

MEDICAL UNIVERSITY OF GDANSK

Faculty of Health Sciences with Institute of Maritime and Tropical Medicine

**Vladyslav Redko**

**ENVIRONMENT AND HUMAN HEALTH HAZARD  
IDENTIFICATION ARISING FROM THE  
BIODEGRADATION PROCESS OF POLYMER PRODUCTS**

**IDENTYFIKACJA RYZYKA DLA ŚRODOWISKA I  
ZDROWIA CZŁOWIEKA,  
POWSTAJĄCEGO PODCZAS PROCESU BIODEGRADACJI  
PRODUKTÓW POLIMEROWYCH**

Doctoral dissertation

written under the supervision

of Prof. Lidia Wolska

and co – supervision

of Dr. Marta Potrykus

in the Division of Environmental Toxicology

of the Medical University of Gdańsk

GDAŃSK 2023

## TABLE OF CONTENTS

<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>3</b>
UZASADNIENIE PODJĘCIA BADAŃ .....	3
CELE PRACY .....	6
ZEBRANY MATERIAŁ I ANALIZY .....	6
WNIOSKI.....	9
<b>Literatura .....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
RATIONALE FOR THE STUDY .....	15
AIMS OF THE STUDY.....	18
COLLECTED MATERIAL AND ANALYSIS .....	18
CONCLUSIONS .....	20
<b>References: .....</b>	<b>24</b>

## STRESZCZENIE

### UZASADNIENIE PODJĘCIA BADAŃ

Tworzywa sztuczne cieszą się ogromnym popytem na całym świecie ze względu na ich walory ekonomiczne (niski koszt wytwarzania), czy techniczne (niska waga oraz wyjątkową trwałość w porównaniu do materiałów takich jak szkło). Chiny są czołowym światowym producentem tworzyw sztucznych, odpowiadając za 54% całkowitej produkcji. Tuż za nimi plasują się Stany Zjednoczone i Europa, przyczyniając się odpowiednio w 19% i 16% do ogólnej produkcji. W miarę wzrastającego popytu, produkcja tworzyw sztucznych również zwiększa się. W rezultacie całkowity popyt w Europie w 2019 roku wyniósł 50,7 miliona ton, z głównym zastosowaniem w opakowaniach (39,6%) oraz materiałach budowlanych (20,4%). Trend ten obserwuje się również w Polsce, gdzie całkowita ilość zebranych odpadów polimerowych w latach 2006-2018 wzrosła z 705 do 1074 kiloton. (Plastic Atlas 2019). Tworzywa sztuczne stanowią szeroką gamę rodzajów o różnych strukturach polimerowych. Jak wspomniano w pracy Ronca (2017), dwoma najczęściej produkowanymi syntetycznymi tworzywami polimerowymi są polietylen (PE) i polipropylen (PP), które to używane są jako substraty w produkcji różnych przedmiotów, takich jak torby, pojemniki czy butelki. Co więcej, według danych z 2016 roku, zużycie tworzyw sztucznych przez gospodarstwa domowe stanowiło 47% całej ich produkcji, podczas gdy w rolnictwie zużywano około 1%. (Global Marine Plastic Pollution, 2023). Ponadto, rocznie do oceanów dostaje się od 5 do 13 milionów ton odpadów z tworzyw sztucznych, co ma negatywne konsekwencje dla środowiska (Jambeck i in., 2015; Plastics Europe, 2018).

Powszechne stosowanie PE w życiu codziennym doprowadziło do zwiększenia jego produkcji, ale także skróciło okres eksploatacji wykonanych z niego produktów ze względu na ich nadprodukcję. Nadmierna produkcja PE skutkowałą znacznym nagromadzeniem na składowiskach komunalnych odpadów z szacowanym okresem degradacji wynoszącym około 650 lat (Why Does It Take Plastic So Long to Break Down?, 2020). Składowanie odpadów z PE na składowiskach komunalnych pozostaje jednym z głównych sposobów zarządzania tego typu odpadami. Jednak nieprzepisowe pozbywanie się odpadów z PE często prowadzi do zanieczyszczenia środowiska. Rozważania naukowe na temat mechanizmów degradacji tworzyw sztucznych w środowisku skupiały się początkowo na zmianach w strukturze cząsteczki polimeru, które to zostały przede wszystkim wykazane za pomocą spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR). Pojawienie się nowych grup funkcyjnych w strukturze, takich jak -OH, -COH lub -COOH, zostało zinterpretowane jako wynik degradacji łańcucha polimerowego przy działaniu różnych czynników (fizycznych, chemicznych, mikrobiologicznych), prowadzących ostatecznie do powstania związków o wyższym stopniu utlenienia (Restrepo-Flórez i in., 2014; Ahmed i in., 2018; Tokiwa i in., 2009). Z czasem badania wskazywały także na udział mikroorganizmów w degradacji tworzyw sztucznych w środowisku, a niektórzy biotechnolodzy badali zmodyfikowane bakterie zdolne do degradacji struktur polimerowych (Wu i in., 2023).

Od pewnego czasu, w badaniach zajmujących się (bio-)degradacją tworzyw sztucznych, wspomina się o stabilizatorach, plastifikatorach, lubrykantach i środkach przeciwpalnych, wypełniaczach i innych dodatkach, które mogą stanowić znaczną część, sięgającą nawet 45-50%, składu plastików w tym PE (Wiesinger et al. (2021). Dodatki te mogą być organiczne lub nieorganiczne oraz mogą pełnić różne funkcje, a zalicza się do nich środki opóźniające palność, plastyfikatory, przeciwutleniacze i środki przeciwmikrobiologiczne. Do dodatków organicznych należą środki przeciwmikrobiologiczne, takie jak 2-n-oktyl-4-izotiazolin-3-on, a także środki przeciwmgienne, takie jak estry gliceryny, estry poligliceryny, estry sorbitanu i ich etoksylaty (Andrade i in., 2021).

Dodatki nieorganiczne stanowią barwniki, absorbery promieniowania UVA zawierające metale ciężkie, dodatki przewodzące, takie jak proszki aluminiowe i miedź, oraz środki opóźniające palność, takie jak wodorotlenek glinu (III), wodorotlenek magnezu (II) i tritlenek antymonu, jak to wynika z raportów Andrade i in. (2021) oraz Hahladakis i in. (2018).

W warunkach środowiskowych kluczowym mechanizmem degradacji tworzyw sztucznych jest hydrolytyczne usuwanie tych dodatków ze struktury materiału polimerowego, jak opisano w pracy Eck i in. (2023). Proces ten także osłabia wiązania chemiczne wewnątrz polimeru, prowadząc do postępującej degradacji hydrolytycznej, powstawania pęknięć i rozwarstwienia oraz umożliwia mikroorganizmom środowiskowym rozpoczęcie procesu biodegradacji, jak omówiono w pracy Mohanan i in. (2020). Procesy te nazywane są zbiorczo "(bio-)degradacją" i często w naturalnych środowiskach oddziałują ze sobą w skomplikowany sposób. Podczas (bio-)degradacji tworzyw sztucznych z ich struktury do otoczenia uwalniane są różnorodne dodatki organiczne i nieorganiczne. To uwalnianie stwarza potencjalne ryzyko dla ekosystemów i zdrowia ludzkiego. Obawy te są szczególnie nasilone w przypadku środowisk oceanicznych, w których to występuje niekontrolowane gromadzenie się odpadów polimerowych. Oprócz uwalnianych dodatków, w trakcie (bio-)degradacji pojawiają się różne inne czynniki mogące stanowić ryzyko, takie jak mikroorganizmy patogenne, cząsteczki mikroplastiku i nanoplastiku, gazy cieplarniane i inne.

Warto podkreślić, że brakuje kompleksowych informacji dotyczących długotrwałej (powyżej 5 lat) (bio-)degradacji plastików. Większość badań w tym obszarze skupiała się na badaniach *in-vitro* lub czas trwania (bio-)degradacji ograniczony był do kilku miesięcy. Ten brak długoterminowych danych stanowi zauważalną lukę w zrozumieniu tego problemu, zwłaszcza biorąc pod uwagę, że wiele istniejących badań ma formę przeglądów literaturowych i najczęściej nie dotyczy gleby. Ta luka informacyjna jest szczególnie niepokojąca, biorąc pod uwagę, że znaczna ilość odpadów z tworzyw sztucznych trafia do starych składowisk odpadów komunalnych, które to nie są tak dobrze zabezpieczone jak nowoczesne składowiska (po 1990r). Ze względu na potencjalną migrację zanieczyszczeń z tych składowisk, istnieje ryzyko przenikania ich do wód gruntowych, stwarzając przy tym zagrożenie dla środowiska, a co za tym idzie, zdrowia ludzkiego. W celu rozwiązania tych problemów, model naukowy przyjęty w ramach tego projektu skupia się na składowiskach odpadów komunalnych. Celem jest zidentyfikowanie wszystkich ryzyko związanych z procesem (bio-)degradacji plastików pod wpływem warunków środowiskowych, zarówno dla środowiska, jak i zdrowia człowieka.

