

Anna DZIOŃEK*, Jolanta PAJAŁ

Uniwersytet Śląski, Katedra Biochemii; ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

* e-mail: a.dzionic@10g.pl

Biodegradacja wybranych poliolefin

W artykule przedstawiono problemy związane z biodegradacją wybranych polimerów z klasy poliolefin. Omówiono mechanizmy abiotycznej fotooksydacji polietylenu, polipropylenu oraz polistyrenu. Opisano w jaki sposób mikroorganizmy zwiększały biodostępność tworzyw i jakimi szlakami je degradowały. Dokonano przeglądu szczepów bakterii i grzybów zdolnych do rozkładu wybranych poliolefin.

BIODEGRADATION OF SELECTED POLYOLEFINS

The article characterizes problems associated with biodegradation of selected polyolefins. The mechanisms of abiotic photooxidation of polyethylene, polypropylene and polystyrene have been presented. It is described how microorganisms increased bioavailability of plastic and which pathways they were degraded. A review of bacterial and fungal strains capable to degrade polyolefins has been done.

1. Wstępny rozkład poliolefin

Polimery ulegają rozkładowi pod wpływem działania enzymów produkowanych przez mikroorganizmy takie jak bakterie czy grzyby mikroskopowe. Proces ten nosi nazwę biodegradacji a enzymy uczestniczące w tym procesie określa się mianem depolimeraz. Polimery są podatne na biodegradację w różnym stopniu. Te które trudno ulegają rozkładowi definiuje się jako stabilne inaczej nie-degradowalne. Należą do nich głównie poliolefiny.

Poliolefiny cechują się bardzo dużą odpornością na działanie czynników chemicznych i biologicznych. Są odporne na działanie wody, roztworów soli, ługów, niektórych kwasów oraz rozpuszczalników organicznych. Ze względu na wysoki stopień hydrofobowości, dużą masę cząsteczkową oraz brak aktywnych grup chemicznych są degradowane w środowisku naturalnym od kilkudziesięciu (polistyren) do 300 lat (polietylen). Teoretycznie, ze względu na podobieństwo do alkanów, polietylen, czy polipropylen mogłyby stanowić źródło węgla dla mikroorganizmów, jednak w praktyce duża masa cząsteczkowa i wysoki stopień krystaliczności limituje wykorzystanie ich jako substratów w reakcjach enzymatycznych [1-3].

Do zainicjowania biodegradacji poliolefin niezbędne jest zarówno zmniejszenie masy cząsteczkowej tworzyw jak i wstępne utlenienie łańcucha polimerowego. Zmniejszenie masy cząsteczkowej poliolefin jest konieczne, aby umożliwić transport polimeru do wnętrza komórek mikroorganizmów, ponieważ enzymy wewnątrzkomórkowe rozpoznają tylko te łańcuchy węglowe, które zawierają do 50 atomów węgla. Natomiast oksydacja poliolefin, poza zmniejszaniem hydrofobowości tworzyw, jest wstępem do przemiany węglowodorów głównie do kwasów karboksylowych, które następnie zostaną włączone do metabolizmu komórki. Oba procesy mogą zachodzić zarówno na drodze reakcji biotycznych jak i abiotycznych [1, 4-5].

1.1 Utlenienie poliolefin przez czynniki biologiczne

Mikroorganizmy wydzielają zewnątrzkomórkowe enzymy które tną tworzywo prowadząc do jego fragmentacji.

Polimery zbudowane wyłącznie z atomów węgla i wodoru rozkładają enzymy z klasy oksydoreduktaz [1-3].

