowy wykazały najwyższą zdolność do indukowania zmian widocznych w widmach spektroskopowych PVC. Natomiast w przypadku PC największe zmiany w widmach zaobserwowano w obecności mykobiomu pochodzącego z materiału glebowego.

9. Dyskusja końcowa

Głównym celem badań przeprowadzonych na potrzeby tej dysertacji było pozyskanie z różnych środowisk mikroorganizmów, które były zdolne do degradacji wybranych materiałów polimerowych - PE, PP, PVC, PLA i PC. W tym celu pobrano materiał glebowy ze składowiska odpadów, osad z oczyszczalni ścieków oraz wodę z Wisły. Inokulacja polimerów z wykorzystaniem mikrobiomu badanych środowisk umożliwiła selekcję, izolację i identyfikację szczepów o potencjale do degradacji badanych tworzyw sztucznych. Wpływ mikroorganizmów na strukturę i powierzchnię polimerów oceniono w oparciu o wyniki uzyskane za pomocą FTIR i SEM.

9.1 Zależność między strukturą mikrobiomu a efektywnością procesu biodegradacji

Przeprowadzenie badań metagenomowych potwierdziło różnice w strukturach badanych mikrobiomów. Mogą one wynikać z wielu różnych czynników, takich jak np. dostępność mikroskładników, warunki fizyczne, abiotyczne, wpływ człowieka czy konkurencje międzygatunkowe (Gao i in., 2024; Reay i in., 2025). Wiadomo już, że obecność niektórych związków, takich jak mikrodrobiny plastików w środowisku jest niezaprzeczalna i szczególnie niebezpieczna (Thacharodi i in., 2024). Obecność mikroplastików może kształtować skład i strukturę mikrobiomu, poprzez zakłócanie naturalnej struktury zbiorowiska drobnoustrojów oraz zmianę właściwości fizycznych i chemicznych siedlisk mikroorganizmów. Bardzo istotny wpływ związany jest ze wzrostem ilości węgla zawartego w mikroplastikach (Xiang i in., 2024). Występowanie i udział tego typu indywiduów w środowisku jest różny. Gleby i osady z oczyszczalni ścieków są uważane za najbardziej podatne na zanieczyszczenie polimerami (Boucher i Friot, 2017; Corradini i in., 2019; Mahon i in., 2017). Wody słodkie z kolei charakteryzują się ich zdecydowanie mniejszymi ilościami (Schmidt i in., 2017a).

Zidentyfikowane gromady grzybów obecne w strukturze badanego osadu ściekowego są zgodne z dotychczasową wiedzą na temat specyficznego składu mikrobiologicznego tego środowiska. Grzyby Ascomycota oraz Basidiomycota stanowiły rdzeń całej struktury, a ich wspólny udział wynosił ponad 81% (MN). Badanie metagenomowe dotyczące zbiorowisk grzybów bytujących w trzech oczyszczalniach ścieków, które przeprowadzono

w roku 2019 w Afryce (Assress i in.) pokazało, że te dwie gromady również dominowały stanowiąc 86% mykobiomu, z niewielką przewagą Basidiomycota nad Ascomycota (odpowiednio 48,4% i 38,4%). Kolejne badania przeprowadzone przez Zhang i in. (2018) potwierdzają przewagę dwóch wymienionych wcześniej gromad. Analiza osiemnastu oczyszczalni ścieków działających na terenie Chin ponownie wykazała dominację Ascomycota i Basidiomycota (Niu i in., 2017). Warto nadmienić, że obie gromady pojawiają się najczęściej jako te powiązane z degradacją tworzyw sztucznych (Ekanayaka i in., 2022). W strukturach zbiorowisk grzybów bardzo często wykrywana była także gromada Chytridiomycota, która podobnie jak w badaniach nieopublikowanych (MN), zazwyczaj stanowiła kilka procent struktury mykobiomu (Zhang i in., 2020). Na poziomie taksonomicznym rodzaju powszechna była obecność takich grzybów jak *Talaromyces*, *Mycosphaerella*, *Cuniculitrema*, *Filobasidium* czy *Candida* (Conejo-Saucedo i in., 2021). Ten ostatni stanowił dużą część zbiorowiska badanego osadu (MN) i jest uzanwany za ważny składnik mykobiomu oczyszczalni ścieków (Assress i in., 2019). Inne badania z kolei dotyczące wykorzystania biosubstratów przez grzyby zasiedlające oczyszczalnie ścieków potwierdzają występowanie takich rodzajów jak *Aspergillus*, *Trichoderma* i *Penicillium* (Silva i in., 2019; More i in., 2010). W badaniach niepublikowanych najbardziej licznym rodzajem grzybów był *Dipodascus* (21,7%), którego duży udział zaobserwować można w mykobiomach osadów czynnych (Yang i in., 2011).

Struktura mykobiomu materiału glebowego (MN) zdominowana była przez grzyby należące do gromady Ascomycota (88%). Drugim najczęściej występującym taksonem na tym poziomie okazały się Basidiomycota (3,6%). Europejskie składowiska odpadów są zazwyczaj zdominowane przez dwie główne gromady grzybów: Ascomycota i Basidiomycota, z mniejszym udziałem Mortierellomycota. Badania w całej Europie konsekwentnie wskazują na Ascomycota jako najliczniejszą gromadę mykobiomów składowisk odpadów. Na przykład, badanie składowiska odpadów w centralnej Polsce wykazało, że Ascomycota stanowi około 46% zbiorowiska grzybów w niektórych próbach (Szulc i in., 2022). Basidiomycota są zwykle drugą dominującą grupą; w tym samym miejscu w Polsce Basidiomycota reprezentowały około 23-28% struktury grzybów (Szulc i in., 2022). Inne studium dotyczące składowiska odpadów poprzemysłowych wykazało, że Ascomycota są jeszcze bardziej rozpowszechnione (ponad 80% w próbach powietrza,

33,6% w próbach gleby), podczas gdy Basidiomycota stanowiły około 10% (Szulc i in., 2024). Tymczasem Mortierellomycota mogą być również liczne w glebach składowisk odpadów - osiągając ~32% zbiorowiska w próbie gleby obok Ascomycota i Basidiomycota (Szulc i in., 2024). Inne gromady grzybów (np. Chytridiomycota lub Mucoromycota) są czasami wykrywane, ale zazwyczaj w bardzo niskiej względnej liczebności (Ye i in., 2021). Dominujący udział rodzaju *Thermomyces* w strukturze mykobiomu (MN), wskazuje na to, że procesy mineralizacji materii organicznej zachodzą w fazie termofilnej. Jak wiadomo, wówczas różnorodność mykobiomu spada, a grzyby termofilne dominują w mykobiomie. Badania pokazują, że grzyby należące do tego rodzaju są w stanie kolonizować i rozkładać PE. Chaudhary i in., (2021) wykazał ubytek masy tego polimeru na poziomie 9,2% podczas jednomiesięcznej inkubacji. Dodatkowo wyniki badań z roku 2019 (Al Hosni i in.) wskazują, że w środowisku kompostowym, przy temperaturze około 50°C *T. lanuginosus* okazał się dominującym grzybem kolonizującym, prowadząc do całkowitego rozpadu PCL w ciągu trzech miesięcy.

Analiza składu taksonomicznego rzek europejskich wykazała, że do dominujących gromad grzybów należą Ascomycota (17%-30%) i Basidiomycota (8%-25%). Niewiele mniejszy udział w strukturze mykobiomu wykazano dla Chytridiomycota (10%-30%) i Cryptomycota (15%-18%) (Lepère i in., 2019; Retter i in., 2024). Badania składu taksonomicznego (MN) ujawniły, że woda rzeczna Wisły bogata jest zarówno w grzyby reprezentujące gromady Ascomycota (36,6%), jak i Chytridiomycota (25,5%), natomiast udział przedstawicieli Basidiomycota jest znacznie mniejszy (12,6%). Częsta obecność grzybów z rodzaju *Dipodascus* nie jest powszechna, zazwyczaj stanowią one do kilku procent mykobiomu, preferując środowiska zasobne w składniki odżywcze i charakteryzujące się wysoką dostępnością materii organicznej.

Przeprowadzenie analizy dyskryminacyjnej pokazało, że istnieje bardzo liczna grupa grzybów, które różnicują badane środowiska. Stwierdzono, że materiał glebowy, jest bogaty w grzyby, które uczestniczą w biodegradacji mikroplastików, w tym obecne są grzyby termofilne i celulolityczne, których występowanie może korzystnie wpływać na rozkład mikroplastików. Osad ściekowy natomiast okazał się siedliskiem charakteryzującym się największą liczebnością mikroorganizmów zdolnych do przeprowadzania procesu fermentacji i degradacji materii organicznej co sprawia,

że może on być traktowany jako obiecujące środowisko mikroorganizmów rozkładających mikroplastiki. Wodę rzeczną z kolei kolonizowały głównie grzyby pasożytnicze. Badanie mikrobiomu bakteryjnego materiału glebowego wykazało z kolei obecność wielu rodzajów bakterii (np. *Bacillus*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*) odgrywających ważną rolę w rozkładaniu materiałów syntetycznych (Cai i in., 2023; Rodríguez-Fonseca i in., 2021; Zhang i in., 2024; Wilkes i Aristilde, 2017). Analiza (P2, MN) ujawniła, że w kontekście badanej charakterystyki woda rzeczna wykazuje najmniejszy potencjał jako środowisko sprzyjające izolacji szczepów o zdolnościach degradacyjnych. W osadzie ściekowym, podobnie jak w przypadku materiału glebowego odnotowano obecność rodzajów bakterii tj. *Aeromonas* i *Acinetobacter*, które znane są ze zdolności do degradacji polimerów (Gao i in., 2024; Canellas i in., 2024).

Analiza funkcjonalna mykobiomów badanych środowisk ujawniła, że zarówno osad ściekowy jak i materiał glebowy są źródłem licznych patogenów. Powyższa obserwacja jest spójna z wynikami identyfikacji hodowlanych grzybów, wśród których prawie wszystkie grzyby zaliczają się do patogenów (MN). Na ten moment nie ma korelacji i dowodów na to, że grzyby patogenne są bardziej skuteczne w degradacji mikroplastików niż grzyby niepatogenne. Badania w tej dziedzinie koncentrują się na zdolnościach enzymatycznych poszczególnych gatunków, niezależnie od ich patogenności.

Warunki środowiskowe takie jak skład wartości odżywczych, pH czy zasolenie mogą mieć wpływ w proces biodegradacji (Dong i in., 2023; Viel i in., 2023). Wyniki korelacji pomiędzy parametrami fizykochemicznymi a mikroorganizmami należącymi do określonych taksonów jasno wskazują, że większość grzybów wykazuje negatywną korelację z takimi parametrami jak N-NO₂ i N-NO₃ oraz pH. Pozytywny związek z powyższymi parametrami fizykochemicznymi odnotowano dla grzybów z rzędu *Capnodiales*. TN, N-NH₄ i TP były pozytywnie skorelowane z występowaniem przedstawicieli rzędów *Mortierellales* i *Microascales*. Badając te korelacje można założyć, że warunki środowiskowe optymalizujące degradację tworzyw sztucznych to takie, które promują wzrost wyspecjalizowanych rodzajów grzybów zdolnych do przeprowadzania tego procesu (często poprzez ograniczenie dostępności składników odżywczych dla innych mikroorganizmów lub obecność określonych form składników odżywczych), jednocześnie nie faworyzując ich szybciej rosnących konkurentów. W praktyce warunki takie jak niska

ilość TN/TP, wystarczająca, ale nie nadmierna ilość stałego N (do wzrostu), neutralne pH i odpowiednie zasolenie/wilgotność tworzą preferencyjne warunki dla wzrostu i rozwoju zbiorowisk drobnoustrojów, w których mikroorganizmy aktywnie degradują tworzywa sztuczne (np. *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Arthrobacter*) (Stabnikova i in., 2021). Te spostrzeżenia są cenne dla zarządzania środowiskiem - na przykład strategie bioremediacji mogą celowo dostosowywać poziomy składników odżywczych lub pH, aby przechylić równowagę w kierunku mikroorganizmów degradujących plastik, przyspieszając oczyszczanie odpadów z tworzyw sztucznych w naturalnych ekosystemach (Dey i in., 2021; Kliem i in., 2020).

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej dysertacji wykazały, że środowiska o potencjalnie wyższym stopniu zanieczyszczenia polimerami, takie jak gleba wysypiskowa oraz osady ściekowe, charakteryzowały się obniżoną różnorodnością mikrobiomu bakteryjnego w porównaniu do środowiska wodnego. Zjawisko to może być częściowo związane z toksycznym oddziaływaniem mikroplastików obecnych w tych środowiskach. (Fernández-Juárez i in., 2021; Lear i in., 2021). Fan i in. (2022) wskazali, że obecność tego typu zanieczyszczeń może zmienić dynamikę ekosystemu poprzez przekształcenie struktury mikrobiomu, ostatecznie powodując, że bakterie reprezentujące niektóre taksony konkurują z innymi. Naukowcy zauważyli też, że zakres tych zmian był wysoce zależny od rodzaju zanieczyszczeń (Fan i in., 2022). Zebrane dane (**P2, MN**) potwierdziły, że gleba ze składowiska odpadów oraz osad ściekowy wykazują większy potencjał jako źródła mikroorganizmów zdolnych do degradacji mikroplastików. Wyizolowana ilość szczepów bakterii była ponad dwukrotnie wyższa w materiale glebowym i osadzie, czyli środowiskach, które charakteryzowały się najniższym poziomem bioróżnorodności alfa. Liczba szczepów grzybów wyizolowanych z prób była ponad czterokrotnie większa w przypadku materiału glebowego oraz dwukrotnie wyższa dla osadu ściekowego w porównaniu do wody rzecznej. Warto nadmienić, że osad ściekowy, mimo że potencjalnie wysoce zanieczyszczony mikroplastikami, wykazywał najwyższy poziom bioróżnorodności (natomiast nie różnił się on istotnie od mikrobiomu wody). Jednym z powodów takiego stanu rzeczy może być fakt, że mikroorganizmy w glebie i osadach ściekowych łatwiej tworzą biofilmy na mikroplastikach, co zwiększa efektywność biodegradacji (jednym z wielu czynników jest wysoka zawartość substancji

odżywczych i organicznych) (Arab i in., 2024). Ocena efektywności procesu degradacji została przeprowadzona na podstawie analizy widm FTIR, które wykazały wyraźne różnice pomiędzy badanymi środowiskami, z wyjątkiem PP dla którego nie odnotowano różnic istotnych statystycznie (MN). Widma uzyskane dla pozostałych polimerów ujawniły, że największe zmiany w strukturach zaobserwowano dla prób inkubowanych z materiałem glebowym i osadem ściekowym. Wyniki uzyskane w ramach realizacji rozprawy doktorskiej wyraźnie wskazują, że nie ma korelacji między poziomem bioróżnorodności a wydajnością procesu biodegradacji. Środowiska potencjalnie bardziej zanieczyszczone (o niższej bioróżnorodności wyrażonej indeksem Shannona-Wienera), były lepszym źródłem mikroorganizmów zaangażowanych w degradację badanych tworzyw sztucznych. Zarówno materiał glebowy pochodzący ze składowiska odpadów, jak i osady ściekowe były źródłem kilkunastu szczepów, podczas gdy woda, jako środowisko potencjalnie najmniej zasobne w zanieczyszczenia polimerowe (o najwyższym poziomie bioróżnorodności), dostarczyła jedynie sześć szczepów bakteryjnych i tylko cztery szczepy grzybów. Warto dodać, że niektóre badania sugerują, że zmniejszenie różnorodności drobnoustrojów może prowadzić do bardziej wydajnej biodegradacji (Kang i in., 2020). Dzieje się tak, ponieważ uproszczone konsorcja mogą zminimalizować konkurencję i skoncentrować aktywność metaboliczną na określonych szlakach degradacji. Na przykład zmniejszenie różnorodności biologicznej zbiorowisk drobnoustrojów z gleb zanieczyszczonych olejem napędowym spowodowało zmianę puli genów funkcjonalnych i zwiększenie wydajności biodegradacji oleju napędowego (Jung i in., 2016). Co ciekawe, taka zależność nie jest regułą i w wielu przypadkach większa różnorodność drobnoustrojów zwiększa wydajność biodegradacji. Zróżnicowane zbiorowiska drobnoustrojów posiadają szerszy zakres zdolności metabolicznych, umożliwiając im degradację szerszej gamy złożonych związków. Wykazano na przykład, że niektóre konsorcja drobnoustrojów skutecznie rozkładają odporne materiały, takie jak lignoceluloza i poliuretany, przewyższając pojedyncze szczepy drobnoustrojów. Na podstawie badań Sheridana i in. (2022) zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy indeksem Shannona-Wienera a szybkością biodegradacji tworzyw sztucznych. W roku 2024 Lozano i in., wykazali, że obecność mikroplastiku w glebie może wpływać na jej charakterystykę w różny sposób, zależny od nawodnienia miejsca pobrania próby. W przypadku gleb dobrze nawodnionych

obecność mikrodrobin zmniejszała bioróżnorodność, podczas gdy w warunkach suszy, wskaźnik ulegał zwiększeniu (Lozano i in., 2024).

9.2 Polimery obecne w środowisku mogą selekcjonować mikroorganizmy zdolne do ich biodegradacji

Analiza porównawcza wyników identyfikacji hodowlanych szczepów mikroorganizmów, wyselekcjonowanych po wielokrotnych pasażach z badanymi polimerami, z danymi uzyskanymi w analizach metagenomowych badanych środowisk wykazała, że wśród wyizolowanych szczepów bakterii i grzybów zdolnych do degradacji polimerów znajdują się przedstawiciele rzadkich taksonów w badanych mikrobiomach. Wykazano, że taksony te znajdują się w grupie o liczebności poniżej 0,01% struktury badanych mikrobiomów. W przypadku bakterii były to *Klebsiella*, *Serratia* i *Ancylobacter*. Wśród zidentyfikowanych bakterii *P. aeruginosa* posiadał najszerszy potencjał degradacji różnych polimerów, w badaniach wyizolowano go z plastisfery wszystkich czterech badanych polimerów. Wyniki dotyczące szczepów bakterii zostały szerzej opisane w **P2**. W przypadku grzybów, na uwagę zasługuje *F. oxysporum*, który wyizolowano z mikroplastików inkubowanych z mikrobiomem pochodzącym z wszystkich badanych środowisk. Co ciekawe, szczep ten znany jest z biodegradacji PET (Dimarogona i in., 2015), natomiast nie potwierdzono do tej pory jego zdolności degeadacyjnych względem innych polimerów. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, iż *F. oxysporum* może degradować również PP, PVC i PLA. Na uwagę zasługuje także fakt, że pozostałe szczepy tj. *Microdochium bollei*, *Trichoderma harzianum*, *Neosetophoma samarorum* czy *Clonostachys rosea* należące do rzadkich rodzajów zostały wyizolowane tylko w przypadku mikroplastików inkubowanych z materiałem glebowym. *T. harzianum* posiada potwierdzone właściwości do degradacji PE (Sowmya i in., 2014). *C. rosea* z kolei jest w stanie degradować PCL (Urbanek i in., 2021) oraz PLA (Viel i in., 2023). Niektóre ze zidentyfikowanych grzybów tj. *M. bollei* czy *N. samarorum* nie zostały opisane w publikacjach naukowych w kontekście degradacji polimerów.

9.3 Zależność pomiędzy wydajnością biodegradacji polimerów a rodzajem mikroorganizmów (bakterie i grzyby)

Mikrobiologiczny rozkład polimerów takich jak PE i PP przez bakterie i grzyby zależy jest od kilku kluczowych czynników: ich struktury chemicznej, hydrofobowości oraz dostępności enzymów zdolnych do rozkładu. Ocena wydajności procesu degradacji dwóch badanych polimerów (PE i PP) przez mikroorganizmy pochodzące z materiału glebowego składowiska odpadów wskazała na większe powinowactwo mikrobiomu bakteryjnego do PP i mykobiomu do PE. Mimo pewnych podobieństw, takich jak na przykład brak polarnych grup funkcyjnych w strukturze obu polimerów, co warunkuje ich hydrofobowy charakter (Foster i in., 2020), to istnieją pewne istotne różnice, determinujące ostateczny przebieg procesu degradacji.

Wiadomo, że PP zawiera dodatkową grupę metylową ($-CH_3$) przy każdym monomerze. Obecność grupy metylowej w PP sprawia, że polimer ten trudniej ulega rozpadowi, ma wyższą krystaliczność i sztywność (Czakaj i in., 2024), co skutkuje tym, że bakterie wykorzystują mechanizmy powierzchniowej oksydacji grup metylowych. Proces ten polega na utlenianiu dostępnych wyżej wymienionych grup na powierzchni materiału, co prowadzi do wprowadzenia grup funkcyjnych ułatwiających dalszy rozkład polimeru (Żuchowska i in., 1998; Żuchowska i in., 1999). Z kolei brak rozgałęzień w przypadku PE (na szczególną uwagę zasługuje LDPE), ułatwia mikroorganizmom dostęp do swojej struktury.

Na podstawie uzyskanych widm FTIR, obrazujących istotne obszary zmian stwierdzono, że w przypadku PE wartości CI, które bardzo często są wykorzystywane jako parametr określający stopień degradacji, były prawie 10-krotnie wyższe niż dla PP po 90-dniowej inkubacji polimerów z mykobiomem. Wzrost wartości CI jest niezaprzeczalnym wskaźnikiem procesów degradacyjnych co potwierdzono między innymi w roku 2023 (Hoseini i in.). Ponadto dzięki analizie powierzchni polimeru za pomocą SEM stwierdzono, że biofilm obecny na powierzchni jest lepiej rozwinięty na granulках PP w próbach bakteryjnych, podczas gdy biofilm grzybowy był skuteczniej formowany na powierzchni PE. W tym miejscu, w przypadku bakterii warto zwrócić uwagę na bardzo ważny aspekt dotyczący wytwarzania specyficznej grupy związków – biosurfaktantów. Kilka szczepów bakterii, zwłaszcza z rodzajów *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Rhodococcus*, wykazuje zdolność

do degradacji PP poprzez mechanizmy oksydacyjne i produkcję biosurfaktantów, które zwiększają interakcję bakterii z tym hydrofobowym polimerem (Wilkes i Aristilde, 2017; Desai i Banat, 1997). Produkcja biosurfaktantów przez te szczepy bakterii odgrywa kluczową rolę w usprawnianiu procesu degradacji. Biosurfaktanty bowiem zmniejszają napięcie powierzchniowe i zwiększają hydrofilowość powierzchni polimeru, ułatwiając lepszą adhezję bakterii i późniejszą degradację. Na przykład *Pseudomonas aeruginosa* wytwarza ramnolipidy, rodzaj biosurfaktantów glikolipidowych, które pomagają w emulgowaniu związków hydrofobowych, poprawiając w ten sposób ich biodostępność dla degradacji mikrobiologicznej (Soberón-Chávez i in., 2005). Zdolności takie wykazuje również *S. marcescens* (Clements i in., 2019), która stanowiła ponad 70% wszystkich izolatów uzyskanych w badaniu (P2) na próbach z PP. W przypadku grzybów te specyficzne interakcje można wyjaśnić ich zdolnością do adhezji do hydrofobowej powierzchni polimeru (Muhonja i in., 2018). Przyjmuje się (na przykładzie PE), że grzyby są zdolne do produkcji enzymów wewnątrzkomórkowych (esterazy, lakazy, peroksydazy) zaangażowanych w adhezję mikroorganizmów do powierzchni polimeru, a tym samym bezpośrednio inicjujących pierwszy etap procesu biodegradacji – tworzenia biofilmu (Wei i Zimmermann 2017). Dodatkowo grzyby wydzielają różnorodne enzymy zewnątrzkomórkowe, takie jak kutynazy, lipazy, proteazy, i enzymy lignocelulolityczne, które inicjują oksydacyjną degradację polimeru, prowadząc do jego rozpadu na mniejsze cząsteczki, co ma kluczowe znaczenie dla biodegradacji materiałów takich jak PE właśnie (Di Napoli i in., 2023). Niektóre enzymy ligninolityczne, wytwarzane przez grzyby, które zwiększają efektywność kolonizacji i rozkładu trudnych do degradacji materiałów takich jak ligninia czy drewno, okazują się skuteczne w przypadku polimerów takich jak PE i PVC (Temporiti i in., 2022). Dodatkowo grzyby, w przeciwieństwie do bakterii, posiadają aparat strzępkowy, który odpowiada za zwiększenie zdolności do degradacji polimerów, głównie poprzez zwiększenie powierzchni kontaktu z materiałem (Sanchez, 2020). Strzępki grzybów są w stanie produkować zestaw enzymów hydrolaz grzybowych, które mogą wchodzić w interakcje z wybranymi polimerami, zwiększając wydajność omawianego procesu (Roohi i in., 2017). W przypadku poliolefin sytuacja jest trudniejsza i bardziej skomplikowana, ponieważ struktura molekularna tych polimerów jest dość zwarta i przed procesem biodegradacji często wymagane jest działanie czynnika abiotycznego

np. promieniowania elektromagnetycznego lub ciepła (Stachurek, 2012). Jednak niektóre gatunki grzybów są w stanie wytwarzać oksydoreduktazy, które są w stanie depolimeryzować poliolefiny (Okal i in., 2023). Ponadto jeśli zewnętrzna struktura tworzywa sztucznego jest uszkodzona (pęknięcia, mikrourazy), strzępki grzybni penetrują takie miejsca i kolonizują oderwane części, co w konsekwencji przyczynia się do przyspieszenia procesu biodegradacji (Hyde i in., 2019).

9.4 Ocena zmian strukturalnych polimerów przy wykorzystaniu FTIR oraz zmian na ich powierzchni za pomocą SEM

Postęp biodegradacji polimeru można monitorować za pomocą różnych metod odpowiednich dla każdego etapu procesu (Zhang i in., 2022a). Ocena powierzchni polimeru metodą mikroskopową pozwoliła na potwierdzenie procesu biodegradacji. Mikropęknięcia, erozje lub pofałdowania wskazujące na degradację polimeru można łatwo wykryć za pomocą SEM (Easton i in., 2023; Gajendiran i in., 2016; J. Schmidt i in., 2017b; Skariyachan i in., 2018; Teodonio i in., 2016). Obserwacja silnie rozwiniętego biofilmu (**P1**) i zmian w zewnętrznej strukturze polimerów (**P1, P2, materiał niepublikowany**) wskazuje, że proces biodegradacji został zainicjowany. Obecność i rozwój biofilmu na powierzchni materiału polimerowego jest wskaźnikiem i dowodem jego biodegradacji (Orr i in., 2004).

Monitorowanie zmian strukturalnych badanych polimerów zostało przeprowadzone w oparciu o widma FTIR. Ocena poszczególnych etapów procesu biodegradacji w oparciu o tę technikę jest dość dobrze ustandaryzowana (Zhang i in., 2022a). Pierwszy etap procesu, obejmujący tworzenie biofilmu oraz początkową degradację łańcucha polimerowego m.in. na skutek działania enzymów wytwarzanych przez mikroorganizmy, jest sygnalizowany spadkiem intensywności charakterystycznych pasm polimeru. Następnie obserwuje się wzrost wartości CI, co wynika bezpośrednio z pojawienia się nowych pasm odpowiadających grupom karbonylowym. Rejestrowanie postępu procesu degradacji ujawnia redukcję grup karbonylowych i powstawanie kwasów karboksylowych (co sprzyja utlenianiu), co skutkuje spłaszczeniem pasma odpowiadającego grupom karbonylowym na widmach (Mohanani i in., 2020). W przeprowadzonych badaniach PP okazał się polimerem najbardziej odpornym na działanie mikroorganizmów. Chociaż obrazy SEM, wskazujące na rozwój biofilmu, sugerują inicjację procesu degradacji

PP, wyniki analizy widma FTIR potwierdziły ten proces tylko poprzez zmniejszenie intensywności charakterystycznych pasm spektroskopowych w przypadku mikroplastiku w formie granul (po inkubacji z mikrobiomem bakteryjnym i mykobiomem materiału glebowego ze składowiska odpadów) oraz w formie sproszkowanej (inkubowanego z mikrobiomem bakteryjnym materiału glebowego, osadu ściekowego i wody rzecznej) (P1, P2). Co ciekawe, w przypadku wyników przedstawionych w formie niepublikowanej, inkubacja mikroplastików w formie sproszkowanej z mykobiomem trzech różnych środowisk prowadziła tylko do nieznaczącego spadku intensywności pasm wskazujących na zachodzenie procesu biodegradacji. W przeprowadzonych eksperymentach nie wykryto zmian potwierdzających proces utleniania tego polimeru, co może być wynikiem zbyt krótkiego czasu inkubacji tak odpornego na degradację polimeru z mikroorganizmami. W przypadku wariantów PE i PVC inkubowanych z mykobiomem materiału glebowego pobranym ze składowiska odpadów, stwierdzono zmiany w widmach polegające na pojawieniu się dodatkowych pasm o liczbach falowych odpowiadających grupom karbonylowym. Analogiczne zmiany zaobserwowano na widmach IR uzyskanych dla wariantów inkubowanych z mikrobiomem bakteryjnym materiału glebowego dla PVC. Dodatkowo wykazano, że struktura tego polimeru została zmieniona po kontakcie z grzybami występującymi w osadzie ściekowym. Zmiany spowodowane przez bakterie wyizolowane z badanych środowisk, zostały potwierdzone poprzez określenie wartości CI. W tych przypadkach potwierdzono utlenianie (początkowy etap biodegradacji) polimerów. Proces biodegradacji przebiegał najszybciej w przypadku PLA i PC, co jest częściowo związane z ich budową. W wybranych wariantach tych polimerów zaobserwowano obniżenie intensywności pasm odpowiadających grupom karbonylowym, co znalazło odzwierciedlenie w wartościach CI. Rozkład, a tym samym zmniejszenie liczby grup tlenowych, skutkowało obniżeniem wartości CI. Opisane powyżej zmiany wskazują na etap biodeterioracji. Podobne obserwacje poczynili Novotny i in. (2018) badając biodegradację PE. Powstające w tym procesie grupy karbonylowe i estrowe sprawiają, że polimer jest bardziej dostępny dla mikroorganizmów (Longo i in., 2011; Restrepo-Flórez i in., 2014; Aravinthan i in., 2016). W przypadku PP, który jest uważany za jeden z najtrudniejszych do degradacji polimerów, nie wykryto statystycznie istotnych zmian w wartości CI na podstawie widm. W przypadku PLA i PC obecność grup karbonylowych umożliwia

łatwiejszy i szybszy dostęp dla mikroorganizmów, wchodzącym w interakcję z tymi polimerami. Zatem rozpad tych grup powoduje spadek wartości CI (Zhang i in., 2022a).

10. Wnioski końcowe

- ✓ **Poziom bioróżnorodności alfa mikrobiomu środowiskowego nie determinuje szybkości ani efektywności procesu biodegradacji.** Wyniki badań wskazują, że sama liczba taksonów w mikrobiomie, choć istotna dla ogólnej funkcji ekosystemu, nie jest decydująca dla tempa i efektywności degradacji tworzyw sztucznych. Zamiast tego, kluczową rolę w tym procesie odgrywa obecność określonych taksonów, takich jak *Pseudomonas* spp. czy *Fusarium* spp., które mimo niskiego udziału w strukturze mikrobiomu plastisfery, wykazują zdolność do efektywnej biodegradacji polimerów. Wskazuje to na szeroki potencjał metaboliczny tych mikroorganizmów oraz ich ogromne znaczenie ekologiczne, nawet gdy stanowią one niewielką część mikrobiomu.
- ✓ **Potwierdzono, że bakterie i grzyby charakteryzują się odmienną efektywnością biodegradacji polimerów o zróżnicowanych właściwościach chemicznych.** Badania wykazały, że grzyby mają znacznie wyższy potencjał degradacyjny w stosunku do polietylenu (PE), podczas gdy bakterie wykazują lepsze właściwości biodegradacyjne w odniesieniu do polipropylenu (PP). Różnice te mogą być związane z takimi czynnikami, jak stopień hydrofobowości polimerów, który wpływa na ich dostępność dla mikroorganizmów, oraz zróżnicowane właściwości metaboliczne mikroorganizmów. Grzyby, ze względu na zdolności wytwarzania i wydzielania różnorodnych enzymów oksydoredukcyjnych uczestniczą w rozkładzie trudniejszych do degradacji substancji, takich jak PE, podczas gdy bakterie, dzięki mniejszym wymaganiom metabolicznym, lepiej przystosowują się do degradacji PP.
- ✓ **Środowiska, które były potencjalnie bardziej zanieczyszczone polimerami – materiał glebowy ze składowisk odpadów i osady z oczyszczalni ścieków – były lepszym źródłem mikroorganizmów zdolnych do degradacji tworzyw sztucznych niż woda z rzeki.** Wyniki sugerują, że środowiska o wyższym poziomie zanieczyszczenia polimerami stwarzają warunki do selekcji

mikroorganizmów zdolnych do degradacji tworzyw sztucznych. Zawartość mikroplastików w tych środowiskach może sprzyjać namnażaniu mikroorganizmów, które rozkładają polimery, co czyni je lepszymi źródłami mikroorganizmów degradujących plastik w porównaniu do mniej zanieczyszczonych środowisk wodnych, takich jak rzeka.

- ✓ **Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że polimery obecne w różnych środowiskach mogą selekcjonować z ich mikrobiomów podobne rodzaje bakterii i grzybów.** Pomimo zróżnicowania warunków środowiskowych oraz odmiennej struktury mikrobiomu w badanych próbach (materiał glebowy, osady ściekowe, woda rzeczna), zaobserwowano, że określone taksony bakterii i grzybów znalazły się w grupie wyselekcjonowanych i zidentyfikowanych mikroorganizmów degradujących testowane tworzywa sztucznych.