Główna koncepcja pracy doktorskiej była ukierunkowana na dwa zadania. Pierwsze z nich skupiało się na zagadnieniach związanych z procesami i zmianami zachodzącymi wewnątrz struktury tworzywa sztucznego w trakcie i po długotrwałej (bio-)degradacji. Drugie zadanie opierało się o badanie wpływu długotrwałego procesu (bio-)degradacji na środowisko. W związku z tym, postawiona hipoteza naukowa brzmiała: *"Odpady z tworzyw sztucznych dostające się do środowiska w wyniku trwającego procesu (bio-)degradacji tego materiału prowadzą do zmian chemicznych i mikrobiologicznych w środowisku, które stanowią zagrożenie dla zdrowia człowieka"*.

Pierwsze **dwie załączone publikacje** przedstawiają wyniki uzyskane podczas badań wstępnych. Dzięki ścisłej współpracy z zewnętrznymi instytutami badawczymi, podczas wykonywania tych badań uzyskano możliwość wykorzystania różnych technik analitycznych w celu zbadania zmiany w strukturze PP, jednego z najczęściej używanych materiałów polimerowych. Głównym celem tych badań było wykrycie potencjalnych zagrożeń dla środowiska i zdrowia człowieka w okresie ok. 5 lat (bio-)degradacji. W ramach pierwszej części badania wstępnego, opisanej w **publikacji inauguracyjnej P1**, skupiono się na ustaleniu struktury polimeru pozyskanego

ze składowiska w Chlewnicy i identyfikacji zmian zachodzących w strukturze PP po około 5 latach ciągłej (bio-)degradacji (zalegania w ziemi). Na (bio-)degradację tworzywa sztucznego wpływa wiele czynników środowiskowych, przy czym główną rolę odgrywa (bio-)degradacja mikrobiologiczna. Ponadto różne formy degradacji często wzajemnie oddziałują w warunkach środowiskowych. W wyniku tego oddziaływania może dochodzić do zmian w mikrobiomie środowiskowym. Ponadto mikrobiom środowiskowy może ulec modyfikacjom nie tylko w wyniku kolonizacji struktury PP w trakcie (bio-)degradacji, ale także poprzez interakcję między substancjami chemicznymi uwalnianymi ze struktury do środowiska glebowego i wodnego. Przykładem takich substancji są uwalniane w trakcie (bio-)degradacji związki zaburzące układ hormonalny (EDCs). Wang i Qian (2021) oraz Tuan Tran i in. (2022) wskazują, iż wśród tych EDCs znajdują się ftalany, powszechnie stosowane jako plastyfikatory w produkcji tworzyw sztucznych, które to stanowią zagrożenie zarówno dla środowiska, jak i zdrowia ludzkiego. Ponadto halogenowane substancje organiczne (AOX) często stosowane są jako dodatki do produkcji polimerów syntetycznych. Substancje te mają również potencjał do uwalniania się podczas (bio-)degradacji, co stanowi ryzyko prowadzące do zmian w środowisku, w tym w mikrobiomie środowiskowym, i nie tylko. Głównym celem **publikacji P2** było kompleksowe zidentyfikowanie potencjalnych punktów ryzyka i zweryfikowanie zakresu wymaganych technik analitycznych dla tego rodzaju badań, obejmujących aspekty mikrobiologiczne, chemiczne i toksykologiczne. Niniejsza publikacja miała na celu rzucić światło na zmiany w środowisku i mikrobiomie środowiskowym jako skutków trwających procesów (bio-)degradacji.

To pierwsze doświadczenie wykorzystałem do zbudowania planu i metodologii badań na unikatowym polu badawczym, którym było stare składowisko odpadów komunalnych, założone z początkiem lat 60. ubiegłego wieku. Z powodu prac renowacyjnych i konieczności przygotowania obszaru pod nową inwestycję, systematycznie opróżniano dużą kwaterę odpadów komunalnych. W trakcie eksploatacji składowiska, materiały odpadowe nie były mieszane warstwami; po prostu pokrywano je następną warstwą ziemi i kolejną warstwą odpadów. Warto podkreślić, że jako stare składowisko odpadów komunalnych, opróżniana kwatera nie posiadała izolacji od otoczenia. W trzeciej publikacji skupiono się więc na zmianach zachodzących wewnątrz struktury polimerowej (zidentyfikowanej jako PE) w okresie około 60 lat, ponieważ stanowiło to jedno z kluczowych zadań niniejszej dysertacji (**publikacja P3**). Dotąd materiały z tego okresu cieszyły się ograniczonym zainteresowaniem naukowców. Chociaż w licznych pracach przeglądowych badano mechanizmy degradacji i biodegradacji, niniejsza praca przyniosła nowe spostrzeżenia, które to nie wynikały z badań laboratoryjnych przeprowadzanych zgodnie z trendami w kontrolowanych warunkach, ale z warunków rzeczywistych.

Jak wspomniano wcześniej, druga część badań skupiała się na zmianach w środowisku powstałych na skutek długotrwałej (bio-)degradacji tworzyw sztucznych. **Publikacja P4** stanowiła kulminację tych wysiłków, rzucając światło na brak informacji w tej dziedzinie. Potencjalne czynniki ryzyka, takie jak uwalniane dodatki, EDCs, metale ciężkie, mikroplastiki i mikroorganizmy patogenne, mają zdolność do przenikania z czasem do środowiska przez niewłaściwie zabezpieczone podstawy składowisk odpadów, głównie pod wpływem opadów deszczu. Wyjaśnienie tego zjawiska stanowiło główny cel **publikacji P4**. W tym etapie badań próbki gleby pobrane spod składowiska odpadów komunalnych (MWL) stanowiły kluczowe pole testowe. To unikalne podejście pozwoliło na uzyskanie i potwierdzenie wielu spostrzeżeń dotyczących potencjalnych zagrożeń zarówno dla środowiska, jak i zdrowia ludzkiego.

## CELE PRACY

Odpady z tworzyw sztucznych składowane na miejskich wysypiskach podlegają wpływowi różnorodnych czynników środowiskowych, które uruchamiają procesy (bio-)degradację. W trakcie (bio-)degradacji uwalniane są liczne związki, takie jak dodatki (w tym związki zaburzające układ hormonalny (EDCs), metale ciężkie i inne) co może prowadzić do zanieczyszczeń środowiska.

Przy czym lokalnie, w miejscu kontaktu plastiku z glebą, poziom stężeń związków wymywanych z plastiku (zanieczyszczeń) może być znacząco wysoki. W takich warunkach może dochodzić do znaczących zmian w jakości chemicznej i mikrobiologicznej środowiska.

Ocena zmian zachodzących w tworzywach sztucznych, podlegających (bio-)degradacji, oraz zmian w środowisku (wodnym czy glebowym), w którym proces ten zachodzi, wymaga interdyscyplinarnych badań obejmujących aspekty fizyczne, chemiczne, toksykologiczne i mikrobiologiczne. Złożoność badań częściowo wyjaśnia niedostatek spójnej wiedzy na temat procesów (bio-)degradacji plastików zachodzących w środowisku, zwłaszcza w środowisku glebowym.

Główne cele badań wykonanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej skupiały się na:

- Ocenie zmian w strukturze odpadów z tworzyw sztucznych podczas (bio-)degradacji.
- Ocenie zachodzących zmian w środowisku otaczającym składowisko odpadów, mogących stwarzać ryzyko dla zdrowia ludzkiego.

W ramach realizacji zadań związanych z badaniem zmian w strukturze tworzyw sztucznych postanowiono wykonać następujące kroki:

- Potwierdzenie procesu (bio-)degradacji w pobranych próbkach tworzyw sztucznych.
- Identyfikacja pobranych próbek odpadów z tworzyw sztucznych jako materiałów otrzymywanych z surowców ropopochodnych.
- Obserwacja zmian w strukturze tworzywa sztucznego za pomocą technik mikroskopowych.

Druga część badań ukierunkowana była na ocenę zmian w środowisku i obejmowała następujące kroki:

- oznaczanie podstawowych parametrów fizyko-chemicznych gleby;
- oznaczane w glebie metali, kationów i anionów oraz lotnych związków organicznych, a także identyfikacja i oszacowanie zanieczyszczeń organicznych w ekstraktach z gleby;
- identyfikacja lotnych związków organicznych (LZO) w próbkach powietrza;
- analiza ekotoksyczności gleby.

Na podstawie wyników utworzono bazy danych, które poddano kompleksowej analizie w celu identyfikacji ryzyka dla środowiska i zdrowia człowieka powstającego na skutek procesu (bio-)degradacji produktów polimerowych.

## ZEBRANY MATERIAŁ I ANALIZY

**Zbiór Próbek:** Próbki zostały pobrane jesienią 2020 roku podczas przebudowy składowiska odpadów, kiedy to usuwano kolejne warstwy odpadów z kwartałów składowiska. W sumie zebrano 26 próbek odpadów z tworzyw sztucznych (PW) oraz 13 próbek gleby (w tym próbka kontrolna) i 5 próbek powietrza. Podczas każdej kampanii

próbki pobierano z różnych warstw składowiska, a próbki kontrolne uzyskiwano z miejsca oddalonego od składowiska. Warto zaznaczyć, że próbki gleby zostały zebrane jako próbki przylegające dopróbek z polietylenu (PE), które ulegały (bio-)degradacji. Podczas pierwszej kampanii, 10 października 2020 roku, temperatura powietrza wynosiła 17°C, a wilgotność oscylowała w okolicach 90%. Podczas drugiej kampanii, która to miała miejsce 14 listopada 2020 roku, temperatura wynosiła 12°C, a wilgotność wynosiła około 87%. Ten sekwencyjny proces zbierania próbek pozwolił na osiągnięcie głównego celu: badania procesu (bio-)degradacji odpadów z tworzyw sztucznych i jej wpływu na otoczenie na przestrzeni około 60 lat.