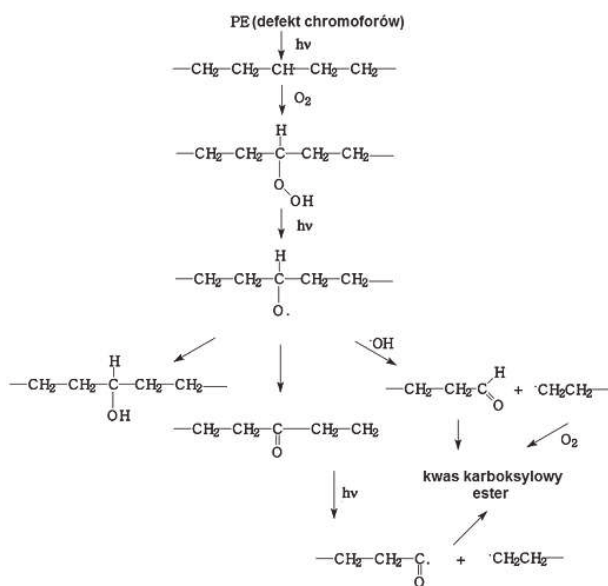
Zmniejszenie masy cząsteczkowej polietylenu jest wynikiem działania zewnątrzkomórkowych depolimeraz, takich jak peroksydaza ligninowa lub lakaza, które katalizują jednocześnie reakcję cięcia oraz utlenienia łańcucha głównego. Oksydację PE i PP prowadzą także nieswoiste zewnątrzkomórkowe oksygenazy wydzielane przez niektóre gatunki grzybów oraz związana z błoną komórkową hydroksylaza alkanowa [1, 4-6]. Łańcuch główny polistyrenu utlenia zewnątrzkomórkowa peroksydaza hydrochinonowa [6].

Wydatność tego procesu w dużym stopniu zależy od utworzenia biofilmu na powierzchni polimeru. Jednak ze względu na wysoką hydrofobowość tworzyw, formowanie biofilmu jest utrudnione. Spośród omawianych poliolefin, polipropylen cechuje się największą hydrofobowością a polistyren najmniejszą. Aby zredukować hydrofobowość poliolefin i wspomóc kolonizację, niektóre bakterie produkują biosurfaktanty. U grzybów zaobserwowano natomiast produkcję specyficznych hydrofobowych protein oraz polisacharydów [4-5].

1.2 Utlenienie poliolefin przez czynniki abiotyczne

Utlenienie poliolefin na drodze abiotycznej zachodzi w wyniku działania czynników chemicznych (np. stężonych kwasów) lub fizycznych (promieniowania UV i γ , wysokiej temperatury) [5].

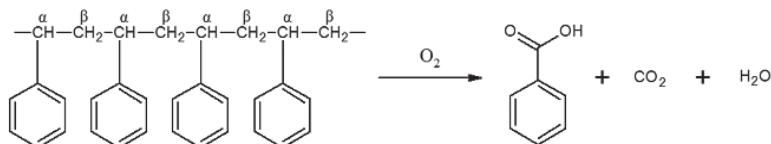
Fotooksydacja poliolefin jest łańcuchową reakcją wolnorodnikową w skutek której, do łańcucha głównego zostaje wprowadzony tlen z jednoczesnym utworzeniem grup ketonowych, estrowych i karboksylowych (Rys. 1) [4, 7]. Wynikiem utlenienia węgla α polistyrenu jest powstanie kwasu benzoowego a węgla β dwutlenku węgla i wody (Rys. 2) [6]. Ze względu na brak grup chromoforowych, niektóre poliolefiny nie absorbują światła słonecznego. Aby zapoczątkować proces tworzenia się wolnych rodników niezbędna jest obecność zanieczyszczeń, które stanowią ośrodki inicjujące [4, 7]. Wyjątkiem jest polistyren, gdyż obecna w jego strukturze grupa fenylo-



Rys. 1. Mechanizm fotooksydacji polietylenu [12, 14] zmodyfikowano

wa wykazuje właściwości chromoforowe i inicjuje tworzenie wolnych rodników [8].

Podwyższona temperatura działając na polimery prowadzi do termodegradacji, a w obecności tlenu atmosferycznego termodegradacji oksydacyjnej tworzywa. Termodegradacja może przebiegać w obrębie jednej cząsteczki lub międzycząsteczkowo, co skutkuje rozpadem



Rys. 2. Mechanizm fotooksydacji polistyrenu [9] zmodyfikowano

łańcucha głównego lub cyklizacją i wytworzeniem wiązań krzyżowych pomiędzy łańcuchami polimeru [9].

