

Beata BOBEK<sup>1</sup>, Aleksandra SMYŁŁA<sup>1</sup>, Piotr RYCHTER<sup>1</sup>, Robert BICZAK<sup>1</sup>  
i Marek KOWALCZUK<sup>1,2</sup>

## DEGRADACJA WYBRANYCH POLIESTRÓW W GLEBIE Z UDZIAŁEM MIKROORGANIZMÓW

### MICROBIAL DEGRADATION OF SELECTED POLYESTERS IN SOIL

**Abstrakt:** Obecnie w wielu gałęziach przemysłu niedegradowalne tworzywa sztuczne zastępuje się polimerami przyjaznymi środowisku. Wprowadzenie tych biodegradowalnych materiałów do codziennego użytku pomoże zredukować ilość powstających odpadów stałych, których recykling jest nieoptymalny. Chociaż biodegradowalne polimery są produkowane z myślą o ich kompostowaniu po zużyciu, niestety nie ma możliwości uniknięcia stosowania tzw. niewłaściwych praktyk (zaśmiecania), które prowadzą do powstawania nielegalnych, niekontrolowanych składowisk odpadów. Ponieważ wiadomo, że biopoliestry mogą ulegać degradacji w glebie w obecności szerokiej gamy mikroorganizmów, takich jak: bakterie, promieniowce czy grzyby, istnieje potrzeba badania oddziaływania tych materiałów na środowisko glebowe. Prezentowane wyniki dotyczą testu biodegradacji wybranych poliesterów (alifatyczno-aromatyczny kopolimer tereftalan-butanodiol/adypinian-butanodiol *BTA*, krystaliczny i amorficzny polilaktyd *PLA*, ataktyczny poli[(R,S)-3-hydroksymaślan] *a-PHB*) oraz ich mieszanin w glebie, przygotowanego w formie eksperymentu wazonowego, prowadzonego w warunkach kontrolowanych. Próbkę tych poliesterów w postaci żyłek umieszczono w glebie, a następnie w określonych odstępach czasu dokonywano analizy na obecność mikroorganizmów. Zmiany liczebności mikroorganizmów glebowych w testowanych poliestrach wykrywano na różnych podłożach selektywnych: bakterie na podłożach *YS*, promieniowce na ekstrakcie glebowym i grzyby na podłożu *DRBC*. Rodzaj i liczebność bakterii rozkładających polimery oznaczano na podłożach zawierających *BTA*, *PLA* i *a-PHB* jako jedyne źródło węgla przy użyciu podłoży selektywnych. Zaobserwowano, że liczebność bakterii zdolnych do tworzenia kolonii zależała od czasu trwania doświadczenia i rodzaju zastosowanych polimerów. Liczebność bakterii obecnych na podłożu zawierającym *a-PHB* była większa w porównaniu do podłoży z pozostałymi poliestrami. Wśród bakterii zdolnych do rozkładu biopolimerów dominowały Gram-dodatnie laski przetrwalnikujące oraz Gram-ujemne pałeczki.

**Słowa kluczowe:** biodegradacja, degradacja z udziałem mikroorganizmów, poliestry biodegradowalne

W ostatnich latach produkcja i zużycie materiałów polimerowych znacznie wzrosła, powiększając tym samym ilość odpadów uciążliwych dla środowiska. Wszechstronność zastosowań klasycznych tworzyw sztucznych, w tym głównie opakowań, wynika z ich walorów użytkowych, takich jak: niska cena, funkcjonalność, duża elastyczność, niewielka masa, chemiczna stabilność, nieprzepuszczalność, strukturalna różnorodność, odporność na rozkład mikrobiologiczny czy atmosferyczny. Produkty te z powodzeniem zastępują wiele tradycyjnych materiałów, takich jak: papier, szkło, drewno oraz metale.

Niekorzystnym efektem tak szerokiego zastosowania tworzyw jest duża ilość odpadów trafiających do środowiska, których znaczna większość jest niedegradowalna, a ich recykling jest mało optymalny. Dlatego wydaje się być ważne zastąpienie nieulegających degradacji tworzyw sztucznych takimi, które są w pełni biodegradowalnymi, tj. przyjaznymi środowisku materiałami polimerowymi otrzymywanymi głównie ze źródeł

<sup>1</sup> Instytut Chemii i Ochrony Środowiska, Akademia im. Jana Długosza, al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa, email: b.bobek@ajd.czyst.pl, a.smylla@ajd.czyst.pl, p.rychter@ajd.czyst.pl, r.biczak@ajd.czyst.pl

<sup>2</sup> Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych, Polska Akademia Nauk, ul. M. Curie-Skłodowskiej 34, 41-819 Zabrze, email: cchpmk@bachus.ck.gliwice.pl

odnawialnych zdolnych do samorzutnej degradacji hydrolitycznej bądź enzymatycznej po wymaganym czasie eksploatacji.