11. Bibliografia

- Al Hosni, A. S., Pittman, J. K., & Robson, G. D. (2019). Microbial degradation of four biodegradable polymers in soil and compost demonstrating polycaprolactone as an ideal compostable plastic. *Waste Management*, 97, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.07.042>
- Allen, D., Allen, S., Abbasi, S., Baker, A., Bergmann, M., Brahney, J., Butler, T., Duce, R. A., Eckhardt, S., Evangeliou, N., Jickells, T., Kanakidou, M., Kershaw, P., Laj, P., Levermore, J., Li, D., Liss, P., Liu, K., Mahowald, N., Wright, S. (2022). Microplastics and nanoplastics in the marine-atmosphere environment. *Nature Reviews Earth & Environment*, 3(6), 393–405. <https://doi.org/10.1038/s43017-022-00292-x>
- Allwood, J. M., Ashby, M. F., Gutowski, T. G., & Worrell, E. (2011). Material efficiency: a white paper. *Resources, Conservation and Recycling*, 55(3), 362–381. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2010.11.002>
- Amass, W., Amass, A., & Tighe, B. (1998). A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International*, 47(2), 89–144. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0126\(199810\)47:2<89::AID-PI86>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0126(199810)47:2<89::AID-PI86>3.0.CO;2-F)
- Arab, M., Yu, J., & Nayebi, B. (2024). Microplastics in sludges and soils: a comprehensive review on distribution, characteristics, and effects. *ChemEngineering*, 8(5), 86. <https://doi.org/10.3390/chemengineering8050086>
- Aravinthan, A., Arkatkar, A., Juwarkar, A. A., & Doble, M. (2016). Synergistic growth of *Bacillus* and *Pseudomonas* and its degradation potential on pretreated polypropylene. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46(2), 109–115. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.985836>
- Arefian, M., Tahmourespour, A., & Zia, M. (2023). Polycarbonate biodegradation by newly isolated *Bacillus* strains. *Archives of Environmental Protection*, 46(1), 14–20. <https://doi.org/10.24425/aep.2020.132521>
- Artham, T., & Doble, M. (2008). Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromolecular Bioscience*, 8(1), 14–24. <https://doi.org/10.1002/mabi.200700106>
- Artham, T., & Doble, M. (2010). Biodegradation of physicochemically treated polycarbonate by fungi. *Biomacromolecules*, 11(1), 20–28. <https://doi.org/10.1021/bm9008099>
- Assress, H. A., Selvarajan, R., Nyoni, H., Ntushelo, K., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. M. (2019). Diversity, co-occurrence and implications of fungal communities

- in wastewater treatment plants. *Scientific Reports*, 9(1), 14056. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50624-z>
- Bosch, X. (2001). Fungus eats CD. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/news010628-11>
- Boucher, J., & Friot, D. (2017). Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of sources. IUCN International Union for Conservation of Nature. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2017.01.en>
- Cai, Z., Li, M., Zhu, Z., Wang, X., Huang, Y., Li, T., Gong, H., & Yan, M. (2023). Biological degradation of plastics and microplastics: a recent perspective on associated mechanisms and influencing factors. *Microorganisms*, 11(7), 1661. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071661>
- Canellas, A. L. B., Abdon, B. B., Diniz, M. N., da Silva Oliveira Alves, G., de Paula Lourenço, M. F., Machado, W. T. V., Giambiagi-deMarval, M., de Oliveira, B. F. R., & Laport, M. S. (2023). Antimicrobial resistance and biotechnological potential of plastic-associated bacteria isolated from an urban estuary. *Environmental Microbiology*, 25(12), 2851–2863. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16540>
- Chaudhary, A. K., Chaitanya, K., Dalmia, R., & Vijayakumar, R. P. (2021). Synergistic effect of UV, thermal, and chemical treatment on biological degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Thermomyces lanuginosus*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(8), 513. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09296-4>
- Clements, T., Ndlovu, T., Khan, S., & Khan, W. (2019). Biosurfactants produced by *Serratia* species: classification, biosynthesis, production and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2), 589–602. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9520-5>
- Conejo-Saucedo, U., Ledezma-Villanueva, A., Ángeles de Paz, G., Herrero-Cervera, M., Calvo, C., & Aranda, E. (2021). Evaluation of the potential of sewage sludge mycobiome to degrade high diclofenac and bisphenol-A concentrations. *Toxics*, 9(6), 115. <https://doi.org/10.3390/toxics9060115>
- Coppock, R. L., Cole, M., Lindeque, P. K., Queirós, A. M., & Galloway, T. S. (2017). A small-scale, portable method for extracting microplastics from marine sediments. *Environmental Pollution*, 230, 829–837. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.017>
- Corradini, F., Meza, P., Eguiluz, R., Casado, F., Huerta-Lwanga, E., & Geissen, V. (2019). Evidence of microplastic accumulation in agricultural soils from sewage sludge disposal. *Science of The Total Environment*, 671, 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.368>
- Czakaj, J., Pakuła, D., Głowacka, J., Sztorch, B., & Przekop, R. E. (2024). Mechanical and thermal properties of polypropylene, polyoxymethylene and poly (methyl

- methacrylate) modified with adhesive resins. *Journal of Composites Science*, 8(10), 384. <https://doi.org/10.3390/jcs8100384>
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47–64. <https://doi.org/10.1128/mmbr.61.1.47-64.1997>
- Dey, T. K., Uddin, Md. E., & Jamal, M. (2021). Detection and removal of microplastics in wastewater: evolution and impact. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(14), 16925–16947. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12943-5>
- Dimarogona, M., Nikolaivits, E., Kanelli, M., Christakopoulos, P., Sandgren, M., & Topakas, E. (2015). Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(11), 2308–2317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.009>
- Di Napoli, M., Silvestri, B., Castagliuolo, G., Carpentieri, A., Luciani, G., Di Maro, A., Sorbo, S., Pezzella, A., Zanfardino, A., & Varcamonti, M. (2023). High density polyethylene (HDPE) biodegradation by the fungus *Cladosporium halotolerans*. *FEMS Microbiology Ecology*, 99(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac148>
- Dong, X., Zhu, L., He, Y., Li, C., & Li, D. (2023). Salinity significantly reduces plastic-degrading bacteria from rivers to oceans. *Journal of Hazardous Materials*, 451, 131125. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131125>
- Easton, Z. H. W., Essink, M. A. J., Rodriguez Comas, L., Wurm, F. R., & Gojzewski, H. (2023). Acceleration of biodegradation using polymer blends and composites. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 224(6). <https://doi.org/10.1002/macp.202200421>
- Ellis, L. D., Rorrer, N. A., Sullivan, K. P., Otto, M., McGeehan, J. E., Román-Leshkov, Y., Wierckx, N., & Beckham, G. T. (2021). Chemical and biological catalysis for plastics recycling and upcycling. *Nature Catalysis*, 4(7), 539–556. <https://doi.org/10.1038/s41929-021-00648-4>
- Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — a comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 367–392. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>
- Fernández-Juárez, V., López-Alforja, X., Frank-Comas, A., Echeveste, P., Bennasar-Figueras, A., Ramis-Munar, G., Gomila, R. M., & Agawin, N. S. R. (2021). “The Good, the bad and the double-sword” effects of microplastics and their organic additives in marine bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581118>

- Foster, J. C., Akar, I., Grocott, M. C., Pearce, A. K., Mathers, R. T., & O'Reilly, R. K. (2020). 100th anniversary of macromolecular science viewpoint: the role of hydrophobicity in polymer phenomena. *ACS Macro Letters*, 9(11), 1700–1707. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.0c00645>
- Gajendiran, A., Krishnamoorthy, S., & Abraham, J. (2016). Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *3 Biotech*, 6(1), 52. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0394-x>
- Gambarini, V., Pantos, O., Kingsbury, J.M., Weaver, L., Handley, K.M., Lear, G. 2021. Phylogenetic distribution of plastic-degrading microorganisms. *mSystems* 6. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01112-20>
- Gao, W., Xu, M., Zhao, W., Yang, X., Xin, F., Dong, W., Jia, H., & Wu, X. (2024). Microbial degradation of (micro)plastics: mechanisms, enhancements, and future directions. *Fermentation*, 10(9), 441. <https://doi.org/10.3390/fermentation10090441>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Ghatge, S., Yang, Y., Ahn, J.-H., & Hur, H.-G. (2020). Biodegradation of polyethylene: a brief review. *Applied Biological Chemistry*, 63(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00511-3>
- Goel, R., Zaidi, M. G. H., Soni, R., Lata, K., & Shouche, Y. S. (2008). Implication of *Arthrobacter* and *Enterobacter* species for polycarbonate degradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(2), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.07.001>
- Graziano, A., Jaffer, S., & Sain, M. (2019). Review on modification strategies of polyethylene/polypropylene immiscible thermoplastic polymer blends for enhancing their mechanical behavior. *Journal of Elastomers & Plastics*, 51(4), 291–336. <https://doi.org/10.1177/0095244318783806>
- Guo, X., & Wang, J. (2019). The chemical behaviors of microplastics in marine environment: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.019>
- Gupta, A. P., & Kumar, V. (2007). New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – polylactide: a critique. *European Polymer Journal*, 43(10), 4053–4074. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.06.045>
- Gyung Yoon, M., Jeong Jeon, H., & Nam Kim, M. (2012). Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000145>

- Haque, F., & Fan, C. (2023). Fate and impacts of microplastics in the environment: hydrosphere, pedosphere, and atmosphere. *Environments*, 10(5), 70. <https://doi.org/10.3390/environments10050070>
- He, Y., Deng, X., Jiang, L., Hao, L., Shi, Y., Lyu, M., Zhang, L., & Wang, S. (2024). Current advances, challenges and strategies for enhancing the biodegradation of plastic waste. *Science of The Total Environment*, 906, 167850. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167850>
- Hoseini, M., Stead, J., & Bond, T. (2023). Ranking the accelerated weathering of plastic polymers. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 25(12), 2081–2091. <https://doi.org/10.1039/D3EM00295K>
- Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T., Abeywickrama, P. D., Aluthmuhandiram, J. V. S., Brahamanage, R. S., Brooks, S., Chaiyasen, A., Chethana, K. W. T., Chomnunti, P., Chepkirui, C., Chuankid, B., de Silva, N. I., Doilom, M., Faulds, C., Gentekaki, E., Stadler, M. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, 97(1), 1–136. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>
- 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 JJY0216 isolated from soil grove. *Polymer Degradation and Stability*, 191, 109662. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109662>
- Jung, J., Philippot, L., & Park, W. (2016). Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Scientific Reports*, 6(1), 23012. <https://doi.org/10.1038/srep23012>
- Kang, D., Jacquiod, S., Herschend, J., Wei, S., Nesme, J., & Sørensen, S. J. (2020). Construction of simplified microbial consortia to degrade recalcitrant materials based on enrichment and dilution-to-extinction cultures. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03010>
- Kang, J., Zhou, L., Duan, X., Sun, H., Ao, Z., & Wang, S. (2019). Degradation of cosmetic microplastics via functionalized carbon nanosprings. *Matter*, 1(3), 745–758. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2019.06.004>
- Kelly, J. J., London, M. G., McCormick, A. R., Rojas, M., Scott, J. W., & Hoellein, T. J. (2021). Wastewater treatment alters microbial colonization of microplastics. *PLOS ONE*, 16(1), e0244443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244443>
- Kibria, Md. G., Masuk, N. I., Safayet, R., Nguyen, H. Q., & Mourshed, M. (2023). Plastic waste: challenges and opportunities to mitigate pollution and effective management.

- International Journal of Environmental Research, 17(1), 20.
<https://doi.org/10.1007/s41742-023-00507-z>
- Kliem, S., Kreutzbruck, M., & Bonten, C. (2020). Review on the biological degradation of polymers in various environments. *Materials*, 13(20), 4586.
<https://doi.org/10.3390/ma13204586>
- Lamichhane, G., Acharya, A., Marahatha, R., Modi, B., Paudel, R., Adhikari, A., Raut, B. K., Aryal, S., & Parajuli, N. (2023). Microplastics in environment: global concern, challenges, and controlling measures. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(4), 4673–4694. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04261-1>
- Lear, G., Kingsbury, J. M., Franchini, S., Gambarini, V., Maday, S. D. M., Wallbank, J. A., Weaver, L., & Pantos, O. (2021). Plastics and the microbiome: impacts and solutions. *Environmental Microbiome*, 16(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00371-w>
- Lee, Y., Cho, J., Sohn, J., & Kim, C. (2023). Health effects of microplastic exposures: current issues and perspectives in South Korea. *Yonsei Medical Journal*, 64(5), 301. <https://doi.org/10.3349/ymj.2023.0048>
- Lepère, C., Domaizon, I., Humbert, J.-F., Jardillier, L., Hugoni, M., & Debroas, D. (2019). Diversity, spatial distribution and activity of fungi in freshwater ecosystems. *PeerJ*, 7, e6247. <https://doi.org/10.7717/peerj.6247>
- Lin, X., Zhang, S., Yang, S., Zhang, R., Shi, X., & Song, L. (2023). A landfill serves as a critical source of microplastic pollution and harbors diverse plastic biodegradation microbial species and enzymes: study in large-scale landfills, China. *Journal of Hazardous Materials*, 457, 131676. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131676>
- Longo, C., Savaris, M., Zeni, M., Brandalise, R. N., & Grisa, A. M. C. (2011). Degradation study of polypropylene (PP) and bioriented polypropylene (BOPP) in the environment. *Materials Research*, 14(4), 442–448. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392011005000080>
- Luo, W., Su, L., Craig, N. J., Du, F., Wu, C., & Shi, H. (2019). Comparison of microplastic pollution in different water bodies from urban creeks to coastal waters. *Environmental Pollution*, 246, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.081>
- MacLean, J., Mayanna, S., Benning, L. G., Horn, F., Bartholomäus, A., Wiesner, Y., Wagner, D., & Liebner, S. (2021). The terrestrial plastisphere: diversity and polymer-colonizing potential of plastic-associated microbial communities in soil. *Microorganisms*, 9(9), 1876. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091876>
- Mahon, A. M., O’Connell, B., Healy, M. G., O’Connor, I., Officer, R., Nash, R., & Morrison, L. (2017). Microplastics in sewage sludge: effects of treatment.

- Environmental Science & Technology, 51(2), 810–818.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04048>
- McCormick, A., Hoellein, T. J., Mason, S. A., Schluep, J., & Kelly, J. J. (2014). Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environmental Science & Technology*, 48(20), 11863–11871.
<https://doi.org/10.1021/es503610r>
- Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., & Levin, D. B. (2020). Microbial and enzymatic degradation of synthetic plastics. *Frontiers in Microbiology*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709>
- Montazer, Z., Habibi Najafi, M. B., & Levin, D. B. (2020). Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene. *Polymers*, 12(1), 123.
<https://doi.org/10.3390/polym12010123>
- More, T. T., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2010). Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. *Bioresource Technology*, 101(20), 7691–7700.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.033>
- Muhonja, C. N., Makonde, H., Magoma, G., & Imbuga, M. (2018). Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. *PLOS ONE*, 13(7), e0198446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446>
- Ng, E.-L., Huerta Lwanga, E., Eldridge, S.M., Johnston, P., Hu, H.-W., Geissen, V., Chen, D. (2018). An overview of microplastic and nanoplastic pollution in agroecosystems. *Science of The Total Environment* 627, 1377–1388.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.341>
- Nichterlein, M. (2022). Quarterly Report Q3/2022 European plastics manufacturers (EU 27). *PlasticsEurope AISBL*.
- Novotny, Č., Malachová, K., Adamus, G., Kwiecień, M., Lotti, N., Soccio, M., Verney, V., & Fava, F. (2018). Deterioration of irradiation/high-temperature pretreated, linear low-density polyethylene (LLDPE) by *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 132, 259–267.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.04.014>
- Nowak B., & Pająk J. (2010). Biodegradacja polilaktydu (PLA). *Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska*, 12(2), 1–10.
- Nyamjav, I., Jang, Y., Lee, Y. E., & Lee, S. (2023). Biodegradation of polyvinyl chloride by *Citrobacter koseri* isolated from superworms (*Zophobas atratus* larvae). *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1175249>
- Ohtake, Y., Kobayashi, T., Asabe, H., Murakami, N., & Ono, K. (1998). Oxidative degradation and molecular weight change of LDPE buried under bioactive soil for

- 32-37 years. *Journal of Applied Polymer Science*, 70(9), 1643–1648. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19981128\)70:9<1643::AID-APP1>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19981128)70:9<1643::AID-APP1>3.0.CO;2-V)
- Okal, E. J., Heng, G., Magige, E. A., Khan, S., Wu, S., Ge, Z., Zhang, T., Mortimer, P. E., & Xu, J. (2023). Insights into the mechanisms involved in the fungal degradation of plastics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 262, 115202. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115202>
- Orr, I., Hadar, Y., & Sivan, A. (2004). Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1). <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1584-8>
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B., Kolter, R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in enzymology*, 91–109. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)10008-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)10008-9)
- Plastics - the Facts 2021. An analysis of European plastics production, demand and waste data. (2021). <https://plasticseurope.org/pl/resources/market-data/>
- Pol, W., Żmijewska, A., Stasińska, E., Zieliński, P. (2022). Spatial–temporal distribution of microplastics in lowland rivers flowing through two cities (NE Poland). *Water Air Soil Pollut* 233, 140. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05608-7>
- Rashed, A. H., Yesilay, G., Hazeem, L., Rashdan, S., AlMealla, R., Kilinc, Z., Ali, F., Abdulrasool, F., & Kamel, A. H. (2023). Micro- and nano-plastics contaminants in the environment: sources, fate, toxicity, detection, remediation, and sustainable perspectives. *Water*, 15(20), 3535. <https://doi.org/10.3390/w15203535>
- Reay, M. K., Graf, M., Greenfield, L. M., Bargiela, R., Onyije, C., Lloyd, C. E. M., Bull, I. D., Evershed, R. P., Golyshin, P. N., Chadwick, D. R., & Jones, D. L. (2025). Microbial degradation of bioplastic (PHBV) is limited by nutrient availability at high microplastic loadings. *Environmental Science: Advances*, 4(1), 133–146. <https://doi.org/10.1039/D4VA00311J>
- Restrepo-Flórez, J.-M., Bassi, A., & Thompson, M. R. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene – a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>
- Retter, A., Griebler, C., Nilsson, R. H., Haas, J., Birk, S., Breyer, E., Baltar, F., & Karwautz, C. (2024). Metabarcoding reveals ecologically distinct fungal assemblages in river and groundwater along an Austrian alpine to lowland gradient. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(11). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae139>
- Rodríguez-Fonseca, M. F., Sánchez-Suárez, J., Valero, M. F., Ruiz-Balaguera, S., & Díaz, L. E. (2021). *Streptomyces* as potential synthetic polymer degraders: a systematic review. *Bioengineering*, 8(11), 154. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8110154>

- Roohi, Bano, K., Kuddus, M., Zaheer, M. R., Zia, Q., Khan, M. F., Ashraf, G. Md., Gupta, A., & Aliev, G. (2017). Microbial enzymatic degradation of biodegradable plastics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(5). <https://doi.org/10.2174/1389201018666170523165742>
- Saeedi, M. (2024). How microplastics interact with food chain: a short overview of fate and impacts. *Journal of Food Science and Technology*, 61(3), 403–413. <https://doi.org/10.1007/s13197-023-05720-4>
- Sanchez, C. (2020). Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: an overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances*, 40, 107501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107501>
- Sarmah, P., & Rout, J. (2018). Efficient biodegradation of low-density polyethylene by *cyanobacteria* isolated from submerged polyethylene surface in domestic sewage water. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(33), 33508–33520. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3079-7>
- Sathiyabama, M., Boomija, R. V., Sathiyamoorthy, T., Mathivanan, N., & Balaji, R. (2024). Mycodegradation of low-density polyethylene by *Cladosporium sphaerospermum*, isolated from platisphere. *Scientific Reports*, 14(1), 8351. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59032-4>
- Schmidt, C., Krauth, T., & Wagner, S. (2017a). Export of plastic debris by rivers into the sea. *Environmental Science & Technology*, 51(21), 12246–12253. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02368>
- Schmidt, J., Wei, R., Oeser, T., Dedavid e Silva, L., Breite, D., Schulze, A., & Zimmermann, W. (2017b). Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases. *Polymers*, 9(12), 65. <https://doi.org/10.3390/polym9020065>
- Sekudewicz, I., Dąbrowska, A.M., Syczewski, M.D. (2021). Microplastic pollution in surface water and sediments in the urban section of the Vistula River (Poland). *Science of The Total Environment* 762, 143111. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143111>
- Sheridan, E. A., Fonvielle, J. A., Cottingham, S., Zhang, Y., Dittmar, T., Aldridge, D. C., & Tanentzap, A. J. (2022). Plastic pollution fosters more microbial growth in lakes than natural organic matter. *Nature Communications*, 13(1), 4175. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31691-9>
- Silva, A., Delerue-Matos, C., Figueiredo, S., & Freitas, O. (2019). The use of algae and fungi for removal of pharmaceuticals by bioremediation and biosorption processes: a review. *Water*, 11(8), 1555. <https://doi.org/10.3390/w11081555>

- Silva, R. R. A., Marques, C. S., Arruda, T. R., Teixeira, S. C., & de Oliveira, T. V. (2023). Biodegradation of polymers: stages, measurement, standards and prospects. *Macromol*, 3(2), 371–399. <https://doi.org/10.3390/macromol3020023>
- Skariyachan, S., Patil, A. A., Shankar, A., Manjunath, M., Bachappanavar, N., & Kiran, S. (2018). Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants. *Polymer Degradation and Stability*, 149, 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.01.018>
- Soberón-Chávez, G., Aguirre-Ramírez, M., & Sánchez, R. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(11–12), 675–677. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0243-0>
- Sowmya, H. V., Ramalingappa, Krishnappa, M., & Thippeswamy, B. (2014). Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum* — SEM, FTIR, and NMR analyses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(10), 6577–6586. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3875-6>
- Stabnikova, O., Stabnikov, V., Marinin, A., Klavins, M., Klavins, L., & Vaseashta, A. (2021). Microbial life on the surface of microplastics in natural waters. *Applied Sciences*, 11(24), 11692. <https://doi.org/10.3390/app112411692>
- Stachurek, I. (2012). Problemy z biodegradacją tworzyw sztucznych w środowisku. *Zeszyty Naukowe Wyższej Szkoły Zarządzania Ochroną Pracy w Katowicach*, 1(8), 71–108.
- Szulc, J., Okrasa, M., Nowak, A., Nizioł, J., Ruman, T., & Kuberski, S. (2022). Assessment of physicochemical, microbiological and toxicological hazards at an illegal landfill in Central Poland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(8), 4826. <https://doi.org/10.3390/ijerph19084826>
- Szulc, J., Okrasa, M., Nowak, A., Ryngajłło, M., Nizioł, J., Kuźniar, A., Ruman, T., & Gutarowska, B. (2024). Uncontrolled post-industrial landfill—source of metals, potential toxic compounds, dust, and pathogens in environment—a case study. *Molecules*, 29(7), 1496. <https://doi.org/10.3390/molecules29071496>
- Temporiti, M. E. E., Nicola, L., Nielsen, E., & Tosi, S. (2022). Fungal enzymes involved in plastics biodegradation. *Microorganisms*, 10(6), 1180. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061180>
- Teodonio, L., Missori, M., Pawcenis, D., Łojewska, J., & Valle, F. (2016). Nanoscale analysis of degradation processes of cellulose fibers. *Micron*, 91, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.07.013>

- Thacharodi, A., Meenatchi, R., Hassan, S., Hussain, N., Bhat, M. A., Arockiaraj, J., Ngo, H. H., Le, Q. H., & Pugazhendhi, A. (2024). Microplastics in the environment: a critical overview on its fate, toxicity, implications, management, and bioremediation strategies. *Journal of Environmental Management*, 349, 119433. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119433>
- Thakur, B., Singh, J., Singh, J., Angmo, D., & Vig, A. P. (2023). Biodegradation of different types of microplastics: molecular mechanism and degradation efficiency. *Science of The Total Environment*, 877, 162912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162912>
- Tun, T. Z., Kunisue, T., Tanabe, S., Prudente, M., Subramanian, A., Sudaryanto, A., Viet, P. H., & Nakata, H. (2022). Microplastics in dumping site soils from six Asian countries as a source of plastic additives. *Science of The Total Environment*, 806, 150912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150912>
- Urbanek, A. K., Strzelecki, M. C., & Mirończuk, A. M. (2021). The potential of cold-adapted microorganisms for biodegradation of bioplastics. *Waste Management*, 119, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.031>
- Viel, T., Manfra, L., Zupo, V., Libralato, G., Cocca, M., & Costantini, M. (2023). Biodegradation of plastics induced by marine organisms: future perspectives for bioremediation approaches. *Polymers*, 15(12), 2673. <https://doi.org/10.3390/polym15122673>
- Viljakainen, V. R., & Hug, L. A. (2021). New approaches for the characterization of plastic-associated microbial communities and the discovery of plastic-degrading microorganisms and enzymes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 6191–6200. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.11.023>
- Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1308–1322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710>
- Wilkes, R. A., & Aristilde, L. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 582–593. <https://doi.org/10.1111/jam.13472>
- Wróbel, M., Deja-Sikora, E., Hryniewicz, K., Kowalkowski, T., & Szymańska, S. (2024). Microbial allies in plastic degradation: specific bacterial genera as universal plastic-degraders in various environments. *Chemosphere*, 363, 142933. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142933>
- Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T., & Hryniewicz, K. (2023). Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation.

- Microbiological Research, 267, 127251.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127251>
- Xiang, Y., Rillig, M. C., Peñuelas, J., Sardans, J., Liu, Y., Yao, B., & Li, Y. (2024). Global responses of soil carbon dynamics to microplastic exposure: a data synthesis of laboratory studies. *Environmental Science & Technology*, 58(13), 5821–5831. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c06177>
- Xu, Y., Xian, Z.-N., Yue, W., Yin, C.-F., & Zhou, N.-Y. (2023). Degradation of polyvinyl chloride by a bacterial consortium enriched from the gut of *Tenebrio molitor* larvae. *Chemosphere*, 318, 137944. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137944>
- Yadav, D. K., & Kumar, R. (2023). Microplastic effects in aquatic ecosystems with special reference to fungi–zooplankton interaction: identification of knowledge gaps and prioritization of research needs. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11. <https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1279589>
- Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyaya, Y., Saiganji, A., & Tani, Y. (2001). Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degradation and Stability*, 72(2), 323–327. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00027-1](https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1021/es504038a>
- Yang, Q., Angly, F. E., Wang, Z., & Zhang, H. (2011). Wastewater treatment systems harbor specific and diverse yeast communities. *Biochemical Engineering Journal*, 58–59, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.012>
- Ye, R., Xu, S., Wang, Q., Fu, X., Dai, H., & Lu, W. (2021). Fungal diversity and its mechanism of community shaping in the milieu of sanitary landfill. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 15(4), 77. <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1370-6>
- Yu, H., Qi, W., Cao, X., Hu, J., Li, Y., Peng, J., Hu, C., & Qu, J. (2021). Microplastic residues in wetland ecosystems: do they truly threaten the plant-microbe-soil system? *Environment International*, 156, 106708. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106708>
- Zettler, E. R., Mincer, T. J., & Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science & Technology*, 47(13), 7137–7146. <https://doi.org/10.1021/es401288x>

- Zhang, G. S., & Liu, Y. F. (2018). The distribution of microplastics in soil aggregate fractions in southwestern China. *Science of The Total Environment*, 642, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.004>
- Zhang, H., Feng, J., Chen, S., Li, B., Sekar, R., Zhao, Z., Jia, J., Wang, Y., & Kang, P. (2018). Disentangling the drivers of diversity and distribution of fungal community composition in wastewater treatment plants across spatial scales. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01291>
- Zhang, N., Ding, M., & Yuan, Y. (2022a). Current advances in biodegradation of polyolefins. *Microorganisms*, 10(8), 1537. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081537>
- Zhang, T., Li, X., Rao, X., Peng, Y., Zhao, C., Xu, Y., Li, J., & Wei, J. (2024). Biodegradation of polystyrene and polyethylene by *Microbacterium esteraromaticum* SW3 isolated from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 274, 116207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116207>
- Zhang, Y., Pedersen, J. N., Eser, B. E., & Guo, Z. (2022b). Biodegradation of polyethylene and polystyrene: from microbial deterioration to enzyme discovery. *Biotechnology Advances*, 60, 107991. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107991>
- Zurier, H. S., & Goddard, J. M. (2021). Biodegradation of microplastics in food and agriculture. *Current Opinion in Food Science*, 37, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.09.001>
- Żuchowska, D., Hlavatá, D., Steller, R., Adamiak, W., & Meissner, W. (1999). Physical structure of polyolefin–starch blends after ageing. *Polymer Degradation and Stability*, 64(2), 339–346. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(98\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(98)00212-2)
- Żuchowska, D., Steller, R., & Meissner, W. (1998). Structure and properties of degradable polyolefin-starch blends. *Polymer Degradation and Stability*, 60(2–3), 471–480. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00110-9](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00110-9)

12. Publikacje

12.1 P1 - Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation



Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation

Mariusz Wróbel^{a,b}, Sonia Szymańska^{a,*}, Tomasz Kowalkowski^b, Katarzyna Hryniewicz^a

^a Department of Microbiology, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Lwowska 1, 87-100 Toruń, Poland

^b Department of Environmental Chemistry and Bioanalytics, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Gagarina 7, 87-100 Toruń, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Microplastics
Decomposition
Plastic degradable microorganisms
Bacteria
Fungi

ABSTRACT

Microorganisms degrade microplastics, but their potential is still not fully exploited, e.g., due to inadequate selection of microorganisms. We developed an effective selection method of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation and assessed the scale of polymer degradation by microbial populations.

We isolated seven bacterial strains (three *Priestia megaterium* strains, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter ludwigii*, *Chryseobacterium* sp.) and seven fungal strains (four *Fusarium* spp., two *Lecanicillium* spp. and *Trichoderma* sp.) with PE degradation potential, as well as seven bacterial strains (five *Serratia marcescens* and two *Enterobacter* spp.) and six fungal strains (four *Aspergillus* spp., *Fusarium oxysporum* and *Penicillium granulatum*) with PP degradation ability. Scanning electron microscopy (SEM) analysis confirmed the presence of a biofilm and revealed surface changes in both PE and PP pellets, but the greatest changes (microcracks and corrugations) were observed for PP incubated with bacteria. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy confirmed the structural changes on the studied polymer surfaces.

In conclusion, the isolation of plastic-degrading bacteria and fungi from waste landfills represents an effective strategy for the collection of microorganisms with high potential for PE and PP degradation. The bacteria and fungi revealed better potential for PP degradation and PE degradation, respectively.

1. Introduction

In the middle of the twentieth century, a material that changed almost every industry in the world was discovered. The invention of nylon (trade name of polyamides) caused an increase in the production and use of plastics in every area of human life (Strong, 2006). Generally, these inexpensive production materials are defined as a group of compounds belonging to the family of petroleum-derived organic polymers. Examples include polymers such as polyvinyl chloride, polypropylene, polyethylene, polyethylene terephthalate and polystyrene, which represent approximately 90 % of the produced polymers (Ivar do Sul and Costa, 2014; Vert et al., 2012). These compounds are widely used due to their specific properties and versatility, including relatively low density, high flexibility and corrosion resistance. The multitude of applications has caused a continuous increase in annual production, which started from approximately 1.5 million tons (in the 1950s) to approximately 367 million tons worldwide (in 2020) (Tiseo, 2022). Unfortunately, the ubiquity and large quantities of durable plastic debris negatively affect

the environment (Barnes et al., 2009; Chatterjee and Sharma, 2019; Heimowska, 2016; Unepetty and Evans, 1997). The most numerous plastics, i.e., polypropylene and polyethylene, can be found, for example, in everyday care products. Polyethylene is added to toothpastes, shampoos, face cleaners and moisturizers as well as shaving products (Anderson et al., 2016; Cole et al., 2011; Derraik, 2002; Driedger et al., 2015).

Plastic pollution has led to great interest in the subject by many scientists around the world. The problem of increasing amounts of polymer waste regards not only contamination visible to the naked eye, such as bags and bottles, but increasingly also so-called micro- and nanoplastics. Microplastics are plastics whose particle diameter is within the range of 5 mm – 1 µm, while nanoplastics are regarded as particles smaller than 1 µm (Duis and Coors, 2016; Gigault et al., 2018). In the literature, the division of microplastics into primary and secondary microplastics can be found (Avio et al., 2017). The former type includes purpose-made products, very often used as exfoliants or additives for clothing production (Hidalgo-Ruz et al., 2012). Secondary microplastics

* Corresponding author.

E-mail address: soniasz@umk.pl (S. Szymańska).

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127251>

Received 27 April 2022; Received in revised form 26 October 2022; Accepted 31 October 2022

Available online 8 November 2022

0944-5013/© 2022 Published by Elsevier GmbH. This article is made available under the Elsevier license (<http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>).

are formed as a result of three basic mechanisms of polymer chain destruction (depolymerization, destruction, degradation) (Porejko et al., 1974; Sikorski, 1985). As a result of the above processes, monomers, other low-molecular-weight compounds or polymer fragments with large but smaller molecular masses are formed.

The problem of pollution with these substances concerns all living environments on Earth. Waste that originates from polymeric materials may constitute 80 % of all the waste found in aquatic ecosystems (Holm et al., 2013). The presence of microplastics is related to their very wide range of applications and their properties. The low density of plastics, as well as their high durability, allows their facile distribution and transport around the globe with wind and water currents. This fact explains their presence even on isolated islands or in the Antarctic and Arctic (Hammer et al., 2012; Lubbadah, 2014).

Plastic degradation occurs as the result of various factors that change the chemical and physical structure of polymers, e.g., chemical and environmental factors (humidity, light, heat). It can also be the result of biological activity (Pospíšil and Nešpůrek, 1997). The first reports on the destructive potential of microorganisms in relation to polymeric materials were published in the first half of the XXth century (Lenz and Marchessault, 2005). The biodegradation process refers to mechanisms by which organic substances are destroyed using living organisms, and this term is widely used in relation to ecology, waste management and remediation (Shah et al., 2008). According to Shah et al. (2008), the decomposition of high-molecular-weight polymers into CO₂ requires cooperation between several types of microorganisms characterized by different metabolic properties. The reason is that only some of these microbes will be able to break down the polymer into monomers. The created monomers can be processed only by organisms with other specific properties. Their activity leads to the formation of simpler compounds, which are secreted and broken down by the last group of microbes (Shah et al., 2008). It is worth noting that the efficiency of microorganisms' degradation capacity varies under different conditions. These processes are proposed to be mainly due to the involvement of extra- and intracellular depolymerases (Donaruma, 1991; Gu, 2003). Moreover, according to Lugauskas et al. (2003), exoenzymes secreted by microorganisms can catalyze reactions principally at the boundaries of the plastic polymer.

Bacteria and fungi isolated from different environments – compost, soil, sea water and sludge, can possess biodegradation properties of PP and PE (Montazer et al., 2020). In the scientific literature, there are more known examples of the biodegradation of PE by bacteria and fungi (Bonhomme et al., 2003; El-Shafei et al., 1998; Mohanan et al., 2020; Nowak et al., 2011). The biodegradation process of PP is quite demanding and difficult. Therefore, the pretreatments of the PP can be used before biodegradation, e.g. Arkatkar et al. (2010) treated PP with UV light before inoculation with *Bacillus flexus* and revealed 2.5 % reduction in polymer weight, compared to non-inoculated control variant. It was confirmed that PE known for its high density (HDPE) can be decomposed by bacteria of the *Arthrobacter* family (polymer weight decrease by 12.23 %) and *Pseudomonas* (polymer weight decrease by 15.18 %), although the degradation is slower than in the case of polyethylene lower density (LDPE) (Zheng et al., 2005). Recent studies on the biodegradation of PE have shown that some bacterial strains are capable of not only reducing the mass of the polymer, but also bioconverting to biodegradable polyhydroxyalkanoate polymers (Montazer et al., 2019).

We hypothesized that soil microorganisms isolated from scrap heaps will degrade polymers, while the efficiency of that process will depend on specific groups of microorganisms (bacteria or fungi) and plastic (PE or PP) types. The applied methodology and results obtained in this work will allow the isolation and selection of microorganisms capable of biodegradation of polymers.

We assumed that natural biological material collected from a landfill will contain some microorganisms capable of utilizing polymers (PE and PP) as the primary source of carbon and ultimately degrade

microplastics very rapidly. The decomposition process (efficiency and scale of degradation) may depend on many factors, e.g., the type of polymer and the group of microorganisms (bacteria or fungi). Our aim is also to develop an effective method for the selection of bacteria and fungi capable of degrading the studied polymers and to evaluate the degree of changes occurring using appropriate techniques.

2. Materials and methods

2.1. Polymer sample preparation

Granular polymers (polyethylene, PE; polypropylene, PP) were obtained from Department of Physical Chemistry and Physicochemistry of Polymers, Nicolaus Copernicus University in Toruń. Thirty uniformly sized granules (1350 – 1800 µm) of each polymer were placed in 100 ml conical flasks containing 20 ml 0.85 % NaCl. Prepared flasks were sterilized for 15 min at 120 °C and used in further analyses.

2.2. Soil sample collection

Soil samples were collected in the autumn of 2019 from a municipal waste landfill site located in Toruń (Poland) belonging to the Municipal Waste Disposal Plant (Miejskie Przedsiębiorstwo Oczyszczania Sp. z o. o.). Three soil samples (20 × 20 × 20 cm) were taken from different landfill sites (S1, S2, S3) using sterile tools. Each sample was collected in a separate bag to avoid contamination and transported immediately to the laboratory for analysis.

2.3. Selection of polymer-degrading bacteria and fungi

Serial dilutions (10⁻¹-10⁻⁵) in 0.85 % NaCl solution were prepared for the three soil samples (S1, S2, S3). Two dilutions of 10⁻³ and 10⁻⁵ were selected and used for inoculation. Previously prepared sterile flasks with 0.85 % NaCl and polymer granules were enriched with antibiotics (100 mg l⁻¹ nystatin to select bacteria and 40 mg l⁻¹ tetracycline to select fungi) and inoculated with diluted soil (two polymers: PP and PE; three soils: S1, S2 and S3; two dilutions: 10⁻³ and 10⁻⁵, with two technical replicates; two types of selected microorganisms: bacteria and fungi; a total of 48 flasks used to isolate microorganisms; and 4 flasks prepared as a control with polymers and antibiotics but without dilutions). Bacteria and fungi were incubated for one month at 26 °C with shaking. After that time, the incubated samples were passaged three times in new sterile conical flasks containing 20 ml 0.85 % NaCl and thirty granules (1 ml suspension was transferred to a new 100 ml conical flask containing 20 ml 0.85 % NaCl and an appropriate antibiotic) and incubated for 8, 6 and 4 weeks.