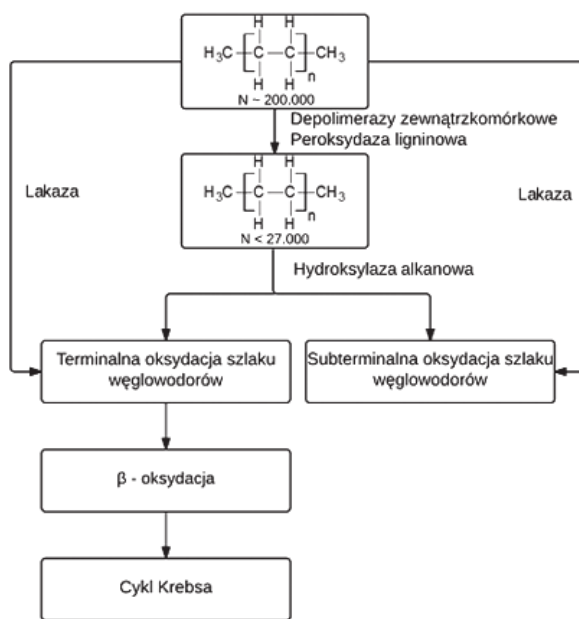
Wskutek starzenia abiotycznego poliolefin następuje fragmentacja łańcuchów głównych z jednoczesnym uwolnieniem mono- lub oligomerów, które mogą być następnie utleniane przez enzymy zewnątrzkomórkowe lub te związane z błoną komórkową [4, 7].

2. Właściwa biodegradacja poliolefin

Właściwa biodegradacja zachodzi z udziałem enzymów wewnątrzkomórkowych. W tym celu utlenione oligomery i mery są transportowane przez ścianę i błonę komórkową do wnętrza komórki [4].

Oligomery PE i PP ulegają rozkładowi w procesie β-oksydacji kwasów tłuszczowych do acetylo-CoA (Rys. 3) [4].

Kwas benzoesowy – produkt fotooksydacji polistyrenu, w komórkach bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, ulega



Rys. 3. Mechanizm biodegradacji PE [8, 14, 16-17] zmodyfikowano

najpierw przekształceniu do katecholu, a następnie pierścieni aromatyczny tego związku jest rozszczepiany szlakiem *meta* lub *orto* odpowiednio do aldehydu octowego i pirogronianu lub acetyloCoA i bursztynianu [12].

Styren w komórkach mikroorganizmów ulega degradacji dwoma szlakami. Jeden z nich opiera się na transfor-

macji styrenu do kwasu fenylloctowego, który następnie ulega aktywacji przez CoA. Mechanizm ten został wykryty u bakterii *Pseudomonas putida* CA-3, *Xanthobacter* sp. 124X, *Xanthobacter* sp. S5, *Pseudomonas fluorescens* ST oraz *Pseudomonas* sp. Y2. Inny szlak degradacji styrenu zaobserwowano u bakterii *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259. Styren jest przekształcany do 3-winyloocatecholu, który ulega rozszczepieniu *meta* do aldehydu octowego i pirogronianu (Rys. 4) [8].

Ostatecznie, produkty końcowe szlaków rozkładu poliolefin włączane są do cyklu Krebsa i metabolizowane do CO₂ i H₂O. Polimer staje się źródłem węgla i/lub energii dla mikroorganizmów [8].

3. Biodegradacja poliolefin w różnych warunkach

Badania biodegradacji poliolefin prowadzi się w różnych środowiskach naturalnych jak i w warunkach laboratoryjnych, które umożliwiają określenie roli poszcze-

gólnych mikroorganizmów i czynników abiotycznych w rozkładzie tworzywa [3-30].