Obecnie polimerami biodegradowalnymi cieszącymi się dużym zainteresowaniem są m.in. polimery uzyskiwane bezpośrednio z surowców odnawialnych (polisacharydy naturalne, takie jak skrobia, celuloza i ich pochodne), naturalne poliestry produkowane przez mikroorganizmy (poli-3-hydroksymaślan PHB, jego kopolier z kwasem 3-hydroksywalerianowym PHBV), polimery produkowane przez klasyczną syntezę chemiczną z monomerów pochodzenia naturalnego (polilaktyd, PLA) oraz polimery wytwarzane z surowców petrochemicznych jak poli( $\epsilon$ -kaprolakton) PCL [1-3].

Szybkość procesu degradacji biodegradowalnych materiałów polimerowych w środowisku przyrodniczym zależy zarówno od budowy i właściwości samego materiału, jak i od warunków otoczenia, w którym się znajduje. Najważniejszym biologicznym czynnikiem występującym w środowisku naturalnym (kompost, gleba, osad czynny), wpływającym na tempo mineralizacji biopolimeru, jest aktywność obecnych tam mikroorganizmów, a zwłaszcza bakterii, promieniowców i grzybów [4-5].

## **Materiały i metody**

Badania nad udziałem mikroorganizmów glebowych w rozkładzie biopolimerów prowadzono na próbkach polimerów w postaci wytłoczonych żyłek przygotowanych w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze. Wykorzystane w doświadczeniu wazonowym materiały poliestrowe to: alifatyczno-aromatyczny kopolimer tereftalan-butanodiol/adypinian-butanodiol (BTA), krystaliczny (PLLA) i amorficzny (PDLLA) polilaktyd, ataktyczny poli[(R,S)-3-hydroksymaślan] (*a*-PHB). Dodatkowo, oprócz żyłki BTA, do testu biodegradacji przygotowano próbkę tego samego polimeru w postaci folii.

Gleba użyta do badań należała do grupy piasku luźnego, o pH zbliżonym do obojętnego. Eksperyment prowadzono w temperaturze  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  z zachowaniem stałej wilgotności próbek gleby. Badania mikrobiologiczne przeprowadzono w pierwszym, trzecim, dziesiątym, piętnastym oraz dwudziestym trzecim miesiącu inkubacji polimerów w glebie. Oprócz tych poliestrów badano następujące binarne mieszaniny z ich udziałem: PDLLA/*a*-PHB(90/10), PDLLA/*a*-PHB(95/5), BTA/PDLLA(70/30), BTA/PLLA(70/30), oraz mieszaniny trójskładnikowe: BTA/PDLLA/*a*-PHB(40/40/20) i BTA/PDLLA/*a*-PHB(90/5/5).