Samples obtained after the last passage (a total of 3 months of microorganism incubation) were plated in triplicate on R2A (Difco) plates supplemented with nystatin (Sigma, 100 µg ml⁻¹) and on PDA (Difco) plates enriched with tetracycline (Sigma, 40 mg l⁻¹). The plates were incubated for 7 days at 26 °C. Based on the morphological features of microorganisms, 13 fungal and 14 bacterial colonies were selected and subjected to 16S/18S rRNA identification.

2.4. DNA isolation and identification of microorganism strains

Selected bacterial strains were identified based on 16S rRNA gene sequencing. Genomic DNA was isolated using the Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx). Selected fungal strains were identified based on 18S rRNA gene sequencing. Genomic DNA was isolated using the Plant & Fungi DNA purification Kit (EURx). Isolation was performed according to a standard procedure given by the manufacturer with a modified elution step (50 µl elution buffer was used for DNA isolation instead of 100–200 µl proposed by the manufacturer). The quality and quantity of the isolated DNA were estimated spectrophotometrically (UV-Vis, NanoDrop 2000). The obtained DNA was used as a

matrix for PCR. The following primers were used for the PCR amplification of 16S ribosomal DNA: 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Miller et al., 2013). The following primers were used for the PCR amplification of 18S ribosomal DNA: ITS1 (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Gardes and Bruns, 1993), (White et al., 1990). PCRs were carried out using FirePol MasterMix 7.5 mM MgCl₂ (CytoGen, Poland). The cycling conditions were as follows: 10 cycles of 3 min at 94 °C, 45 s at 60 °C, 1 min at 72 °C, 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 50 °C, 1 min at 72 °C and finally 7 min at 72 °C (fungal DNA). The bacterial DNA conditions were as follows: one cycle of 2 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 2 min at 72 °C, and one final cycle of 5 min at 72 °C. The presence and size of the PCR products stained with Simply Safe (EurX) were assessed using 2.0 % w/v agarose gels. The PCR products were purified using a PCR/DNA Clean-up Purification Kit (EURx) according to the manufacturer's protocol. The fragments were sequenced using appropriate primers for the identification of bacteria (27F and 1492R) and fungi (ITS1 and ITS4). Sequencher 5.1 (Gene Codes 20) software was used to assemble the forward and reverse sequences. The acquired sequences were analyzed using reference sequences deposited in the GenBank nucleotide database. A minimum of 99 and 97 % similarity was required for appropriate identification bacteria and fungi, respectively. All of the obtained DNA sequences were submitted to GenBank.

2.5. SEM analysis

One polymer granule per variant of experiment (two polymers: PP and PE; three soils: S1, S2 and S3; two dilutions: 10⁻³ and 10⁻⁵, with two technical replicates; two types of selected microorganisms: bacteria and fungi; three incubation times: 2, 2.5 and 3 months; a total of 144 granules tested to investigate microorganisms' effects on polymers; 4 PE and PP granules from noninoculated variants additionally prepared as a control per incubation time; and a total 12 granules analyzed as controls) after a 90-day incubation period was washed several times with sodium azide solution (0.1 %, Chempur, Poland), followed by several times with distilled water. The sample was then fixed in 2 % glutaraldehyde in phosphate buffer (pH 7.2) and dehydrated in ethanol. After fixation, the sample was dried at room temperature and sputter-coated with gold. After this polymer granule was examined with scanning electron microscopy (Quanta 3D FEG scanning electron microscope SEM/FIB) using secondary electron emission mode with high-vacuum mode at 30 kV. The effect of microorganisms on granule surfaces was observed at magnifications of 200×, 500×, 1000×, 5000×, 10,000×, and 50,000× for fungi and 200×, 1000×, 5000×, 10,000×, and 50,000× for bacteria. The obtained images were analyzed by comparing those of granules treated by microorganisms to those of control granules (noninoculated variants).

2.6. Estimation of biofilm formation

After each passage (microorganisms incubated for 2, 2.5 and 3 months with polymers), 10 granules (5 beads from each technical replicate) of polymer for each variant of the experiment (two polymers: PP and PE; three soils: S1, S2 and S3; two dilutions: 10⁻³ and 10⁻⁵) were taken for biofilm assessment. The biofilm assessment applies only to bacteria. Biofilm formation was estimated according to the method described by O'Toole with slight modification (O'Toole et al., 1999). Briefly, collected granules were gently rinsed with distilled water and dried at 60 °C (45 min). Then, bacterial cells bound to the granules were stained with 300 µl 0.5 % crystal violet for 15 min at room temperature. Unbound crystal violet was removed by rinsing the granules with distilled water, and the rinsed granules were dried at room temperature and subjected to spectrophotometric analysis (Synergy HT Multi-Mode microplate reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). The biofilm was dissolved in 80 % ethanol, and then, absorbance changes were

tested at a wavelength of 590 nm.

2.7. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy analysis

The granules obtained after three incubation periods (polymers incubated with microorganisms for 2, 2.5 and 3 months) were rinsed with 0.1 % sodium azide solution (Chempur, Poland) to remove microorganisms from their surface, and washed several times with distilled water. The obtained material was subjected to IR analysis. The samples in granular form were analyzed by infrared spectroscopy using a vacuum FT-IR Vertex 70v spectrometer with a Hyperion 1000/2000 microscope (Bruker Optik). Samples taken at different incubation times were compared with control samples (untreated by microorganisms). The carbonyl index (CI) was determined based on the work of Almond et al. (2020). The CI was calculated as the average value of five random bands received after analysis of five different granules of PE or PP. The area of the band was calculated with the use of the Bruker OPUS 7.0 FTIR software.

3. Results

3.1. Identification of bacteria and fungi with plastic degradation potential

In total, 27 strains of microorganisms were identified by comparative 16S/18S rRNA and ITS sequence analysis: 14 bacterial and 13 fungal strains (Table 1, Table 2).

From each polymer (PE and PP), 7 bacterial strains were isolated and identified. Among the bacteria obtained from PE samples, three strains were Gram-positive and belonged to Bacillota (*Priestia megaterium*), and the remaining four strains were Gram-negative and were represented by the phyla Pseudomonadota (*Klebsiella pneumoniae* PE-S2-12bb, *Pseudomonas fluorescens* PE-S2-4B, *Enterobacter ludwigii* PE-S1-11bb) and Bacteroidota (*Chryseobacterium* sp. PE-S3-3B). Only representatives of Pseudomonadota were found in variants with PP. Among the identified strains, *Serratia marcescens* was the most frequent species (5 of 7); additionally, the presence of two *Enterobacter* sp. was noted (Table 1). There were no identified strains belonging to the same species among bacteria isolated from samples with PP and PE (Table 1).

All of the identified fungi belonged to the phylum Ascomycota. Among the 7 identified fungi isolated from PE samples, two strains of *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Lecanicillium araneicola* as well as one *Trichoderma lixii* strain were noted. In the case of 6 fungal strains isolated from PP samples, two strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*, one strain of *F. oxysporum* and one strain of *Penicillium granulatatum* were identified. Only *F. oxysporum* was found in both PE and PP samples (Table 2).

3.2. Effect of bacteria and fungi on the polymer surface

The effects of bacterial and fungal incubation with polymers on PP and PE surfaces as observed by scanning electron microscopy (magnifications of 5000×, 10,000× and 50,000×) are shown in Fig. 1 and Fig. 2. Images from a to c show the results of SEM analysis for tested polymers incubated with microorganisms, while images d – f present polymer surfaces untreated by bacteria and fungi, i.e., the control variant. The images show the most representative samples, i.e., fungi in the case of polyethylene and bacteria for polypropylene (Fig. 1 and Fig. 2). SEM analysis of the polymeric material showed significant changes during the incubation process. The surfaces of both types of polymeric granules (PE and PP) were analyzed with respect to the external structure (cracks, deformations) and the presence of microorganisms on their surface (Fig. 1, Fig. 2, Supplementary Figure 1).

The structures of polyethylene granules untreated by microorganisms (control samples) were not very different (images d – f). The surface was relatively smooth (slight wrinkling on the surface was visible), with no pores or microdamage visible at the applied magnification. There

Table 1

Identified bacterial strains isolated from samples containing PE or PP, as determined by 16S rDNA nucleotide sequencing (abbreviations: BA – Bacillota, PS – Pseudomonadota, B- Bacteroidota).

| Polymer | Number | Strain | GenBank Accession number | bp | Blast NCBI | Degree of coverage (%) |
|---------|--------|---|--------------------------|------|---|------------------------|
| PE | 1 | <i>Prestia megaterium</i> PE-S2–5b (BA) | OL913964 | 1443 | <i>Bacillus megaterium</i> [KJ789369] | 1440/1441 (99 %) |
| | 2 | <i>Prestia megaterium</i> PE-S1–14b (BA) | OL913972 | 1424 | <i>Bacillus megaterium</i> [CP031777] | 1424/1424 (100 %) |
| | 3 | <i>Prestia megaterium</i> PE-S2–15bb (BA) | OL913973 | 1433 | <i>Bacillus megaterium</i> [KJ789369] | 1432/1432 (100 %) |
| | 4 | <i>Klebsiella pneumonia</i> PE-S2–12bb (PS) | OL913970 | 1427 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> [KJ803915] | 1419/1419 (100 %) |
| | 5 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> PE-S2–4B (PS) | OL913963 | 1427 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> [KF444431] | 1418/1419 (99 %) |
| | 6 | <i>Enterobacter ludwigii</i> PE-S1–11bb (PS) | OL913969 | 1413 | <i>Enterobacter ludwigii</i> [CP018785] | 1412/1412 (100 %) |
| | 7 | <i>Chryseobacterium</i> sp. PE-S3–3B (B) | OL913962 | 1408 | <i>Chryseobacterium</i> sp. [AY468478] | 1377/1383 (99 %) |
| PP | 1 | <i>Serratia marcescens</i> PP-S1–13bb (PS) | OL913971 | 1417 | <i>Serratia marcescens</i> [AP019009] | 1415/1415 (100 %) |
| | 2 | <i>Serratia marcescens</i> PP-S3–10BB (PS) | OL913968 | 1428 | <i>Serratia marcescens</i> [CP027300] | 1428/1428 (100 %) |
| | 3 | <i>Serratia marcescens</i> PP-S2–9BB (PS) | OL913967 | 1409 | <i>Serratia marcescens</i> [CP027300] | 1409/1409 (100 %) |
| | 4 | <i>Serratia marcescens</i> PP-S1–7B (PS) | OL913966 | 1430 | <i>Serratia marcescens</i> [JQ308599] | 1426/1426 (100 %) |
| | 5 | <i>Serratia marcescens</i> PP-S1–2B (PS) | OL913961 | 1442 | <i>Serratia marcescens</i> [CP027300] | 1433/1433 (100 %) |
| | 6 | <i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> PP-S1–6B (PS) | OL913965 | 1425 | <i>Enterobacter xiangfangensis</i> [CP017183] | 1423/1423 (100 %) |
| | 7 | <i>Enterobacter</i> sp. PP-S1–1B (PS) | OL913960 | 1423 | <i>Enterobacter</i> sp. [HF572841] | 1421/1422 (99 %) |

Table 2

Identified fungal strains isolated from samples containing PE or PP, as determined by 18S rDNA nucleotide sequencing.

| Polymer | Number | Strain | Accession number | bp | Blast NCBI | Degree of coverage (%) |
|---------|--------|--|------------------|-----|---|------------------------|
| PE | 1 | <i>Fusarium solani</i> PE-S1–14 g | OL919442 | 592 | <i>Fusarium solani</i> [MH864512] | 587/589 (99 %) |
| | 2 | <i>Fusarium solani</i> PE-S1–18 g | OL919446 | 569 | <i>Fusarium solani</i> [JX524021] | 558/560 (99 %) |
| | 3 | <i>Fusarium oxysporum</i> PE-S1–15 g | OL919443 | 585 | <i>Fusarium oxysporum</i> [KR094464] | 581/586 (99 %) |
| | 4 | <i>Fusarium oxysporum</i> PE-S1–17 g | OL919445 | 585 | <i>Fusarium oxysporum</i> [KR094464] | 581/584 (99 %) |
| | 5 | <i>Lecanicillium araneicola</i> -PE-S1–6 g | OL919438 | 637 | <i>Lecanicillium araneicola</i> [AB378506] | 582/600 (97 %) |
| | 6 | <i>Lecanicillium araneicola</i> PE-S1–13 g | OL919441 | 636 | <i>Lecanicillium araneicola</i> [NR_121208] | 582/600 (97 %) |
| | 7 | <i>Trichoderma lixii</i> PE-S1–19 g | OL919447 | 573 | <i>Hypocrea lixii</i> [GU046487] | 573/573 (100 %) |
| PP | 1 | <i>Aspergillus flavus</i> PP-S3–1 g | OL919436 | 635 | <i>Aspergillus flavus</i> [MH279451] | 631/631 (100 %) |
| | 2 | <i>Aspergillus flavus</i> PP-S3–10 g | OL919440 | 635 | <i>Aspergillus flavus</i> [MH279451] | 631/631 (100 %) |
| | 3 | <i>Aspergillus fumigatus</i> PP-S1–9 g | OL919439 | 625 | <i>Aspergillus fumigatus</i> [NR_740380] | 625/625 (100 %) |
| | 4 | <i>Aspergillus fumigatus</i> PP-S2–5 g | OL919437 | 598 | <i>Aspergillus fumigatus</i> [KP131567] | 594/595 (99 %) |
| | 5 | <i>Fusarium oxysporum</i> PP-S3–16 g | OL919444 | 585 | <i>Fusarium oxysporum</i> [GU566301] | 581/583 (99 %) |
| | 6 | <i>Penicillium granulatum</i> PP-S1–21 g | OL919448 | 586 | <i>Penicillium granulatum</i> [DQ681334] | 581/584 (99 %) |

were no microorganisms on the surface. We also obtained images of the polymer (PE) after 90 days of incubation with fungi. The surface of the granule was covered with shreds of different lengths. Empty spaces in the images visibly demonstrate delicate pits in the granule structure. Microdamage to the outer layer of the structure is clearly visible, especially in image c (Fig. 1).

Even a 90-day exposure of polypropylene to bacteria brought measurable results (Fig. 2). The obtained SEM images (images a - c) showed bacterial cells attached to the granule surface and biofilm

formed in many places on the tested area. The structure of the polymer showed a highly undulating surface (image a). The height density of bacteria colonizing PP granules and the evidently changed surface structure revealed the plastic biodegradation capacity of these microorganisms. For comparison, the surface of the polymer without exposure to bacteria (images d - f) was smooth, showing no folds (Fig. 2).

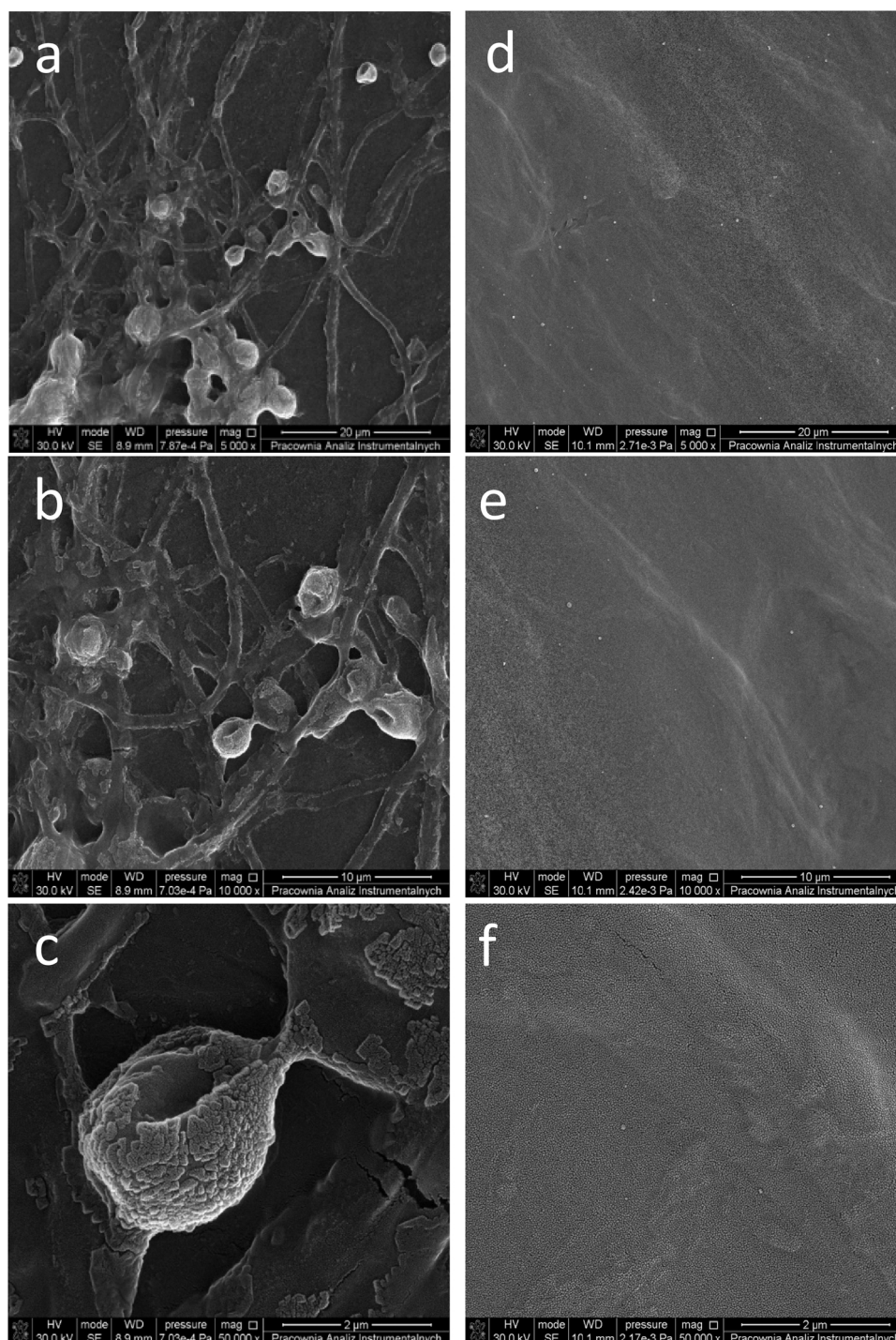


Fig. 1. Scanning electron micrographs of polyethylene film after 90 days of incubation with fungi (magnification of: a – 5,000×; b – 10,000×; c – 50,000×) and incubation without microorganisms – control (magnification of: d – 5,000×; e – 10,000×; f – 50,000×).

3.3. Biofilm analysis

The presence of microorganisms forming the biofilm was confirmed not only by the SEM method but also spectrophotometrically. Depending on the type of polymer, the number of microorganisms forming the biofilm differed, which directly influenced the measured absorbance value. The smaller the incubation time was, the smaller the differences in the measured parameter values in regard to both polymers. As the incubation process progressed, the number of microorganisms forming the biofilm on polypropylene granules clearly increased. In the case of polyethylene pellets, an increase in absorbance values was also

observed, but this change was not substantial (Fig. 3).

3.4. Analysis of Fourier Transform Infrared spectroscopy spectra

3.4.1. Polyethylene

The degree of polymer biodegradation by microorganisms was evaluated through infrared spectroscopy by analyzing the changes in the intensity of bands indicating the presence of C-H bonds and the possible appearance of completely new bonds, such as oxygen-containing bonds (Pasiczna-Patkowska and Lesiuk, 2013). Pure polyethylene has intense bands at wavenumbers of approximately 2920 and 2848 cm^{-1} , which

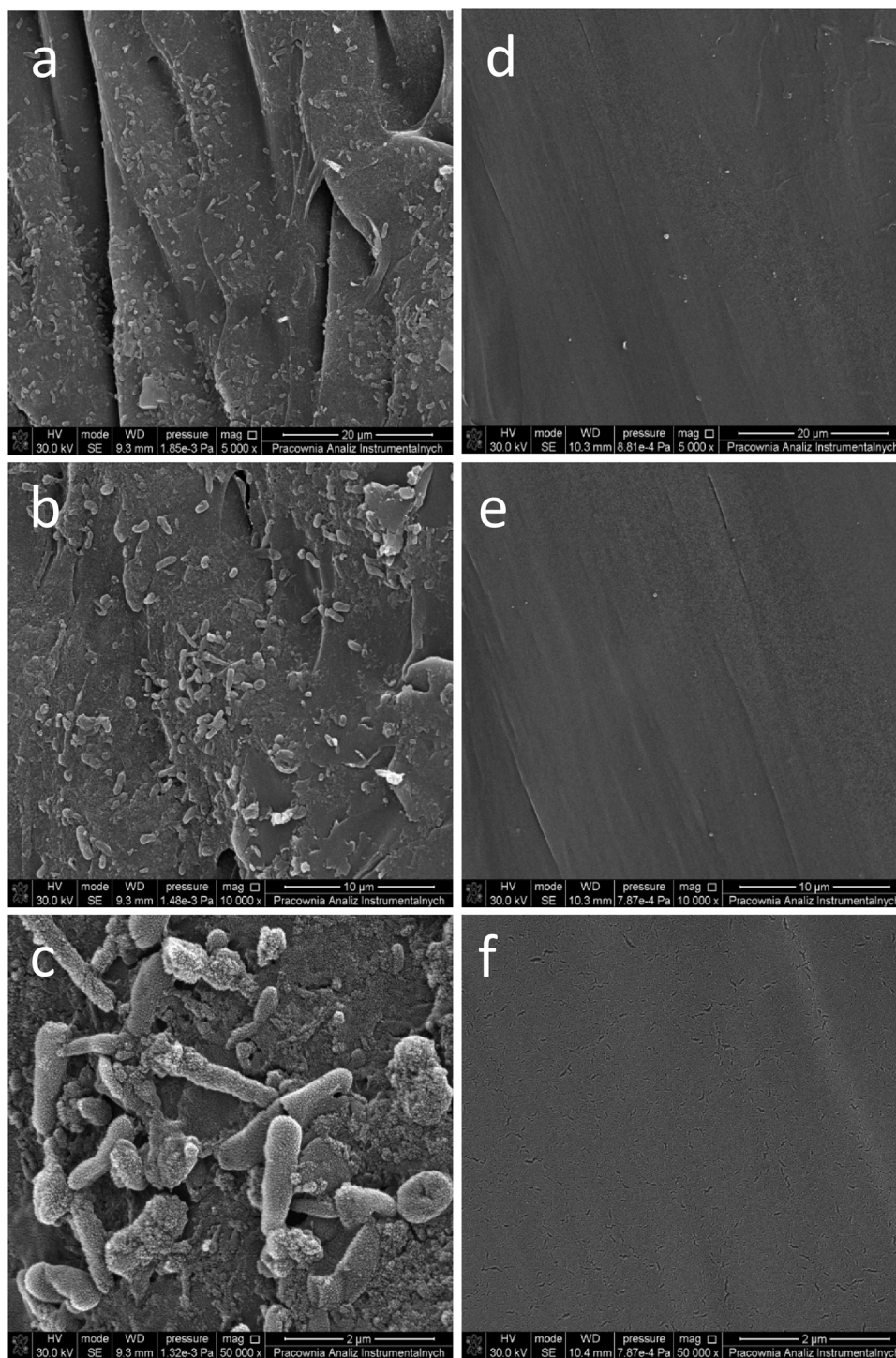


Fig. 2. Scanning electron micrographs of polypropylene film after 90 days of incubation with bacteria (magnification of: a –5000 ×; b - 10,000×; c – 50,000×) and incubation without microorganisms – control variant (magnification of: d – 5000×; e – 10,000×; f – 50,000×).

correspond to the C-H stretching vibrations; intense bands at approximately 1460 cm^{-1} (C-H deformation vibrations); and medium intensity bands at approximately 725 cm^{-1} (rocking deformations). The splitting of the bands is usually caused by the degree of crystallinity of the polyethylene. In this case, additional bands can be observed at lengths of 1470 cm^{-1} and 730 cm^{-1} (Pasiczna-Patkowska and Lesiuk, 2013) (Fig. 4).

For better readability of the obtained spectra, they were divided into two areas where any changes occurred (the spectra were recorded in the full wavenumber range of $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) (Fig. 4b and c). Polyethylene

from control samples without the addition of microorganisms (incubation only in 0.85 % NaCl solution with antibiotics, i.e., nystatin and tetracycline) is assigned as red. The blue line indicates the polyethylene sample incubated with fungi in NaCl salt solution and tetracycline (inhibiting bacterial growth). The green line represents the spectra of polyethylene incubated with bacteria in 0.85 % NaCl solution and nystatin (an antibiotic that inhibits fungal growth) (Fig. 4).

Comparison of the obtained spectra shows significant differences in band intensities at 2915 cm^{-1} (asymmetrical tensile vibrations of the methylene CH_2 group) and 2848 cm^{-1} (symmetrical vibrations of the

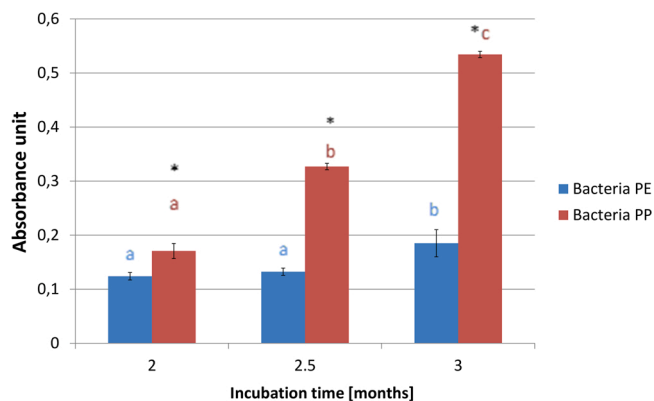


Fig. 3. Biofilm formation on the polymer surface (polypropylene, PP; polyethylene, PE) by bacteria after 2, 2.5 and 3 months of incubation. The red color corresponds to the development of biofilm on the surface of polypropylene, blue - on the surface of polyethylene. The mean values \pm standard deviation are presented ($n = 3$). ANOVA was performed to check significant differences between PE and PP for a specific passage (*) and significant differences between passages for a given polymer (small letter).

CH₂ group) (Fig. 4a and b). The samples with the most intense signals were the controls, which were devoid of the influence of microorganisms (a lack of bacteria and fungi was confirmed in the cultures). Incubation of the polymer with microorganisms resulted in lower intensities of the spectral bands (blue and green). Moreover, additional bands at approximately 3360 cm⁻¹ appeared, most likely indicating the presence of -OH groups originating from carboxylic acids in the structure. It should be noted that these bands were only noticeable for samples incubated with fungi (Fig. 4a and b).

Additional bands for materials incubated with fungi appeared at approximately 1659 cm⁻¹ and 1632 cm⁻¹ (Fig. 4a and c). These bands may indicate the presence of C=O bonds in the polymer structure. The band at 1659 cm⁻¹ may also be from C=O groups coupled with C=C double bonds of vinyl groups. The C-H deformation vibrations assigned to bands at approximately 1472 cm⁻¹ and 1463 cm⁻¹ were also less intense than those of the control sample. The situation was similar at 730 and 719 cm⁻¹. The spectral bands of polymers incubated with added microorganisms were much less intense than those of the control sample (Fig. 4a and c).

Incubation of polyethylene with fungal strains led to more than 10 times higher carbonyl index values (CI = 0820 \pm 0009), compared to incubation with bacterial material (CI = 0080 \pm 0002), as well as control samples (CI = 0030 \pm 0007).

3.4.2. Polypropylene

Pure polypropylene has bands at approximately 2950, 2918 and 2836 cm⁻¹, which correspond to C-H tensile vibrations, and bands at approximately 1456 cm⁻¹ are from CH₂ deformation vibrations (Fig. 5). Bands at approximately 1376 cm⁻¹ are from symmetrical deformation vibrations CH₃, and peaks at 1166, 998, 974 and 842 cm⁻¹ are isotactic polypropylene bands (Fig. 5a and c).

The changes that can be observed in the analysis of polypropylene spectra mainly represent a reduction in band intensity at certain wavenumbers, similar to that of polyethylene. The most intense band (red) represents the control samples. The blue line represents the bands derived from polymer samples incubated with fungi, while green represents the spectra of polymers incubated with bacteria (Fig. 5).

4. Discussion

It is known that the complete degradation of polymers can take up to several decades. However, changes that can be observed even after a few months may indicate that this long-term process has begun. The

biological materials obtained from the landfill allowed for the isolation of several strains of microorganisms. Carbon from polymers, which served as the only source of food for bacteria and fungi, allowed sufficient growth and survival of 8 different strains of bacteria and 8 different strains of fungi. The degradation of these polymers was measured by comparing the spectroscopic spectra (modifications of chemical functional groups) of samples treated with microorganisms and control variants. In addition, the biofilm formed on the surface of the polymers was compared, where biofilm formation is known to be an initial step in the degradation process (Orr et al., 2004). Structural changes were also analyzed using SEM.

Based on the literature, biodegradation of polyethylene by microorganisms was investigated as early as the 1990s (Pometto et al., 1992). The difficulty of degrading this polymer is mainly due to its high molecular weight. In addition, this polymer lacks functional groups and is insoluble in aqueous solutions (Arutchevi et al., 2008). The presence of biofilms on the polymer surface may indicate that biodegradation has occurred. There are known cases of the use of bacteria to break down polyethylene. This activity was confirmed by Pometto et al. (1992), who analyzed strains of *Streptomyces* spp. (*badius*, *setonia* or *viridosporus*). *Bacillus* spp. were observed in a large portion of all described cases of PE biodegradation (Nowak et al., 2011; Kawai et al., 2004; Watanabe et al., 2009; Sudhakar et al., 2008; Roy et al., 2008; Seneviratne et al., 2006). The list of specific *Bacillus* strains contains 9 cases of biodegradability of the tested polymer (Restrepo-Flórez et al., 2014) but does not apply to the *P. megaterium* (former *Bacillus megaterium*) strain that was isolated from soil samples taken at a landfill. *S. marcescens* has been described as a bacterium capable of polyethylene degradation (Azeko et al., 2015). Information on the use of strains such as *Chryseobacterium* sp., *Enterobacter* spp. (e.g. *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis*, *E. ludwigii*) or *K. pneumoniae* has not yet been published, which is undoubtedly an additional advantage of the present study. *P. fluorescens* (Nowak et al., 2011) was found in the isolated soil material under study and at the same time it was shown to be capable of biodegradation. Of all the bacterial strains isolated in the experiment, *P. megaterium* appears to be the most promising in terms of application in open systems, as it is the only strain that does not show a pathogenic character.

In the literature, the number of fungal strains described as being associated with the polyethylene degradation process is much smaller than the number of bacterial strains. It is generally accepted that fungi degrade polyethylene more efficiently than bacteria (Muhonja et al., 2018). The first reason for this difference is the ability of fungi to attach to the hydrophobic surface of the polymer. Additionally, extracellular enzymes targeting insoluble fibers are produced and survive under stressful growth conditions. Strains of the genera *Aspergillus* (Koutny et al., 2006; Manzur et al., 2004; Pramila and Ramesh, 2017), *Fusarium* (Albertsson and Karlsson, 1990; Albertsson, 1980) and *Penicillium* (Seneviratne et al., 2006; Volke-Septúlveda et al., 2002) are probably the best known. The first reference of the use of the potential of fungi dates back to the early 1980s (Albertsson, 1980). The strains that were isolated in this experiment, namely, *L. araneicola*, *F. solani* and *T. lixii*, were not previously described as those associated with the PE degradation process. Although the abovementioned strains show some degradation potential against polyethylene, in practice, due to their pathogenic nature, they cannot be used in open systems, which could lead to their spread.

As in the case of polyethylene, the change in the external structure of the tested polypropylene (numerous microcracks, grooves on the surface or uneven edges) undoubtedly suggests the occurrence of degradation processes. Biofilm formation by bacteria is nothing new with regard to polypropylene (Iibuchi et al., 2010); however, the type of bacteria found to be involved in this process may represent a new discovery. Polypropylene is considered to be a polymer with much lower degradability than that of PE. Nevertheless, it is possible to find research that addresses the biodegradation of PP by bacteria belonging to the genera *Alcaligenes*, *Pseudomonas* and *Vibrio* (Cacciari et al., 1993) or by using *Bacillus cereus* and *Sporosarcina globispora* (Helen et al., 2017).

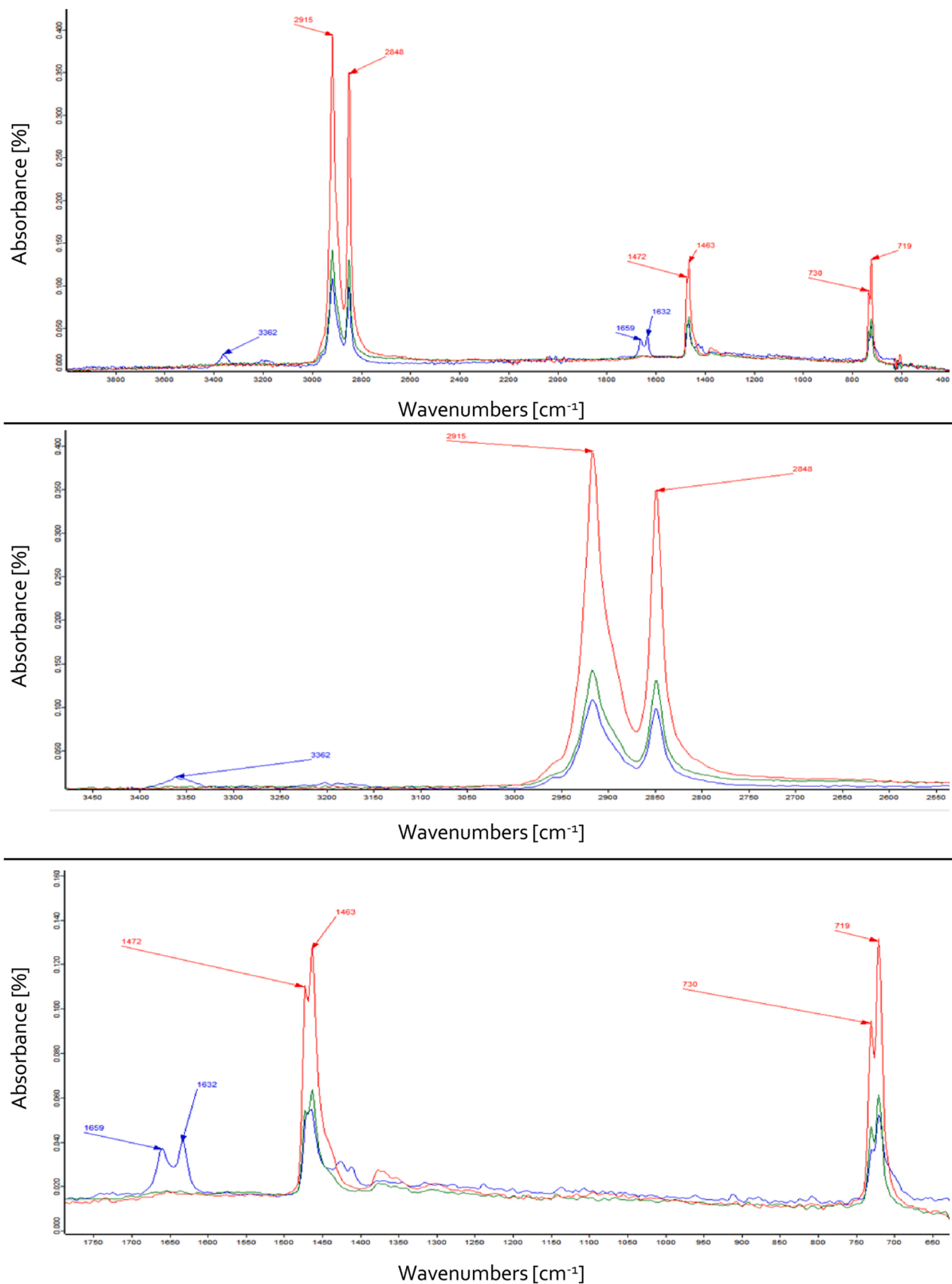


Fig. 4. Representative IR spectra for polyethylene granules untreated by microorganisms (control – red line) and incubated with bacteria (green line) and fungi (blue line) after the second passage (90 days of incubation). Full-range spectra (wavenumber range: 4000–400 cm⁻¹) are presented in A, and the most different areas of spectra in panel A are presented in panels B and C.