**Klasyfikacja Gleby:** W oparciu o system klasyfikacji gleby WRB (IUSS WG WRB, 2015; Kabała i in., 2019), glebę, na której prawdopodobnie zostały zdeponowane PW oraz glebę pobraną na składowisku (w konsultacji ze specjalistami IUNG) jako Gleby Brunatne (Brunic Arenosols).

**Przechowywanie Próbek Środowiskowych:** Pobrane próbki powietrza, po dostarczeniu do laboratorium, jeszcze tego samego dnia były analizowane z zastosowaniem techniki TD-GC-MS. Próbki gleby były odważone i zalane dichlorometanem, a następnie analizowane z zastosowaniem techniki OC-GC-MS/MS. Odważki gleby zalewano również wodą dejonizowaną w celu dalszej analizy kationów i anionów z zastosowaniem chromatografii jonowej. Próbki gleby analizowano także pod kątem mikrobiologii i ekotoksykologii. Pozostałe próbki gleby zostały podzielone, część z każdej próbki pozostawiono w stanie niezmienionym i przechowywano w temperaturze ok. 4°C, część poddano liofilizacji. Próbki gleby (liofilizowane) wysłane zostały do akredytowanych laboratoriów do analizy metali oraz oceny wymywalności. Próbki plastiku przechowywano w naczyniach szklanych w temperaturze ok. 4°C.

**Analiza Próbek Tworzyw Sztucznych:** Istotnym pierwszym etapem w tym badaniu było określenie struktury zebranych próbek odpadów z tworzyw sztucznych. Badania te zostały zlecone na Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej. Rodzaj materiału próbek odpadów został zidentyfikowany za pomocą techniki Spektroskopii Fourierowskiej w Podczerwieni (FTIR). Każda próbka PW przeszła proces identyfikacji oparty na wykrywaniu grup funkcyjnych w ich wnętrzu. Przed analizą próbki zostały starannie oczyszczone i umyte acetonem. Proces skanowania przeprowadzono przy użyciu spektrometru Nicolet IR200 wyposażonego w moduł ATR (Attenuated Total Reflectance). Dodatkowo, przejście fazowe (topnienie) i stopień krystaliczności określono za pomocą różnicowego kalorymetru skaningowego Phoenix Netzsch 209 F1 (DSC).

**Badanie Próbek Foli:** Aby zbadać proces degradacji folii, wykonano zdjęcia zarówno materiałów odniesienia, jak i próbek folii przy użyciu Mikroskopii Elektronowej Skaningowej (SEM) z mikroskopem elektronowym JEOL JSM-5310LV, pracującym przy napięciu 25 kV. Próbki folii zostały przycięte na kawałki o średnicy 0,5–1 cm, dokładnie umyte w sterylnie przygotowanej wodzie dejonizowanej i pozostawione do wyschnięcia. Badania wykonano we współpracy z prof. A. Piotrowicz-Cieślak z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, w którym odbyłem kilkudniowe szkolenie. Zweryfikowano żywotność bakterii na powierzchni PW we wszystkich próbkach z różnych warstw. Na tym etapie badań wykorzystano zestaw do oceny żywotności bakterii Live/Dead BacLight (Molecular Probes, L7012). Mieszaninę barwników, składającą się z SYTO® 9 i jodku propidyny, bezpośrednio naniesiono na próbki na szkiełka i inkubowano przez co najmniej 30 minut w ciemności. Następnie próbki zostały zbadane przy użyciu konfokalnego mikroskopu laserowego Leica TCS SP5, a uzyskane obrazy zostały poddane analizie za pomocą oprogramowania Leica Confocal. Test żywotności bakterii polegał na barwieniu komórek jodkiem propidyny (PI), barwnikiem kwasów nukleinowych wskazującym uszkodzenie komórek, oraz zielonym barwnikiem fluorescencyjnym SYTO 9.

**Badanie Próbek Gleby:** Badanie próbek gleby rozpoczęto poprzez ekstrakcję jonów w fiolkach o pojemności 50 ml. Osiągnięto to przez zmieszanie gleby z wodą dejonizowaną w stosunku objętościowym 1:10. Mieszanki te były następnie mieszane w inkubatorze z sitkiem (Cole-Parmer Ltd., SI 500, USA) z prędkością obrotową 10 obrotów na minutę przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, zgodnie z metodą opisaną przez Rajmunda i in. w 2019 roku. Tą metodę przygotowania próbek zastosowano zarówno do ekstrakcji kationów jak i anionów nieorganicznych. Następnie przeprowadzono analizę metali ciężkich w każdej próbce gleby zebranej ze składowiska podczas dwóch kampanii. Badanie to przeprowadzono we współpracy z Bureau Veritas Commodities Canada Ltd. Do rozpuszczania większości minerałów wykorzystano zestawy do wielokrotnego trawienia kwasami. 0,25 g próbki gleby podgrzewano w mieszaninie HNO<sub>3</sub>, HClO<sub>4</sub> i HF aż do wydzielenia dymu, a następnie suszono. Powstały osad rozpuszczano w HCl. Przygotowane ekstrakty poddano kompleksowej analizie za pomocą techniki spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-ES/MS), która to dostarczyła danych na temat większości pierwiastków.

Dodatkowo, przeprowadzono analizę składu chemicznego próbek gleby przy użyciu chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS) firmy Shimadzu Corp. z siedzibą w Kioto, Japonia.

Wykorzystanie aparatury posiadającej potrójny kwadrupol jako analizatora umożliwiło zwiększenie czułości opracowanej metody oraz zmniejszenie błędów identyfikacyjnych substancji. Przygotowanie gleb do analizy technikami łączonymi rozpoczęto od mechanicznego oczyszczenia próbek gleby, obejmującego usunięcie kamieni i innych zanieczyszczeń. Po tej operacji próbki poddano suszeniu chemicznemu poprzez dodanie acetonu w stosunku 1:1. Mieszanki te pozostawiono na dobę w temperaturze pokojowej. W następnym etapie do wysuszonych próbek gleby dodano dichlorometanu w stosunku 1:3 (3 gramy próbki gleby + 9 mililitrów dichlorometanu). Po ekstrakcji i zatężeniu ekstrakty glebowe przeniesiono do mikrowładek o objętości 10 µL, które stanowiły integralne komponenty w obrębie fiołki.

**Badanie Próbek Powietrza:** Próbkę powietrza pobrano na pięciu różnych poziomach głębokości, zachowując ostrożność, aby zapobiec zewnętrznemu zanieczyszczeniu. W celu izolacji otoczenia(?) podczas pobierania próbek, zastosowano metalową barierę w formie kopuły. Anality z powietrza były adsorbowane na stałym sorbencie, Tenax TA, który został przygotowany w kwarcowych tubkach (130 mg Tenax TA, 1/4" × 90 mm), zgodnie z metodą wykorzystującą desorpcję termiczną, opisaną przez Berga i in. w 2020 roku (literatura).

**Ocena Ekotoksyczności:** Przeprowadzono trzy testy biologiczne aby ocenić wpływ zebranych próbek gleby na biotę. Testy te obejmowały test Phytotoxkit F<sup>TM</sup> (MicroBioTest Inc., Ghent, Belgia), test Microtox<sup>®</sup> (z wykorzystaniem analizatora Model 500 z oprogramowaniem Microtox Omni firmy ModernWater Ltd., Wielka Brytania) oraz Ostracodtoxkit<sup>®</sup>.

**Analiza Danych Eksploracyjnych i Uczenie Maszynowe:** Do analizy danych i przetwarzania statystycznego użyto języka programowania Python 3.11 (Guido i Fred, 2009). Dodatkowo wykorzystano kilka platform do wykonywania różnych zadań: platformę Scikit-learn (Pedregosa i in., 2011) do implementacji i walidacji algorytmów klastrowania oraz do regresji liniowej k-średnich do oszacowania całkowitej degradacji struktury tworzywa sztucznego; Plotly (Inc., 2015) do wizualizacji danych oraz SciPy (Virtanen i in., 2020) i Pingouin (Vallat, 2018) do implementacji testów statystycznych.