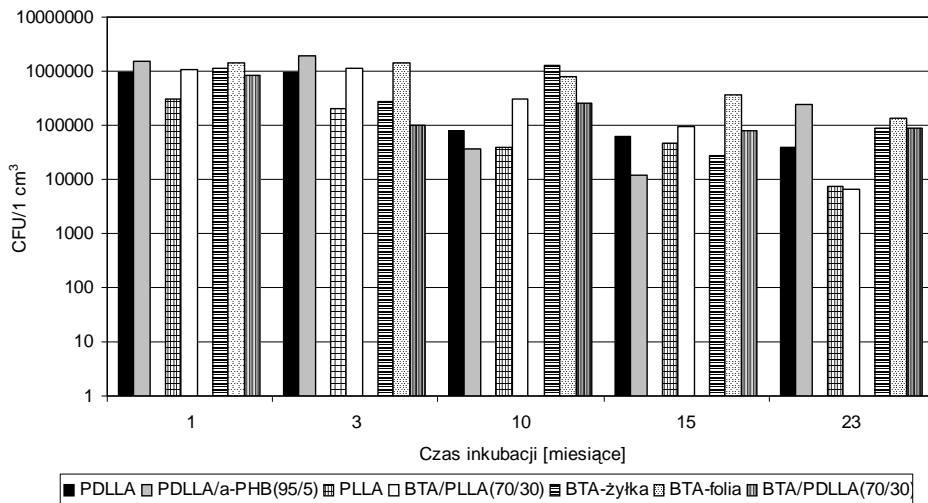
Próbki polimerów po wyjęciu z gleby umieszczano w  $10\text{ cm}^3$  0,1% roztworu Tween 80 w 0,9% NaCl i wytrząsano przez 10 minut. Liczebność bakterii heterotroficznych i promieniowców określano na podłożu YS (wyciąg glebowy z ekstraktem drożdżowym), grzyby mikroskopowe na podłożu DRBC (z chloramfenikolem i różem bengalskim). Do podłoża z polimerami oraz YS dodawano nystatyny oraz actidionu w ilości  $50\ \mu\text{g}/\text{cm}^3$  podłoża w celu zahamowania wzrostu grzybów. Kolonie bakterii heterotroficznych liczono po 48 godzinach inkubacji w temperaturze  $28^\circ\text{C}$ , po 14 dniach liczono promieniowce, a po 7 dniach liczebność grzybów mikroskopowych. Wynik podano jako ogólną liczebność mikroorganizmów w  $1\text{ cm}^3$  [6-8].

Występowanie bakterii zdolnych do degradacji polimerów określono w próbkach po 23 miesiącach inkubacji. Materiał posiewano na podłoża zawierające polimery PLLA, PDLLA, BTA, *a*-PHB jako jedyne źródło węgla. Polimery rozpuszczono w chloroformie,

a następnie zhomogenizowano w mineralnym podłożu przy użyciu dezintegratora firmy Bandelin electronics typ: UW 2070 [9]. Po 14 dniach inkubacji obserwowano wokół kolonii bakterii strefy przejaśnienia zwane „halo” wskazujące na degradację polimeru znajdującego się w podłożu.

### Wyniki, ich omówienie i analiza

W trakcie badań największa liczebność bakterii heterotroficznych wystąpiła w pierwszych miesiącach badań, a mniejsza w końcowych miesiącach, co prawdopodobnie wiąże się z wyczerpywaniem substratów w podłożu. Wyniki te znajdują potwierdzenie w badaniach [8] i [10], w których stwierdzono, że aktywny wzrost mikroorganizmów glebowych jest ograniczony przez dostęp substancji pokarmowych, zwłaszcza źródeł węgla. Liczebność bakterii heterotroficznych w trakcie całych badań była większa niż pozostałych badanych grup mikroorganizmów (promieniowców i grzybów mikroskopowych). W pracach [3, 8, 10] również bakterie stanowiły dominującą grupę mikroorganizmów, zaś promieniowce i grzyby były mniej liczne.



Rys. 1. Liczebność bakterii obecnych na powierzchni wybranych próbek polimerowych

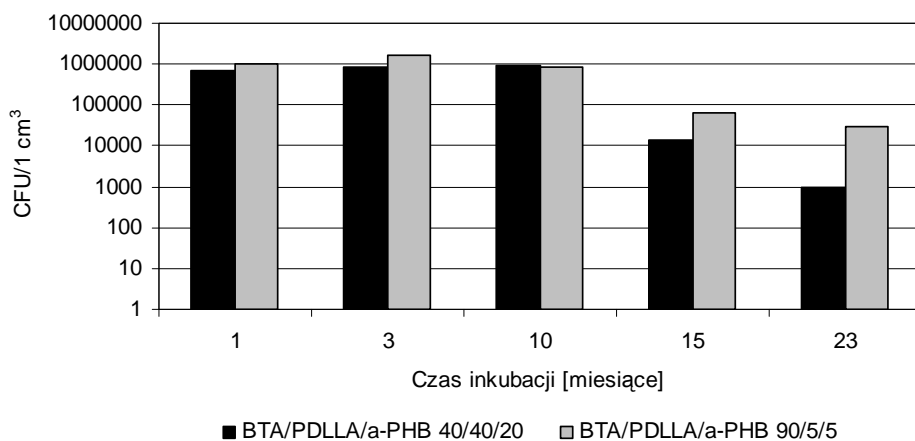
Fig. 1. Number of bacteria presented on surface of selected polymer samples

Liczebność bakterii heterotroficznych zasiedlających poszczególne polimery była zróżnicowana (rys. 1). Stwierdzono, że najliczniej zasiedlanym poliestrem był BTA, przy czym więcej bakterii obserwowano na folii niż na żyłce, co mogłoby wskazywać, że folia z racji większej powierzchni w porównaniu do żyłki jest bardziej dostępna dla mikroorganizmów. Wyniki te znajdują potwierdzenie w badaniach Wanga [11], który wykazał, że szybkość rozkładu polimerów jest zależna od rodzaju powierzchni, tj. polimery o powierzchni niejednorodnej (szorstkie) były szybciej rozkładane niż gładkie.