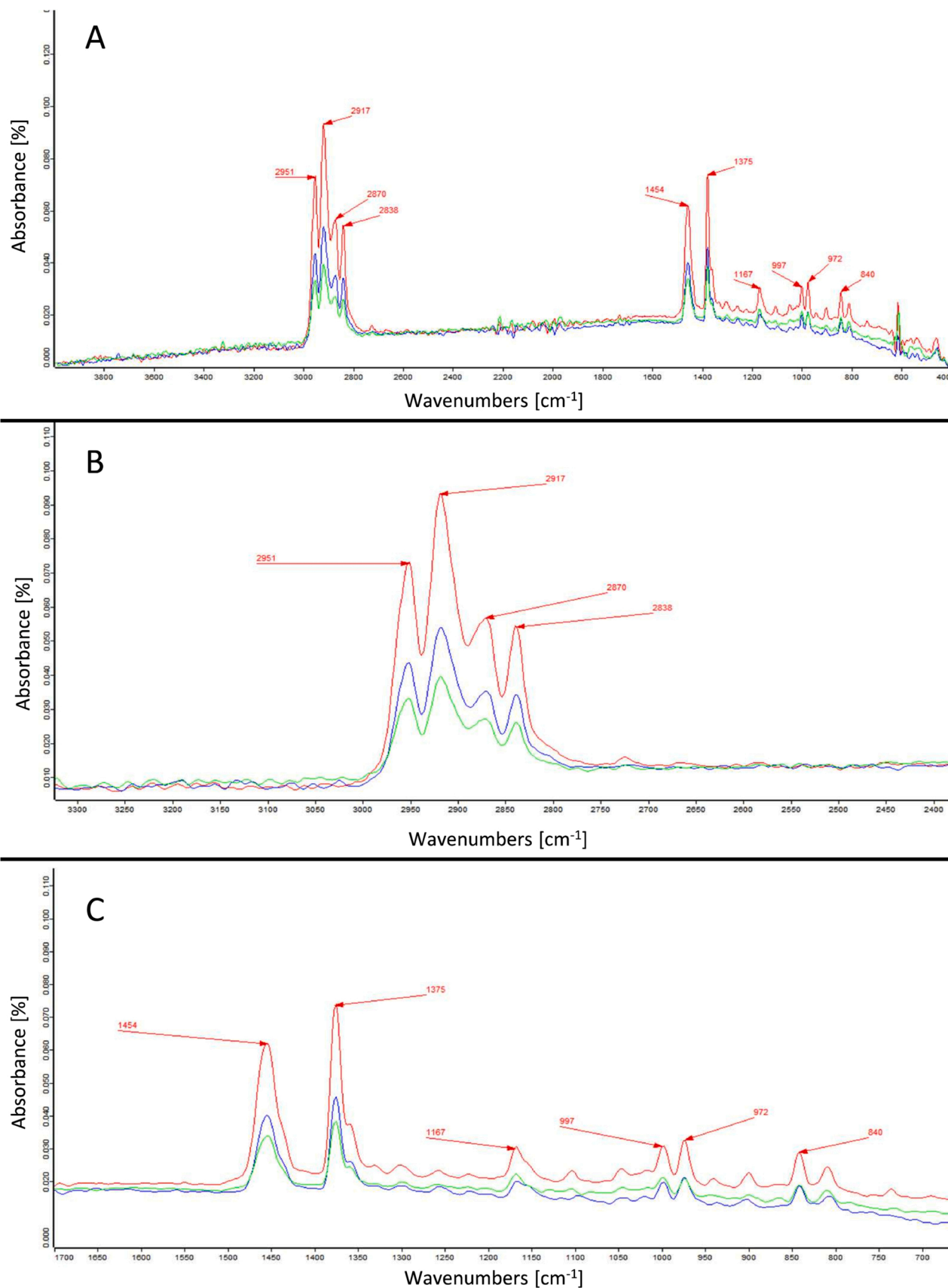


Fig. 5. Representative IR spectra for polypropylene granules untreated by microorganisms (control – red line) and incubated with bacteria (green line) and fungi (blue line) after the second passage (90 days of incubation). Full-range spectra are presented in panel A, and the most different areas of spectra A are presented in panels B and C.

Aspergillus niger, *A. terreus*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotii*, and *Scopulariopsis brevicaulis* are fungal strains that have been described as having degradative potential for PP (Strömberg and Karlsson, 2009). The possibility of growing cultured strains of *A. flavus*, *F. oxysporum* or *P. granulatum* for a three-month incubation period using polypropylene as the only carbon source allows us to determine their degradation potential. Changes observed in SEM images in the form of cracks or small gaps indicate changes in the structure of a given polymer. Spectrophotometric analysis showed that fungi incubated with polypropylene granules were able to survive over a three-month period without supplementation of an additional carbon source.

Comparing the spectra of the two polymers, there were clear differences in the changes that occurred over the three-month period. In the case of polyethylene, we observed the formation of oxygen-containing bonds (at approximately 3360 cm^{-1}), most likely indicating the presence of -OH groups originating from carboxylic acids in the structure, and at approximately 1659 cm^{-1} and 1632 cm^{-1} . These bands may indicate the presence of C=O bonds in the polymer structure. The bond at 1659 cm^{-1} may additionally be due to C=O groups coupled with C=C double bonds of vinyl groups), which undoubtedly indicates polymer degradation (Pasiczna-Patkowska and Lesiuk, 2013). The polypropylene spectrum in this respect is a weak source of information, and apart from the decrease in intensity of bonds characteristic of PP, no significant changes can be seen.

Some of the isolated strains have already been described as potential microorganisms that may be involved in polymer degradation. One example is *P. fluorescens*, described by Mogil'nitskii and others as a strain capable of degrading polyvinyl chloride (Mogil'nitskii et al., 1987). *F. solani*, in turn, has been described in the literature as a fungus capable of degrading polyurethane (Howard, 2002) or polycaprolactone (Benedict et al., 1983); however, its pathogenic nature means that it cannot be viewed as a potential agent used in applied research.

5. Conclusion

Incubation of biological materials extracted from a landfill allowed us to isolate several strains of microorganisms that exhibit degradative potential toward PE and PP. Microorganisms showing degradability toward PE included bacteria such as *P. megaterium*, *K. pneumoniae*, *P. fluorescens*, *E. ludwigii*, and *Chryseobacterium* sp.; the relevant fungi mainly included those of the genus *Fusarium*, namely, *F. solani*, *F. oxysporum* and *Fusarium* sp., as well as *L. araneicola* and *T. lixii*. Isolation of strains residing on PP showed the presence of bacteria such as *S. marcescens* and *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* and fungi such as *A. flavus*, *A. fumigatus*, *F. oxysporum* and *P. granulatum*.

Surface analysis by SEM showed that both fungi and bacteria changed the polymer structure, which was observed in the form of numerous cracks and fissures on the plastic surface, while the control samples were characterized by a smooth and uniform surface. The greatest changes in external structure were observed on the surface of polypropylene incubated with bacterial materials; nevertheless, in other cases, the changes were also very pronounced. Additionally, the estimated spectrometric analyses of bacterial biofilms on the surface of both polymers confirmed the literature reports of higher affinity of bacteria to PP. The greatest changes in the external structure of polyethylene were observed when it was exposed to fungal strains. FTIR examination of both polymers showed that some changes in their structure occurred during incubation with microorganisms. Additional oxygen-associated bands and a decrease in the intensity of characteristic bands confirmed the possibility that specific fungal strains initiated the degradation of PE granules. In the case of PP, the largest changes occurred in the granules incubated with bacterial materials and involved a decrease in the intensity of characteristic bands of this polymer.

Funding

All microbiological and chemical analysis as well as manuscript editing were funded from the project: Universitas Copernicana Thoruniensis In Futuro – modernization of the Nicolaus Copernicus University as part of the Integrated University Program (project no. POWR.03.05.00-00-Z302/17-00) implemented under the Knowledge Education Development Operational Program.

CRediT authorship contribution statement

Mariusz Wróbel: Visualization, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Sonia Szymańska:** Investigation, Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Katarzyna Hryniewicz:** Conceptualization, Methodology, Funding acquisition, Project administration, Writing – review & editing. **Tomasz Kowalkowski:** Funding acquisition, Project administration, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.micres.2022.127251.

References

- Albertsson, A., Karlsson, S., 1990. The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene. *Prog. Polym. Sci.* 15, 177–192. [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(90\)90027-X](https://doi.org/10.1016/0079-6700(90)90027-X).
- Albertsson, A.C., 1980. The shape of the biodegradation curve for low and high density polyethenes in prolonged series of experiments. *Eur. Polym. J.* 16, 623–630. [https://doi.org/10.1016/0014-3057\(80\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0014-3057(80)90100-7).
- Almond, J., Sugumaar, P., Wenzel, M.N., Hill, G., Wallis, C., 2020. Determination of the carbonyl index of polyethylene and polypropylene using specified area under band methodology with ATR-FTIR spectroscopy. *e-Polym.* 20, 369–381. <https://doi.org/10.1515/epoly-2020-0041>.
- Anderson, J.C., Park, B.J., Palace, V.P., 2016. Microplastics in aquatic environments: implications for Canadian ecosystems. *Environ. Pollut.* 218, 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.074>.
- Arkatkar, A., Juwarkar, A.A., Bhaduri, S., Uppara, P.V., Doble, M., 2010. Growth of *Pseudomonas* and *Bacillus* biofilms on pretreated polypropylene surface. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 530–536. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.002>.
- Arutchevi, J., Sudhakar, M., Arkatkar, A., Doble, M., Bhaduri, S., Uppara, P.V., 2008. Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian J. Biotechnol.* 7, 9–22.
- Avio, C.G., Gorbi, S., Regoli, F., 2017. Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat. *Mar. Environ. Res.* 128, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.012>.
- Azoko, S.T., Odusanya, O.S., Malatesta, K., Anuku, N., Soboyejo, W.O., 2015. Bacterial remediation of polyethylene by *Serratia marcescens* sub sp. *marcescens* and its supernatant. *Adv. Mater. Res.* 1132, 238–251. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1132.238>.
- Barnes, D.K.A., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 364, 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>.
- Benedict, C.V., Cameron, J.A., Huang, S.J., 1983. Polycaprolactone degradation by mixed and pure cultures of bacteria and a yeast. *J. Appl. Polym. Sci.* 28, 335–342. <https://doi.org/10.1002/app.1983.070280129>.
- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A.-M., Lemaire, J., Sancelme, M., Scott, G., 2003. Environmental biodegradation of polyethylene. *Polym. Degrad. Stab.* 81, 441–452. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00129-0).
- Cacciari, I., Quatrini, P., Zirletta, G., Mincione, E., Vinciguerra, V., Lupattelli, P., Giovannozzi Sermanni, G., 1993. Isotactic polypropylene biodegradation by a microbial community: physicochemical characterization of metabolites produced. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3695–3700. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.11.3695-3700.1993>.

- Chatterjee, S., Sharma, S., 2019. Microplastics in our oceans and marine health. *Field Actions Science Reports*. *J. Field Actions* 54–61.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>.
- Derraik, J.G., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 842–852. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00220-5).
- Donaruma, L.G., 1991. Microbial polyesters, by Yoshiharu Doi, VCH, New York, 1990, 156 pp. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 29 <https://doi.org/10.1002/pola.1991.080290916>.
- Driedger, A.G.J., Dürr, H.H., Mitchell, K., Van Cappellen, P., 2015. Plastic debris in the Laurentian Great Lakes: a review. *J. Great Lakes Res.* 41, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2014.12.020>.
- Duis, K., Coors, A., 2016. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environ. Sci. Eur.* 28, 2. <https://doi.org/10.1186/s12302-015-0069-y>.
- El-Shafei, H.A., Abd El-Nasser, N.H., Kansoh, A.L., Ali, A.M., 1998. Biodegradation of disposable polyethylene by fungi and *Streptomyces* species. *Polym. Degrad. Stab.* 62, 361–365. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(98\)00019-6](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(98)00019-6).
- Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>.
- Gigault, J., Halle, A., ter, Baudrimont, M., Pascal, P.-Y., Gauffre, F., Phi, T.-L., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., 2018. Current opinion: what is a nanoplastic. *Environ. Pollut.* 235, 1030–1034. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>.
- Gu, J.D., 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52, 69–91. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00177-4).
- Hammer, J., Kraak, M.H.S., Parsons, J.R., 2012. Plastics in the marine environment: the dark side of a modern gift. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3414-6_1.
- Heimowska, A., 2016. Zagrożenie dla środowiska morskiego dryfującymi materiałami polimerowymi. *Zesz. Nauk. Akad. Mor. w Gdyni* 141–145.
- Helen, A.S., Uche, E.C., Hamid, F.S., 2017. Screening for polypropylene degradation potential of bacteria isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia. *Int. J. Biosci., Biochem. Bioinforma.* 7, 245–251. <https://doi.org/10.17706/ijbbb.2017.7.4.245-251>.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3060–3075. <https://doi.org/10.1021/es2031505>.
- Holm, P., Schulz, G., Athanassopoulou, K., 2013. Mikroplastik - ein unsichtbarer Störenfried. *Biol. Unserer Zeit* 43, 27–33. <https://doi.org/10.1002/biuz.201310497>.
- Howard, G.T., 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 49, 245–252. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00051-3](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00051-3).
- Iibuchi, R., Hara-Kudo, Y., Hasegawa, A., Kumagai, S., 2010. Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. *J. Food Prot.* 73, 1506–1510. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.8.1506>.
- Ivar do Sul, J.A., Costa, M.F., 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environ. Pollut.* 185, 352–364. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.036>.
- Kawai, F., Watanabe, M., Shibata, M., Yokoyama, S., Sudate, Y., Hayashi, S., 2004. Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi. *Polym. Degrad. Stab.* 86, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.polydegstab.2004.03.015>.
- Koutny, M., Sancelme, M., Dabin, C., Pichon, N., Delort, A.-M., Lemaire, J., 2006. Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives. *Polym. Degrad. Stab.* 91, 1495–1503. <https://doi.org/10.1016/j.polydegstab.2005.10.007>.
- Lenz, R.W., Marchessault, R.H., 2005. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1021/bm049700c>.
- Lubbadeh, J., 2014. *Der junge Mann und das Meer*. *Technol. Rev.* 7, 26–33.
- Lugauskas, A., Levinskait, L., Pečiulytė, D., 2003. Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52, 233–242. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00110-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00110-0).
- Manzur, A., Limón-González, M., Favela-Torres, E., 2004. Biodegradation of physicochemically treated LDPE by a consortium of filamentous fungi. *J. Appl. Polym. Sci.* 92, 265–271. <https://doi.org/10.1002/app.13644>.
- Miller, C.S., Handley, K.M., Wrighton, K.C., Frischkorn, K.R., Thomas, B.C., Banfield, J.F., 2013. Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PLoS One* 8, e56018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056018>.
- Mogil'nikskii, G.M., Sagatelyan, R.T., Kutishcheva, T.N., Zhukova, S.V., Kerimov, S.I., Parfenova, T.B., 1987. Disruption of the protective properties of the polyvinyl chloride coating under the effect of microorganisms. *Prot. Met.* 23, 173–175.
- Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P.K., Levin, D.B., 2020. Microbial and enzymatic degradation of synthetic plastics. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709>.
- Montazer, Z., Habibi Najafi, M.B., Levin, D.B., 2019. Microbial degradation of low-density polyethylene and synthesis of polyhydroxyalkanoate polymers. *Can. J. Microbiol.* 65, 224–234. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0335>.
- Montazer, Z., Habibi Najafi, M.B., Levin, D.B., 2020. Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene. *Polymers* 12, 123. <https://doi.org/10.3390/polym12010123>.
- Muhonja, C.N., Makonde, H., Magoma, G., Imbuga, M., 2018. Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. *PLOS ONE* 13, e0198446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446>.
- Nowak, B., Pajak, J., Drozd-Bratkowicz, M., Rymarz, G., 2011. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 757–767. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.007>.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.L., Newman, D.K., Weaver, V.B., Kolter, R., 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Method Enzymol.* 91–109. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)10008-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)10008-9).
- Orr, I., Hadar, Y., Sivan, A., 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1584-8>.
- Pasieczna-Patkowska, S., Lesiuk, A., 2013. Ocena rozkładu handlowych opakowań polietylenowych w glebie metodą FT-IR/PAS. *Chemik* 67, 863–872.
- Pometto, A.L., Lee, B.T., Johnson, K.E., 1992. Production of an extracellular polyethylene-degrading enzyme(s) by *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 731–733. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.2.731-733.1992>.
- Porejko, S., Fejgin, J., Zakrzewski, L., 1974. *Chemia związków wielkocząsteczkowych*. Wydawn. Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- Pospisil, J., Nešpírek, S., 1997. Highlights in chemistry and physics of polymer stabilization. *Macromol. Symp.* 115, 143–163. <https://doi.org/10.1002/masy.19971150110>.
- Pramila, R., Ramesh, K., 2017. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from municipal landfill area. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 1, 131–136.
- Restrepo-Flórez, J.-M., Bassi, A., Thompson, M.R., 2014. Microbial degradation and deterioration of polyethylene – a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 88, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>.
- Roy, P.K., Titus, S., Surekha, P., Tulsí, E., Deshmukh, C., Rajagopal, C., 2008. Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polym. Degrad. Stab.* 93, 1917–1922. <https://doi.org/10.1016/j.polydegstab.2008.07.016>.
- Seneviratne, G., Tennakoon, N.S., Weerasekara, M.L.M.A.W., Nandasena, K.A., 2006. Polyethylene biodegradation by a developed *Penicillium-Bacillus* biofilm. *Curr. Sci.* 90, 20–21.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26, 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>.
- Sikorski, R.T., 1985. *Podstawy chemii i technologii polimerów*. PWN, Warszawa.
- Strömberg, E., Karlsson, S., 2009. The effect of biodegradation on surface and bulk property changes of polypropylene, recycled polypropylene and polylactide biocomposites. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 1045–1053. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.08.003>.
- Strong, A., 2006. *Plastics: materials and processing*. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 14, 917.
- Sudhakar, M., Doble, M., Murthy, P.S., Venkatesan, R., 2008. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 61, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.07.011>.
- Tiseo, I., 2022. Annual production of plastics worldwide from 1950 to 2020. <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/> (accessed 25 April 2022).
- Unepetty, P., Evans, S.M., 1997. The impact of plastic debris on the biota of tidal flats in Ambon Bay (eastern Indonesia). *Mar. Environ. Res.* 44, 233–242. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00002-0).
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., Schué, F., 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* <https://doi.org/10.1351/pac-rec-10-12-04>.
- Volke-Sepúlveda, T., Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M., Manzur, A., Favela-Torres, E., 2002. Thermally treated low density polyethylene biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. *J. Appl. Polym. Sci.* 83, 305–314. <https://doi.org/10.1002/app.2245>.
- Watanabe, T., Ohtake, Y., Asabe, H., Murakami, N., Furukawa, M., 2009. Biodegradability and degrading microbes of low-density polyethylene. *J. Appl. Polym. Sci.* 111, 551–559. <https://doi.org/10.1002/app.29102>.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: *PCR Protocols*. Elsevier, pp. 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Zheng, Y., Yanful, E.K., Bassi, A.S., 2005. A review of plastic waste biodegradation. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 243–250. <https://doi.org/10.1080/07388550500346359>.

12.2 P2 - Microbial allies in plastic degradation: specific bacterial genera as universal plastic-degraders in various environments



Microbial Allies in Plastic Degradation: Specific bacterial genera as universal plastic-degraders in various environments

Mariusz Wróbel^{a,b}, Edyta Deja-Sikora^{a,**}, Katarzyna Hrynkiewicz^a, Tomasz Kowalkowski^b, Sonia Szymańska^{a,*}

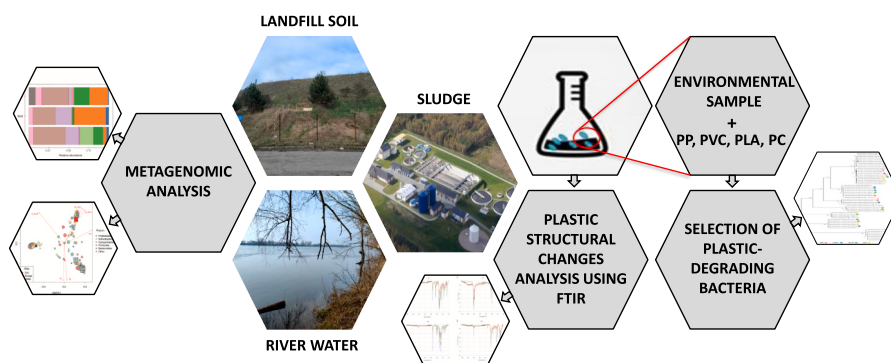
^a Department of Microbiology, Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University, Lwowska 1, 87-100, Toruń, Poland

^b Department of Environmental Chemistry and Bioanalysis, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Gagarina 7, 87-100, Toruń, Poland

HIGHLIGHTS

- Microplastics influence environmental microbiome diversity to various degree.
- Plastic-degraders belonged to rare taxa within studied communities.
- Microbiome diversity does not correlate with carbonyl index for plastic degradation.
- Microplastics select similar bacterial genera from various environmental microbiomes.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Handling editor: Paolo Pastorino

Keywords:

Microplastics
Plastisphere
Microbiome
Biodegradation
Polymers

ABSTRACT

Microbiological degradation of polymers offers a promising approach for mitigating environmental plastic pollution. This study (i) elucidated the diversity and structure of bacterial microbiomes from distinct environments (landfill soil, sewage sludge, and river water) characterized by specific physicochemical parameters, and (ii) utilized environment-derived microbial cultures enriched with microplastics (MPs) to investigate the degradation of polymers and identify culturable bacterial strains contributing to the plastisphere. We found that alpha diversity was notably higher in river water (~20%) compared to landfill soil and sewage sludge. Dominant phyla included Pseudomonadota in sewage sludge (39.1%) and water (23.7%), while Actinomycetota prevailed in soil (38.5%). A multistage experiment, involving successive subcultures of environmental microbiomes exposed to polypropylene (PP), polyvinyl chloride (PVC), polycarbonate (PC), and polylactic acid (PLA), facilitated the assessment of MPs degradation processes. Analysis of carbonyl indices CIs and FTIR spectra revealed substantial structural changes in the treatment PVC-landfill soil, as well as in PLA- and PC-sludge enriched cultures. Further, using enriched cultures as a source of microorganisms, the study obtained 17 strains of plastic degraders from landfill soil, 14 from sewage sludge, and 6 from river water. Remarkably, similar bacterial genera were isolated across environmental microbiomes regardless of the MPs substrate used in enriched cultures.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: dejasikora@umk.pl (E. Deja-Sikora), soniasz@umk.pl (S. Szymańska).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142933>

Received 28 March 2024; Received in revised form 22 July 2024; Accepted 23 July 2024

Available online 25 July 2024

0045-6535/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Among the 37 identified strains, Pseudomonadota predominated (64.86%) and were accompanied by Bacteroidota (16.22%), Actinomycetota (13.51%), and Bacillota (5.41%). This study highlights the complex relationship between microbiome diversity and the biodegradation efficiency of plastics, showing the potential for using microbial communities in the plastic pollution management.

1. Introduction

Plastics, essential to various industries for their affordability, durability, and versatility, have become a significant environmental threat in the 21st century. Common polymers like polypropylene (PP), polyethylene (PE), polystyrene (PS), polyvinyl chloride (PVC), and polyethylene terephthalate (PET) dominate global production due to their favorable properties (Napper and Thompson, 2023). However, these polymers pose serious ecological and health risks worldwide, largely due to their high crystallinity, molecular weight, and resistance to oxidation, which contribute to their persistence in the environment (Lambert et al., 2017). Microplastics (MPs), defined as plastic particles measuring 1–5000 μm , are of particular concern due to their widespread distribution in terrestrial and aquatic ecosystems (Free et al., 2014; Law and Thompson, 2014). Many studies have confirmed that MPs can enter the biosphere, accumulate, and be transmitted through food chains, impacting both environmental biodiversity and human health (Saeedi, 2024; Hale et al., 2020; Fournier et al., 2022).

The level of MP pollution depends on the type of environment. Rivers generally have lower MP concentrations compared to soils (Pol et al., 2022; Sekudewicz et al., 2021). Approximately 52% of MPs end up in soils (Boucher and Friot, 2017), primarily due to agricultural practices including mulching (Zhaorong et al., 2020) and the use of organic fertilizers (Zhang et al., 2022a). In North America and Europe, substantial amounts of MPs are introduced annually into arable soils through sewage sludge application (Ng et al., 2018). Landfill sites are major sources of MPs, with contamination levels varying across different regions (Tun et al., 2022). Conventional MPs disposal methods including incineration, landfilling, and recycling have proven inadequate, prompting a search for sustainable strategies like microbial degradation (Du et al., 2022; Omidoyin and Jho, 2023).

In recent years, research into the “microbial plastisphere”, a community of polymer-degrading microorganisms, has recently gained significant attention (Lear et al., 2021; Bacha et al., 2023). Specific bacterial strains from environmental samples have been linked to the degradation of various polymers. PP has been shown to be degraded by bacterial and fungal strains such as *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Rhodococcus* sp., and *Phanerochaete chrysosporium* (Auta et al., 2018; Shimpi et al., 2018; Skariyachan et al., 2018). Wróbel et al. (2023), using landfill soil as a source material, isolated *Serratia marcescens* and *Enterobacter* spp. strains decomposing PP and polyethylene (PE). Thermophilic consortia from sewage sludge, consisting of *Brevibacillus* spp. and *Aneurinibacillus* sp., were found to reduce PP mass (Skariyachan et al., 2018), making sewage sludge and soil promising sources of plastic-degrading microorganisms.

Polycarbonate (PC) has been effectively degraded by species such as *Arthrobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, and *Pseudoxanthomonas* sp. strain NyZ600 PC (Arefian et al., 2023; Yue et al., 2021; Goel et al., 2008). Additionally, *Bacillus flexus* and *Pseudomonas citronellolis* have been observed to degrade PVC (Giacomucci et al., 2019). PLA, which breaks into environmentally harmless compounds like water and carbon dioxide (Farah et al., 2016), can be biodegraded by various bacteria including *Amycolatopsis* sp., *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudonocardia* sp., *Serratia* sp., *Lentzea* sp., *Streptoloteichus* sp., *Kibdelosporangium* sp., and *Saccharothrix* sp. (Pranamuda et al., 1997; Tokiwa and Calabia, 2006; Penkhrue et al., 2015; Yottakot and Leelavatharamas, 2019). These studies demonstrated the potential of microbial methods for plastic waste management.

Despite these advances, significant gaps remain in our understanding

of the diversity and capabilities of plastic-degrading microorganisms in different environments. While specific plastic-degrading bacteria and fungi have been identified, comprehensive studies on the overall diversity and prevalence of these microorganisms in various environments are lacking. Therefore, our research aimed to: (i) determine the biodiversity of microbiomes in plastic impacted environments, sewage sludge, landfill soil, and river water; (ii) select bacteria with potential for degrading specific MPs; (iii) assess the extent of PP, PVC, PLA, and PC degradation by enriched bacterial cultures. We assumed the following hypotheses: (i) landfill soil, being most polluted with MPs, will exhibit lower microbiome diversity compared to river water and sewage sludge; (ii) selective pressure methods will enable the isolation of polymer-degrading bacteria, even from low-abundance taxa within microbiomes; (iii) despite environmental variations, similar bacterial taxa capable of degrading plastics will be identified across diverse microbial communities; (iv) higher alpha diversity of microbiomes within studied environments will positively correlate with the efficiency of polymer degradation in enriched cultures. To verify these assumptions, we assessed the extent of MPs biodegradation by enriched cultures of bacteria originating from each environment. Additionally, we isolated and identified the bacterial strains belonging to the plastisphere associated with tested MPs. Metagenomic analyses were conducted to determine the prevalence of plastic-degrading strains in these diverse environments. Furthermore, we examined the structure and biodiversity of site-specific microbiomes and linked these findings to the physicochemical parameters of the studied environments. The novelty of this study is in its comprehensive approach to understanding the microbial degradation of plastics by comparing different polluted environments, identifying specific bacterial strains, and correlating microbial diversity with degradation efficiency. This integrative analysis provides new insights into the potential of using microbial communities for bioremediation of plastic pollution. An important aspect of the conducted research that requires further exploration is the characterization of the selected strains in the field of transcriptomic and metabolomic analyses combined with the study of reaction intermediates formed during incubation of polymers with bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Polymer sample preparation

Granular polymers (PP, PVC, PLA, PC) were obtained from the Department of Physical Chemistry and Physicochemistry of Polymers, Nicolaus Copernicus University in Toruń. The granules were ground using a commercial grinder (Biomix 2500 W; USA). To prevent plastic overheating, the grinding process was carried out with continuous cooling using liquid nitrogen. The particle sizes were assessed using a Malvern Mastersizer 2000 Particle Size Analyzer (UK) and ranged from 20 μm (approximately 20%) to 50–800 μm (80%). Then, 200 μl of each type of microgranule was added to 100 ml conical flasks containing 20 ml of 0.85% NaCl and sterilized for 10 min at 120 °C. The mixtures were subjected to further analyses.

2.2. Sample collection

All samples were collected during the second week of May 2019 (late spring) from three distinct environments. Soil samples (SL) were taken from a depth of approximately 35 cm and originated from a municipal waste landfill site in Toruń (53.0501532 N 18.6505457 E). Sludge

samples (SG) were obtained from the WWTP in Grudziądz (53.5312204 N 18.7935916 E). Water samples (WR) were collected in sterile glass bottles (with a total volume of 3 l) from a depth of approximately 20 cm in the Vistula River (53.0035672 N 18.5649681 E) in Toruń. In the laboratory, the environmental samples (SL, SG, and WR) were divided into three separate portions; each was used for different types of analyses, including (1) physicochemical analysis, (2) metagenomic analysis and identification of polymer-degrading bacteria, and (3) analysis of the polymer structure after inoculation with the entire environmental microbiome.

2.3. Analysis of SL and SG physicochemical parameters

Total carbon (TC) and total nitrogen (TN) were determined using a Vario Macro Cube CHN/CHNS microanalyzer (Elementar, Germany). Calcium carbonate (CaCO_3) was determined by the volumetric method using a Scheibler apparatus (Poland) according to the method of Pansu and Gautheyrou (2006). Total phosphorus (TP) was determined colorimetrically using the Bleck method with modifications, as described by Gebhardt (1982), and was measured with a Rayleigh UV-1601 spectrophotometer (Rayleigh Instruments Ltd., UK). The nitrate nitrogen (N-NO_3), nitrite nitrogen (N-NO_2) and ammonium nitrogen (N-NH_4) concentrations in the aqueous extracts were determined at a soil–water ratio of 1:2.5 via the colorimetric method. The concentration was measured with a Merck Spectroquant Prove 100 spectrophotometer (Merck, Germany) using Merck test kits based on the methods of van Reeuwijk (2002). The pH was measured with an Elmetron CP-551 pH meter (Elmetron, Poland) in aqueous extract ($\text{pH-H}_2\text{O}$) and 1 M potassium chloride (pH-KCl) at a soil: solution ratio of 1:2.5 based on van Reeuwijk (2002). Statistically significant differences in variable values between samples were analyzed using ANOVA and post hoc Tukey's HSD test.

2.4. Analysis of WR physicochemical parameters

The pH was measured with a pH meter CP-551 (Elmetron, Poland). The specific electrolytic conductivity (SEC) at 20 °C and 25 °C was determined via a conductometric method with a CPC-401 conductivity meter (Elmetron, Poland). The concentration of orthophosphate (PO_4^{3-}) was determined via chromatography on a Thermo Scientific Dionex Aquion ion chromatograph (Thermo Fisher Scientific, USA). Total phosphorus (TP), total nitrogen (TN), organic nitrogen N_{org} , nitrate (N-NO_3), nitrite (N-NO_2) and ammonium (N-NH_4) were determined via spectrophotometry on a Merck Spectroquant Prove 100 spectrophotometer (Germany) using Merck test kits. Statistically significant differences in variable values between samples were analyzed using ANOVA and post hoc Tukey's HSD test.

2.5. Isolation of metagenomic DNA and NGS

Metagenomic DNA was isolated using a Soil DNA Purification Kit (EURx, Poland) following the manufacturer's procedure. For each environment, five biological replicates were analyzed. For the soil and sludge, 250 mg of material was utilized for each isolation. For the water samples, the initial step involved filtering 250 ml of water through sterile CA filters with a pore size of 0.22 μm (Chemland, Poland). These aseptically fragmented filters were subsequently processed in a manner similar to that used for soil and sludge. The quantity and quality of the isolated DNA were assessed spectrophotometrically (UV-Vis NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA).

Libraries of bacterial V3–V4 16S rRNA gene fragments for the analyzed samples were prepared and sequenced by Novogene Co. (Beijing, China) using an Illumina NovaSeq 6000 system (depth of sequencing ranged from 84.3% to 91.1%). The raw data were provided in FASTQ format. The sequences are available via the BioProject database ID: PRJNA1079663, PRJNA1079663, PRJNA1080345 for landfill

soil, river water and sewage sludge samples, respectively.

2.6. Bioinformatics analysis

An operational taxonomic unit (OTU) table was constructed at a similarity level of 97% (0.03 dissimilarity), and taxonomical assignments were provided by Novogene Co. (Beijing, China). Further analyses were performed using R 4.2.1 (R Core Team, 2023). The table was quality checked and filtered to remove OTUs affiliated with taxa other than Bacteria (i.e., Archaea, Chloroplasts, Mitochondria, unassigned Kingdom). The OTU table was normalized by rarefying to even depth (McMurdie and Holmes, 2014); then, alpha diversity indices (OTU Observed, Chao1, ACE, Shannon and Inverted Simpson) were calculated, and the Kruskal-Wallis test with Dunn post-hoc and Bonferroni correction was applied to indicate statistically significant differences between sites. The abovementioned analyses were performed using the Phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013). The top taxa in the abundance plots were aggregated using the microbiome package (Lahti and Shetty, 2012–2019). The taxonomic structures of the microbiomes plotted at the phylum and genus levels were combined with distance trees based on the Bray–Curtis (BC) dissimilarity index calculated with vegdist from vegan package (Oksanen et al., 2022). Beta diversity was calculated using ANOSIM (analysis of similarity) in the vegan package, and a significant difference was reached when these conditions were satisfied: $R > 0.3$ and $P < 0.05$. Bacterial genera differentially abundant in the analyzed environments (biomarkers) were identified based on LefSe analysis using the microbiomeMarker package (Cao et al., 2022). Non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination was calculated using metaMDS from the vegan package. The environmental variables were combined with an ordination plot using the envfit function. The significance of the variable vectors was checked after applying the Bonferroni correction. Only variables with p values ≤ 0.05 are shown on the NMDS plot. A phylogenetic tree of 16S rDNA sequences for the environmental isolates and bacterial type strains (T) obtained from the NCBI Reference Material database was generated using the ML method in MEGA X software (Kumar et al., 2018).

2.7. Isolation of polymer-degrading bacteria

A 10-step, 10-fold dilution series in 0.85% NaCl was prepared for each environmental sample (SL, SG, and WR). From each series, two dilutions were selected (SL – 10^{-6} and 10^{-9} , SG – 10^{-6} and 10^{-10} , and WR – 10^{-1} and 10^{-4}) and used for inoculating the polymers. For each experimental variant, three sterile flasks containing 0.85% NaCl, MPs, and nystatin (100 mg/l) were inoculated with 1 ml of the appropriate dilution. In total, 72 flasks were used to select plastic-degrading microorganisms. Control samples were also prepared containing polymers and antibiotics but lacking dilutions. These controls were incubated alongside the other samples for 5 weeks at 26 °C with shaking (PSU-20i Orbital Shaking Platform, Biosan, Latvia; orbital motion at 120 rpm). Following this incubation period, three additional serial subcultures were initiated by transferring 1 ml of the previous culture into a fresh flask containing 20 ml of 0.85% NaCl and 200 μl of polymer dust. The first subculture was incubated for 15 weeks, the second for 10 weeks, and the last for 5 weeks. This step aimed to eliminate bacteria that utilized trace amounts of carbon (C) and nitrogen (N) from sources other than plastics. Subsequently, 1 ml from the last subculture was plated in triplicate on R2A agar (Difco) supplemented with nystatin (100 mg/l). The plates were then incubated for 7 days at 26 °C. Based on the distinct morphological characteristics of the colonies, 37 bacteria were selected for 16S rRNA identification.