## WNIOSKI

Przy użyciu technik analitycznych takich jak FTIR, DSC, SEM i mikroskopia fluorescencyjna uzyskano cenne wskazówki dotyczące procesów degradacji zachodzących w próbkach plastiku, deponowanego do ok. 60, lat w środowisku glebowym. Wyniki przeprowadzonych badań ujawniły znaczące zmiany w strukturze PW oraz stopniowe rozwarstwianie się próbek polimerowych w czasie, co było wskaźnikiem występowania procesu (bio-)degradacji. Analiza DCM wykazała spadek fazy krystalicznej, podczas gdy analiza FTIR wykazała obecność kilku charakterystycznych pasm absorpcyjnych. Występowanie drgań rozciągających  $\nu_{C=O}$  ( $1600 - 1750 \text{ cm}^{-1}$ ) zauważono we wszystkich próbkach pobranych na różnych poziomach głębokości odzwierciedlających różne etapy eksploatacji składowiska. Samo występowanie tych drgań jest interesującym zjawiskiem, ponieważ może sugerować występowanie procesu utleniania struktury polimerowej lub obecność ftalanów uwolnionych z struktury PE, jak sugeruje badanie przeprowadzone przez Rajamanikam i in. (2017), lub potencjalnie oba te czynniki. Przydatność tych dwóch wyżej wymienionych technik analitycznych została przetestowana w ramach badań wstępnych (**publikacja P1**), po czym zastosowano je w badaniach przewodnich (**publikacja P3**). Dzięki temu udało się **potwierdzić (bio-)degradację struktury polimerowej. Obie techniki zostały wykorzystane do identyfikacji pobranych próbek tworzyw sztucznych, co jest istotnym elementem tego typu badania.** W **publikacji P1** badane próbki tworzyw zidentyfikowano jako PP, podczas gdy w badaniach przewodnich opisanych w trzeciej publikacji zostały zidentyfikowane jako PE. Metody te służące do identyfikacji zostały przetestowane i zastosowane zarówno w **pierwszej, jak i trzeciej publikacji (P1 i P3), umożliwiając skuteczną identyfikację zebranych próbek tworzyw sztucznych.**

Poprzez obserwacje w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) **zweryfikowano zmiany w strukturze tworzyw sztucznych**, które wskazywały na trend zwiększonej delaminacji i ilości pęknięć wraz z głębokością składowiska. Nawet po 1,5 roku (bio-)degradacji, ślady strukturalnej (bio-)degradacji były już widoczne, co sugeruje pojawianie się zmian przez cały okres składowania. Co ciekawe, wielkość mikroplastikowych cząsteczek również zmniejszała się w miarę upływu czasu. Podczas obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym wykryto obiekty o nieregularnym kształcie, co świadczyło o występowaniu kolonii mikroorganizmów. W związku z tym, kolejnym krokiem badań było zastosowanie techniki mikroskopii fluorescencyjnej, która potwierdziła obecność mikroorganizmów we wszystkich poziomach. Zastosowanie zarówno mikroskopii fluorescencyjnej, jak i techniki SEM (**publikacja P1 i P3**), pozwoliło na **potwierdzenie zmian w strukturze plastiku**. Pomimo braku wyraźnej zależności między liczbą mikroorganizmów a głębokością warstwy składowiska, zauważalna była tendencja w ich dystrybucji. Dystrybucja mikroorganizmów w obrębie materiału polimerowego nie była jednostajna, w przeciwieństwie do próbek tworzywa sztucznego pobranych z dna miejskiego wysypiska odpadów komunalnych (MWL), gdzie mikroorganizmy występowały głównie w obszarach z pęknięciami i delaminacją struktury polimerowej. Sugeruje to, że mikroorganizmy mogą kolonizować obszary o najwyższym stopniu delaminacji. Istotnie, obecność pęknięć w strukturze badanego przedmiotu ułatwiała **tworzenie biofilmu przez mikroorganizmy**, zwiększając ich zdolność do przetrwania. Wszystkie wnioski wynikające z tych obserwacji wskazują na dominujące występowanie degradacji hydrolytycznej, która to odpowiada za usunięcie dodatków z struktury tworzywa i osłabienie wiązań chemicznych. Zaobserwowany spadek krystaliczności dodatkowo potwierdza ten wniosek. Podczas drugiego etapu degradacji dominowała aktywność mikroorganizmów. Wykorzystując istniejące już pęknięcia, mikroorganizmy mogły wnikać w strukturę tworzywa sztucznego, tworząc kolonie w tych miejscach i prowadząc

do rozwoju biofilmu. Interakcja między mikroorganizmami a powierzchnią tworzywa sztucznego skutkowało synergicznymi efektami, które przyspieszały proces degradacji. W związku z tym, dalsza część badań miała na celu zbadanie zmian w otaczającym środowisku i potencjalnych skutków dla zdrowia człowieka, jak to opisano w **publikacji P2 i P4**. W tym celu zastosowano szeroki zakres technik analitycznych do analizy próbek gleby pobranych z miejskiego wysypiska odpadów komunalnych (MWL). Pierwszym krokiem badań była kompleksowa analiza chemiczna gleby. Analiza ilościowa oznaczonych anionów i kationów uzyskana za pomocą chromatografii jonowej (IC), wykazała znaczące odstępstwa w stężeniu siarczanów, bromków oraz chlorków. Związki zawierające te aniony są powszechnie stosowane jako dodatki w produkcji PE, a ich podwyższone poziomy sugerują wydzielanie m.in. halogenowanych związków organicznych z struktury tworzywa w wyniku degradacji hydrolytycznej. Ponadto, zawartość kationów sodu, potasu i wapnia wskazywała na znacznie podwyższone ich poziomy niż w glebie kontrolnej. Prawdopodobnie kationy te pochodziły ze struktury tworzywa, gdyż występują one także w strukturach dodatków organicznych. Ponadto wykryto duże stężenia jonów  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ , co może wskazywać na zachodzące w glebie procesy nityfikacji, potencjalnie związane z zwiększoną aktywnością mikroorganizmów (Nitrifying bacterium, 2023). Podobne zjawiska zaobserwowano zarówno w badaniach wstępnych (**publikacja P2**), jak i w badaniach przewodnich (**publikacja P4**).

W wyniku analizy metali ciężkich w glebie pobranej z miejskiego wysypiska odpadów komunalnych uzyskano wiele istotnych wniosków. Kilka metali, takich jak Zn, Fe, Al, Cu, Pb, Zn i Ti, które to używane są w produkcji polietylenu (PE) (Núñez et al., 2022), wykryto we wszystkich próbkach. Stężenia tych metali w glebie pobranej z MWL były wyższe w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla próbek kontrolnych. Zawartość metali takich jak Pb, Fe, Cu i Al wykazywała podobny trend, w którym to zaobserwowano kilkakrotnie większe stężenia w głębszych warstwach pod MWL, co wskazuje na stopniową migrację metali toksycznych w głąb MWL. Trendy w zmianie stężenia metali z głębokością korelują z powoli pojawiającymi się zmianami ustrojowymi w latach 1980 – 1990. W latach 90. Polska przeszła transformację z gospodarki centralnie planowanej (socjalistycznej) na gospodarkę rynkową (kapitalistyczną) (Swadźba, 2019). Transformacja ta mogła prowadzić do znacznego w latach 90. ubiegłego wieku wzrostu produkcji i zapotrzebowania na tworzywa sztuczne, zwłaszcza na PE oraz napływem towarów z Europy Zachodniej. Metale takie jak Zn, Fe, Al, Cu, Pb, Zn i Ti (używane jako stabilizatory UV, przeciwutleniacze i środki opóźniające palność) mogą być szkodliwe dla środowiska glebowego. Pb jest zaś uważany za metal toksyczny, stanowiący zagrożenie dla środowiska i zdrowia ludzkiego.

W ramach analizy chemicznej oznaczono także lotne i średniolotne związki organiczne w próbkach gleby pobranych z MWL. Próbki pobrane z górnych i środkowych warstw środowiska wykazywały największe całkowite stężenia LZO. We wszystkich próbkach wykryto związki zawierające brom, a w warstwach środkowych przeważały związki zawierające w swojej cząsteczce chlor, jod i fluor. W miarę głębokości, wzrastało stężenie substancji zawierających brom i stały się one dominujące, zwłaszcza przy dnie i pod MWL. Organiczne związki halogenowe, jak omówiono w pracy Al-Malaika i in., 2017, są powszechnie stosowane jako dodatki w produkcji PE, zwłaszcza substancje zawierające brom, co podkreślono w pracy Li i in., 2023.

Dodatkowym interesującym aspektem było oznaczenie dużej ilości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w próbkach gleby i powietrza zebranych w trakcie badań. Obecność takich substancji jest objawem charakterystycznym dla zanieczyszczeń pochodzących ze starych MWLs, co sugerują badania Melnyk i in., 2015, oraz Baalbaki i in., 2016. Związki te powstają w trakcie pożarów, które stanowią niepożądane

incydenty występujące na starych składowiskach. Zgodnie z Baalbaki i in., 2016, PAHs zostały również oznaczone w odciekach z MWL, które mają zdolność przenikania przez warstwy MWL oraz przenikania do środowiska.

Aby ocenić wpływ zebranych próbek gleby na biotę przeprowadzono trzy biotesty,.: Phytotoxkit F™, bioetest Microtox® i Ostracodtoxkit®. Wszystkie trzy biotesty wskazały na wysoką toksyczność niektórych próbek gleby zebranych ze składowiska odpadów komunalnych (MWL).

Fitotoksyczność obserwowano we wszystkich próbkach MWL, podczas gdy próbka kontrolna wykazywała średnią długość korzeni nawet wyższą niż certyfikowany piasek referencyjny. Jednak w teście Microtox® większość próbek MWL była toksyczna; jednak tylko próbki z dolnych warstw wykazywały wysoką toksyczność, co sugeruje migrację potencjalnie toksycznych substancji przez warstwy MWL.