Porównując zasiedlanie przez bakterie PDLLA i PLLA (rys. 1) zaobserwowano, że PLLA jest gorzej i wolniej zasiedlany przez bakterie niż PDLLA, co wskazuje, że forma amorficzna polilaktydu (PDLLA) szybciej ulega degradacji hydrolitycznej, a następnie enzymatycznej. Przegląd literatury światowej wskazuje, że polilaktyd jest wolno degradowany mikrobiologicznie i przez niewiele szczepów bakterii, szczególnie w niższych temperaturach [12-14].

W badaniach własnych wykazano, że krystaliczny PLLA w mieszaninie z kopoliestrem BTA charakteryzuje się wyższym stopniem zasiedlenia przez bakterie w porównaniu do homopolimeru PLLA. Obecność ataktycznego poli[(R,S)-3-hydroksymaślanu] w mieszaninie z amorficznym PDLLA w 1, 3 i 23 miesiącu analizy powoduje wzrost przyswajalności przez mikroorganizmy tego ostatniego (rys. 1).

W mieszaninach trójskładnikowych BTA/PDLLA/a-PHB z dużym udziałem kopoliestru BTA zwiększa się stopień zasiedlenia próbek przez bakterie w porównaniu do mieszanin o małej zawartości tego składnika (rys. 2).



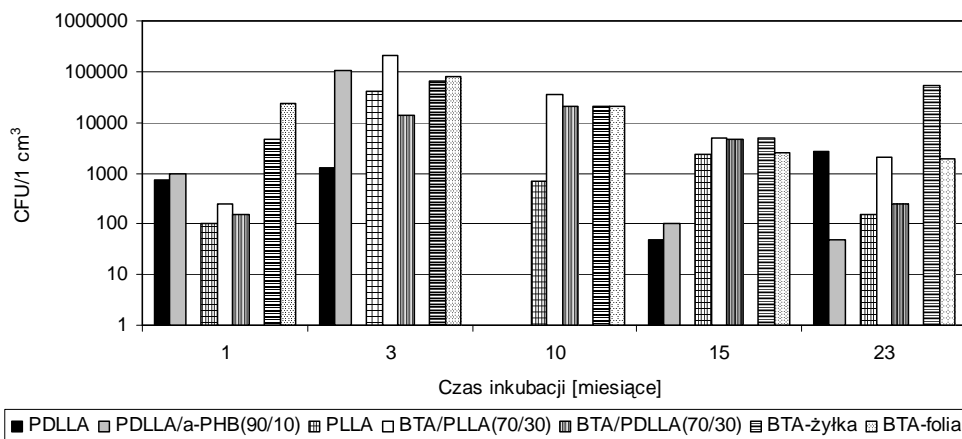
Rys. 2. Liczebność bakterii obecnych na powierzchni trójskładnikowych próbek polimerowych

Fig. 2. Number of bacteria presented on surface of BTA/PDLLA/a-PHB polymer samples

Grzyby szybciej zasiedlają BTA niż PLLA i PDLLA, przy czym, podobnie jak u bakterii, duża powierzchnia folii BTA odznacza się większą ilością grzybów niż żyłka BTA.

Zasiedlanie polimeru PDLLA przez grzyby było większe w mieszaninie z a-PHB w porównaniu z samym homopolimerem PDLLA. W przeciwieństwie do bakterii odnotowano, że PLLA jest w 3 i 15 miesiącu badań łatwiej zasiedlana przez grzyby niż amorficzny PDLLA.