2.8. Identification of bacterial strains

The selected bacterial strains were identified based on 16S rRNA gene sequencing. Genomic DNA extraction was performed using the

Bacterial and Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx, Poland) following the manufacturer's standard procedure. The quantity and quality of the isolated DNA were assessed spectrophotometrically (UV-Vis NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA). The following primers were used for the amplification of 16S ribosomal DNA: 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Gardes and Bruns, 1993; White et al., 1990). PCR was carried out using Taq PCR Master Mix (2x) (Qiagen, Netherlands). The cycling procedure was as follows: 1 cycle of 2 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, 90 s at 72 °C and finally one cycle of 5 min at 72 °C. The presence and size of the PCR products were assessed using a 1% w/v agarose gel stained with Simply Safe (EURx, Poland). The amplicons were purified using a PCR/DNA Clean-up Purification Kit (EURx, Poland) according to the manufacturer's protocol. The 16S rDNA fragments were sequenced using 27F and 1492R universal primers. Sequencher 5.1 (Gene Codes 20) software was used to assemble the forward and reverse reads. The consensus sequences were identified using the GenBank rRNA/ITS database. For the appropriate taxonomic assignment of bacteria, a minimum of 99% coverage and 99% similarity were needed. All received DNA sequences were deposited in GenBank (accession numbers: PP107976-PP108007 and PP375082-PP375085).

2.9. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analysis

The polymers obtained after 15 weeks of incubation were washed with sodium dodecyl sulfate (SDS) (Chempur, Poland), ethyl alcohol and distilled water to remove microorganisms from the surface of the microgranules. Dried MPs were analyzed by infrared spectroscopy using a vacuum FT-IR Vertex 70v spectrometer with a Hyperion 1000/2000 microscope (Bruker Optics, USA). The spectra for all variants were recorded within the range of 4000 to 400 cm⁻¹. The samples from the same incubation variant were compared with the control samples that were not inoculated with microorganisms. For PVC, the carbonyl index (CI) was determined according to the protocol described by Yousif et al. (2015). In the case of PP and PI, spectra were determined based on the methodology of Rouillon et al. (2016). The CIs for PLA and PC were determined according to our previous work (Wróbel et al., 2023). The CI was calculated as the average value from three spectra obtained after analyzing three different samples of each polymer. The area of the band was calculated using Bruker OPUS 7.0 FTIR software (Bruker, USA). The intensities of the characteristic bands, as well as the presence of new bands not observed in the control samples, were examined.

3. Results

3.1. Environmental parameters

The physicochemical parameters of the soil, sludge and water are summarized in Table 1. In case of anion forms of nitrogen the following concentration tendency was observed in analyzed environments: soil > water > sludge. The soil had a slightly alkaline pH of 8.14. Sewage sludge, on the other hand, contained the highest amounts of total phosphorus (TP) and total nitrogen (TN) but had the lowest concentrations of N-NO₃ and N-NO₂; thus, the organic forms of nitrogen and phosphorus were predominantly found in the sludge environment. The pH of the sludge was moderately acidic (Table 1). In contrast, the pH of the water was neutral, and nitrate was the dominant ionic form of nitrogen, with a concentration six times greater than that of ammonium ions. The phosphate content in the Vistula River reached 37 µg/l, which is a typical value for undisturbed river water.

3.2. Bacterial community structure and diversity

The summary statistics from the sequencing can be found in Supplementary Table A. Due to normalization, each sample was randomly

Table 1

The physicochemical parameters of landfill soil, sewage sludge and river water samples. The mean values ± standard deviations are presented (n = 3). Significant differences between the tested environments (soil, sludge and water) are marked with different letters (ANOVA, p < 0.05; Tukey's HSD test).

| Parameter | Mean value ± SD | | |
|---------------------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | Soil | Sludge | Water |
| pH | 8.14 ± 0.14 (c) | 5.86 ± 0.07 (a) | 7.28 ± 0.03 (b) |
| N-NO ₂ [mgN/kg] | 0.95 ± 0.05 (b) | 0.005 ± 0 (a) | 0.029 ± 0.001 (a) |
| N-NO ₃ [mgN/kg] | 10.82 ± 0.29 (c) | 0.48 ± 0.02 (a) | 1.48 ± 0.03 (b) |
| N-NH ₄ [mgN/kg] | 3.31 ± 0.15 (b) | 3.46 ± 0.18 (b) | 0.24 ± 0.02 (a) |
| N _{org} [mgN/l] | NA | NA | 0.42 ± 0.03 |
| TN [mg/kg] | 2280.0 ± 45.8 (b) | 14733.3 ± 378.6 (c) | 2.17 ± 0.03 (a) |
| PO ₄ ³⁻ [mgP/l] | NA | NA | 0.037 ± 0.001 |
| TP [mg/kg] | 763.3 ± 19.3 (b) | 3298.0 ± 81.6 (c) | 0.125 ± 0.004 (a) |
| TC [%] | 5.14 ± 0.13 (a) | 48.13 ± 1.21 (b) | NA |
| C/N | 22.7 ± 0.6 (a) | 32.7 ± 0.6 (b) | NA |
| CaCO ₃ [%] | 1.99 ± 0.05 (b) | 1.67 ± 0.05 (a) | NA |

NA – not analyzed.

subsampled to an equal count, resulting in 73489 sequences distributed among 6767 different OTUs. The alpha-diversity measurements (Supplementary Table B) revealed significant differences between the river water microbiome and both the soil and sewage sludge microbiomes. The number of observed OTUs reached slightly more than 3000 and was highest in water (Fig. 1A), while in the other environments, this number did not exceed 2500. The values of the Chao1 and ACE nonparametric estimators (Fig. 1B and C) for the analyzed sites were similar to their observed OTU numbers, indicating high coverage and a sufficiently deep level of sequencing. The alpha biodiversity was relatively high across all sites, with the Shannon index ranging from 3.72 to 5.54. The soil and sewage sludge exhibited similar levels of biodiversity, while the water had a significantly greater biodiversity (Fig. 1 D, E).

A Venn diagram indicated that the analyzed environments were highly dissimilar to each other. Out of the 6767 OTUs identified, 1340 were shared across soil, sewage sludge, and water (Supplementary Fig. A). When comparing the environments in pairs, river water and sludge exhibited the highest degree of similarity, with 2312 shared OTUs, surpassing the other pairwise comparisons. Remarkably, each environment harbored a significant number of unique OTUs, with water having the highest count of exclusive OTUs, totaling 1732 (Supplementary Fig. A). Further analysis using ANOSIM confirmed the presence of significant differences between the bacterial communities in the three analyzed environments. Intragroup variation revealed a high degree of similarity among subsamples from the same sampling site (Fig. 2).

The structure of the bacterial microbiomes was analyzed at two levels: phyla and genera. We found that 14 phyla represented together more than 99.4% of all the communities. Among these, Pseudomonadota (formerly Proteobacteria) dominated in the sewage sludge (39.1%) and water (23.7%), while Actinomycetota (formerly Actinobacteria) was abundant in the soil (38.5%). At the genus level, the 25 most abundant taxa accounted for approximately 53% of the total sewage sludge and soil microbiome but only 44% of the water microbiome (Fig. 3C–D). The genera *Saccharomonospora* (11.6%), *Pseudomonas* (11.9%), and *Thermotaphylospora* (5.4%) predominated in the soil. The genera *Aeromonas* (12.0%), *Arcobacter* (9.6%), *Acinetobacter* (7.8%) and *Bacteroides* (7.1%) most strongly contributed to the sewage sludge bacterial community. The water microbiome was dominated by unclassified *Sporichthyaceae* (12.1%), *Limnohabitans* (8.7%) and *Luteolibacter* (6.1%).

At the phylum level, the Bray–Curtis distance tree revealed a greater degree of similarity between the aquatic and soil microbiomes compared

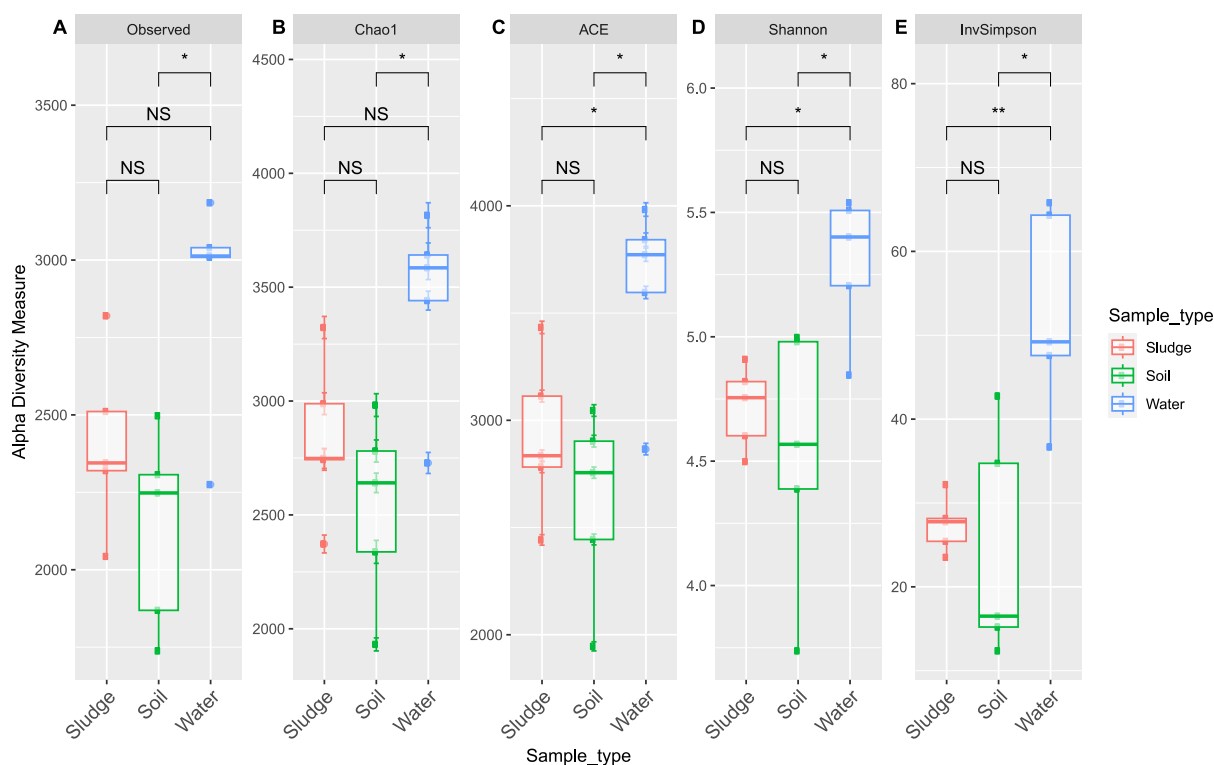


Fig. 1. Comparison of alpha diversity in samples from three environments: sewage sludge (SG), landfill soil (SL) and river water (WR). The microbial richness was estimated based on the number of observed species and two nonparametric indices, Chao1 and ACE. The diversity was evaluated based on the Shannon and inverted Simpson indices. Medians and interquartile ranges are shown. Significant differences between variants are calculated using the Kruskal–Wallis test with Bonferroni correction and are marked with asterisks (p value cutoffs were as follows: 0.05 *, 0.01 ** and 0.001 ***); no statistically significant differences are marked as NS.

to the sewage sludge microbiome (Fig. 3B). However, at the genus level, the distance tree revealed greater similarity in the microbiome structure between the water and sludge samples (Fig. 3D).

LefSe analysis identified 564 marker OTUs that exhibited the greatest differential abundance in the analyzed environments (Supplementary Table C). The soil-specific genera included *Pseudomonas*, *Saccharomonospora*, and *Thermotaphylospora*. *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Acinetobacter*, and *Bacteroides* were particularly associated with the sewage sludge. The aquatic microbiome was characterized by the presence of *Limnohabitans*, *Luteolibacter*, and unclassified bacteria within the Sporichthyaceae family (Fig. 4).

3.3. Effects of the physicochemical parameters on the taxa distribution between sites

The relationships between microbiome structures and environmental parameters were resolved using NMDS. The plot generated for all constructed OTUs (6767) was illegible due to the high number of points in the figure. Therefore, the analysis was limited to the 200 most abundant OTUs. This reduction did not change the arrangement of both sites and vectors within the ordination space. In both analyses, the vectors shown on the plot were statistically significant (Fig. 5). NMDS revealed that the structure of the soil microbiome was influenced by the levels of both N–NO₃ and N–NO₂. These were the most important variables determining the structure of the soil bacterial community. The sewage sludge microbiome was shaped by the high content of total nitrogen and phosphorus. The ammonium ion content partially influenced the water microbiome, although other environmental variables not included in the study could also influence it.

3.4. Identification of plastic-degrading bacteria in the analyzed environments

The incubation of polymeric materials with environmental microbiomes over a period of 15 weeks resulted in enriched cultures that were used to isolate and identify 37 bacterial strains surviving the selective pressure caused by MPs (Fig. 6, Supplementary Table C). Gram-positive bacteria, primarily from the phyla Actinobacteria and Firmicutes, accounted for nearly 19% of the total isolates. The remaining strains were Gram-negative bacteria classified within the phyla Proteobacteria and Bacteroidetes. Soil yielded the highest number of strains with polymer-degrading potential (17), followed by sewage sludge (14), and only 6 isolates with this metabolic trait were obtained from the water. The majority of these bacteria belonged to Proteobacteria (24 strains), while Bacteroidetes and Actinobacteria were represented by 6 and 5 strains, respectively. At the genus level, *Priestia megaterium* was the least abundant isolate (2). Notably, six soil strains were identified as *Chryseobacterium candidae*. Three *Serratia marcescens* and three *Klebsiella aerogenes* strains were isolated from sewage sludge. Among the water isolates, *Pseudomonas aeruginosa* was the dominant species. Additionally, specific associations were observed between the type of plastic and the species isolated from the environment. Among the samples enriched with PP, *Stenotrophomonas acidaminiphila* and *K. aerogenes* were the most frequently isolated strains. For PVC and PLA, *P. aeruginosa* and *C. candidae* were the predominant species. Conversely, for PC, bacteria such as *Microbacterium oxydans* and *C. candidae* were most frequently observed (Fig. 6, Supplementary Table C).

3.5. Analysis of FTIR spectroscopy spectra

We used FTIR spectroscopy to examine changes in the chemical structure of the polymers (i.e., the appearance of additional functional groups) under the influence of microbial activity. The spectra of each

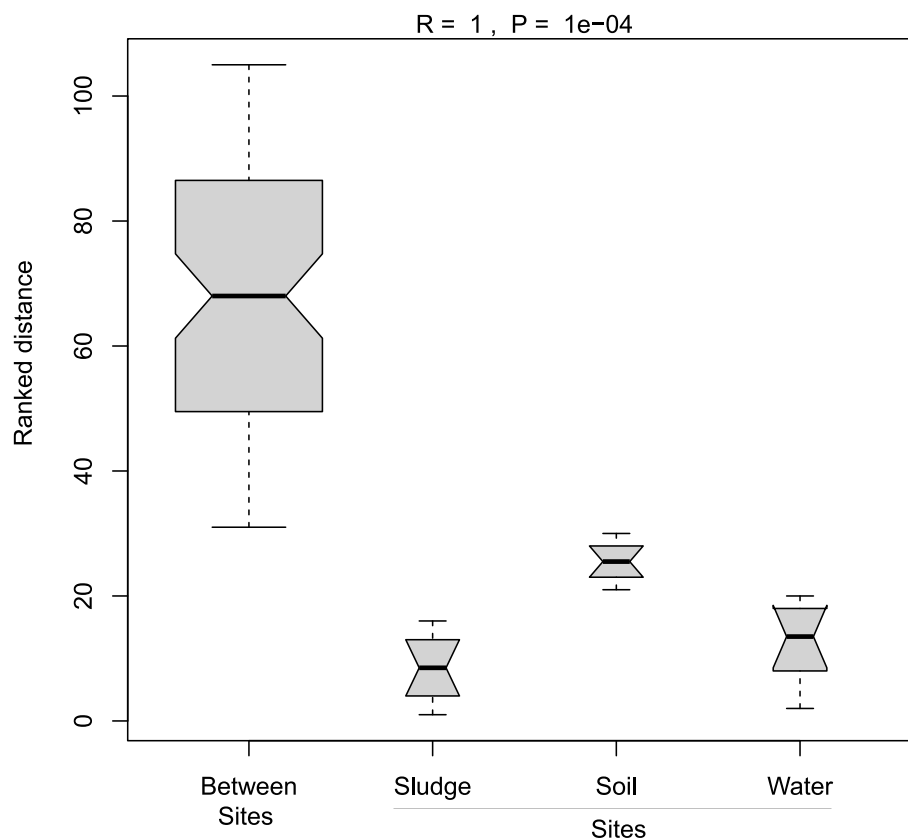


Fig. 2. Analysis of similarity (ANOSIM); the microbiomes of the analyzed sites (sewage sludge, landfill soil and river water) are significantly different from each other. The x-axis shows the grouping of samples by site, and the y-axis represents the ranked Bray–Curtis distance. A positive value of R ($R > 0$) indicates that the mean distance between sites is greater than that observed within sites (intragroup). The P parameter denotes the statistical analysis's reliability, with a significance level set at 0.05. A P value less than 0.05 indicated statistical significance. The bold horizontal bar in the box indicates the median, the bottom and top of the box indicate the 15th and 75th percentiles, respectively; whiskers extend to the most extreme data point, which is no more than the range (i.e., 1.5) times the interquartile range from the box; and the width of the bar is directly proportional to the sample size.

type of plastic were separately analyzed. Pure PP exhibited characteristic bands at approximately 2950, 2918, and 2836 cm^{-1} , corresponding to C–H tensile vibrations (Fig. 7A). Bands at approximately 1456 cm^{-1} resulted from CH_2 deformation vibrations, while those near 1376 cm^{-1} arose from symmetrical deformation vibrations of CH_3 groups. Peaks at 1166, 998, 974, and 842 cm^{-1} were indicative of isotactic PP. When analyzing the spectra of the PP samples, a reduction in the intensity of these characteristic bands was observed. The most significant differences from the control sample were evident in samples incubated with the soil microbiome, where the intensity of the key bands decreased by almost half. Conversely, the smallest differences were observed in samples incubated with sewage sludge bacteria, where the intensity of the characteristic bands decreased by only approximately 3% (Fig. 7A).

The IR spectrum for pure PVC showed vibrational bands at 2914 cm^{-1} (C–H of CHCl), 1422 cm^{-1} (wagging CH_2), 1090 cm^{-1} (bending, C–H), 956 cm^{-1} (rocking CH_2), and 686 cm^{-1} (rocking C–Cl) (Fig. 7B). The most significant spectral changes were observed in the samples incubated with the soil microbial community. In this case, a remarkable reduction in band intensity of approximately 80% was noted for both the bands at 2914 cm^{-1} and 956 cm^{-1} . For the band at 1422 cm^{-1} , the reduction was approximately 50%. Moreover, in addition to the decreased intensity of these bands, a low-intensity band emerged at 1720 cm^{-1} . In contrast, for the other two variants, only a decrease in the intensity of the characteristic bands was observed (Fig. 7B).

PLA shows characteristic stretching bands for C=O, $-\text{CH}_3$ stretching asymmetric, $-\text{CH}_3$ stretching symmetric, and stretching C–O at 1749, 2999, 2943 and 1080 cm^{-1} , respectively (Fig. 7C). The $-\text{CH}_3$ asymmetric and $-\text{CH}_3$ symmetric bands were identified at 1456 and 1384

cm^{-1} , respectively. The greatest changes in PLA structure were observed in samples incubated with the sewage sludge microbiome. In this case, the greatest decrease in band intensity at 1749 cm^{-1} (carbonyl group) of more than 80% was noted. Interestingly, at this wavelength, a similar reduction was observed in all samples but to a lesser extent, reaching 72% for the soil microbes and 52% for the river water community (Fig. 7C).

The pure PC infrared spectrum shows peaks resulting from the following vibrations: C–H aromatic ring deformations at approximately 3000 cm^{-1} ; C=O carbonate group stretching deformations near 1769 cm^{-1} ; C=C stretching vibrations at 1503 cm^{-1} ; asymmetric O–C–O carbonate group deformations in the range 1250–1100 cm^{-1} ; CH_3 stretching vibrations at 1080 cm^{-1} ; and symmetric stretching O–C–O carbonate group deformations near 1013 cm^{-1} (Fig. 7D).

All analyzed microbiomes demonstrated the potential to degrade PC, as evidenced by a reduction in the intensity of the characteristic bands. Specifically, for the most crucial band at a wavelength of 1769 cm^{-1} , the decreases were approximately 57%, 63% and 53% for the soil, sludge and water bacteria, respectively (Fig. 7D).

3.6. Carbonyl index (CI)

Changes in the carbonyl indices were assessed across all spectra. In some cases, CI values for plastics increased due to the activity of the environmental microorganisms, while in other cases, CI values decreased compared to those of the control treatment (Table 2). For PP no statistically significant changes were observed in any treatment (Table 2). The most significant changes in CI values were observed for

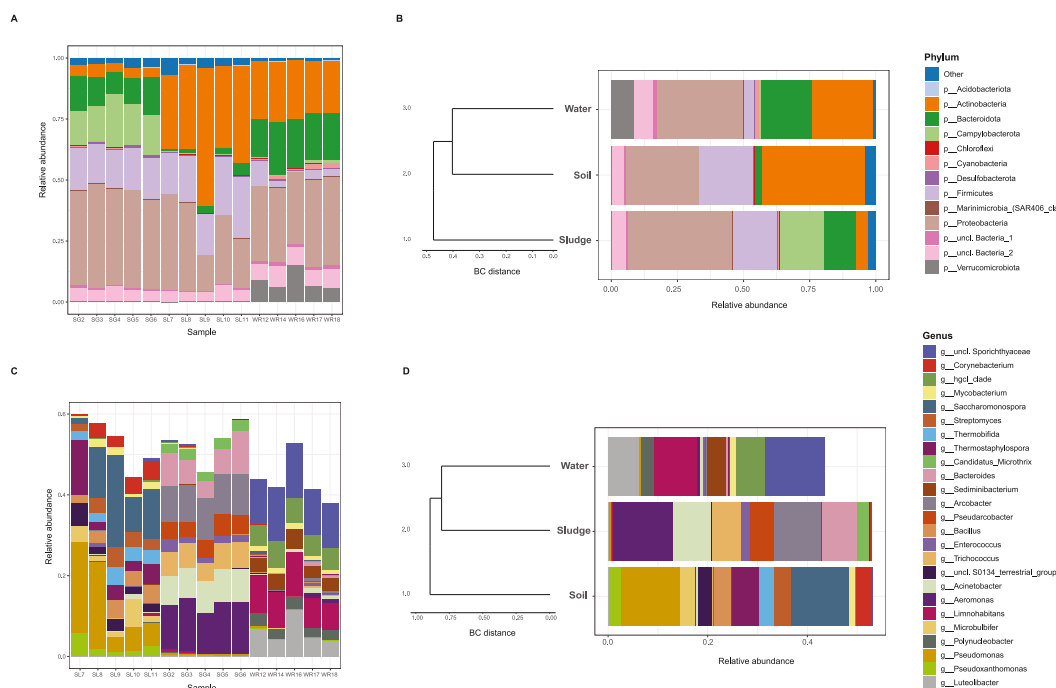


Fig. 3. Taxonomic structure of the bacterial microbiomes in analyzed environments: sewage sludge (SG2-SG6), landfill soil (SL7-SL11), and river water (WR12-WR18). Panels A and C present the relative abundances of taxa in the individual subsamples ($n = 5$) at the phylum (A) and genus (C) levels. Panels B and D present the mean relative abundances of taxa in the environments and the Bray–Curtis distance tree showing the similarity between environments at the phylum (B) and genus (D) levels.

PLA and PC after incubation with the sewage sludge microbiome. The soil microbiome induced the most notable alteration in the CI of the PVC. The increase in the CI value of PVC after incubation treatment with the soil community could be attributed to the appearance of carbonyl groups in the polymer spectrum. Interestingly, the water microorganisms had the most profound impact on the structure of the PC (Table 2).

4. Discussion

4.1. MPs influence environmental microbiome diversity to various degree

The rate of plastic degradation is linked to various physicochemical factors, including the type of polymer, particle size, and specific environmental parameters, such as moisture levels, oxygen availability, and exposure to UV radiation. However, a biological determinant of plastic decomposition lies in the structure and diversity of the microbiome, as well as its enzymatic activity (Jain et al., 2023; Cai et al., 2023). In our research, we isolated bacterial strains capable of degrading MPs under controlled laboratory conditions from three distinct environments: landfill soil, sewage sludge, and river water. These environments were found to be microbiologically diverse, as evidenced by metagenomic analyses. Intriguingly, the bacterial microbiome in the water exhibited significantly greater alpha diversity indices, compared to the soil and sewage sludge communities. This phenomenon was potentially attributed to varying levels of MP toxicity in each of the analyzed environments. The detrimental effects of MPs on bacterial viability have been well documented in numerous studies (Parsaeimehr et al., 2023; Fernández-Juárez et al., 2021; Liu et al., 2019). MPs can disrupt the physical and chemical properties of aquatic and soil habitats, leading to disturbances in natural microbial communities (Lear et al., 2021; Li et al., 2022). This disruption often results from an imbalance in essential nutrients, where an increased supply of carbon sources reduces the relative nitrogen content in the environment. Moreover, toxic byproducts generated during MP degradation can interfere with the activities of specific bacterial enzymes (Li et al., 2014; Kong et al., 2018; Xie et al.,

2010). Fan et al. (2022) indicated that the presence of MPs could alter ecosystem dynamics by reshaping the microbiome structure, ultimately causing certain bacterial taxa to outcompete others. Furthermore, they noted that the extent of these changes was highly contingent on the type of contaminant polymer. As observed in several prior studies, aquatic environments tended to have the lowest MP abundance. It is well documented that the biodiversity of aquatic communities is the least affected by the toxic effects of microplastics (Schmidt et al., 2017; Kunz et al., 2023), which aligns with our observations. We identified approximately 500 more OTUs in the river microbiome compared to those in the other environments. Notably, the microbiomes in landfill soil and sewage sludge could be similarly affected by high MP contents (Yang et al., 2021). Previous studies showed that more than 80% of plastic particles entering WWTPs were retained in the sludge formed during the biological purification process (Di Bella et al., 2022).

4.2. Plastic-degraders belonged to rare taxa within studied communities

Metagenomic analysis revealed the dominance of bacterial taxa representative of each environment under study. Consistent with previous studies, our aquatic microbiome was predominantly composed of Proteobacteria, Actinobacteria, and Bacteroidota (Yu et al., 2021; Feng et al., 2022). The landfill soil microbiome was dominated by bacteria from the phyla Actinobacteria, Proteobacteria, and Firmicutes. These taxa, commonly found in various soil types, are widely recognized for their significant potential in plastic degradation (Selvarajan et al., 2022; Chukwuma et al., 2021). Notably, among the 286 bacterial species identified as capable of plastic biodegradation, up to 98.3% were associated with these three phyla (Gambarini et al., 2021). Conversely, the studied sewage sludge microbiome exhibited an abundance of Proteobacteria, Firmicutes, and Campylobacterota, contributing to approximately 72.1% of the total microbial community. An interesting finding was the minor proportion of Chloroflexi in our sludge samples, despite this taxon typically being a prominent member of activated sewage sludge communities (Li et al., 2022; Xu et al., 2018).

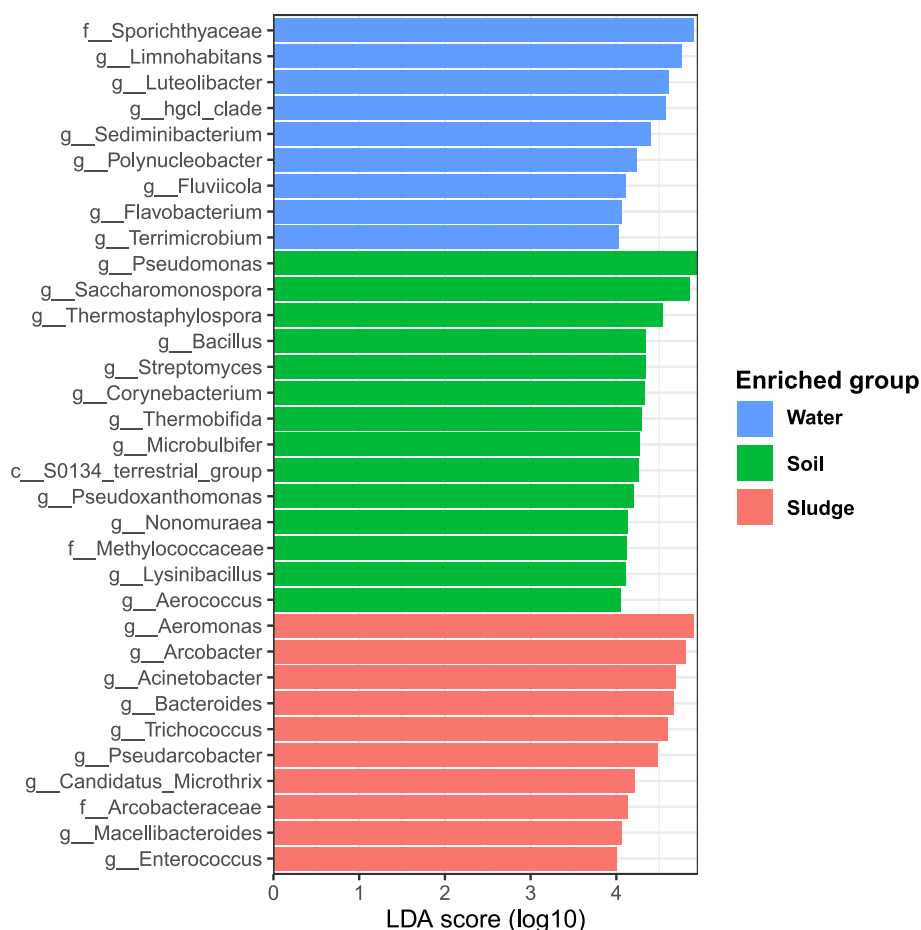


Fig. 4. Linear discriminative analysis (LDA) effect size analysis (LEfSe) showing potential taxonomic biomarkers specific for each tested environment (river water, landfill soil, sewage sludge). The histogram shows the most differentially abundant bacterial genera. Taxa with LDA scores equal and greater than 4 are shown.

A lower taxonomic level provided more accurate information regarding the microbiomes that thrive in each environment. Evidently, each environment harbored a diverse set of bacteria that distinguished it from the others. Through LEfSe analysis, we identified *Limnohabitans* and *Luteolibacter* as specific to river water. Genera such as *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Stacchyromonospora* were predominantly associated with landfill soil, while *Aeromonas*, *Arcobacter*, and *Acinetobacter* were distinct features of the sewage sludge community. Importantly, some of these genera are known to be associated with the plastic degradation process. For instance, *Pseudomonas* sp. was a differentiating factor in soil, representing approximately 12% of the microbiome in this environment but accounting for less than 0.3% of the microbiome in sludge and water. *Pseudomonas*, along with *Bacillus*, are well-documented bacterial genera with plastic biodegradation capabilities (Sutkar et al., 2023). Intriguingly, strains of *P. aeruginosa* were identified among our cultured isolates from all environments. In the soil microbiome, *Bacillus* constituted about 4% and two soil-derived isolates, identified as *Priestia megaterium* (formerly *Bacillus megaterium*), were capable of degrading PC and PLA. These bacterial genera are often linked to the decomposition of various plastics, such as PE (Kunlere et al., 2019), PS (Mohan et al., 2016), PUR (Shah et al., 2008), PP (Arkatkar et al., 2009) and PC (Arefian et al., 2023). We found that the landfill soil microbiome analyzed in this study was enriched in thermophilic actinomycetes from the genera *Thermostaphylospora* and *Thermobifida*, which constitute more than 5% and 3%, respectively, of the bacterial community. Numerous species belonging to these taxa (e.g., *Thermobifida fusca*, *Thermobifida cellulosilytica*, and *Thermomonospora fusca*) (Kleeberg et al., 2005; Herrero Acero et al., 2011) were reported to produce cutinases capable of hydrolyzing aliphatic aromatic polyesters such as PET

(Mohan et al., 2020; Gamerith et al., 2017; Herrero Acero et al., 2011).

The sewage sludge microbiome revealed *Aeromonas* and *Arcobacter* as the most prevalent genera. These bacteria, often accompanied by *Pseudomonas*, are key members of the plastisphere microbiome, known for their ability to colonize plastics by forming biofilms (McCormick et al., 2014; Harrison et al., 2018; Näkki et al., 2021; Eronen-Rasimus et al., 2022). Importantly, species of the *Arcobacter* and *Aeromonas* genera are often human and animal pathogens that can be found in various environments, including WWTP's sludge (Merga et al., 2014; Harrison et al., 2018; Amaral-Zettler et al., 2020), fresh and saline waters (Harrison et al., 2014; McCormick et al., 2014), and landfill soils (Stamps et al., 2016). Surprisingly, the presence of both *Arcobacter* and *Aeromonas* was marginal in the river water and landfill soil analyzed in this study. The genus *Arcobacter* is of particular importance in the context of PE degradation, as it has been found to largely colonize (with a total share reaching 65%) the surface of PE debris (Harrison et al., 2014). Previous research has shown that enhanced cellulose acetate-based polymer degradation, which depends on the enzymatic activity of esterases, is associated with *Arcobacter* enrichment in the bacterial community (Eronen-Rasimus et al., 2022). Similarly, an increased abundance of *Aeromonas* has been linked to PE biodegradation, indicating that enzymes secreted by *Aeromonas* play a crucial role in breaking down PE into smaller, more manageable molecules (Eronen-Rasimus et al., 2022). This finding aligns with the reported ability of *A. salmonicida* to colonize plastic surfaces (Carballo et al., 2000). *Aeromonas* appears to be a versatile contributor to the plastisphere and it has also been correlated with PET biodegradation (Gong et al., 2018). The composition of the plastisphere is complex and can vary depending on

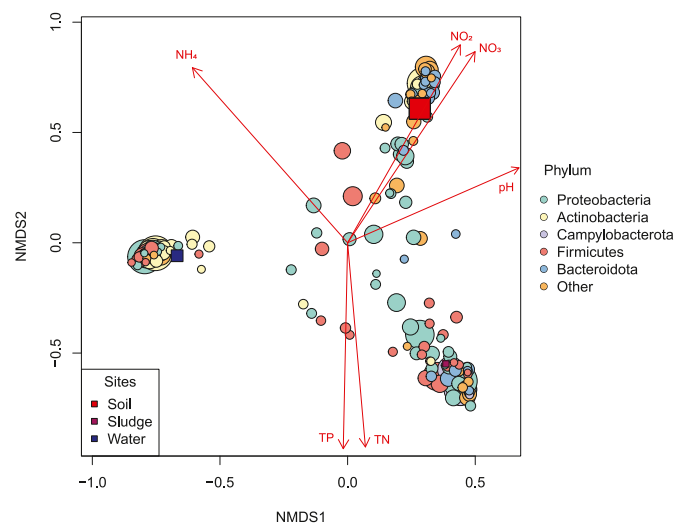


Fig. 5. Nonmetric multidimensional scaling diagram (NMDS) showing dispersion of the 200 most abundant OTUs (circles) and three analyzed sites (squares) based on Bray–Curtis dissimilarity. The ordination presents statistically significant physicochemical parameters based on a permutation test with Bonferroni correction. The circle size correlates with the abundance of the OTU, the circle color indicates the bacterial phylum, and the square size correlates with the content of nitrates at the site. The physicochemical parameters included the following parameters: pH, total phosphorus (TP), total nitrogen (TN), nitrate nitrogen ($N-NO_3$), nitrite nitrogen ($N-NO_2$), and ammonium nitrogen ($N-NH_4$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

factors such as the type of plastic, the environment, and other variables. Furthermore, some genera within the plastisphere potentially play crucial roles in plastic degradation and environmental impact, and this area of research is continuously evolving.