Bioetest Ostracodtoxkit® to test "bezpośredniego kontaktu", w którym organizmy żyją, żywią się i pozostają w stałym kontakcie z próbkami gleby. Wyniki wykazały kilka głównych trendów wśród próbek. Większość próbek wykazywała znaczące wskaźniki śmiertelności przekraczające 85%. W przeciwieństwie do próbki kontrolnej, która wykazała wskaźnik śmiertelności wynoszący 0,0%. próbki gleby zebrane z warstwy pod MWL wykazywały wskaźniki śmiertelności powyżej 85%. Choć te wskaźniki przekroczyły próg 30%, nadal uważane są za wysoce toksyczne. Rezultaty badań z zastosowaniem **biotestów** sugerują uwolnienie substancji charakterystycznych dla struktur plastikowych do środowiska glebowego, co prowadzi do zanieczyszczenia gleby.

**Skład lotnych związków organicznych (VOCs) w powietrzu** został oznaczony dla wszystkich zebranych próbek powietrza z różnych warstw MWL i porównany. Najwyższe całkowite stężenie VOCs wykryto w głębszych warstwach MWL, co sugeruje możliwą migrację substancji toksycznych nie tylko do warstwy pod MWL przez glebę, ale także do powietrza, prowadząc do zanieczyszczenia powietrza. Większość wykrytych substancji została sklasyfikowana jako węglowodory alifatyczne. Jednak nie wykryto w nich żadnych związków organicznych halogenowanych ani ftalanów, w przeciwieństwie do próbek gleby, gdzie wykryto wszystkie wymienione związki, z potencjałem migracji przez warstwy.

Podsumowując wyniki uzyskane w obu badaniach wskazują, że:

1. Proces (bio-)degradacji tworzyw sztucznych (głównie PE), przebiegający w środowisku glebowym, opiera się w pierwszym etapie głównie na wymywaniu dodatków (stanowiących nawet do 55% masy plastiku)
2. Zmiany w strukturze polimeru PE, w obserwowanym czasie ok. 60 lat, zachodzą bardzo powoli, co wskazuje na słabe oddziaływanie czynników fizycznych takich jak temperatura czy promieniowanie UV;
3. Łuszcząca się powierzchnia plastiku stanowi miejsce kolonizacji PE przez mikroorganizmy, które mając zdolność tworzenia biofilmów wewnątrz struktury plastikowej, zwiększając swoją przeżywalność;
4. Łuszcząca się powierzchnia plastiku generuje powstawanie mikroplastiku i nanoplastiku;
5. Do gleby, w której deponowany był PE, migrują związki będące składnikami dodatków do plastiku, które poprawiają funkcjonalność tworzyw;
6. Gleba, zanieczyszczona związkami emitowanymi z PE, stanowi zagrożenie dla środowiska i zdrowia ludzkiego poprzez transport drogą powietrzną (porywy wiatru), oraz transport w glebie, który prowadzi do zanieczyszczenia wód gruntowych;
7. Migracja zanieczyszczeń, zwłaszcza metali ciężkich (które charakteryzują się wolną migracją), w kierunku głębszych warstw i na dno, podkreśla kluczowe znaczenie konieczności likwidacji takich

składowisk, wprowadzenia systemów monitorowania i optymalizacji praktyk zarządzania odpadami w celu zmniejszenia licznych ryzyk dla środowiska;

8. Rozwój mikroorganizmów, w tym patogennych, w przestrzeniach łuszczących się struktur plastiku, dodatkowo zwiększa czynniki ryzyka środowiskowego i zdrowotnego;

**Słowa kluczowe:** długotrwała (bio-)degradacja, ocena toksykologiczna, migracja nieorganicznych i organicznych dodatków, ryzyko dla środowiska i zdrowia.

## Literatura:

- Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I., Muhammad, S., 2018. Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7287–7298. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-1234-6649/METRICS>.
- Andrade, H., Glüge, J., Herzke, D., Ashta, N., Nayagar, S., Scheringer, M., 2021. Oceanic long-range transport of organic additives present in plastic products: an overview. *Environmental Sciences Europe*, 33. doi:10.1186/s12302-021-00522-x.
- Berg, A., Michalska, M., Tankiewicz, M., Staniszewski, A., Ratajczyk, J., Wolska, L., 2020. Effect of carbon filter
- Eck, M., Bernabeu, L., Mecking, S., 2023. Polyethylene-Like Blends Amenable to Abiotic Hydrolytic Degradation. *ACS Sustainable Chemistry Engineering*, 11(12), 4523-4530. doi: 10.1021/acssuschemeng.2c07537.
- Global Marine Plastic Pollution 2023 Global Marine Plastic Pollution: Sources, Solutions and Canada's Role (available at: [https://lop.parl.ca/sites/PublicWebsite/default/en\\_CA/ResearchPublications/201937E](https://lop.parl.ca/sites/PublicWebsite/default/en_CA/ResearchPublications/201937E)).
- Guido, V. R., Fred, L. D., 2009. Python 3 Reference Manual. Scotts Valley, CA: CreateSpace. URL: <https://docs.python.org/3/reference/index.html>.
- Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidou, E., Purnell, P., 2018. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179-199. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.014.
- Hao Ngo, H., Nghiem, L. D., 2022. Phthalates in the environment: characteristics, fate and transport, and advanced <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260352>.
- Jambeck J.R., Geyer R., Wilcox C., Siegler T.R., Perryman M., Andrady A., Narayan R, Law K.L. 2015. Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6223), 768–771.
- Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., Levin, D. B., 2020. Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Frontiers in Microbiology*, 11, 580709. doi: 10.3389/fmicb.2020.580709.
- Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, Blondel M, Prettenhofer P, Weiss R, Dubourg V, Vanderplas J, Passos A, Cournapeau D, Brucher M, Perrot M, Duchesnay E 2011 Scikit-learn: Machine Learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* 12, 2825–2830. <https://dl.acm.org/doi/10.5555/1953048.2078195>.
- Plastic Atlas, 2019. History: Breakthrough in three letters. <https://hk.boell.org/en/2021/04/22/history> (accessed 13 June 2023).
- Rajmund, M., Muntean, E., Pecyna-utylska, P., Kernert, J., 2019. Ion Chromatography - an Advantageous Technique in Soil Analysis. *ProEnvironment/ProMediu*, 12(38), 82-88. Retrieved from <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/promediu>.
- Restrepo-Flórez JM, Bassi A, Thompson M 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>.
- Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., Aiba, S., 2009. Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742. doi: 10.3390/ijms10093722.

- Tuan T. H., Lin, C., Bui, X. T., Ky Nguyen, M., Dan Thanh Cao, N., Mukhtar, H., Giang Hoang, H., Varjani, S.,  
usage period on the secondary emission of bioaerosols. *Polish Journal of Environmental Studies*, 29, 3057-3069.
- Vallat, R., 2018. Pingouin: statistics in Python. *Journal of Open Source Software*, 3(31), 1026. doi: 10.21105/joss.01026.
- Wang, Y., Qian, H., 2021. Phthalates and Their Impacts on Human Health. *Healthcare (Basel, Switzerland)*, 9(5), 603. doi: 10.3390/healthcare9050603.

## **ABSTRACT**

### **RATIONALE FOR THE STUDY**

Plastic polymers are in high demand globally due to their cost-effectiveness, lightweight properties, and exceptional durability compared to materials like glass. China is the leading global plastic producer, accounting for 54% of total production, followed by the USA and Europe, contributing 19% and 16% of the total production, respectively. As demand continues to rise, production of plastics is also increasing. Consequently, the total demand in Europe reached 50.7 million tons in 2019, with primary usage in packaging (39.6%) and construction materials (20.4%).

This trend is similarly observed in Poland, where the total collected plastic waste was 1074 kilotons in 2018, with a noticeable increase since 2006 (then reported as 705 kilotons) (Plastic Atlas 2019). Plastic products include a wide range of types with diverse polymer structures, but the critical factor lies in additives. As it was mentioned by Ronca (2017), the two most common types of plastics produced are polyethylene (PE) and polypropylene (PP), which are used for various products such as bags, containers, and bottles. Household consumption corresponds to/accounts for 47% of all plastic production, while agricultural use was about 1% in 2016 in Canada (Global Marine Plastic Pollution, 2023). It was also reported that between 5 and 13 million tons of plastic waste spreads to/enters the oceans each year, resulting in negative consequences for the environment as described elsewhere (?) (Jambeck et al., 2015; Plastics Europe, 2018).

The extensive distribution PE has led to increased production, but it has also shortened the lifespan of plastic products due to overproduction. Excessive PE production has resulted in a significant accumulation of PE plastic waste in municipal landfills, with an estimated degradation period of around 650 years (Why Does It Take Plastic So Long to Break Down?, 2020). The deposition of PE waste in municipal landfills remains one of the primary methods for managing plastic waste. However, uncontrolled disposal of PE waste often leads to environmental contamination. Scientific discussions on plastic degradation mechanisms in the environment initially are focused on changes within the polymer molecule structure, primarily observed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The emergence of new functional groups in the polymer structure, such as O-H, COH, or COOH, was interpreted as degradation of polymer chain as a result of various influences (physical, chemical, microbiological), leading to oxidation (Restrepo-Flórez et al., 2014; Ahmed et al., 2018; Tokiwa et al., 2009). Over time, studies have also shown the involvement of microorganisms in the environmental degradation of plastics, and some biotechnologists researches are focused on modified bacteria capable of degrading polymer structures (Wu et al., 2023).