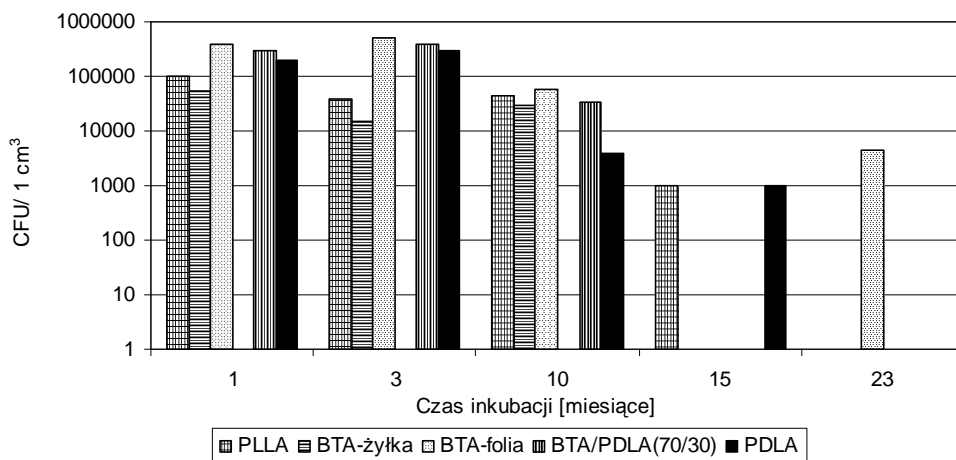
Obecność syntetycznego, alifatyczno-aromatycznego BTA w mieszaninie z krystalicznym PLLA czy amorficznym PDLLA powoduje łatwiejsze i szybsze zasiedlanie tych mieszanin w porównaniu tych homopolimerów zasiedlanych każdy z osobna. Z kolei dodatek PDLLA do BTA pogarsza zasiedlanie w stosunku do czystego BTA (rys. 3).



Rys. 3. Liczebność grzybów obecnych na powierzchni wybranych próbek polimerowych

Fig. 3. Number of fungi presented on surface of selected polymer samples

Obecność promieniowców obserwowano do 10 miesiąca badań, w 15 i 23 miesiącu pojawy były sporadyczne, co mogło być spowodowane wyczerpywaniem się substratów w glebie [8, 10]. Również i w tym przypadku BTA w postaci folii charakteryzowała się większą liczebnością promieniowców w stosunku do żyłki. Relatywnie dużą liczebność zaobserwowano także na mieszaninie BTA/PDLLA. Wprowadzenie BTA do mieszaniny z PDLA powoduje, że próbka jest łatwiej zasiedlana niż czysty PDLA (rys. 4).

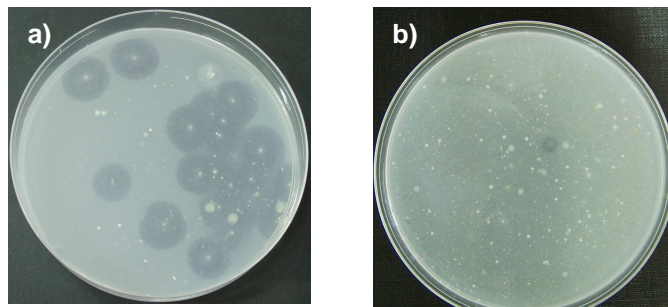


Rys. 4. Liczebność promieniowców obecnych na powierzchni wybranych próbek polimerowych

Fig. 4. Number of actinomycetes presented on surface of selected polymer samples

Wśród bakterii zdolnych do wzrostu na polimerach, jako jedynym źródle węgla, największą liczbę kolonii, otoczonych wyraźną strefą halo, obserwowano na podłożu

zawierającym a-PHB (rys. 5a); na pozostałych podłożach z polimerami występowały pojedyncze kolonie otoczone niewielką strefą halo (rys. 5b).



Rys. 5. Zdjęcia cyfrowe kolonii bakterii z widoczną strefą „halo”: a) na podłożu a-PHB, b) na podłożu BTA

Fig. 5. Digital photographs of bacterial colonies with ‘halo’ surrounded: a) a-PHB medium, b) BTA medium

Bakterie te należały głównie do tlenowych laseczek przetrwalnikujących z rodzaju *Bacillus*, wystąpiły również nieliczne pałeczki Gram-ujemne należące do *Pseudomonadaceae*.

### Podsumowanie i wnioski

1. Szereg dostępności badanych polimerów dla mikroorganizmów kształtuje się następująco: BTA folia > BTA żyłka > PDLA > PLLA.
2. Degradację poliestrów można przyspieszyć poprzez tworzenie mieszanin z innymi materiałami biodegradowalnymi, ułatwiając w ten sposób zasiedlanie trudniej biologicznie rozkładalnych polimerów przez mikroorganizmy glebowe.