4.3. Microbiome alpha diversity does not correlate with CI index for MPs degradation

The relationship between the Shannon diversity and the rate of plastic biodegradation can vary depending on multiple factors, such as environmental conditions, the types of polymers, and the specific microbial communities present in the environment (Wu et al., 2019). Several studies exploring this relationship in different environments have indicated that there could be a positive correlation (Hale et al., 2019), but the results remain inconsistent. In some cases, higher microbial diversity, as measured by Shannon diversity, has been positively correlated with increased rates of plastic biodegradation (Sheridan et al., 2022). This difference is often attributed to the greater diversity of the microbiome, which is more likely to contain bacterial species capable of breaking down specific plastic polymers due to the wider range of enzymatic activity and complementary actions of microorganisms (Zrimec et al., 2021). However, microbial degradation of plastics is a very complex four-step process involving biodeterioration, biofragmentation, assimilation, and mineralization, and very different mechanisms may occur at each stage (Rujnić-Sokele and Pilipović, 2017). These mechanisms may include the following: enzymatic hydrolysis, where the extracellular microbial enzymes breakdown the polymer into smaller fragments; physical and chemical changes in the polymer structure due to oxidation; and the utilization of smaller polymer fragments as carbon and energy sources by microorganisms (Jain et al., 2023). The results obtained in our study showed no correlation between the Shannon diversity and the rate of polymer decomposition. As reported by MacLean et al. (2021), a higher biodiversity in a given environment does not necessarily mean that microbial degradation will occur more efficiently. Notably, CI is not an indicator that

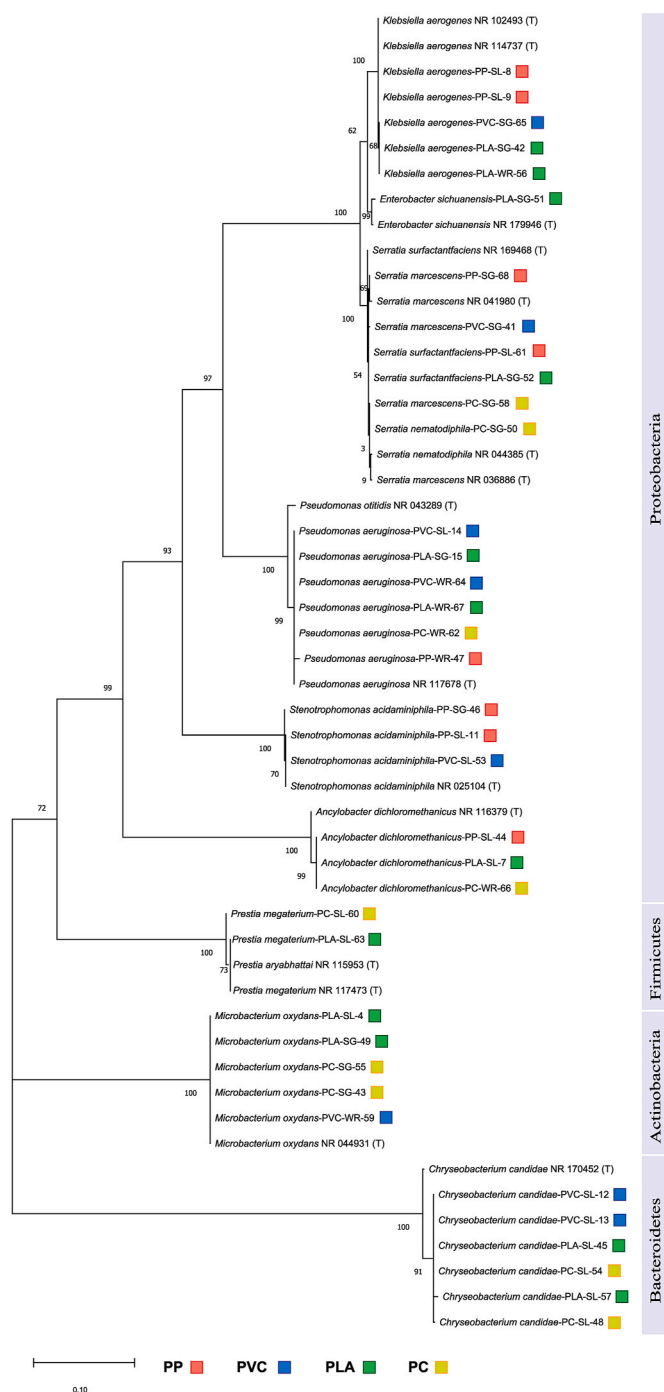


Fig. 6. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree for bacterial strains selected from environmental samples (landfill soil - SL, sludge - SG, river water - WR) based on their ability to degrade the following polymers (polypropylene (PP), polyvinyl chloride (PVC), polylactide (PLA), and polycarbonate (PC)). The tree includes type strains obtained from the GenBank 16S ribosomal RNA database and designated T that are closely related to the analyzed strains. Each strain is assigned a colored square indicating the type of polymer it degrades.

reflects the total structural changes in polymer molecules because it refers to only a selected frequency spectrum (Rouillon et al., 2016). The changes that can be observed in the spectra can be divided into two groups according to the absence (PP and PVC) or presence (PLA and PC) of a carbonyl group in the chemical structure of the polymer. In the spectra of the first group, the changes in chemical structure are associated with an increase in the CI, while in the case of the second group, a decrease in the CI is observed (Albertsson et al., 1987; Orr et al., 2004;

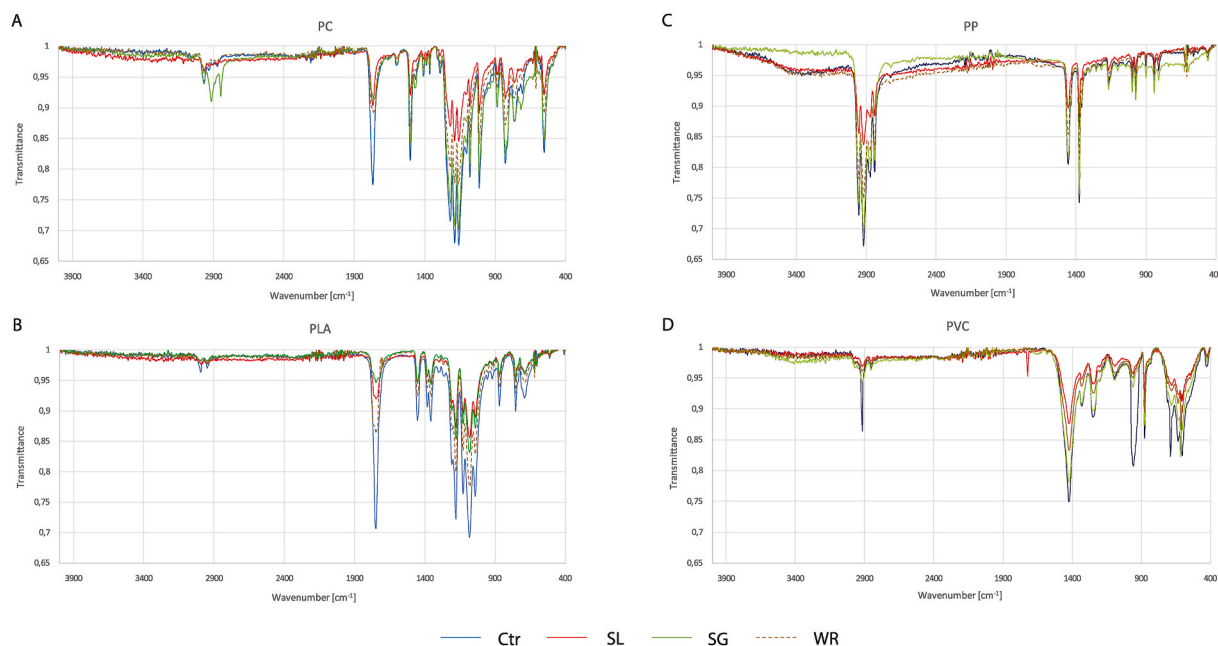


Fig. 7. Representative IR spectra for polypropylene (PP), polyvinyl chloride (PVC), polylactide (PLA), and polycarbonate (PC) not treated with bacteria (control, blue line) and after 5 weeks of incubation with microbiomes from landfill soil (SL, red line), sewage sludge (SG, green line) and river water (WR, brown dashed line). Full-range spectra (wavenumber range: 4000–400 cm^{-1}) are presented. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 2

The carbonyl indices (CIs) (means \pm standard deviations) for the tested polymers (PP, PVC, PLA, and PC) under different inoculation conditions (control - no inoculation, SL - inoculation with the soil microbiome, SG - inoculation with the sewage sludge microbiome, and WR - inoculation with the river water microbiome). Significant differences between variants (ANOVA, $p < 0.05$, with Tukey's HSD) are marked with different letters.

| Polymer | Ctr | SL | SG | WR |
|---------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| PP | 0.421 \pm 0.016 (a) | 0.522 \pm 0.031 (a) | 0.666 \pm 0.205 (a) | 0.474 \pm 0.044 (a) |
| PVC | 0.042 \pm 0.026 (b) | 0.912 \pm 0.011 (a) | 0.024 \pm 0.005 (a) | 0.037 \pm 0.008 (a) |
| PLA | 2.911 \pm 0.111 (a) | 2.053 \pm 0.072 (c) | 1.899 \pm 0.078 (c) | 2.408 \pm 0.090 (b) |
| PC | 1.712 \pm 0.021 (a) | 1.214 \pm 0.037 (b) | 1.013 \pm 0.089 (c) | 1.254 \pm 0.054 (b) |

Hadad et al., 2005; Volke-Sepúlveda et al., 2002; Balasubramanian et al., 2010; Nowak et al., 2011). This phenomenon is a direct result of the oxidation processes that occur during the biodegradation of different plastics. Typically, biodegradation begins with biofilm formation. During the biodeterioration stage, the polyolefin surface of PP or PE is protoxidized, and carbonyl groups are formed due to the activity of oxidative enzymes released by microorganisms (Mohan et al., 2020). On the other hand, in the case of PLA and PC, the presence of carbonyl groups enables easier and faster microbial attack. Thus, the breakdown of these groups results in a decrease in CI values (Zhang et al., 2022b). As is well known, the final evaluation of the degradation process requires confirmation of the structural changes, the changes in the physico-chemical parameters and the evaluation of the metabolites formed after mineralization (Silva et al., 2023).

4.4. MPs select similar bacterial genera from various environmental microbiomes

Proteobacteria were the predominant group of selected bacterial strains capable of polymer degradation, aligning with previous reports

(Marques et al., 2023). The isolates included a single species, identified as *P. aeruginosa*, which was associated with the degradation of each polymer tested. On the basis of metagenomic analysis, we found that *P. aeruginosa* was present in all studied environments, but its content in the bacterial communities varied. It exceeded 10% in the soil but was no more than 0.3% in the water and sludge. Surprisingly, we collected a total of six strains of *P. aeruginosa*, with four originating from river water; in river water, this genus was a minority. Intriguingly, these specific strains were capable of degrading all tested plastics; however, *P. aeruginosa* from the landfill soil was found only in the samples containing PVC. This observation potentially resulted from the intrinsic metabolic versatility of *P. aeruginosa*, enabling its adaptation to various polymer types and different environmental conditions. Numerous *Pseudomonas* species are ubiquitous in terrestrial and aquatic environments (Peng et al., 2014; Balasubramanian et al., 2010). The biodegradation potential of the *Pseudomonas* genus is extensive because it is one of the most frequently described and well-studied taxa that encompasses plastic decomposers. Documented cases have confirmed the degradation of 35 different plastics by members of the *Pseudomonas* genus (Gambarini et al., 2021). These microbes have shown the ability to degrade PS (Shah et al., 2008; Rajendran et al., 2016), PP (Arkatkar et al., 2010), and PVC (Danko et al., 2004). Our study further confirmed the intrinsic metabolic versatility of *Pseudomonas* species, particularly *P. aeruginosa*; these species could adapt to various polymer types (PP, PC, PVC, and PLA) in different environmental conditions.

Notably, among all isolated strains, several belonging to *Klebsiella*, *Serratia*, and *Ancylobacter* were not originally identified in the microbiomes of the strains in the tested environments but were enriched during prolonged incubation with plastics. These taxa belong to a rare microbiome genera with an abundance less than 0.01% (Reveillaud et al., 2014). The absence from the structure of the studied communities may have resulted from the moderate depth of sequencing. For instance, *Klebsiella aerogenes* was specifically enriched in each environment, although this was not initially shown in the structure of any microbiome analyzed. Notably, *Klebsiella* strains were recognized for their ability to degrade PE and PVC (Awasthi et al., 2017; Zhang et al., 2022c). In our study, this pathogenic strain was isolated from samples containing PP,

PVC, and PLA and found to have versatile metabolic activity. Furthermore, *Stenotrophomonas* sp. was previously isolated from wastewater and was confirmed to decompose polyhydroxybutyrate (PHB) and polyethylene terephthalate (PET) (Din et al., 2023; Wani et al., 2016). However, no information was found regarding the degradation of any of the polymers tested by this particular strain. Therefore, our study is the first to link *Stenotrophomonas acidaminiphila* with the biodegradation of PP and PVC in both soil and sewage sludge.

The identification of *Microbacterium oxydans* in the three studied environments is particularly noteworthy, highlighting its versatile association with plastisphere communities related to PLA (in soil and sludge), PC (in sludge), and PVC (in water). Extensive evidence in the literature supports the capacity of this bacterium for polymer degradation. Zhang et al. (2022c) observed *Microbacterium* in the gut microbiome of *Spodoptera frugiperda* larvae participating in the decomposition of PVC. Furthermore, *M. oxydans* were detected in whole-body extracts of *Galleria mellonella*, serving as a source for isolating strains that degraded low-density PE (Montazer et al., 2021). Notably, Rajandas et al. (2012) also confirmed the ability of *Microbacterium* strains to degrade PE. Finally, our findings reveal *Ancylobacter dichloromethanicus* as a consistent participant in the plastisphere, showing plastic-degrading activity against PP, PLA, and PC, despite not having been previously recognized as a potential plastic degrader.

5. Conclusions

This study underscores the critical role of environmental microbial communities in the degradation of microplastics (MPs). Our findings reveal that MPs significantly influence the diversity and structure of microbiomes across various environments, with impacts varying by habitat. Notably, river water microbiomes, while less affected by MP toxicity, still serve as a reservoir for bacterial plastic-degraders. We verified that microbiome diversity does not correlate with MPs degradation rate, suggesting that the presence of specific bacterial taxa is the key determinant of biodegradation efficiency.

The study highlights the importance of rare taxa in plastic biodegradation. These taxa can be enriched from environmental microbiomes under the selective pressure exerted by MPs, even though their contribution to the community is marginal. This enrichment method is effective for retrieving microorganisms beneficial for sustainable waste management practices.

We also show that MPs can select for similar bacterial genera across diverse environmental microbiomes. Despite differences in environmental conditions and microbiome compositions, certain bacterial genera consistently emerge as key players in plastic degradation, suggesting a potential universal biodegradation mechanism facilitated by these microbes. Future research should focus on transcriptomic and metabolomic characterization of identified plastic-degraders to enhance our understanding of their roles in bioremediation.

Funding

All microbiological and chemical analyses as well as manuscript editing were funded by the project Universitas Copernicana Thorunensis In Futuro – modernization of the Nicolaus Copernicus University as part of the Integrated University Program (project no. POWR.03.05.00–00-Z302/17–00) implemented under the Knowledge Education Development Operational Program.

CRedit authorship contribution statement

Mariusz Wróbel: Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Data curation. **Edyta Deja-Sikora:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Katarzyna Hryniewicz:** Writing – review & editing, Supervision, Conceptualization. **Tomasz**

Kowalkowski: Writing – review & editing, Project administration, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization. **Sonia Szymańska:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

The authors are very grateful to dr hab. Ewa Olewnik-Kruszkowska, prof. UMK from Department of Physical Chemistry and Physicochemistry of Polymers, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University in Toruń for assistance in interpreting the results from FTIR analysis and sharing a grinder for microplastics preparation.

Appendix ASupplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142933>.

References

- Albertsson, A.-C., Andersson, S.O., Karlsson, S., 1987. The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polym. Degrad. Stabil.* 18, 73–87. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(87\)90084-X](https://doi.org/10.1016/0141-3910(87)90084-X).
- Amaral-Zettler, L.A., Zettler, E.R., Mincer, T.J., 2020. Ecology of the plastisphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 18, 139–151. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0308-0>.
- Arefian, M., Tahmourespour, A., Zia, M., 2023. Polycarbonate biodegradation by newly isolated *Bacillus* strains. *Arch. Environ. Protect.* <https://doi.org/10.24425/aep.2020.132521>.
- Arkatkar, A., Arutchelvi, J., Bhaduri, S., Uppara, P.V., Doble, M., 2009. Degradation of untreated and thermally pretreated polypropylene by soil consortia. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.06.005>.
- Arkatkar, A., Juwarkar, A.A., Bhaduri, S., Uppara, P.V., Doble, M., 2010. Growth of *Pseudomonas* and *Bacillus* biofilms on pretreated polypropylene surface. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 530–536. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.002>.
- Auta, H.S., Emenike, C.U., Jayanthi, B., Fauziah, S.H., 2018. Growth kinetics and biodegradation of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment. *Mar. Pollut. Bull.* 127, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.036>.
- Awasthi, S., Srivastava, P., Singh, P., Tiwary, D., Mishra, P.K., 2017. Biodegradation of thermally treated high-density polyethylene (HDPE) by *Klebsiella pneumoniae* CH001. *3 Biotech* 7, 332. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0959-3>.
- Bacha, A.-U.-R., Nabi, I., Zaheer, M., Jin, W., Yang, L., 2023. Biodegradation of macro- and micro-plastics in environment: a review on mechanism, toxicity, and future perspectives. *Sci. Total Environ.* 858, 160108. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160108>.
- Balasubramanian, V., Natarajan, K., Hemambika, B., Ramesh, N., Sumathi, C.S., Kottaimuthu, R., Rajesh Kannan, V., 2010. High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Lett. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02883.x>.
- Boucher, J., Friot, D., 2017. Primary Microplastics in the Oceans: a Global Evaluation of Sources. *IUCN*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2017.01.en>.
- Cai, Z., Li, M., Zhu, Z., Wang, X., Huang, Y., Li, T., Gong, H., Yan, M., 2023. Biological degradation of plastics and microplastics: a recent perspective on associated mechanisms and influencing factors. *Microorganisms* 11, 1661. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071661>.
- Cao, Y., Dong, Q., Wang, D., Zhang, P., Liu, Y., Niu, C., 2022. microbiomeMarker: an R/Bioconductor package for microbiome marker identification and visualization. *J. Bioinform.* 38, 4027–4029. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac438>.
- Carballo, J., Seoane, R.M., Nieto, T.P., 2000. Adhesion of *Aeromonas salmonicida* to materials used in aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 20, 77–82.
- Chukwuma, O.B., Rafatullah, M., Tajarudin, H.A., Ismail, N., 2021. Bacterial diversity and community structure of a municipal solid waste landfill: a source of lignocellulolytic potential. *Life* 11, 493. <https://doi.org/10.3390/life11060493>.
- Danko, A.S., Luo, M., Bagwell, C.E., Brigmon, R.L., Freedman, D.L., 2004. Involvement of linear plasmids in aerobic biodegradation of vinyl chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6092–6097. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6092-6097.2004>.

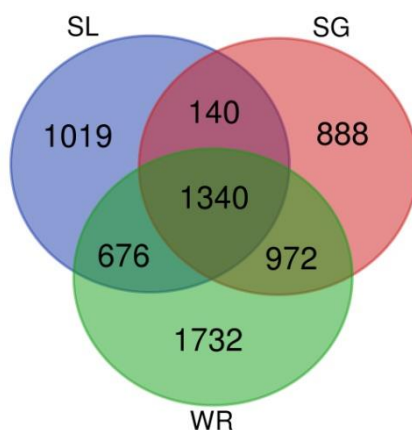
- package version 2.6-2 April 2022. The comprehensive R archive network. <http://cran.r-project.org>.
- Omidoyin, K.C., Jho, E.H., 2023. Effect of microplastics on soil microbial community and microbial degradation of microplastics in soil: a review. *Environ. Res.* 218, 1120716. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.1120716>.
- Orr, I., Hadar, Y., Sivan, A., 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1584-8>.
- Pansu, M., Gautheyrou, J., 2006. *Handbook of Soil Analysis, Organic and Inorganic Methods*. Springer, Berlin-Heidelberg.
- Parsaeimehr, A., Miller, C.M., Ozbay, G., 2023. Microplastics and their interactions with microbiota. *Heliyon* 9, e15104. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15104>.
- Peng, Y.-H., Shih, Y., Lai, Y.-C., Liu, Y.-Z., Liu, Y.-T., Lin, N.-C., 2014. Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. *ESPR* 21, 9529–9537. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2647-8>.
- Penkhrue, W., Khanongnuch, C., Masaki, K., Pathom-aree, W., Punyodom, W., Lumyong, S., 2015. Isolation and screening of biopolymer-degrading microorganisms from northern Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1431–1442. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1895-1>.
- Poł, W., Żmijewska, A., Stasińska, E., Zieliński, P., 2022. Spatial-temporal distribution of microplastics in lowland rivers flowing through two cities (NE Poland). *Water, Air, Soil Pollut.* 233, 140. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-05608-7>.
- Pramuda, H., Tokiwa, Y., Tanaka, H., 1997. Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1637–1640. <https://doi.org/10.1128/aem.63.4.1637-1640.1997>.
- R Core Team, 2023. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R foundation for statistical computing, Vienna. <https://www.R-project.org/>.
- Rajandas, H., Parimannan, S., Sathasivam, K., Ravichandran, M., Su Yin, L., 2012. A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. *Polym. Test.* 31, 1094–1099. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.07.015>.
- Rajendran, S., Kannan, V.R., Natarajan, K., Arokiaswamy, Robert Antony, Durai, N., Kannan, K., Sekar, K., 2016. Persistent organic pollutants and bacterial communities present during the treatment of tannery wastewater. *Environmental Waste Management*. CRC Press, pp. 231–262. <https://doi.org/10.1201/b19243-13>.
- Reveillaud, J., Maignien, L., Eren, A.M., Huber, J.A., Apprill, A., Sogin, M.L., Vanreusel, A., 2014. Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. *ISME J.* 8, 1198–1209. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.227>.
- Rouillon, C., Bussiere, P.-O., Desnoux, E., Collin, S., Vial, C., Therias, S., Gardette, J.-L., 2016. Is carbonyl index a quantitative probe to monitor polypropylene photodegradation? *Polym. Degrad. Stabil.* 128, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.12.011>.
- Rujnić-Sokele, M., Pilipović, A., 2017. Challenges and opportunities of biodegradable plastics: a mini review. *WM and R* 35, 132–140. <https://doi.org/10.1177/0734242X16683272>.
- Saeedi, M., 2024. How microplastics interact with food chain: a short overview of fate and impacts. *J. Food Sci. Technol.* 61, 403–413. <https://doi.org/10.1007/s13197-023-05720-4>.
- Schmidt, C., Krauth, T., Wagner, S., 2017. Export of plastic debris by rivers into the sea. *Environ. Sci. Technol.* 51, 12246–12253. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02368>.
- Sekudewicz, I., Dąbrowska, A.M., Syczewski, M.D., 2021. Microplastic pollution in surface water and sediments in the urban section of the Vistula River (Poland). *Sci. Total Environ.* 762, 143111. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143111>.
- Selvarajan, R., Ogola, H., Kalu, C.M., Sibanda, T., Obize, C., 2022. Bacterial communities in informal dump sites: a rich source of unique diversity and functional potential for bioremediation applications. *Appl. Sci.* 12, 12862. <https://doi.org/10.3390/app122412862>.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26, 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>.
- Sheridan, E.A., Fonvielle, J.A., Cottingham, S., Zhang, Y., Dittmar, T., Aldridge, D.C., Tanentzap, A.J., 2022. Plastic pollution fosters more microbial growth in lakes than natural organic matter. *Nat. Commun.* 13, 4175. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31691-9>.
- Shimpi, N., Borane, M., Mishra, S., Kadam, M., Sonawane, S.S., 2018. Biodegradation of isotactic polypropylene (iPP)/poly(lactic acid) (PLA) and iPP/PLA/nano calcium carbonates using *Phanerochaete chrysosporium*. *Adv. Polym. Technol.* 37, 522–530. <https://doi.org/10.1002/adv.21691>.
- Silva, R.R.A., Marques, C.S., Arruda, T.R., Teixeira, S.C., de Oliveira, T.V., 2023. Biodegradation of polymers: stages, measurement, standards and prospects. *Macromolecules* (Washington, DC, U. S.) 3, 371–399. <https://doi.org/10.3390/macromol3020023>.
- Skariyachan, S., Patil, A.A., Shankar, A., Manjunath, M., Bachapanavar, N., Kiran, S., 2018. Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants. *Polym. Degrad. Stabil.* 149, 92–68. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.01.018>.
- Stamps, B.W., Lyles, C.N., Suffita, J.M., Masoner, J.R., Cozzarelli, I.M., Kolpin, D.W., Stevenson, B.S., 2016. Municipal solid waste landfills harbor distinct microbiomes. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00534>.
- Sutkar, P.R., Gadewar, R.D., Dhulap, V.P., 2023. Recent trends in degradation of microplastics in the environment: a state-of-the-art review. *JHM Advances* 11, 100343. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2023.100343>.
- Tokiwa, Y., Calabria, B.P., 2006. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 244–251. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0488-1>.
- Tun, T.Z., Kunisue, T., Tanabe, S., Prudente, M., Subramanian, A., Sudaryanto, A., Viet, P.H., Nakata, H., 2022. Microplastics in dumping site soils from six Asian countries as a source of plastic additives. *Sci. Total Environ.* 806, 150912. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150912>.
- Van Reeuwijk, L.P., 2002. *Procedures for soil analysis*. In: *International Soil Reference and Information Center (Wageningen)*.
- Volke-Sepúlveda, T., Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M., Manzur, A., Favela-Torres, E., 2002. Thermally treated low density polyethylene biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. *J. Appl. Polym. Sci.* 83, 305–314. <https://doi.org/10.1002/app.2245>.
- Wani, S.J., Shaikh, S.S., Tabassum, B., Thakur, R., Gulati, A., Sayyed, R.Z., 2016. *Stenotrophomonas* sp. RZS 7, a novel PHB degrader isolated from plastic contaminated soil in Shahada, Maharashtra, Western India. *3 Biotech* 6, 179. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0477-8>.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*. Elsevier, pp. 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T., Hryniewicz, K., 2023. Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation. *Microbiol. Res.* 267, 127251. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127251>.
- Wu, Linwei, Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., Shan, X., Zhang, Qiuting, Brown, M.R., Li, Z., Van Nostrand, J.D., Ling, F., Xiao, N., Zhang, Ya, Vierheilig, J., Wells, G.F., Yang, Y., Deng, Y., Tu, Q., Wang, A., Acevedo, D., Agullo-Barcelo, M., Alvarez, P.J.J., Alvarez-Cohen, L., Andersen, G.L., de Araujo, J.C., Boehnke, K.F., Bond, P., Bott, C. B., Bovio, P., Brewster, R.K., Bux, F., Cabezas, A., Cabrol, L., Chen, S., Criddle, C.S., Deng, Y., Etchebehere, C., Ford, A., Frigon, D., Sanabria, J., Griffin, J.S., Gu, A.Z., Habagil, M., Hale, L., Hardeman, S.D., Harmon, M., Horn, H., Hu, Z., Jauffur, S., Johnson, D.R., Keller, J., Keucken, A., Kumari, S., Leal, C.D., Lebrun, L.A., Lee, J., Lee, M., Lee, Z.M.P., Li, Y., Li, Z., Li, M., Li, X., Ling, F., Liu, Y., Luthy, R.G., Mendonça-Hagler, L.C., de Menezes, F.G.R., Meyers, A.J., Mohebbi, A., Nielsen, P.H., Ning, D., Oehmen, A., Palmer, A., Parameswaran, P., Park, J., Patsch, D., Reginatto, V., de los Reyes, F.L., Rittmann, B.E., Noyola, A., Rossetti, S., Shan, X., Sidhu, J., Sloan, W.T., Smith, K., de Sousa, O.V., Stahl, D.A., Stephens, K., Tian, R., Tiedje, J.M., Tooker, N.B., Tu, Q., Van Nostrand, J.D., De los Cobos Vasconcelos, D., Vierheilig, J., Wagner, M., Wakelin, S., Wang, A., Wang, B., Weaver, J.E., Wells, G.F., West, S., Wilmes, P., Woo, S.-G., Wu, Linwei, Wu, J.-H., Wu, Liyou, Xi, C., Xiao, N., Xu, M., Yan, T., Yang, Y., Yang, M., Young, M., Yue, H., Zhang, B., Zhang, P., Zhang, Qiuting, Zhang, Ya, Zhang, T., Zhang, Qian, Zhang, W., Zhang, Yu, Zhou, H., Zhou, J., Wen, X., Curtis, T.P., He, Q., He, Z., Brown, M.R., Zhang, T., He, Z., Keller, J., Nielsen, P.H., Alvarez, P.J.J., Criddle, C.S., Wagner, M., Tiedje, J.M., He, Q., Curtis, T.P., Stahl, D.A., Alvarez-Cohen, L., Rittmann, B.E., Wen, X., Zhou, J., 2019. Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nat. Microbiol.* 4, 1183–1195. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0426-5>.
- Xie, H.-J., Shi, Y.-J., Zhang, J., Cui, Y., Teng, S.-X., Wang, S.-G., Zhao, R., 2010. Degradation of phthalate esters (PAEs) in soil and the effects of PAEs on soil microcosm activity. *JCTB* 85, 1108–1116. <https://doi.org/10.1002/jctb.2406>.
- Xu, S., Yao, J., Ainiwaer, M., Hong, Y., Zhang, Y., 2018. Analysis of bacterial community structure of activated sludge from wastewater treatment plants in winter. *BioMed Res. Int.* 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/8278970>, 2018.
- Yang, J., Li, L., Li, R., Xu, L., Shen, Y., Li, S., Tu, C., Wu, L., Christie, P., Luo, Y., 2021. Microplastics in an agricultural soil following repeated application of three types of sewage sludge: a field study. *Environ. Pollut.* 289, 117943. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117943>.
- Yottakot, S., Leelavatharamas, V., 2019. Isolation and optimisation of poly(lactic acid) (PLA)-packaging-degrading Actinomycete for PLA-packaging degradation. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 4, 1111–1129.
- Yousif, E., Yusop, R., Ahmed, A., Salimon, J., Salih, N., 2015. Photostabilizing efficiency of PVC based on epoxidizedoleic acid. *MJAS* 19, 213–221.
- Yu, E.-M., Li, Z.-C., Li, Z.-F., Wang, G.-J., Xia, Y., Zhang, K., Tian, J.-J., Gong, W.-B., Xie, J., 2021. New insights into the relationships between bacterial dynamics and water quality of aquaculture systems supplemented with carbon source and biofilm substratum. *Microorganisms* 9, 2168. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102168>.
- Yue, W., Yin, C.-F., Sun, L., Zhang, J., Xu, Y., Zhou, N.-Y., 2021. Biodegradation of bisphenol-A polycarbonate plastic by *Pseudoxanthomonas* sp. strain NyZ600. *J. Hazard Mater.* 416, 125775. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125775>.
- Zhang, J., Ren, S., Xu, W., Liang, C., Li, J., Zhang, H., Li, Y., Liu, X., Jones, D.L., Chadwick, D.R., Zhang, F., Wang, K., 2022a. Effects of plastic residues and microplastics on soil ecosystems: a global meta-analysis. *J. Hazard Mater.* 435, 129065. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129065>.
- Zhang, Y., Gao, W., Mo, A., Jiang, J., He, D., 2022b. Degradation of poly(lactic acid)/polybutylene adipate films in different ratios and the response of bacterial community in soil environments. *Environ. Pollut.* 313, 120167. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120167>.

Zhang, Z., Peng, H., Yang, D., Zhang, G., Zhang, J., Ju, F., 2022c. Polyvinyl chloride degradation by a bacterium isolated from the gut of insect larvae. *Nat. Commun.* 13, 5360. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32903-y>.

Zhaorong, M., Yousheng, L., Qianqian, Z., Guangguo, Y., 2020. The usage and environmental pollution of agricultural plastic film. *Asian J. Ecotoxicol.* 15, 21–32. <https://doi.org/10.7524/AJE.1673-5897.20191010002>.

Zrimec, J., Kokina, M., Jonasson, S., Zorrilla, F., Zelezniak, A., 2021. Plastic-degrading potential across the global microbiome correlates with recent pollution trends. *mBio* 12. <https://doi.org/10.1128/mBio.02155-21>.

S2 – Materiały uzupełniające (Supplementary)



Supplementary Figure A. Venn diagram showing the distribution of bacterial OTUs across the studied environments: sewage sludge (SG, red), landfill soil (SL, blue), and river water (WR, green). The number of unique and shared OTUs for the compared microbiomes is presented.