For some time now, in research related to the (bio-)degradation of plastics, there have been mentions of stabilizers, plasticizers, lubricants, flame retardants, fillers, and other additives, which can constitute a significant portion, reaching up to 45-50%, of the composition of plastics, including PE (Wiesinger et al. (2021))

These additives can be organic or inorganic, serving various functions such as flame retardants, plasticizers, antioxidants, and antimicrobials. Organic additives include antimicrobials like 2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one, as well as antifogging additives like glycerol esters, polyglycerol esters, sorbitan esters, and their ethoxylates (Andrade et al., 2021). Inorganic additives encompass dyes, UVA absorbers containing heavy metals, conductive additives like aluminum and copper powders, and flame retardants like aluminum trihydrate (ATH), magnesium hydroxide (MDH), and antimony trioxide, as reported by Andrade et al. (2021) and Hahladakis et al. (2018).

Eck et al. (2023) described that under environmental conditions, the key mechanism of plastic degradation involves the hydrolytic removal of these additives from the plastic structure. This process weakens the chemical bonds within the polymer, leading to progressive hydrolytic degradation, the development of cracks and delamination, and enabling environmental microorganisms to initiate biodegradation, as discussed by Mohanan et al. (2020). These processes are collectively referred to as "(bio-)degradation" and often interact in complex ways in natural environments. During the (bio-)degradation of plastics, a variety of organic and inorganic additives are released from the plastic structure into the surrounding environment. This release poses potential risks to ecosystems and human health. These concerns are particularly heightened in ocean environments, where uncontrolled accumulation of plastic waste is prevalent. Apart from liberated additives, other risks (may) arise during (bio-)degradation, including pathogenic microorganisms, microplastic particles, greenhouse gas emissions, and more.

Furthermore, it is important to note that there is a lack of comprehensive information regarding the long-term (5 years and beyond) (bio-)degradation of plastics. Most research in this area has focused on *in-vitro* studies or has had durations of (bio-)degradation limited to several months. This lack of long-term data is a noticeable gap of the problem understanding, especially considering that most of the existing research is in the form of reviews and are not focused on soil environment. This information gap is particularly concerning given that a significant amount of plastic waste is deposited in old municipal waste landfills, which are not as well protected as modern landfills (built 1990s years). Due to the potential migration of contaminants from these landfills, there is a risk of contaminants infiltrating groundwater, posing a threat to the environment and, subsequently, human health.

To supplement knowledge and explain the phenomena occurring during the deposition of plastic in the soil environment, a municipal waste landfill was adopted as a research model. The goal is to identify risks associated with the (bio-)degradation process of plastics under the influence of environmental conditions, both for the environment and human health. The main concept of the research conducted was aimed on two tasks. The first one focused on alterations identification inner the plastic structure during and after long – term (bio-)degradation, whereas the second one was aimed to study the impact on long-term (bio-)degradation process in the environment. Therefore, the scientific hypothesis was: *“Plastic waste ending up in the environment, as a result of the ongoing (bio-)degradation process of this material, leads to chemical and microbiological changes in the environment, which pose a threat to human health”*.

The **initial two publications** present the results of the preliminary study. Due to the close collaboration with external research institutes, a unique approach with diverse range of analytical techniques to scrutinize alterations in the structure of commonly used polypropylene (PP) was developed. The primary objectives included identification of PW type collected landfill located in Chlewnica, and to uncover potential environmental and human health risks over a period of up to 5 years. Within the **first part of preliminary study**, detailed in the inaugural publication, research honed in on changes occurring within the PP structure after roughly 5 years of continuous (bio-)degradation collected from. The (bio-)degradation of plastic is influenced by numerous environmental factors, with microbial biodegradation playing a central role. Various forms of degradation often intertwine synergistically within environmental settings. As a result, this interaction can potentially lead to changes in the environmental microbiome. Furthermore, the environmental microbiome may undergo modifications not solely due to the colonization of the PP structure during the (bio-)degradation process, but also as a consequence of interactions between chemical substances liberated from the plastic structure into the soil and water



environment. Examples of such compounds are endocrine-disrupting chemicals (EDCs). Among these EDCs are phthalates, commonly used as plasticizers in plastic production, and they pose risks to both the environment and human health, as noted by Wang and Qian (2021) and Tuan Tran et al. (2022). Additionally, halogenated organic substances (AOX) are frequently applied as additives in the production of polymer plastics. These substances also have the potential to be released during (bio-)degradation, presenting risks that can lead to alterations in the environment, including the environmental microbiome, and beyond. The primary goal of the **publication P2** was to comprehensively identify potential points of risk and evaluate the scope of required analytical techniques for this type of study, encompassing microbiological, chemical, and toxicological aspects. This publication intended to shed light on alterations in the environment and the environmental microbiome as consequences of ongoing (bio-)degradation processes.

Following the comprehensive analysis conducted in the preliminary research, numerous findings obtained were carefully considered and then leveraged as the cornerstone for further investigations. During renovation work and new investments in an old landfill near a large city in Poland, a decision was made to rebuild one of the quarters of this landfill, which dates to 1960. During the landfill's operation, waste materials were not mixed with the layers above or below; they were simply covered with the next layer of soil. It's important to underscore that being an old municipal waste landfill, it lacked substantial isolation from the surrounding environment.

These renovation works provided a unique opportunity to collect samples from different layers, representing specific decades of potential (bio-)degradation. Within the **publication P3**, the focus was on changes in the plastic structure (identified as PE) over about 60 years, as it was one of the key concepts of this research.

So far, the research material that has been lying dormant at the site had not undergone scientific analysis. Numerous studies described in the literature focused on degradation and biodegradation mechanisms and were conducted as laboratory research under controlled conditions. My research, on the other hand, involved samples undergoing biodegradation under real-world conditions for a very long time (up to approximately 60 years) and yielded new insights.

Synchronously with the second area of my preliminary research, in the second part of the main study, I focused on changes in the environment after a significantly long period of (bio-)degradation. The fourth publication (P4) marked the culmination of these efforts, and its results shed more light on the processes occurring at the site, filling in informational gaps in this area. Potential risk factors, such as released plastic additives (endocrine-disrupting compounds (EDCs), heavy metals, microplastics, and nanoplastics, as well as pathogenic microorganisms), have the ability to penetrate the environment through:

- Evaporation processes from the landfill surface and its volume;
- Dust spreading processes, including various compounds adsorbed onto dust particles;
- Release processes from polymer structure and MWL into the soil and water, including leaching of various compounds along with rainfall infiltrating the site;
- Chemical and microbiological pollutants infiltration processes into groundwater and soil (particularly at old waste landfills – not properly managed).

Clarifying this phenomenon stood the primary objective of the **publication P4**. In this phase of the investigation, soil samples collected from beneath the municipal waste landfill (MWL) provided a crucial testing ground. This distinctive approach allowed to gain and substantiate a wealth of insights regarding potential risks to both the environment and human health.

## AIMS OF THE STUDY

Plastic waste deposited in municipal landfills undergoes various environmental factors that trigger (bio-)degradation. During (bio-)degradation, numerous byproducts, such as additives (including endocrine-disrupting compounds (EDCs), metals/heavy metals, etc.) are released into the environment, potentially leading to contamination.

In local conditions, at the point of contact between plastic and soil, the concentration levels of compounds leached from the plastic (contaminants) can be significantly high. Under such conditions, significant changes in the chemical and microbiological quality of the environment may occur.

Assessing the changes occurring in plastics undergoing (bio-)degradation and in the environment (aquatic or soil) where this process occurs requires interdisciplinary research encompassing physical, chemical, toxicological, and microbiological aspects. The complexity of the research partly explains the lack of cohesive knowledge about (bio-)degradation processes of plastics occurring in the environment, especially in soil environments.

The main objectives of the investigation were focused on:

- Understanding the changes within the structure of plastic waste undergoing (bio-)degradation.
- Assessing alterations in the environment that may pose risks to human health.

The scope of research activity related to changes in the plastic structure consisted of the following steps:

- Confirmation of the (bio-)degradation process in collected plastic samples.
- Identification of collected crude oil plastic waste samples.
- Observing alterations in the plastic structure using microscopic techniques.

The second scope of tasks was oriented towards assessing alterations in the environment and included the following steps:

- Physico-chemical analysis of soil samples.
- Chemical analysis of soil (heavy metal analysis, cationic and anion analysis, VOCs analysis including identification of pollutants in soil samples)
- Identification of volatile organic compounds (VOCs) in air samples.
- Ecotoxicity assessment of soil.

Based on the results obtained from both scopes the database was created and submitted on comprehensive data analysis as the concluding part of the investigation: Environment and human health hazard identification arising from the (bio-)degradation process of polymer products.

## COLLECTED MATERIAL AND ANALYSIS

**Samples Collection:** Samples were collected during the landfill rebuilding in October and November 2020 during the process of removing successive layers of waste from the landfill. In total, 26 samples of Plastic Waste (PW) were collected from each layer. Additionally, 13 soil and 5 air samples were taken during two sampling campaigns. Each campaign involved collecting samples from various layers, including control samples from a location distant from the landfill. It's noteworthy that these soil samples were gathered near place, where Polyethylene (PE)

samples undergoing (bio-)degradation. During the first visit at the landfill on October 10<sup>th</sup>, 2020, the air temperature was 17°C, with humidity at approximately 90%. On the second visit, which took place on November 14<sup>th</sup>, 2020, the temperature was 12°C, and humidity was around 87%. This sequential collection allowed us to achieve the primary goal: studying the (bio-)degradation process of plastic waste and its impact over approximately 60 years.