### Literatura

- [1] Chiellini E., Cinelli P., D’Antone S. i Ilieva V., Environmentally degradable polymeric materials (EDPM) in agricultural applications - an overview. *Polimery* 2002, **47**(7-8), 538-544.
- [2] Mucha M.: *Polimery a ekologia*. Wyd. Polit. Łódzkiej, Łódź 2002.
- [3] Savenkova L., Gercberga Z., Nikolaeva V., Dzene A., Bibers I. i Kalnin M.: *Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films*. *Process Biochem.*, 2000, **35**, 573-579.
- [4] Pielichowski J. i Puszyński A.: *Technologia tworzyw sztucznych*. WNT, Warszawa 2003.
- [5] Tan F.T., Cooper D.G., Maric M. i Nicell J.A.: *Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms*. *Polymer Degradat. Stabil.*, 2008, **93**, 1479-1485.
- [6] Badura L. i Smyła A.: *Wybrane metody izolowania promieniowców z gleby*. Polskie Towarzystwo Gleboznawcze, Warszawa 1979.
- [7] Atlas R.M.: *Microbiological Media*. CRS Press. Boca Raton, New York 1997.
- [8] Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S. i Burns R.G.: *Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques*. *Soil Biol. Biochem.*, 2002, **34**, 387-401.
- [9] Ishigaki T., Sugano W., Nakanishi A., Tateda M., Ike M. i Fujita M.: *The degradability of biodegradable plastics in aerobic and anaerobic waste landfill model reactors*. *Chemosphere*, 2004, **54**, 225-233.
- [10] Griffiths B., Ritz K., Ebbelwhite N. i Dobson G.: *Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates*. *Soil Biol. Biochem.*, 1999, **31**, 145-153.
- [11] Wang Y.-W., Mo W., Yao H., Wu Q., Chen J. i Chen G.-Q.: *Polymer Degradat. Stabil.*, 2004, **85**, 815-821.
- [12] Tomita K., Tsuji H., Nakajima T., Kikuchi Y., Ikarashi K. i Kieda N.: *Degradation of poly(D-lactic acid) by a thermophile*. *Polymer Degradat. Stabil.*, 2003, **81**, 167-171.

- [13] Tomita K., Nakajima T., Kikuchi Y. i Miwa N.: *Degradation of poly(L-lactic acid) by a newly isolated thermophile*. Polymer Degradat. Stabil., 2004, **84**, 433-438.
- [14] Itavaara M., Karjomaa S. i Selin J-F.: *Biodegradation of polylactide in aerobic and anaerobic thermophilic conditions*. Chemosphere, 2002, **46**, 879-885.

## MICROBIAL DEGRADATION OF SELECTED POLYESTERS IN SOIL

**Abstract:** Nowadays in a lot of industrial branches non-degradable plastics have been replaced by environmental friendly polymers. Introducing these biodegradable materials to human's daily life help reduce harmful solid waste, which recycling is impractical and uneconomical. Generally, biodegradable polymers are produced to be composted after disposal, however there is no possibility to avoid improper practices dealing to produce illegal, uncontrolled landfill sites. As generally known, that biopolyesters can be degraded in soil by the action of a wide range of microorganisms such as bacteria, actinomycetales, and fungi, there is a big necessity for studying ecotoxicological impact of these materials placed in soil. The present results deals with biodegradation test of selected polyesters (aliphatic-aromatic copolymer (terephthalate-butylene/adipate-butylene, *BTA*, crystalline and amorphous polylactide *PLA*, and atactic poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate], *a-PHB*) and their blends incubated in soil, performed under controlled conditions in the pot experiment. Samples of monofilaments prepared from mentioned above polyesters were placed in soil medium and analyzed for microbial activity after specified period of time. The changes of the number of soil microorganism on tested polyesters using a number of different selective media were detected on: YS - for bacteria, soil extract for actinomycetales, DRBC for fungi. Species and number of polymer-degrading microorganisms were estimated on media containing BTA, PLA, and a-PHB as only carbon sources using a number of different selective media. It was found that numbers of all tested culturable microorganisms were dependent upon both on tested polymers and time of experiment. In the presence of polymer BTA, PLA, and a-PHB in medium, more bacteria on a-PHB as only carbon sources, than the other have been noticed. Among bacteria capable of degrading tested polymers Gram-positive sporulated bacilli and Gram-negative rods was dominated.

**Keywords:** biodegradation, microbial degradation, biodegradable polyesters