Supplementary Table A. Sequencing statistics for the 16 rRNA amplicon libraries.

| Environment | Sample | RawPE | Combined | Qualified | Nochime | Base(nt) | Avglen(nt) | Q20 | Q30 | Effective% |
|-------------|--------|--------|----------|-----------|---------|----------|------------|--------|--------|------------|
| Sludge | SG2b | 132130 | 128894 | 125353 | 112193 | 47124611 | 420.03 | 98.12% | 93.97% | 87.04% |
| | SG3b | 139816 | 135851 | 131895 | 116714 | 49019092 | 419.99 | 98.10% | 93.95% | 85.91% |
| | SG4b | 132373 | 129228 | 125613 | 110391 | 46186640 | 418.39 | 98.10% | 93.96% | 85.42% |
| | SG5b | 132096 | 128843 | 125387 | 112630 | 47306290 | 420.02 | 98.08% | 93.92% | 87.42% |
| | SG6b | 133299 | 130690 | 127213 | 115096 | 48364362 | 420.21 | 98.11% | 93.92% | 88.07% |
| Soil | SL7b | 134172 | 130992 | 126730 | 114054 | 47994925 | 420.81 | 97.75% | 93.18% | 87.07% |
| | SL8b | 131824 | 128328 | 124667 | 113061 | 47567203 | 420.72 | 97.92% | 93.54% | 88.10% |
| | SL9b | 118398 | 115756 | 112752 | 97549 | 40721922 | 417.45 | 97.93% | 93.69% | 84.27% |
| | SL10b | 119410 | 116464 | 113016 | 102076 | 42847256 | 419.76 | 98.00% | 93.82% | 87.65% |
| | SL11b | 117653 | 114773 | 111421 | 99257 | 41553163 | 418.64 | 98.04% | 93.91% | 86.48% |
| Water | WR12b | 134150 | 130691 | 127119 | 112363 | 46972862 | 418.05 | 98.04% | 93.79% | 85.98% |
| | WR14b | 135348 | 131658 | 128206 | 115321 | 47956211 | 415.85 | 98.10% | 93.92% | 87.59% |
| | WR16b | 148650 | 144383 | 140730 | 131477 | 54591176 | 415.21 | 98.10% | 93.85% | 91.06% |
| | WR17b | 132277 | 128691 | 125438 | 111837 | 46547492 | 416.21 | 98.11% | 93.89% | 86.90% |
| | WR18b | 136360 | 132745 | 129055 | 114297 | 47527683 | 415.83 | 98.10% | 93.90% | 86.10% |

Supplementary Table B. Alpha diversity of the samples collected from three different environments.

| Environment | Sample | Observed | Chao1 | se.chao1 | ACE | se.ACE | Shannon | Simpson | InvSimp |
|--------------------|---------------|-----------------|--------------|-----------------|------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Sludge | SG2 | 2105 | 2599.265 | 52.78129 | 2691.168 | 26.36782 | 4.897189 | 0.9687696 | 32.02012 |
| | SG3 | 2058 | 2551.853 | 53.79571 | 2613.355 | 26.00624 | 4.813981 | 0.9644196 | 28.10540 |
| | SG4 | 1854 | 2316.065 | 51.86584 | 2405.119 | 25.17475 | 4.591503 | 0.9636095 | 27.47973 |
| | SG5 | 2546 | 3277.989 | 66.74507 | 3399.293 | 30.29601 | 4.751597 | 0.9608166 | 25.52100 |
| | SG6 | 2239 | 2899.675 | 63.41830 | 3020.342 | 28.66618 | 4.490810 | 0.9574092 | 23.47925 |
| Soil | SL7 | 1615 | 2214.250 | 64.01114 | 2335.331 | 26.71746 | 3.720421 | 0.9182757 | 12.23627 |
| | SL8 | 2051 | 2780.391 | 72.40572 | 2850.805 | 28.58727 | 4.385055 | 0.9344825 | 15.26309 |
| | SL9 | 1667 | 1942.782 | 37.14392 | 1964.915 | 21.74056 | 4.566360 | 0.9393936 | 16.49991 |
| | SL10 | 2056 | 2592.419 | 57.15445 | 2646.096 | 26.20988 | 4.982317 | 0.9764279 | 42.42308 |
| | SL11 | 2357 | 2911.091 | 55.23105 | 3014.691 | 27.66928 | 4.976874 | 0.9711485 | 34.66024 |
| Water | WR12 | 3003 | 3736.907 | 62.08428 | 3940.250 | 32.30283 | 5.202373 | 0.9790910 | 47.82625 |
| | WR14 | 2998 | 3430.115 | 41.42620 | 3594.388 | 28.86420 | 5.398789 | 0.9796477 | 49.13456 |
| | WR16 | 2275 | 2728.151 | 46.18382 | 2865.677 | 26.89277 | 4.846120 | 0.9727357 | 36.67800 |
| | WR17 | 2915 | 3528.003 | 54.44895 | 3734.175 | 31.30986 | 5.537253 | 0.9844164 | 64.17018 |
| | WR18 | 2930 | 3609.546 | 58.76692 | 3822.232 | 32.15826 | 5.502073 | 0.9847537 | 65.58972 |

Supplementary Table C. Differentially abundant OTUs in the analyzed environments based on LefSe analysis.

| | Feature | enrich_grop | ef_lda | pvalue |
|----------|--|-------------|------------------|---------------------|
| marker1 | g_Aeromonas | Sludge | 4.8985213932432 | 0.00245408818041391 |
| marker2 | g_Arcobacter | Sludge | 4.80236343208878 | 0.00631017797340678 |
| marker3 | g_Acinetobacter | Sludge | 4.69045837652575 | 0.00814785969767997 |
| marker4 | g_Bacteroides | Sludge | 4.65793647267232 | 0.0074559137922491 |
| marker5 | g_Trichococcus | Sludge | 4.59363455880227 | 0.0089292242292995 |
| marker6 | g_Pseudarcobacter | Sludge | 4.48299973248217 | 0.00245408818041391 |
| marker7 | g_Candidatus_Microthrix | Sludge | 4.21663366025796 | 0.00486306220321926 |
| marker8 | p_Campylobacterota_f_Arcobacteraceae | Sludge | 4.13218197766915 | 0.00242784476860532 |
| marker9 | g_Macellibacteroides | Sludge | 4.0525964818708 | 0.00242784476860532 |
| marker10 | g_Enterococcus | Sludge | 4.03581795120842 | 0.00900477758243655 |
| marker11 | p_unidentified_Bacteria_f_Actinomycetaceae | Sludge | 3.95477253653322 | 0.00467359199974446 |
| marker12 | p_Proteobacteria_o_Enterobacterales | Sludge | 3.92139116867369 | 0.00321882549606629 |
| marker13 | g_Enhydrobacter | Sludge | 3.86721367253082 | 0.00829899273040929 |
| marker14 | g_Leptotrichia | Sludge | 3.85010573983122 | 0.00421716550555259 |
| marker15 | g_Citrobacter | Sludge | 3.82903955150186 | 0.00680566449223056 |
| marker16 | g_Thauera | Sludge | 3.82738110595201 | 0.00905624163770228 |
| marker17 | g_Acidovorax | Sludge | 3.80447690545323 | 0.00814785969767997 |
| marker18 | g_Vagococcus | Sludge | 3.79211509493477 | 0.00800859336353107 |
| marker19 | g_Uruburuella | Sludge | 3.71720718298058 | 0.00210360536870227 |
| marker20 | g_Comamonas | Sludge | 3.67841166107547 | 0.00242784476860532 |
| marker21 | g_Cetobacterium | Sludge | 3.67563260409808 | 0.00300095853580599 |
| marker22 | g_Lachnoclostridium | Sludge | 3.61477705031363 | 0.00896719986616963 |
| marker23 | g_Propionivibrio | Sludge | 3.61258816434115 | 0.00268885993058316 |
| marker24 | g_Proteocatella | Sludge | 3.58537882543149 | 0.00645650798676583 |
| marker25 | f_Caldilineaceae | Sludge | 3.56369637582434 | 0.00476978262950539 |
| marker26 | g_Cloacibacterium | Sludge | 3.48438080971984 | 0.00681943849875872 |
| marker27 | o_Saccharimonadales | Sludge | 3.40006054365254 | 0.00524751839918138 |
| marker28 | g_Prevotella_9 | Sludge | 3.38058632353727 | 0.0075126187581603 |
| marker29 | g_Tolumonas | Sludge | 3.36942238905372 | 0.00386018676797056 |
| marker30 | g_Fusobacterium | Sludge | 3.35763894760894 | 0.00423614100667364 |
| marker31 | g_Candidatus_Competibacter | Sludge | 3.35542885879208 | 0.00213462911164494 |
| marker32 | g_Alysiella | Sludge | 3.30375623732491 | 0.00296448299341755 |
| marker33 | g_Sulfurospirillum | Sludge | 3.27697410203455 | 0.00170323194838346 |
| marker34 | g_Vitreoscilla | Sludge | 3.21621253636293 | 0.00429344144214741 |
| marker35 | g_Acetoanaerobium | Sludge | 3.20919261747181 | 0.0069306971513832 |
| marker36 | g_Zoogloea | Sludge | 3.20008193859048 | 0.00903354836465739 |
| marker37 | g_Blautia | Sludge | 3.19812889577546 | 0.0207144640379963 |
| marker38 | g_Paracoccus | Sludge | 3.19751605481323 | 0.00857849047189916 |
| marker39 | g_Propionispira | Sludge | 3.19447565546853 | 0.0045425133937338 |
| marker40 | g_Dechloromonas | Sludge | 3.18398061753154 | 0.00193045413622771 |
| marker41 | f_Enterobacteriaceae | Sludge | 3.1789947824202 | 0.00877404746789386 |
| marker42 | g_Faecalibacterium | Sludge | 3.1683639962861 | 0.00852701321848007 |
| marker43 | g_Lactococcus | Sludge | 3.16111250943861 | 0.00918668615624469 |

| | | | | |
|----------|--|--------|------------------|---------------------|
| marker44 | g_Erysipelotrichaceae_UCG-003 | Sludge | 3.14836229113142 | 0.0341218211879231 |
| marker45 | g_Candidatus_Accumulibacter | Sludge | 3.1406142503711 | 0.00180410702846182 |
| marker46 | g_Hypnocyclus | Sludge | 3.13143167652551 | 0.00429344144214741 |
| marker47 | f_Lachnospiraceae | Sludge | 3.11561802115653 | 0.00305798217642331 |
| marker48 | g_Peptoniphilus | Sludge | 3.08360569590683 | 0.00292829969481819 |
| marker49 | g_Desulfobulbus | Sludge | 3.07842570397321 | 0.0019089905589745 |
| marker50 | g_Agathobacter | Sludge | 3.06866542415614 | 0.0059265358391849 |
| marker51 | g_Phascalactobacterium | Sludge | 3.05320213610352 | 0.010740949819173 |
| marker52 | g_Peptostreptococcus | Sludge | 3.04333942810664 | 0.00932863416424983 |
| marker53 | g_Angelakisella | Sludge | 3.04271471201841 | 0.00512901264460003 |
| marker54 | g_Desulfovibrio | Sludge | 3.0308425437495 | 0.00650649119536142 |
| marker55 | g_Actinomyces | Sludge | 3.02678410944563 | 0.0089292242292995 |
| marker56 | g_Sealdella | Sludge | 3.01293983878134 | 0.00292829969481819 |
| marker57 | g_Ottowia | Sludge | 3.00606712708078 | 0.00213462911164494 |
| marker58 | g_Laribacter | Sludge | 2.98875495204821 | 0.00477460302589118 |
| marker59 | f_ST-12K33 | Sludge | 2.97523851369947 | 0.00292829969481819 |
| marker60 | g_Tetrasphaera | Sludge | 2.97437569558906 | 0.00778021166206075 |
| marker61 | p_unidentified_Bacteria_f_Acidaminococcaceae | Sludge | 2.9705738320529 | 0.00866576172641378 |
| marker62 | g_Paucilactobacillus | Sludge | 2.94365856533674 | 0.00847961619615397 |
| marker63 | g_Formivibrio | Sludge | 2.93443252069161 | 0.00427682034920893 |
| marker64 | p_unidentified_Bacteria_f_Eubacteriaceae | Sludge | 2.90313398169906 | 0.00848360116902765 |
| marker65 | g_Latilactobacillus | Sludge | 2.89647705476879 | 0.00797752542664261 |
| marker66 | o_Run-SP154 | Sludge | 2.89316004175548 | 0.00192992676179137 |
| marker67 | p_Firmicutes | Sludge | 2.87723838755625 | 0.00836103829299707 |
| marker68 | g_Dysgonomonas | Sludge | 2.8434494060719 | 0.00153154004957021 |
| marker69 | g_Desulfomicrobium | Sludge | 2.82864641260603 | 0.00863067611323469 |
| marker70 | f_Bacteroidetes_vadinHA17 | Sludge | 2.8264995966038 | 0.00806242789190011 |
| marker71 | g_Erysipelothrix | Sludge | 2.79851989239856 | 0.0069306971513832 |
| marker72 | g_Gallicola | Sludge | 2.79840627711415 | 0.00398062757691798 |
| marker73 | g_JTB215 | Sludge | 2.79394533955254 | 0.00688935523764198 |
| marker74 | g_Pygmaibacter | Sludge | 2.79042023996561 | 0.00608520577201696 |
| marker75 | g_Yersinia | Sludge | 2.79040636866374 | 0.00650649119536142 |
| marker76 | g_Christensenellaceae_R-7_group | Sludge | 2.78146001917749 | 0.00514969801288225 |
| marker77 | g_XBB1006 | Sludge | 2.77780783303432 | 0.00300095853580599 |
| marker78 | g_Shinella | Sludge | 2.77445733432106 | 0.0106871875800842 |
| marker79 | g_Paludibacter | Sludge | 2.76369108584165 | 0.00538496674357932 |
| marker80 | f_DEV007 | Sludge | 2.75651885290032 | 0.00726142015154223 |
| marker81 | g_Succinispira | Sludge | 2.71771455848745 | 0.00477460302589118 |
| marker82 | g_Clostridium_sensu_stricto_5 | Sludge | 2.71710600098949 | 0.017969390667562 |
| marker83 | p_Bacteroidota_c_Bacteroidia | Sludge | 2.71555306787924 | 0.0030264717352835 |
| marker84 | g_Falsiporphyrmonas | Sludge | 2.69631246884968 | 0.00300095853580599 |
| marker85 | g_Ruminococcus | Sludge | 2.66335830702309 | 0.00529380167556909 |
| marker86 | g_Lachnospira | Sludge | 2.66090964054746 | 0.00681943849875872 |
| marker87 | p_unidentified_Bacteria_o_Microtrichales | Sludge | 2.65979687001061 | 0.00598115656744718 |
| marker88 | g_Roseburia | Sludge | 2.65256594547932 | 0.00764572494861239 |
| marker89 | g_Sedimentibacter | Sludge | 2.64894178022898 | 0.00822674403973058 |

| | | | | |
|-----------|---|--------|------------------|---------------------|
| marker90 | g_Longilinea | Sludge | 2.64564825689497 | 0.00449590224119385 |
| marker91 | g_Companilactobacillus | Sludge | 2.6450845344364 | 0.00975475910234288 |
| marker92 | g_W5 | Sludge | 2.6433951117748 | 0.00233620955207365 |
| marker93 | g_Romboutsia | Sludge | 2.64216556236888 | 0.00438576732002492 |
| marker94 | g_Simplicispira | Sludge | 2.63562477434349 | 0.008433162045407 |
| marker95 | p_unidentified_Bacteria_f_Synergistaceae | Sludge | 2.63345379207709 | 0.0079099562552869 |
| marker96 | p_Proteobacteria_f_Spongiibacteraceae | Sludge | 2.6315170873285 | 0.00188768997350398 |
| marker97 | g_Parabacteroides | Sludge | 2.60642798501626 | 0.00681827925135103 |
| marker98 | g_Subdoligranulum | Sludge | 2.59211589251043 | 0.00920165340607139 |
| marker99 | g_Thermomonas | Sludge | 2.58968963828405 | 0.00896580916687303 |
| marker100 | g_Dechlorobacter | Sludge | 2.58269507512052 | 0.00604239257440519 |
| marker101 | g_TM7a | Sludge | 2.57824937658023 | 0.0151090767720082 |
| marker102 | g_NK4A214_group | Sludge | 2.57453002801368 | 0.00880661397040661 |
| marker103 | g_Collinsella | Sludge | 2.56383466179716 | 0.00862610422627031 |
| marker104 | g_Shuttleworthia | Sludge | 2.5637933897638 | 0.00296448299341755 |
| marker105 | g_Porphyrmonas | Sludge | 2.55977881992585 | 0.00440077760187292 |
| marker106 | p_unidentified_Bacteria_f_Arcobacteraceae | Sludge | 2.53890026802723 | 0.015299054929203 |
| marker107 | g_[Eubacterium]_hallii_group | Sludge | 2.53708073339189 | 0.0373429101170538 |
| marker108 | g_Catenibacterium | Sludge | 2.53702279636809 | 0.0072931637378115 |
| marker109 | g_Anaerostignum | Sludge | 2.53546156155408 | 0.00292829969481819 |
| marker110 | g_Loigolactobacillus | Sludge | 2.52541596565669 | 0.0113334131546673 |
| marker111 | g_Proteiniphilum | Sludge | 2.52453037718603 | 0.00910993245506058 |
| marker112 | g_UCG-002 | Sludge | 2.51545245023711 | 0.0112254882984581 |
| marker113 | g_Haloimpatiens | Sludge | 2.51418609854172 | 0.0159582749637878 |
| marker114 | g_[Cytophaga]_xylanolytica_group | Sludge | 2.51345167414932 | 0.0069306971513832 |
| marker115 | g_Williamwhitmania | Sludge | 2.49420894687728 | 0.0214574816129086 |
| marker116 | g_Anaerostipes | Sludge | 2.49216105000826 | 0.0172664009801119 |
| marker117 | f_Saccharimonadaceae | Sludge | 2.48323959288743 | 0.00483040759112827 |
| marker118 | g_[Ruminococcus]_torques_group | Sludge | 2.48286473008661 | 0.0125762828867655 |
| marker119 | g_Dokdonella | Sludge | 2.47770523608793 | 0.00836103829299707 |
| marker120 | f_T34 | Sludge | 2.46696632917424 | 0.00229219759111113 |
| marker121 | g_Brachymonas | Sludge | 2.4578265556515 | 0.00752449877855242 |
| marker122 | g_Shewanella | Sludge | 2.44765717802561 | 0.0121551783299149 |
| marker123 | g_Smithella | Sludge | 2.44704243947434 | 0.00477460302589118 |
| marker124 | g_Fusicatenibacter | Sludge | 2.43976720925462 | 0.00539707677355459 |
| marker125 | f_[Eubacterium]_coprostanoligenes_group | Sludge | 2.41989209670951 | 0.00692330201384091 |
| marker126 | f_009E01-B-SD-P15 | Sludge | 2.40181644436384 | 0.00296448299341755 |
| marker127 | f_A0839 | Sludge | 2.40134598183144 | 0.00184557567944834 |
| marker128 | o_RsaHf231 | Sludge | 2.39484884325503 | 0.0039344873562879 |
| marker129 | g_Bosea | Sludge | 2.38304131713427 | 0.00417566766936946 |
| marker130 | o_Micrococcales | Sludge | 2.36434598363322 | 0.00829003796752367 |
| marker131 | g_Malaciobacter | Sludge | 2.3559972305849 | 0.0468961442145095 |
| marker132 | g_DMER64 | Sludge | 2.35489671211719 | 0.00477460302589118 |
| marker133 | f_Rhodocyclaceae | Sludge | 2.35392923340132 | 0.00229219759111113 |
| marker134 | p_unidentified_Bacteria_f_Rikenellaceae | Sludge | 2.35275364943688 | 0.014706244177752 |
| marker135 | p_Firmicutes_f_Acidaminococcaceae | Sludge | 2.35015139692045 | 0.00236860395609192 |

| | | | | |
|-----------|---|--------|------------------|---------------------|
| marker136 | g__Aquaspirillum | Sludge | 2.3337628720172 | 0.0045425133937338 |
| marker137 | p__unidentified_Bacteria_f__Dysgonomonadaceae | Sludge | 2.33258136738379 | 0.00300095853580599 |
| marker138 | g__Thermovirga | Sludge | 2.32543983170367 | 0.00300095853580599 |
| marker139 | p__Proteobacteria_f__Neisseriaceae | Sludge | 2.3224948128973 | 0.00300095853580599 |
| marker140 | g__Sutterella | Sludge | 2.31682439074887 | 0.0133041147946287 |
| marker141 | g__Acetobacterium | Sludge | 2.31612824975249 | 0.00681827925135103 |
| marker142 | f__Erysipelotrichaceae | Sludge | 2.3119630342586 | 0.00300095853580599 |
| marker143 | o__1-20 | Sludge | 2.30960503959164 | 0.00350965054612196 |
| marker144 | p__unidentified_Bacteria_f__Prolixibacteraceae | Sludge | 2.30538647908439 | 0.008433162045407 |
| marker145 | p__unidentified_Bacteria_f__Paludibacteraceae | Sludge | 2.30308035600384 | 0.00465543638985885 |
| marker146 | g__OLB8 | Sludge | 2.3009020298879 | 0.00300095853580599 |
| marker147 | g__Selenomonas | Sludge | 2.28781682980221 | 0.00233620955207365 |
| marker148 | f__Pasteurellaceae | Sludge | 2.26369119528898 | 0.00296448299341755 |
| marker149 | g__Alistipes | Sludge | 2.24687539287179 | 0.0442527466690402 |
| marker150 | o__Syntrophales | Sludge | 2.24488514080803 | 0.00292829969481819 |
| marker151 | g__Proteiniclasticum | Sludge | 2.24032870941621 | 0.00727913179866547 |
| marker152 | p__Firmicutes_f__Ruminococcaceae | Sludge | 2.23543024946344 | 0.00939514342590055 |
| marker153 | p__Firmicutes_o__Veillonellales-Selenomonadales | Sludge | 2.23349854253912 | 0.0014592236281057 |
| marker154 | o__Geobacterales | Sludge | 2.22725007902232 | 0.0063308622189361 |
| marker155 | g__Acidaminococcus | Sludge | 2.20052430956911 | 0.00396891247374512 |
| marker156 | g__Moraxella | Sludge | 2.19626941900352 | 0.00292829969481819 |
| marker157 | g__Oscillibacter | Sludge | 2.18931108399096 | 0.00704260680583994 |
| marker158 | g__Uliginosibacterium | Sludge | 2.17866297271323 | 0.00459472342537635 |
| marker159 | f__Butyricocccaceae | Sludge | 2.17808951600876 | 0.0103849708743895 |
| marker160 | g__Dorea | Sludge | 2.17670724756496 | 0.0127599816208161 |
| marker161 | g__Lactobacillus | Sludge | 2.17352220980654 | 0.00692220040196637 |
| marker162 | p__Bacteroidota_f__Paludibacteraceae | Sludge | 2.17160089668324 | 0.00548655598496441 |
| marker163 | g__Butyrivibrio | Sludge | 2.16643247327281 | 0.00236860395609192 |
| marker164 | f__W27 | Sludge | 2.1586182806225 | 0.00300095853580599 |
| marker165 | g__Thiothrix | Sludge | 2.15551351727043 | 0.00458393006525558 |
| marker166 | g__unidentified_Caldilineaceae | Sludge | 2.15358260717954 | 0.00286102963935502 |
| marker167 | f__Dermatophilaceae | Sludge | 2.14273907331302 | 0.0108811072576575 |
| marker168 | p__Fibrobacterota_f__Fibrobacteraceae | Sludge | 2.13542260590062 | 0.00292829969481819 |
| marker169 | g__Defluviimonas | Sludge | 2.1240552673076 | 0.00981332290050954 |
| marker170 | f__Atopobiaceae | Sludge | 2.12110124096319 | 0.00717722755233757 |
| marker171 | p__Actinobacteriota_f__Ilumatobacteraceae | Sludge | 2.11642508982372 | 0.00178361348613653 |
| marker172 | p__Firmicutes_f__Oscillospiraceae | Sludge | 2.1149459290444 | 0.0077218314880025 |
| marker173 | o__IMCC26256 | Sludge | 2.11350966399649 | 0.0175194349721074 |
| marker174 | g__[Eubacterium]_eligens_group | Sludge | 2.09252955313893 | 0.0173574869133744 |
| marker175 | g__Tissierella | Sludge | 2.08827327753617 | 0.0155426380443235 |
| marker176 | g__Candidatus_Soleiferrea | Sludge | 2.08819761525076 | 0.00434714794335045 |
| marker177 | g__dgA-11_gut_group | Sludge | 2.08774711950245 | 0.0240175140517681 |
| marker178 | g__Candidatus_Paracaedibacter | Sludge | 2.07321180252518 | 0.0121950033579137 |
| marker179 | c__D8A-2 | Sludge | 2.07081041894034 | 0.00300095853580599 |
| marker180 | g__IMCC26207 | Sludge | 2.06706140432815 | 0.0430951548885599 |
| marker181 | g__Anaerosinus | Sludge | 2.04253831878169 | 0.00499756352219305 |

| | | | | |
|-----------|--|--------|------------------|---------------------|
| marker182 | g__Anaeromusa-Anaeroarcus | Sludge | 2.0369900945117 | 0.00236860395609192 |
| marker183 | g__Nitrosomonas | Sludge | 2.03541919634333 | 0.00850921001760978 |
| marker184 | g__Paludicola | Sludge | 2.03040589749594 | 0.00236860395609192 |
| marker185 | p__Proteobacteria_f__Xanthomonadaceae | Sludge | 2.0266288433725 | 0.0102244740657078 |
| marker186 | p__Proteobacteria_o__Rhizobiales | Sludge | 2.02259209841307 | 0.00548693209602953 |
| marker187 | f__Intrasporangiaceae | Sludge | 2.01773462093928 | 0.0431548008200841 |
| marker188 | g__Defluviicoccus | Sludge | 2.01014100787518 | 0.00995673175246193 |
| marker189 | g__Candidatus_Caldatribacterium | Sludge | 2.00972313116555 | 0.00296448299341755 |
| marker190 | g__Desulfobacterium | Sludge | 2.00437300468152 | 0.00236860395609192 |
| marker191 | g__Pseudomonas | Soil | 4.95262901197106 | 0.00524751839918138 |
| marker192 | g__Saccharomonospora | Soil | 4.79972877283257 | 0.00471883233864109 |
| marker193 | g__Thermostaphylospora | Soil | 4.62710327723248 | 0.00232474681151881 |
| marker194 | g__Microbulbifer | Soil | 4.33978847241785 | 0.00778516413675086 |
| marker195 | g__Bacillus | Soil | 4.32914958695158 | 0.00476434609530532 |
| marker196 | c__S0134_terrestrial_group | Soil | 4.31267134577295 | 0.0055900777947879 |
| marker197 | g__Streptomyces | Soil | 4.30931435755231 | 0.00305520345587273 |
| marker198 | g__Corynebacterium | Soil | 4.30095299084208 | 0.00900477758243655 |
| marker199 | g__Thermobifida | Soil | 4.29425434205415 | 0.00215146593399865 |
| marker200 | g__Pseudoxanthomonas | Soil | 4.27087734316153 | 0.00524751839918138 |
| marker201 | g__Nonomurea | Soil | 4.15769351994232 | 0.00829899273040929 |
| marker202 | p__unidentified_Bacteria_f__Methylococcaceae | Soil | 4.14708229268338 | 0.00244022545300487 |
| marker203 | g__Lysinibacillus | Soil | 4.13448130937645 | 0.00713345001289255 |
| marker204 | g__Thermobacillus | Soil | 4.05453777179978 | 0.00229219759111113 |
| marker205 | g__Aerococcus | Soil | 4.02830724533646 | 0.00822674403973058 |
| marker206 | g__Mycobacterium | Soil | 3.92550194406174 | 0.00865169520312063 |
| marker207 | g__Chelatococcus | Soil | 3.9078272216458 | 0.00744658307092436 |
| marker208 | g__unidentified_Thermomonosporaceae | Soil | 3.87544457794599 | 0.00232474681151881 |
| marker209 | g__Paenibacillus | Soil | 3.87381040161284 | 0.00468433334113742 |
| marker210 | g__Weissella | Soil | 3.86475158583204 | 0.00807805097781873 |
| marker211 | g__Actinomadura | Soil | 3.8041243460491 | 0.00544295680294048 |
| marker212 | g__Sphingobacterium | Soil | 3.80071098377469 | 0.0082741121550696 |
| marker213 | g__Brevibacillus | Soil | 3.70968725165663 | 0.00401528456421475 |
| marker214 | g__Marinobacter | Soil | 3.6843547817425 | 0.00188768997350398 |
| marker215 | g__Bordetella | Soil | 3.67392416494916 | 0.00292829969481819 |
| marker216 | g__Thermopolyspora | Soil | 3.63452823839328 | 0.00657430009533404 |
| marker217 | g__Vulgatibacter | Soil | 3.63259377807286 | 0.00350965054612196 |
| marker218 | g__Ureibacillus | Soil | 3.61536428652011 | 0.00300095853580599 |
| marker219 | g__Hydrogenispora | Soil | 3.60060941270627 | 0.00398062757691798 |
| marker220 | g__Longispora | Soil | 3.51642094345218 | 0.00456553611805471 |
| marker221 | g__Saccharopolyspora | Soil | 3.497908453944 | 0.00236860395609192 |
| marker222 | f__Paenibacillaceae | Soil | 3.49317986009223 | 0.00300095853580599 |
| marker223 | o__Thalassobaculales | Soil | 3.41036423773871 | 0.00222462488375693 |
| marker224 | g__Thermomonospora | Soil | 3.3969079377505 | 0.00468433334113742 |
| marker225 | g__Ornithinibacillus | Soil | 3.38412191459634 | 0.00401528456421475 |
| marker226 | g__Thermotunica | Soil | 3.36934580796963 | 0.00300095853580599 |
| marker227 | p__unidentified_Bacteria_f__Rhodothermaceae | Soil | 3.34534357838705 | 0.00373502786468808 |

| | | | | |
|-----------|--|------|------------------|---------------------|
| marker228 | g_Glutamicibacter | Soil | 3.32626399381626 | 0.00514969801288225 |
| marker229 | g_Oceanobacillus | Soil | 3.30911566354348 | 0.00429344144214741 |
| marker230 | g_Haloplasma | Soil | 3.30905754181063 | 0.00401528456421475 |
| marker231 | g_Staphylococcus | Soil | 3.28998729036948 | 0.00710943334233319 |
| marker232 | f_Sandaracinaceae | Soil | 3.25738300730981 | 0.0051984656147736 |
| marker233 | g_Brachy bacterium | Soil | 3.24105055396792 | 0.00401706275619209 |
| marker234 | g_Cellulosimicrobium | Soil | 3.222668559315 | 0.0044285724344335 |
| marker235 | g_Tepidimicrobium | Soil | 3.21320335806585 | 0.00401528456421475 |
| marker236 | g_Nocardiosis | Soil | 3.13774237345351 | 0.00489820395957067 |
| marker237 | g_Symbiobacterium | Soil | 3.07614922194505 | 0.00489275372523948 |
| marker238 | g_Rhodococcus | Soil | 3.05359435116123 | 0.00500510294849163 |
| marker239 | g_unidentified_Pseudonocardiaceae | Soil | 3.04221807343686 | 0.00401528456421475 |
| marker240 | g_Bifidobacterium | Soil | 3.03741349403201 | 0.0462600425439484 |
| marker241 | g_Paucisalibacillus | Soil | 3.01843927447479 | 0.00489820395957067 |
| marker242 | g_Alcanivorax | Soil | 3.01266743053726 | 0.00268885993058316 |
| marker243 | g_Aeribacillus | Soil | 3.00972302609776 | 0.00236860395609192 |
| marker244 | f_JG30-KF-CM45 | Soil | 2.98449974133453 | 0.008433162045407 |
| marker245 | g_Novibacillus | Soil | 2.98385964980438 | 0.00236860395609192 |
| marker246 | o_Granulosicoccales | Soil | 2.97884429455712 | 0.00477460302589118 |
| marker247 | g_Thermophagus | Soil | 2.97703069657201 | 0.00236860395609192 |
| marker248 | g_Chelativorans | Soil | 2.96309314894323 | 0.00401528456421475 |
| marker249 | g_Thermoflavimicrobium | Soil | 2.95346242759434 | 0.00236860395609192 |
| marker250 | g_Lysobacter | Soil | 2.95223687007283 | 0.00229219759111113 |
| marker251 | g_Halocella | Soil | 2.94781514210827 | 0.00236860395609192 |
| marker252 | f_Streptosporangiaceae | Soil | 2.9427953391717 | 0.00236860395609192 |
| marker253 | f_Limnochordaceae | Soil | 2.9323851390932 | 0.00472414076852035 |
| marker254 | g_Brochothrix | Soil | 2.93025059319253 | 0.0112137596065908 |
| marker255 | f_Micromonosporaceae | Soil | 2.91877643904803 | 0.00289453611475761 |
| marker256 | g_Carnobacterium | Soil | 2.9006780162997 | 0.00425892397455713 |
| marker257 | g_Lactiplantibacillus | Soil | 2.89568457294665 | 0.00245408818041391 |
| marker258 | g_Gordonia | Soil | 2.89159794962747 | 0.00471883233864109 |
| marker259 | g_Ligilactobacillus | Soil | 2.87885078968009 | 0.009133741947188 |
| marker260 | g_Levilactobacillus | Soil | 2.86985783349184 | 0.00401706275619209 |
| marker261 | o_WN-HWB-116 | Soil | 2.84882738797424 | 0.00401528456421475 |
| marker262 | g_Cellvibrio | Soil | 2.84739413645795 | 0.0044285724344335 |
| marker263 | g_Garciella | Soil | 2.84320375967406 | 0.00236860395609192 |
| marker264 | g_Limnochorda | Soil | 2.83153478007177 | 0.00489275372523948 |
| marker265 | g_Psychrobacter | Soil | 2.82663575927276 | 0.0270518468663503 |
| marker266 | f_Planococcaceae | Soil | 2.82392395558096 | 0.0121063063405672 |
| marker267 | p_unidentified_Bacteria_c_Limnochordia | Soil | 2.80765281712868 | 0.0012997678332737 |
| marker268 | g_Defluviitalea | Soil | 2.78342051254578 | 0.00300095853580599 |
| marker269 | g_Pseudochroactrum | Soil | 2.76051257714125 | 0.00240178944194986 |
| marker270 | g_Lutibacter | Soil | 2.7594432333707 | 0.0112137596065908 |
| marker271 | g_Planomicrobium | Soil | 2.74176207127971 | 0.00641487173029733 |
| marker272 | c_Gitt-GS-136 | Soil | 2.74149586563254 | 0.0104996825415873 |
| marker273 | o_Pseudomonadales | Soil | 2.73302368505698 | 0.0484168697834358 |

| | | | | |
|-----------|--|------|------------------|---------------------|
| marker274 | p__Proteobacteria_f__Alcaligenaceae | Soil | 2.73278900376836 | 0.00236860395609192 |
| marker275 | f__Microscillaceae | Soil | 2.72102709804093 | 0.00182476091445767 |
| marker276 | g__Desemzia | Soil | 2.6983915561041 | 0.00998637539663483 |
| marker277 | p__Proteobacteria_f__Hyphomicrobiaceae | Soil | 2.69802714793539 | 0.00633319591211143 |
| marker278 | g__Thermocrispum | Soil | 2.69270349522338 | 0.00401528456421475 |
| marker279 | g__Idiomarina | Soil | 2.68949999073232 | 0.00489820395957067 |
| marker280 | g__Kroppenstedtia | Soil | 2.68884757857527 | 0.00292829969481819 |
| marker281 | g__Steroidobacter | Soil | 2.6862481516402 | 0.00534579910082301 |
| marker282 | g__Alkanindiges | Soil | 2.66384898408367 | 0.0110805484192677 |
| marker283 | g__Desulfohalotomaculum | Soil | 2.65895653919371 | 0.00236860395609192 |
| marker284 | g__Globicatella | Soil | 2.65866146673035 | 0.00542900175931565 |
| marker285 | g__Georgenia | Soil | 2.64101608711157 | 0.0053344259155788 |
| marker286 | g__Azotobacter | Soil | 2.64099492096603 | 0.00242784476860532 |
| marker287 | g__Filomicrobium | Soil | 2.63788146331208 | 0.00405690656357323 |
| marker288 | g__Leuconostoc | Soil | 2.63605503670136 | 0.00629113903079999 |
| marker289 | g__Ornithinococcus | Soil | 2.61849010775239 | 0.00751358887746549 |
| marker290 | f__67-14 | Soil | 2.60318656294451 | 0.00275242557917179 |
| marker291 | g__Moheibacter | Soil | 2.60304488553229 | 0.0138101294056158 |
| marker292 | g__Thiobacillus | Soil | 2.60232074666447 | 0.00750345795260781 |
| marker293 | g__Caldicoproacter | Soil | 2.59241924390631 | 0.00236860395609192 |
| marker294 | p__unidentified_Bacteria_c__Alphaproteobacteria | Soil | 2.57268625897138 | 0.00514969801288225 |
| marker295 | g__Sphingomonas | Soil | 2.5560122724765 | 0.00345607837155914 |
| marker296 | g__Hahella | Soil | 2.53951025302903 | 0.00414822549866481 |
| marker297 | g__Devosia | Soil | 2.53887481454285 | 0.0114075860431473 |
| marker298 | p__Firmicutes_c__Bacilli | Soil | 2.5261175702198 | 0.00641487173029733 |
| marker299 | g__Chryseolinea | Soil | 2.52091324625378 | 0.00934827750333358 |
| marker300 | o__M55-D21 | Soil | 2.51553572751347 | 0.00121433948080398 |
| marker301 | g__Microbacterium | Soil | 2.51244766134634 | 0.0243765815707662 |
| marker302 | g__Clostridium_sensu_stricto_7 | Soil | 2.50389869576632 | 0.0072931637378115 |
| marker303 | g__Gillisia | Soil | 2.49157103983586 | 0.00943624620179814 |
| marker304 | g__Salinispora | Soil | 2.48990857269223 | 0.00330708443968182 |
| marker305 | g__Jeotgalicoccus | Soil | 2.47927462983675 | 0.00812892944448914 |
| marker306 | g__Marmoricola | Soil | 2.4769492623767 | 0.006889355237642 |
| marker307 | g__Brevibacterium | Soil | 2.46759163115067 | 0.00720245503977475 |
| marker308 | p__unidentified_Bacteria_f__Thermoactinomycetaceae | Soil | 2.45590357918195 | 0.00233620955207365 |
| marker309 | f__Gemmatimonadaceae | Soil | 2.45495705189399 | 0.00484641028919936 |
| marker310 | g__unidentified_Peptococcaceae | Soil | 2.44897278769396 | 0.00236860395609192 |
| marker311 | g__Sinibacillus | Soil | 2.44730024998841 | 0.00236860395609192 |
| marker312 | p__Proteobacteria_f__Rhizobiaceae | Soil | 2.44192168066965 | 0.015300155609624 |
| marker313 | g__Laceyella | Soil | 2.44058119391135 | 0.00401528456421475 |
| marker314 | g__unidentified_M55-D21 | Soil | 2.43481231108743 | 0.0012997678332737 |
| marker315 | g__Puia | Soil | 2.42906775892049 | 0.00233620955207365 |
| marker316 | g__Youngiibacter | Soil | 2.42729016451578 | 0.00554947447659061 |
| marker317 | p__unidentified_Bacteria_f__Cellvibrionaceae | Soil | 2.42046346215716 | 0.00389903174561041 |
| marker318 | g__Thermasporomyces | Soil | 2.40817346494029 | 0.00236860395609192 |
| marker319 | g__Pseudonocardia | Soil | 2.39219750478682 | 0.00300095853580599 |