**Soil Classification:** The soil in the landfill where PW was deposited, as well as soil from surrounding area, were classified as Brunic Arenosols. The categorization was based on the WRB soil classification system (IUSS WG WRB, 2015; Kabała et al., 2019),

**Environmental Samples Storage:** The air samples, after being collected and delivered to the laboratory, were analyzed on the same day using the TD-GC-MS technique. Soil samples were weighed, soaked in dichloromethane, and then analyzed using the OC-GC-MS/MS technique. Soil weighings were also treated with deionized water for further analysis of cations and anions using ion chromatography. Soil samples were also analyzed for microbiology and ecotoxicology. The remaining soil samples were divided; a portion of each sample was left unchanged and stored at approximately 4°C. Lyophilized soil samples were sent to accredited laboratories for metal analysis and leachability assessment. Plastic samples were stored in glass containers at around 4°C.

**Plastic Samples Analysis:** An essential preliminary step in this study involved a thorough examination of all collected plastic waste samples. The material of the plastic waste samples was identified using the Fourier Transform Infrared (FTIR) technique. Each Plastic Waste (PW) sample underwent an identification process based on the detection of functional groups within them. Before analysis, the samples were meticulously cleaned and washed with acetone. The scanning process was carried out using the Nicolet IR200 spectrometer equipped with an Attenuated Total Reflectance (ATR) module. The phase transition (melting) and degree of crystallinity were determined using the Netzsch 209 F1 Phoenix differential scanning calorimeter (DSC). To investigate the degradation process of foil, the images of both the reference and old foil samples were captured using Scanning Electron Microscopy (SEM) with the JEOL JSM-5310LV electron microscope, operating at 25 kV. These foil samples were cut into pieces measuring 0.5–1 cm in diameter, thoroughly washed with sterile deionized water, and allowed to dry. The viability of bacteria on the PW surface for all samples from all layers was verified. In this preparation, the Live/Dead BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes, L7012) was utilized. The stain mixture, consisting of SYTO® 9 and propidium iodide, was directly applied to the samples on slides and incubated for at least 30 minutes in darkness. Subsequently, the samples were examined using a Leica TCS SP5 confocal laser-scanning microscope, and the resulting images were analyzed using Leica Confocal Software. The bacteria viability test involved staining the cells with propidium iodide (PI), a nucleic acid stain indicating cell impairment, along with the SYTO 9 green-fluorescent stain.

**Examination of Soil Samples:** The examination of soil samples was initiated by extracting ions in 50 ml vials. This was achieved by mixing the soil with deionized water in a 1:10 volume-to-volume ratio. The mixtures were then agitated in a shaker incubator (Cole-Parmer Ltd., S1 500, USA) at 10 rotations per minute for 24 hours at room temperature, following the method outlined by Rajmund et al. in 2019. This sample preparation procedure was applied for extraction of both inorganic anions and cations. Subsequently, heavy metal analysis was conducted on each soil sample collected from the landfill during two sampling campaigns. This study was carried out in collaboration with Bureau Veritas Commodities Canada Ltd. To dissolve most minerals, multi-acid digestion

packages were utilized. A 0.25 g portion of each soil sample was heated in a mixture of HNO<sub>3</sub>, HClO<sub>4</sub>, and HF until fuming, and then it was dried. The resulting residue was dissolved in HCl. The prepared extracts underwent comprehensive analysis using the Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-ES/MS) technique, which provided comprehensive data on most elements. Furthermore, a chemical composition analysis of the soil samples was performed using gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) from Shimadzu Corp., Kyoto, Japan. To enhance screening sensitivity and reduce identification errors in substances, a mass spectrometer equipped with a triple quadrupole as an analyzer was applied. The analysis procedure began with the purification of soil samples by removing of stones and other impurities. Following this step, the samples underwent chemical drying by introducing acetone in a 1:1 ratio. These mixtures were kept at room temperature for a day before subsequent analysis. In the next stage, dichloromethane was added to the dried soil samples in a 1:3 ratio (3 grams of soil sample + 9 milliliters of dichloromethane). After extraction and concentration (using a stream of nitrogen), the soil extracts were transferred to micro-inserts with a volume of 10 µL, which were integrated components within a vial.

**Examination of Air Samples:** Air samples were collected at five different depth levels while taking precautions to prevent external contamination. To ensure isolation during sampling, a metal barrier in the form of a dome was employed. The samples were adsorbed onto a solid sorbent, Tenax TA, which had been prepared in quartz tubes (130 mg of Tenax TA, 1/4" × 90 mm), following the thermal desorption method as described by Berg et al. in 2020.

**Ecotoxicity Assessment:** Three bioassays were conducted to evaluate the impact of collected soil samples on biota. These bioassays included the Phytotoxkit F<sup>TM</sup> (MicroBioTest Inc., Gent, Belgium), Microtox<sup>®</sup> bioassay (utilizing the Model 500 analyzer with Microtox Omni Software, ModernWater Ltd., UK), and Ostracodtoxkit<sup>®</sup>.

**Exploratory Data Analysis and Machine Learning:** For data analysis and statistical processing, the Python 3.11 programming language was employed (Guido and Fred, 2009). Additionally, several frameworks to perform various tasks were utilized: the Scikit-learn framework (Pedregosa et al., 2011) for implementing and validating clustering algorithms, k-means linear regression to estimate total plastic structure degradation; Plotly (Inc., 2015) for data visualization; and SciPy (Virtanen et al., 2020) and Pingouin (Vallat, 2018) for the implementation of statistical tests.

## CONCLUSIONS

By employing analytical techniques such as FTIR, DSC, SEM, and fluorescence microscopy, valuable insights into the degradation processes occurring in these samples were obtained. The results of this investigation revealed significant alterations in the plastic waste (PW) structure and the progressive delamination of plastic samples over time, indicative of (bio-)degradation. DCM analysis identified a decrease in the crystalline phase, while FTIR analysis showed the presence of several characteristic absorbance bands. The νC=O vibration (1600 – 1750 cm<sup>-1</sup>) were detected in all samples at different stages, corresponding to the depth or layer from which the samples were collected. Additionally, the presence of the νC=O vibration (1600 – 1750 cm<sup>-1</sup>) is an intriguing observation, as it may suggest the oxidation of the plastic structure or the presence of phthalates liberated from the PE structure, as indicated in a study conducted by Rajamanikam et al. (2017), or potentially both.

These methods were tested in the preliminary study (**publication P1**) and successfully employed in the main investigation (**publication P3**). As a result, **the (bio-)degradation of the plastic structure was confirmed.**

Both techniques were employed for the identification of the collected plastic samples, which is an important part of such type of study. In the **publication P1**, the collected plastic sample was identified as PP, whereas in the main research described in the **publication P3**, samples were identified as PE. These identification methods were tested and applied in both the first and third publications, **enabling the successful identification of the collected plastic samples.**

Through scanning electron microscopy observations, **alterations in the plastic structure were verified**, which indicated a trend of increased delamination and cracks with MWL depth. Even after 1.5 years of (bio-)degradation, traces of structural (bio-)degradation were already visible, suggesting the accumulation of alterations throughout the entire deposition period. Interestingly, the size of the microplastic particles also decreased over time.

During SEM observations, irregularly shaped objects were detected, suggesting the presence of microorganisms within the study. In light of this, the next step of the observations involved employing the fluorescence microscopy technique, which confirmed the presence of microorganisms in all samples. Both fluorescence microscopy and SEM techniques were successfully used in tandem (**publications P1/P3**), allowing to **verify alterations in the plastic structure.** While there was no clear trend between the number of microorganisms and MWL depth, there was a noticeable trend in their distribution. Microorganism distribution was not uniform, in contrast to the case of plastic samples from the bottom of the municipal waste landfill (MWL), where microorganisms were primarily located in areas with plastic structure cracks and delamination. This suggests that microorganisms may colonize areas with the highest degree of delamination. Importantly, the presence of cracks in the plastic structure facilitated the formation of a biofilm created by microorganisms, enhancing their survival capability. All the insights obtained from these observations point to hydrolytic degradation as the dominant process responsible for removing additives from the plastic structure, thereby weakening the chemical bonds. The loss of crystallinity further supports this observation. The second phase of degradation involved the activity of microorganisms. Exploiting pre-existing cracks, microorganisms were able to penetrate the plastic structure, forming colonies at these sites and leading to the development of a biofilm. This interaction between microorganisms and the plastic surface resulted in synergistic effects that enhanced the degradation process.

The second part of study conducted aimed to investigate alterations in the surrounding environment and potential implications for human health, as detailed in the **publications P2/P4.** To achieve this, a wide range of analytical techniques were applied to analyze soil samples collected from the municipal waste landfill (MWL).