| | | | | |
|-----------|---|------|------------------|---------------------|
| marker320 | o__Streptosporangiales | Soil | 2.39068843271457 | 0.00236860395609192 |
| marker321 | g__Tepidanaerobacter | Soil | 2.39042771453916 | 0.00236860395609192 |
| marker322 | g__DSSF69 | Soil | 2.37343581836593 | 0.00365109822629686 |
| marker323 | g__Blastococcus | Soil | 2.37008323990951 | 0.00381582597359011 |
| marker324 | g__Thermoactinomyces | Soil | 2.36109825048874 | 0.00296448299341755 |
| marker325 | g__Pseudactinotalea | Soil | 2.35928096410707 | 0.0415766807684144 |
| marker326 | p__Firmicutes_f__Bacillaceae | Soil | 2.34034231750188 | 0.00296448299341755 |
| marker327 | g__Kurthia | Soil | 2.33360151135226 | 0.00699945439229076 |
| marker328 | p__Acidobacteriota_f__Vicinamibacteraceae | Soil | 2.33275403150421 | 0.00739074393185114 |
| marker329 | g__Persicitalea | Soil | 2.33104441459742 | 0.00365109822629686 |
| marker330 | g__Cohnella | Soil | 2.31684304002298 | 0.00292829969481819 |
| marker331 | g__HN-HF0106 | Soil | 2.31352940113541 | 0.00611452996536733 |
| marker332 | g__Promicromonospora | Soil | 2.31142364943806 | 0.00402251884369567 |
| marker333 | g__Cavicella | Soil | 2.31134604798298 | 0.0157584311341127 |
| marker334 | f__Birii41 | Soil | 2.31079287043431 | 0.00567556762009949 |
| marker335 | g__Amylolactobacillus | Soil | 2.31005556603999 | 0.00548693209602953 |
| marker336 | g__Aeromicrobium | Soil | 2.30498711696811 | 0.00320240492938362 |
| marker337 | g__Proteiniborus | Soil | 2.30491505685339 | 0.00236860395609192 |
| marker338 | g__Kocuria | Soil | 2.29105859251719 | 0.00466378500391156 |
| marker339 | g__Arthrobacter | Soil | 2.27278540217136 | 0.00347987295282572 |
| marker340 | g__Gracilibacillus | Soil | 2.26905727744878 | 0.00512901264460003 |
| marker341 | g__Myxococcus | Soil | 2.26749887054007 | 0.00233620955207365 |
| marker342 | g__Pusillimonas | Soil | 2.25947061691299 | 0.00236860395609192 |
| marker343 | o__Limnochordales | Soil | 2.25449605490522 | 0.0012997678332737 |
| marker344 | g__Lutispora | Soil | 2.22963957841574 | 0.0157584311341127 |
| marker345 | g__WCHB1-32 | Soil | 2.2288470293689 | 0.006359419484499 |
| marker346 | o__Izemoplasmatales | Soil | 2.21680615376846 | 0.00233620955207365 |
| marker347 | g__Leucobacter | Soil | 2.21362737622186 | 0.00316883101729174 |
| marker348 | g__Ammoniphilus | Soil | 2.21079256777802 | 0.00236860395609192 |
| marker349 | g__Microvirga | Soil | 2.20549935964167 | 0.014292584531711 |
| marker350 | g__Planifilum | Soil | 2.18149498980694 | 0.0061327154677794 |
| marker351 | g__Acholeplasma | Soil | 2.16692813974552 | 0.00454151140907057 |
| marker352 | g__Pediococcus | Soil | 2.16491388152564 | 0.00472414076852035 |
| marker353 | p__unidentified_Bacteria_o__Frankiales | Soil | 2.15567777178139 | 0.00512901264460003 |
| marker354 | g__Sandaracinus | Soil | 2.1555714344882 | 0.00539707677355459 |
| marker355 | o__Vicinamibacterales | Soil | 2.15521101465972 | 0.0117786360827831 |
| marker356 | p__Firmicutes_f__Hungateiclostridiaceae | Soil | 2.13628202204454 | 0.00291122898761603 |
| marker357 | g__Dietzia | Soil | 2.11731150112672 | 0.0282894854492351 |
| marker358 | g__Aneurinibacillus | Soil | 2.11281151064799 | 0.00127802859531871 |
| marker359 | o__CCD24 | Soil | 2.10923894466374 | 0.00528417922384133 |
| marker360 | g__Mesorhizobium | Soil | 2.10517505852517 | 0.0204623293679065 |
| marker361 | g__Pelagibius | Soil | 2.10035352991916 | 0.00217566928717926 |
| marker362 | g__Altererythrobacter | Soil | 2.09344955133134 | 0.00458393006525558 |
| marker363 | p__Myxococcota_f__Nannocystaceae | Soil | 2.09184978040095 | 0.00215146593399865 |
| marker364 | f__Clostridiaceae | Soil | 2.08075285426283 | 0.0242784916966321 |
| marker365 | g__Antarcticibacterium | Soil | 2.07412215612121 | 0.0157584311341127 |

| | | | | |
|-----------|---|-------|------------------|---------------------|
| marker366 | g_Skermanella | Soil | 2.07364582060533 | 0.00880661397040661 |
| marker367 | g_Ammonibacillus | Soil | 2.06197935080496 | 0.00127802859531871 |
| marker368 | g_Desulfitibacter | Soil | 2.06029554732328 | 0.0012997678332737 |
| marker369 | p_unidentified_Bacteria_f_Illumatobacteraceae | Soil | 2.05739001986699 | 0.00457411623244123 |
| marker370 | f_Garciellaceae | Soil | 2.05676701952322 | 0.0012997678332737 |
| marker371 | o_Blfdi19 | Soil | 2.0539557927119 | 0.00421716550555259 |
| marker372 | g_Sphaerobacter | Soil | 2.04376536996651 | 0.00292829969481819 |
| marker373 | g_Desulfotomaculum | Soil | 2.03626185899643 | 0.0012997678332737 |
| marker374 | g_Phaselicystis | Soil | 2.03531972741781 | 0.00467401398029443 |
| marker375 | g_Luteimonas | Soil | 2.03169162568792 | 0.0071801771267263 |
| marker376 | o_Peptostreptococcales-Tissierellales | Soil | 2.02630875451072 | 0.00752363498342709 |
| marker377 | g_Ornithinimicrobium | Soil | 2.00276090468659 | 0.00489820395957067 |
| marker378 | p_unidentified_Bacteria_c_Bacilli | Soil | 2.00102498949164 | 0.0012997678332737 |
| marker379 | f_Sporichthyaceae | Water | 4.8947542906804 | 0.00850564609435004 |
| marker380 | g_Limnohabitans | Water | 4.75710704284102 | 0.00739074393185114 |
| marker381 | g_Luteolibacter | Water | 4.61239467702013 | 0.00903354836465739 |
| marker382 | g_hgcI_clade | Water | 4.56639229462126 | 0.0089292242292995 |
| marker383 | g_Sediminibacterium | Water | 4.39651131470448 | 0.00487972376297666 |
| marker384 | g_Polynucleobacter | Water | 4.23807729784834 | 0.00843578310557586 |
| marker385 | g_Fluviicola | Water | 4.10889372915638 | 0.00814785969767997 |
| marker386 | g_Flavobacterium | Water | 4.04634856335766 | 0.00476434609530532 |
| marker387 | g_Terrimicrobium | Water | 4.02590953371687 | 0.00736005177449249 |
| marker388 | g_CL500-29_marine_group | Water | 3.94822843267927 | 0.00656567945128715 |
| marker389 | f_NS11-12_marine_group | Water | 3.94255636585831 | 0.0044285724344335 |
| marker390 | c_Verrucomicrobiae | Water | 3.93625662190502 | 0.00528048370559057 |
| marker391 | g_Clade_Ia | Water | 3.92175170270413 | 0.0044285724344335 |
| marker392 | g_Dinghuibacter | Water | 3.88934255140682 | 0.00686045178197574 |
| marker393 | g_Pseudarcicella | Water | 3.85542785956693 | 0.00649733207483473 |
| marker394 | g_Algoriphagus | Water | 3.83913012858363 | 0.0059265358391849 |
| marker395 | p_Proteobacteria_f_Rhodobacteraceae | Water | 3.82474598764497 | 0.00680566449223056 |
| marker396 | p_Bacteroidota_o_Cytophagales | Water | 3.81059709560478 | 0.00477460302589118 |
| marker397 | g_Rhodoferrax | Water | 3.79159273197722 | 0.00603608292359955 |
| marker398 | f_env.OPS_17 | Water | 3.78621555839214 | 0.00386018676797056 |
| marker399 | p_unidentified_Bacteria_f_Cryomorphaceae | Water | 3.7618411748151 | 0.00975475910234288 |
| marker400 | k_Bacteria_p_uncl_Bacteria_uncl_Bacteria | Water | 3.75532798451439 | 0.00245408818041391 |
| marker401 | p_Proteobacteria_f_Methylophilaceae | Water | 3.75437151786896 | 0.0077218314880025 |
| marker402 | p_unidentified_Bacteria_o_Rhizobiales | Water | 3.68943248488654 | 0.00524751839918138 |
| marker403 | f_NS9_marine_group | Water | 3.68464256978484 | 0.00305798217642331 |
| marker404 | g_Synechococcus_CC9902 | Water | 3.62168216550955 | 0.0177743299536594 |
| marker405 | g_Sphingorhabdus | Water | 3.61039500059767 | 0.00814785969767997 |
| marker406 | g_Polaromonas | Water | 3.58313105558315 | 0.00869989393787776 |
| marker407 | f_Clade_II | Water | 3.58190420872374 | 0.00425892397455713 |
| marker408 | g_Solitalea | Water | 3.56685376629834 | 0.00765246643940302 |
| marker409 | f_Comamonadaceae | Water | 3.55712725040826 | 0.00193045413622771 |
| marker410 | p_unidentified_Bacteria_f_Oxalobacteraceae | Water | 3.54117173179752 | 0.0083716097356688 |
| marker411 | g_Ascidiaceihabitans | Water | 3.49945674774019 | 0.0253097572594121 |

| | | | | |
|-----------|---|-------|------------------|---------------------|
| marker412 | g_GKS98_freshwater_group | Water | 3.45695515394402 | 0.00863067611323469 |
| marker413 | g_NS10_marine_group | Water | 3.43961152158069 | 0.00645650798676583 |
| marker414 | g_NS5_marine_group | Water | 3.40862579501651 | 0.0233790728714741 |
| marker415 | g_Tibeticola | Water | 3.39000531374158 | 0.00725600464560742 |
| marker416 | g_unidentified_AEGEAN-169_marine_group | Water | 3.35580825550665 | 0.0345271007801468 |
| marker417 | p_unidentified_Bacteria_f_Saprospiraceae | Water | 3.33447961664025 | 0.00910993245506058 |
| marker418 | g_Candidatus_Methylopumilus | Water | 3.33320771818096 | 0.00645650798676583 |
| marker419 | f_AEGEAN-169_marine_group | Water | 3.31073094826302 | 0.0055900777947879 |
| marker420 | g_NS4_marine_group | Water | 3.17361723332772 | 0.0427443615608497 |
| marker421 | o_PeM15 | Water | 3.17009320108573 | 0.00581821020220902 |
| marker422 | g_Candidatus_Limnoluna | Water | 3.15621889788278 | 0.0044285724344335 |
| marker423 | p_unidentified_Bacteria_f_Verrucomicrobiaceae | Water | 3.15531608954959 | 0.0089292242292995 |
| marker424 | g_Cyanobium_PCC-6307 | Water | 3.15317833738159 | 0.0172533396253628 |
| marker425 | p_unidentified_Bacteria_f_Chitinophagaceae | Water | 3.1459108986072 | 0.00739074393185114 |
| marker426 | p_unidentified_Bacteria_o_Actinomarinales | Water | 3.13237523096552 | 0.0343896373434726 |
| marker427 | g_OM60(NOR5)_clade | Water | 3.1306807570132 | 0.0177743299536594 |
| marker428 | g_Candidatus_Aquirestis | Water | 3.09077386202803 | 0.00651539275001758 |
| marker429 | f_Clade_III | Water | 3.05815662967089 | 0.00656567945128715 |
| marker430 | f_Steroidobacteraceae | Water | 3.05636635967196 | 0.00905624163770228 |
| marker431 | g_Arenimonas | Water | 3.03383006042345 | 0.00918668615624469 |
| marker432 | g_Candidatus_Actinomarina | Water | 3.01037646669027 | 0.045251125867959 |
| marker433 | g_Ilumatobacter | Water | 2.97309820891077 | 0.0074559137922491 |
| marker434 | g_Clade_Ib | Water | 2.97288001449378 | 0.00430094349327915 |
| marker435 | o_Chloroplast | Water | 2.94881422453974 | 0.00903354836465739 |
| marker436 | f_Thiotrichaceae | Water | 2.93786522611269 | 0.0184997141198193 |
| marker437 | g_Prochlorococcus_MIT9313 | Water | 2.93754096672234 | 0.00553835724886887 |
| marker438 | p_Marinimicrobia_(SAR406_clade) | Water | 2.90187548908646 | 0.0179195353789908 |
| marker439 | g_Vibrio | Water | 2.90129055201745 | 0.0055900777947879 |
| marker440 | p_unidentified_Bacteria_f_Cyclobacteriaceae | Water | 2.90019263054821 | 0.0484168697834358 |
| marker441 | o_Burkholderiales | Water | 2.89915559091327 | 0.0019089905589745 |
| marker442 | o_Kapabacteriales | Water | 2.88367431349517 | 0.00608355490842723 |
| marker443 | g_Actibacter | Water | 2.87604996056442 | 0.0104281829052582 |
| marker444 | f_S25-593 | Water | 2.85348147001864 | 0.0162899927557232 |
| marker445 | g_Pseudanabaena_PCC-7429 | Water | 2.83957162078183 | 0.00517859924167836 |
| marker446 | o_SAR202_clade | Water | 2.83924512505759 | 0.00840691782885475 |
| marker447 | g_Rhizobacter | Water | 2.83499039469839 | 0.00862610422627031 |
| marker448 | g_Chthoniobacter | Water | 2.83027194780024 | 0.0076486658601718 |
| marker449 | g_MWH-Ta3 | Water | 2.82594110850533 | 0.00650649119536142 |
| marker450 | f_KI89A_clade | Water | 2.814672671725 | 0.0113334131546673 |
| marker451 | g_Brevundimonas | Water | 2.81247901817349 | 0.00686045178197574 |
| marker452 | o_Defluviococcales | Water | 2.78869193307638 | 0.0199414468887923 |
| marker453 | g_Prostheco bacter | Water | 2.75899473757847 | 0.008556955394369 |
| marker454 | p_Proteobacteria_c_Gammaproteobacteria | Water | 2.75794447982136 | 0.0345271007801468 |
| marker455 | g_Opitutus | Water | 2.74123654955511 | 0.00749509484173856 |
| marker456 | g_Methylotenera | Water | 2.74015833805645 | 0.0082741121550696 |
| marker457 | g_Ferruginibacter | Water | 2.74014247702827 | 0.00895753390980355 |

| | | | | |
|-----------|---|-------|------------------|---------------------|
| marker458 | g__Sva0996_marine_group | Water | 2.73907445016108 | 0.010774313687757 |
| marker459 | g__Rhodoluna | Water | 2.72795332537531 | 0.00505048814629565 |
| marker460 | f__Bdellovibrionaceae | Water | 2.7261868981877 | 0.00778021166206075 |
| marker461 | o__Chitinophagales | Water | 2.71799630575076 | 0.0019089905589745 |
| marker462 | p__Actinobacteria_o__Frankiales | Water | 2.70384621540491 | 0.00736005177449249 |
| marker463 | f__Nisaeaceae | Water | 2.68977026777429 | 0.0361761636872503 |
| marker464 | g__Massilia | Water | 2.68248913153109 | 0.00814785969767997 |
| marker465 | f__NS7_marine_group | Water | 2.67744210302696 | 0.0324737761070131 |
| marker466 | g__Hydrogenophaga | Water | 2.67410125401162 | 0.0103579597176137 |
| marker467 | g__Methylobacter | Water | 2.67083878435088 | 0.0138753882129501 |
| marker468 | g__Isopticola | Water | 2.65868917747839 | 0.024582383982434 |
| marker469 | g__Peredibacter | Water | 2.65833450395501 | 0.008433162045407 |
| marker470 | g__Halioglobus | Water | 2.64916926937721 | 0.00910993245506058 |
| marker471 | g__Candidatus_Planktoluna | Water | 2.64627672774585 | 0.00756332444199017 |
| marker472 | g__LD29 | Water | 2.62027712785482 | 0.00698747258714489 |
| marker473 | f__Roseiflexaceae | Water | 2.61793726832613 | 0.00413443004361397 |
| marker474 | g__Caulobacter | Water | 2.60998662747961 | 0.00242784476860532 |
| marker475 | g__Lacihabians | Water | 2.59646609209208 | 0.00330708443968182 |
| marker476 | p__Bacteroidota_f__Flavobacteriaceae | Water | 2.59604021360313 | 0.00865169520312063 |
| marker477 | p__unidentified_Bacteria_f__Neisseriaceae | Water | 2.58799546809078 | 0.00517859924167836 |
| marker478 | p__Proteobacteria_f__Beijerinckiaceae | Water | 2.58291988989551 | 0.00787073115700941 |
| marker479 | p__SAR324_clade(Marine_group_B) | Water | 2.57327204441209 | 0.0281487903737355 |
| marker480 | g__Legionella | Water | 2.56696503010152 | 0.00560521440344151 |
| marker481 | f__Bacteroidetes_BD2-2 | Water | 2.5629097287049 | 0.0252138871124521 |
| marker482 | g__Tabrizicola | Water | 2.55695218436111 | 0.00674518302523746 |
| marker483 | f__Sphingomonadaceae | Water | 2.5289281806077 | 0.00622569766979761 |
| marker484 | f__SC-I-84 | Water | 2.51424670765395 | 0.00713345001289255 |
| marker485 | g__Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium | Water | 2.51103134207834 | 0.0219977359474935 |
| marker486 | f__MWH-UniP1_aquatic_group | Water | 2.50893835071215 | 0.0453168929162202 |
| marker487 | g__Pedobacter | Water | 2.50255631044764 | 0.0450007884246645 |
| marker488 | g__Lutimonas | Water | 2.50049101690628 | 0.0217598945490729 |
| marker489 | o__Dadabacteriales | Water | 2.49214873842458 | 0.0123837901630705 |
| marker490 | g__NS2b_marine_group | Water | 2.48777752327549 | 0.012853339417578 |
| marker491 | f__Parvibaculaceae | Water | 2.47677596312441 | 0.0145057279165385 |
| marker492 | f__Halieaceae | Water | 2.47418506317162 | 0.038774207831722 |
| marker493 | g__Gemmatimonas | Water | 2.47163422425893 | 0.00581821020220902 |
| marker494 | g__Sulfurovum | Water | 2.46901726983355 | 0.0323869407729069 |
| marker495 | g__Sulfuritalea | Water | 2.4630064968972 | 0.00358780089824588 |
| marker496 | f__AKYH767 | Water | 2.4537648715694 | 0.00182476091445767 |
| marker497 | g__Sva0081_sediment_group | Water | 2.44529715257563 | 0.0380372555934863 |
| marker498 | c__KD4-96 | Water | 2.43040941711852 | 0.00877921710691638 |
| marker499 | g__Marinoscillum | Water | 2.42188411317754 | 0.0043432244731259 |
| marker500 | g__Sphaerotilus | Water | 2.41832831935013 | 0.00471883233864109 |
| marker501 | g__unidentified_SAR86_clade | Water | 2.40443613143645 | 0.0386147147582896 |
| marker502 | g__Acidibacter | Water | 2.4019021476014 | 0.00325222056172745 |
| marker503 | g__Aurantimicrobium | Water | 2.4003813446118 | 0.0295231480061341 |

| | | | | |
|-----------|---|-------|------------------|---------------------|
| marker504 | g__Undibacterium | Water | 2.37948693082954 | 0.00829899273040929 |
| marker505 | p__unidentified_Bacteria_f__Methylophilaceae | Water | 2.37911942910884 | 0.00642264965035019 |
| marker506 | g__Planktothrix_NIVA-CYA_15 | Water | 2.3769230217581 | 0.00549605676999543 |
| marker507 | g__Edaphobaculum | Water | 2.373176506288 | 0.00644762572044236 |
| marker508 | g__Roseibacillus | Water | 2.37279360266406 | 0.00421716550555259 |
| marker509 | f__Stappiaceae | Water | 2.37053279490678 | 0.0403093764366102 |
| marker510 | p__unidentified_Bacteria_f__Flavobacteriaceae | Water | 2.36316218694712 | 0.0373963632654333 |
| marker511 | f__LiUU-11-161 | Water | 2.35605431167275 | 0.00300095853580599 |
| marker512 | g__Thiohalophilus | Water | 2.33535071689248 | 0.0451548467271089 |
| marker513 | f__Sutterellaceae | Water | 2.33448663383288 | 0.00738089215478662 |
| marker514 | g__Rurimicrobium | Water | 2.33222123124281 | 0.00296448299341755 |
| marker515 | g__Sulfurimonas | Water | 2.32382733033542 | 0.00290256003079355 |
| marker516 | p__Bacteroidota_f__Chitinophagaceae | Water | 2.31987635086424 | 0.00736005177449249 |
| marker517 | o__Ga0077536 | Water | 2.31523938262695 | 0.0168795124038565 |
| marker518 | p__unidentified_Bacteria_o__Micavibrionales | Water | 2.30919417233031 | 0.00153154004957021 |
| marker519 | o__UBA10353_marine_group | Water | 2.28955744898914 | 0.018368137996915 |
| marker520 | g__Labrenzia | Water | 2.27903873985286 | 0.00545941888400005 |
| marker521 | g__Rheinheimera | Water | 2.27224365530808 | 0.0455019544046217 |
| marker522 | p__unidentified_Bacteria_f__Magnetospiraceae | Water | 2.27059195502432 | 0.00727913179866547 |
| marker523 | o__PLTA13 | Water | 2.26076273833822 | 0.00543580203130379 |
| marker524 | g__SUP05_cluster | Water | 2.26071046027963 | 0.0330806308210092 |
| marker525 | p__unidentified_Bacteria_f__Methylomonadaceae | Water | 2.24614934032244 | 0.00742723053625942 |
| marker526 | g__UKL13-1 | Water | 2.23539772303018 | 0.00456553611805471 |
| marker527 | g__Erythrobacter | Water | 2.2312089209363 | 0.0150711483223779 |
| marker528 | f__Microtrichaceae | Water | 2.221789804852 | 0.0252067071964263 |
| marker529 | g__Eudoraea | Water | 2.18976736364675 | 0.0094115013965718 |
| marker530 | g__Aquibacter | Water | 2.18508257471431 | 0.0360528749197707 |
| marker531 | f__Lentimicrobiaceae | Water | 2.18484811979552 | 0.00873170849986188 |
| marker532 | g__Rickettsiella | Water | 2.17196588740686 | 0.0207836565807637 |
| marker533 | o__Sphingobacteriales | Water | 2.16561203350094 | 0.00709467188807972 |
| marker534 | g__Maribacter | Water | 2.16529222301016 | 0.00812232621520166 |
| marker535 | g__Cytophaga | Water | 2.15980270751904 | 0.0124314846990215 |
| marker536 | o__Subgroup_17 | Water | 2.14926117549009 | 0.00877921710691638 |
| marker537 | g__MND1 | Water | 2.1411375923271 | 0.0112421334636013 |
| marker538 | g__Ellin6067 | Water | 2.1400338414578 | 0.00631017797340678 |
| marker539 | g__OLB12 | Water | 2.13937556867822 | 0.00355394316032532 |
| marker540 | g__Armatimonas | Water | 2.12740671490278 | 0.00300095853580599 |
| marker541 | g__Novosphingobium | Water | 2.12084197162168 | 0.0487627522823899 |
| marker542 | g__Portibacter | Water | 2.1168077277045 | 0.00571589826822681 |
| marker543 | g__Duganella | Water | 2.1100543941902 | 0.00472356599684635 |
| marker544 | g__IS-44 | Water | 2.10931653229132 | 0.0359612185703702 |
| marker545 | g__Inhella | Water | 2.1066326652292 | 0.00489820395957067 |
| marker546 | g__Candidatus_Megaira | Water | 2.09962836548261 | 0.00472356599684635 |
| marker547 | f__Sva1033 | Water | 2.09886021792546 | 0.0247565131585383 |
| marker548 | g__966-1 | Water | 2.09517884755759 | 0.00510375988879423 |
| marker549 | g__Phenylobacterium | Water | 2.08671510179005 | 0.0061962379730235 |

| | | | | |
|-----------|--|-------|------------------|---------------------|
| marker550 | g_Muriicola | Water | 2.08325744642432 | 0.0238319711834089 |
| marker551 | g_SH3-11 | Water | 2.07595313000457 | 0.00467401398029443 |
| marker552 | g_Alkalimarinus | Water | 2.07214733004917 | 0.0255984052278237 |
| marker553 | p_unidentified_Bacteria_f_Rickettsiaceae | Water | 2.06866030235193 | 0.0114267878142663 |
| marker554 | g_Flectobacillus | Water | 2.06766196412784 | 0.00449590224119385 |
| marker555 | o_Rickettsiales | Water | 2.0629011576339 | 0.00542900175931565 |
| marker556 | f_Oligoflexaceae | Water | 2.05597182792335 | 0.0114082588937077 |
| marker557 | g_unidentified_Actinomarinales | Water | 2.04732040878524 | 0.0145057279165385 |
| marker558 | g_Sandarakinorhabdus | Water | 2.04471435593397 | 0.00729259723763518 |
| marker559 | g_Lentimonas | Water | 2.04299174401435 | 0.0222897184237775 |
| marker560 | o_CCM19a | Water | 2.02890756732814 | 0.00441211829595411 |
| marker561 | p_Bacteroidota_o_Bacteroidales | Water | 2.01706530336365 | 0.00199661037682809 |
| marker562 | g_unidentified_Paracaedibacteraceae | Water | 2.00754847508053 | 0.00812892944448914 |
| marker563 | f_TRA3-20 | Water | 2.00355513588015 | 0.0127336949957302 |
| marker564 | f_SM2D12 | Water | 2.00135320938553 | 0.00725600464560742 |

Supplementary Table D. Identification of cultivable bacterial degraders isolated from microbiomes of landfill soil, sewage sludge and river water after long-term incubation with selected polymers (PP, PVC, PLA, PC).

| Site | Polymer | NCBI no | Strain | bp | Blast NCBI | Degree of coverage (%) |
|------|---------|----------|---|------|--|------------------------|
| Soil | PP | PP107976 | <i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> -PP-SL-44 | 1368 | <i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> [NR_116379] | 1360/1371 (99%) |
| | | PP107977 | <i>Klebsiella aerogenes</i> -PP-SL-9 | 1411 | <i>Klebsiella aerogenes</i> [NR_114737] | 1406/1408 (99%) |
| | | PP107978 | <i>Klebsiella aerogenes</i> -PP-SL-8 | 1412 | <i>Klebsiella aerogenes</i> [NR_102493] | 1407/1408 (99%) |
| | | PP107979 | <i>Serratia surfactantfaciens</i> -PP-SL-61 | 1410 | <i>Serratia surfactantfaciens</i> [NR_169468] | 1407/1410 (99%) |
| | | PP107980 | <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> -PP-SL-11 | 1417 | <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> [NR_025104] | 1414/1415 (99%) |
| | PVC | PP107981 | <i>Chryseobacterium candidae</i> -PVC-SL-12 | 1388 | <i>Chryseobacterium candidae</i> [NR_170452] | 1373/1389 (99%) |
| | | PP107982 | <i>Chryseobacterium candidae</i> -PVC-SL-13 | 1396 | <i>Chryseobacterium candidae</i> [NR_170452] | 1381/1396 (99%) |
| | | PP375082 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -PVC-SL-14 | 1400 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [NR_117678] | 1393/1409 (99%) |
| | | PP107983 | <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> -PVC-SL-53 | 1415 | <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> [NR_025104] | 1409/1409 (100%) |
| | PLA | PP107984 | <i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> -PLA-SL-7 | 1368 | <i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> [NR_116379] | 1354/1365 (99%) |
| | | PP107985 | <i>Chryseobacterium candidae</i> -PLA-SL-57 | 1401 | <i>Chryseobacterium candidae</i> [NR_170452] | 1380/1401 (99%) |
| | | PP107986 | <i>Chryseobacterium candidae</i> -PLA-SL-45 | 1398 | <i>Chryseobacterium candidae</i> [NR_170452] | 1385/1400 (99%) |
| | | PP107987 | <i>Microbacterium oxydans</i> -PLA-SL-4 | 1397 | <i>Microbacterium oxydans</i> [NR_044931] | 1396/1397 (99%) |
| | | PP107988 | <i>Priestia megaterium</i> -PLA-SL-63 | 1424 | <i>Priestia megaterium</i> [NR_112636] | 1423/1424 (99%) |

| | | | | | | |
|--------|-------|----------|--|---|--|---|
| | PC | PP107989 | <i>Chryseobacterium candidae</i> -PC-SL-54 | 1402 | <i>Chryseobacterium candidae</i> [NR_170452] | 1387/1402 (99%) |
| | | PP107990 | <i>Chryseobacterium candidae</i> -PC-SL-48 | 1401 | <i>Chryseobacterium candidae</i> [NR_170452] | 1383/1403 (99%) |
| | | PP107991 | <i>Prestia megaterium</i> -PC-SL-60 | 1419 | <i>Prestia megaterium</i> [NR_112636] | 1418/1419 (99%) |
| Sludge | PP | PP107992 | <i>Serratia marcescens</i> -PP-SG-68 | 1413 | <i>Serratia marcescens</i> [NR_114043] | 1409/1410 (99%) |
| | | PP107993 | <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> -PP-SG-46 | 1417 | <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> [NR_025104] | 1417/1420 (99%) |
| | PVC | PP107994 | <i>Klebsiella aerogenes</i> -PVC-SG-65 | 1410 | <i>Klebsiella aerogenes</i> [NR_102493] | 1401/1402 (99%) |
| | | PP107995 | <i>Serratia marcescens</i> -PVC-SG-41 | 1413 | <i>Serratia marcescens</i> [NR_114043] | 1406/1410 (99%) |
| | PLA | PP107996 | <i>Enterobacter sichuanensis</i> -PLA-SG-51 | 1410 | <i>Enterobacter sichuanensis</i> [NR_179946] | 1402/1408 (99%) |
| | | PP107997 | <i>Klebsiella aerogenes</i> -PLA-SG-42 | 1410 | <i>Klebsiella aerogenes</i> [NR_102493] | 1405/1407 (99%) |
| | | PP107998 | <i>Microbacterium oxydans</i> -PLA-SG-49 | 1403 | <i>Microbacterium oxydans</i> [NR_044931] | 1399/1401 (99%) |
| | | PP375086 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -PLA-SG-15 | 1402 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [NR_114043] | 1402/1402 (100%) |
| | | PP107999 | <i>Serratia surfactantfaciens</i> -PLA-SG-52 | 1413 | <i>Serratia surfactantfaciens</i> [NR_169468] | 1411/1416 (99%) |
| | PC | PP108000 | <i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> -PC-WR-66 | 1363 | <i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> [NR_116379] | 1354/1363 (99%) |
| | | PP108001 | <i>Microbacterium oxydans</i> -PC-SG-55 | 1415 | <i>Microbacterium oxydans</i> [NR_044931] | 1402/1403 (99%) |
| | | PP108002 | <i>Microbacterium oxydans</i> -PC-SG-43 | 1404 | <i>Microbacterium oxydans</i> [NR_044931] | 1403/1406 (99%) |
| | | PP108003 | <i>Serratia marcescens</i> -PC-SG-58 | 1414 | <i>Serratia marcescens</i> [NR_114043] | 1412/1414 (99%) |
| | | PP108004 | <i>Serratia nematodiphila</i> -PC-SG-50 | 1412 | <i>Serratia nematodiphila</i> [NR_044385] | 1411/1415 (99%) |
| | Water | PP | PP108005 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -PP-WR-47 | 1397 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [NR_117678] |
| PVC | | PP108006 | <i>Microbacterium oxydans</i> -PVC-WR-59 | 1407 | <i>Microbacterium oxydans</i> [NR_044931] | 1403/1404 (99%) |
| | | PP375085 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -PVC-WR-64 | 1405 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [NR_117678] | 1402/1402 (100%) |
| PLA | | PP108007 | <i>Klebsiella aerogenes</i> -PLA-WR-56 | 1411 | <i>Klebsiella aerogenes</i> [NR_102493] | 1410/1412 (99%) |
| | | PP375084 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -PLA-WR-67 | 1408 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [NR_117678] | 1408/1409(99%) |
| PC | | PP375083 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -PC-WR-62 | 1401 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [NR_117678] | 1401/1402 (99%) |

13. Dorobek naukowy

Działalność naukowo – badawcza:

a) Publikacje

1. Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T., & Hrynkiewicz, K. (2023). Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation. *Microbiological Research*, 67, 127251. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127251> (IF=6,1; pkt. MNiSW=100)
2. Wróbel, M., Deja-Sikora, E., Hrynkiewicz, K., Kowalkowski, T., & Szymańska, S. (2024). Microbial allies in plastic degradation: specific bacterial genera as universal plastic-degraders in various environments. *Chemosphere*, 363, 142933. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142933> (IF=8,1; pkt. MNiSW=140)

b) Udział w konferencjach, warsztatach

postery:

1. Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T., Hrynkiewicz, K; Acquisition of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation – zaprezentowany na międzynarodowej konferencji pt.: „Plant productivity and food safety: Soil science, Microbiology, Agricultural Genetics and Food quality”, która odbyła się w Toruniu w dniach 15 –16.09.2022.

referaty ustne:

1. Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T., Hrynkiewicz, K; Soil as a source of microorganisms with polymers biodegradation potential – wygłoszony podczas międzynarodowego seminarium pt.: „4th SUITMA International Seminar”, które odbyło się w Toruniu w dniu 13.01.2023.
2. Wróbel, M., Deja-Sikora, E., Szymańska, S., Kowalkowski, T., Hrynkiewicz, K; Pozyskiwanie bakterii degradujących polimery – PP,

PVC, PLA i PC.” wygłoszony podczas ogólnopolskiego sympozjum mikrobiologicznego pt.: “VII Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne – “Metagenomy różnych środowisk”, które odbyło się w Lublinie w dniach 20 – 21.06.2023.

3. Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T., Hrynkiewicz, K; Acquisition of microplastic-degrading microorganisms from natural and contaminated environments – wygłoszony podczas warsztatów pt.: „Cały świat w (pod)czerwieni - zastosowanie analityki i mikroskopii FTIR w ochronie środowiska, naukach o Ziemi i badaniach biologicznych”, które odbyły się w Toruniu w dniu 15.03.2024.

c) nagrody

1. Nagroda za zajęcie III miejsca w konkursie na najlepszą prezentację na VII Ogólnopolskim Sympozjum Mikrobiologicznym “Metagenomy różnych środowisk”. Wróbel, M., Deja-Sikora, E., Szymańska, S., Kowalkowski, T., Hrynkiewicz, K; Pozyskiwanie bakterii degradujących polimery – PP, PVC, PLA i PC.” Lublin w dniach 20 – 21.06.2023.