In relation to the soil where PW (presumably waste) was deposited, the WRB soil classification system was employed (IUSS WG WRB, 2015; Kabała et al., 2019) to classify the soil within the landfill and its surrounding area as Brunic Arenosols. The first step involved a **comprehensive chemical analysis of the soil.** Analysis of anions and cations revealed significant outliers in the concentration of sulphates, bromides, and chlorines. These compounds are commonly used as additives in PE plastic production, and their elevated levels suggest the liberation of i.a. halogenated organic compounds from the plastic structure due to hydrolytic degradation. Additionally, cations such as sodium, potassium, and calcium showed significantly higher concentrations. Their high content in analyzed soil is possibly originating from the plastic structure, as these metals are commonly used components of organic additives. Furthermore, elevated concentrations of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  were detected, which

may indicate nitrification processes in the soil, potentially linked to increased microbiome activity (Nitrifying bacterium, 2023). Similar phenomena were observed in both the preliminary study (**publication P2**) and the main study (**publication P4**)

Numerous insights were obtained through the analysis of heavy metals in soil collected from the municipal waste landfill (MWL). Several metals were detected in all samples, including Zn, Fe, Al, Cu, Pb, Zn and Ti, which are used in the production of polyethylene (PE) (Núñez et al., 2022). They were found in MWL soil at higher concentrations compared to control samples. Metals such as Pb, Fe, Cu, and Al exhibited a similar trend, with concentrations several times higher at depths below the MWL, indicating the gradual migration of toxic metals to the MWL's bottom. This concentration trend aligns with slowly emerging regime changes between 1980 and 1990. During the 1990s, the region studied underwent a transformation from a centrally planned (socialist) economy to a market-based (capitalist) economy (Swadźba, 2019). This transformation possibly led to a significant increase in the production and demand for plastics, especially PE and the inflow of goods from Western Europe. Metals such as Zn, Fe, Al, Cu, Pb, Zn, and Ti (used as UV stabilizers, antioxidants, and flame retardants) are harmful in high concentrations. Pb is considered a toxic metal, posing a significant threat to the environment and human health.

Volatile and semi-volatile organic compounds were analyzed in MWL soil samples. Samples from the upper and middle levels showed the highest total concentrations of such substances. In all samples, bromide-containing substances were detected. At middle levels chloro-, iodo-, and fluoro-containing substances were predominantly found. As moving deeper, bromide-containing substances become more dominant, particularly at the bottom and beneath the MWL. These halogens, as discussed in the paper by Al-Malaika et al., 2017, are widely used as additives in PE production, with a specific emphasis on bromide-containing substances, as mentioned by Li et al., 2023.

An additional interesting observation was made regarding the presence of a large amount of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil and air samples collected from MWL. The presence of such substances is a typical type of pollutant in old MWLs, as suggested by Melnyk et al., 2015, and Baalbaki et al., 2016. This observation is not directly linked to PE (bio-)degradation; however, it represents an additional risk factor that requires attention. According to Baalbaki et al., 2016, PAHs were also detected in MWL leachates, which have the capacity to migrate through MWL layers and penetrate the environment.

Three bioassays were conducted to assess the impact of collected soil samples on the biota: Phytotoxkit F<sup>TM</sup>, Microtox<sup>®</sup> bioassay, and Ostracodtoxkit<sup>®</sup>. All three bioassays indicated high toxicity in most of soil samples collected from the municipal waste landfill (MWL).

Phytotoxicity was observed in all MWL samples, whereas the control sample exhibited an average root length even higher than that of the ISO-certified reference sand. However, the Microtox<sup>®</sup> bioassay showed no toxicity for most of the MWL samples; except for samples from the bottom layers showed high toxicity, suggesting the migration of potentially toxic substances through the layers of the MWL.

The Ostracodtoxkit<sup>®</sup> is a 'direct contact' test in which organisms live, feed, and consistently remain in close contact with analyzed soil samples. The results revealed several main trends among the samples. The majority of samples exhibited significant mortality rates, exceeding 85%. In contrast, the control sample demonstrated a mortality rate of 0.0%. Exceeding the 30% threshold of this rate indicates high toxicity of the tested soil. **These**

**bioassays** suggested the release of chemicals characteristic of plastic structures into the soil environment, resulting in soil contamination.

The **composition of VOCs in the air** was tested for all collected air samples from different layers of the MWL and compared. The highest total concentration of VOCs was detected in the deeper layers of the MWL, suggesting the possible migration of toxic substances not only to the bottom layer beneath the MWL through the soil but to the air a well, leading to its contamination. Most of the detected substances were classified as aliphatic hydrocarbons. However, no halogenated organic compounds or phthalates were detected in the air samples, in contrast to the soil samples where all mentioned compounds with the potential for migration through the layers were detected.

To sum up, all the results obtained in both studies indicate that:

- The (bio-)degradation process of plastics (mainly PE), taking place in the soil environment, is based in the first stage mainly on the removing of additives (constituting up to 55% of the plastic structure).
- Changes in the structure of the PE polymer, over the observed period of approximately 60 years, occur very slowly, which indicates a weak impact of physical factors such as temperature or UV radiation.
- The delamination of the plastic surface provides a suitable environment for microorganisms with the capability to form biofilms within the plastic structure, thereby enhancing their survivability.
- The delamination of plastic surface leads to the generation of microplastics and nanoplastics.
- Compounds that are components of plastic additives, which enhance the functionality of the materials, migrate to the soil where PE was deposited.
- Soil contaminated with compounds emitted from PE poses a threat to the environment and human health through airborne transport (windborne dispersal) and soil transport, leading to groundwater contamination.
- The migration of contaminants, especially heavy metals (which exhibit slow migration), towards deeper layers and the bottom underscores the crucial importance of the need to close such landfills, implement monitoring systems, and optimize waste management practices to reduce numerous environmental risks.
- The microorganisms, including pathogens, within dealminated plastic structures, further increases environmental and health risk factors.

**Key words:** long – term (bio-)degradation, toxicological assessments, migration of inorganic and organic additives, environmental and health risk.

## References:

- Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I., Muhammad, S., 2018. Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7287–7298. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-1234-6649/METRICS>.
- Andrade, H., Glüge, J., Herzke, D., Ashta, N., Nayagar, S., Scheringer, M., 2021. Oceanic long-range transport of organic additives present in plastic products: an overview. *Environmental Sciences Europe*, 33. doi:10.1186/s12302-021-00522-x.
- Berg, A., Michalska, M., Tankiewicz, M., Staniszewski, A., Ratajczyk, J., Wolska, L., 2020. Effect of carbon filter
- Eck, M., Bernabeu, L., Mecking, S., 2023. Polyethylene-Like Blends Amenable to Abiotic Hydrolytic Degradation. *ACS Sustainable Chemistry Engineering*, 11(12), 4523–4530. doi: 10.1021/acssuschemeng.2c07537.
- Global Marine Plastic Pollution 2023 Global Marine Plastic Pollution: Sources, Solutions and Canada's Role (available at: [https://lop.parl.ca/sites/PublicWebsite/default/en\\_CA/ResearchPublications/201937E](https://lop.parl.ca/sites/PublicWebsite/default/en_CA/ResearchPublications/201937E)).
- Guido, V. R., Fred, L. D., 2009. Python 3 Reference Manual. Scotts Valley, CA: CreateSpace. URL: <https://docs.python.org/3/reference/index.html>.
- Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidou, E., Purnell, P., 2018. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179–199. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.014.
- Hao Ngo, H., Nghiem, L. D., 2022. Phthalates in the environment: characteristics, fate and transport, and advanced <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260352>.
- Jambeck J.R., Geyer R., Wilcox C., Siegler T.R., Perryman M., Andrady A., Narayan R, Law K.L. 2015. Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6223), 768–771.
- Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., Levin, D. B., 2020. Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Frontiers in Microbiology*, 11, 580709. doi: 10.3389/fmicb.2020.580709.
- Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, Blondel M, Prettenhofer P, Weiss R, Dubourg V, Vanderplas J, Passos A, Cournapeau D, Brucher M, Perrot M, Duchesnay E 2011 Scikit-learn: Machine Learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* 12, 2825–2830. <https://dl.acm.org/doi/10.5555/1953048.2078195>.
- Plastic Atlas, 2019. History: Breakthrough in three letters. <https://hk.boell.org/en/2021/04/22/history> (accessed 13 June 2023).
- Rajmund, M., Muntean, E., Pecyna-utylska, P., Kernert, J., 2019. Ion Chromatography - an Advantageous Technique in Soil Analysis. *ProEnvironment/ProMediu*, 12(38), 82–88. Retrieved from <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/promediu>.
- Restrepo-Flórez JM, Bassi A, Thompson M 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>.
- Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., Aiba, S., 2009. Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742. doi: 10.3390/ijms10093722.



- Tuan T. H., Lin, C., Bui, X. T., Ky Nguyen, M., Dan Thanh Cao, N., Mukhtar, H., Giang Hoang, H., Varjani, S.,  
usage period on the secondary emission of bioaerosols. *Polish Journal of Environmental Studies*, 29, 3057-3069.
- Vallat, R., 2018. Pingouin: statistics in Python. *Journal of Open Source Software*, 3(31), 1026. doi: 10.21105/joss.01026.
- Wang, Y., Qian, H., 2021. Phthalates and Their Impacts on Human Health. *Healthcare (Basel, Switzerland)*, 9(5), 603. doi: 10.3390/healthcare9050603.