3.1. Degradacja poliolefin w środowisku naturalnym

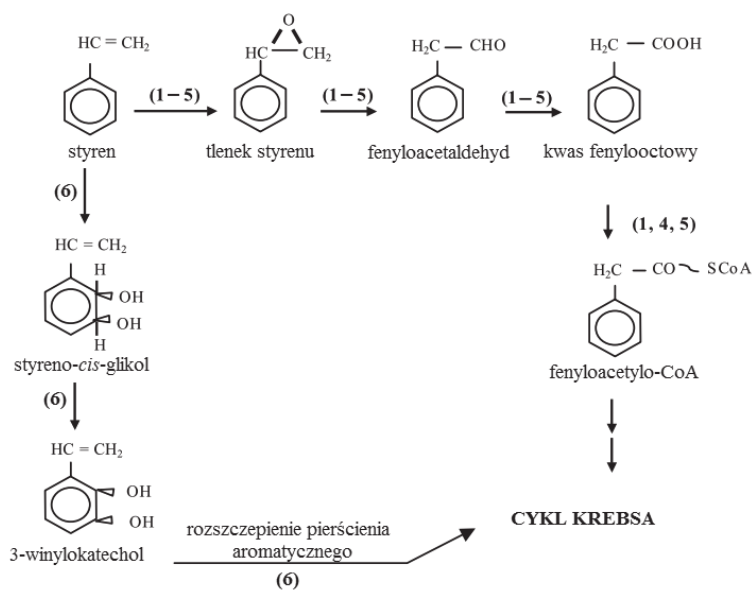
Degradację polietylenu niskiej gęstości (LDPE) badano w różnych typach gleb (namorzynowej, leśnej, z hałdy, dna krateru) oraz w glebach sterylizowanych a następnie zaszczipianych bakteriami [3], zarodnikami wybranych gatunków grzybów mikroskopowych lub ich mieszaną populacją [13]. Wykazano, że polietylen bardzo wolno rozkłada się w glebie, przy czym proces ten nieznacznie szybciej przebiega w glebach szczepionych mikroorganizmami niż w glebach naturalnych. Ubytek masy polietylenu wynosił od 0,02 % do 3,5 % odpowiednio po 225 dniach degradacji w glebie leśnej zaszczipionej mieszaną populacją grzybów, złożoną z *Aspergillus terreus*, *Aureobasidium pullulans*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium ochrochloron*, *Scopularopsis brevicaulis* i *Trichoderma viride* oraz po 9 miesiącach w glebie namorzynowej inokulowanej *Aspergillus glaucus* [3, 13].

Podobnie, bardzo nieznacznie LDPE rozkładał się w Morzu Bałtyckim [14]. Po 12 miesiącach inkubacji tworzyw w wodzie morskiej masa próbek zmalała o 0,6% za to ich wytrzymałość na zerwanie obniżyła się o 30 %, prawdopodobnie na skutek ruchu fal morskich a nie działania makro- czy mikroorganizmów. Polipropylen w wodach Zatoki Bengalskiej był degradowany nieznacznie szybciej niż PE bo po 6 miesiącach inkubacji rozkładowi uległo 0,5 % masy polimeru a wytrzymałości na zerwanie próbek obniżyła się o 2 % [15].

Nie obserwowano rozkładu polietylenu w wodach rzeki La Silla w Meksyku w ciągu 60 dni trwania eksperymentu [16].

3.2. Degradacja poliolefin z udziałem zdefiniowanych kultur bakterii, grzybów mikroskopowych i grzybów zgnilizny białej w warunkach laboratoryjnych

Zdolne do degradacji LDPE są bakterie *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus* sp., *Brevibacillus parabrevis*, *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus ruber*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus lactis* oraz bakterie rodzaju *Streptomyces* [3, 4, 17]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że bakterie degradowały folie w zakresie od 1,75% dla *Bacillus subtilis* do 46,1% dla rodzaju *Streptomyces* odpowiednio po 30 dniach i sześciu miesiącach inkubacji. Analiza mikrografów SEM wykazała, że bakterie wprowadzały zmiany w strukturze polimeru, co obserwowano w postaci licznych szczelin i pęknięć na powierzchni tworzywa, podczas gdy próby kontrolne cechowały się gładką i jednolitą powierzchnią [3, 17]. Poli-



Rys. 4. Główne szlaki mikrobiologicznego rozkładu styrenu przez: (1) *Pseudomonas putida* CA-3, (2) *Xanthobacter* sp. 124X, (3) *Xanthobacter* sp. S5, (4) *Pseudomonas fluorescens* ST, (5) *Pseudomonas* sp. Y2, (6) *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 [13] zmodyfikowano

etylen niskiej gęstości był również podatny na atak grzybów mikroskopowych takich jak *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. niger* i *A. versicolor*, grzybów rodzaju *Fusarium* oraz grzybów zgnilizny białej *Phanerochaete chrysosporium* i *Trametes versicolor* [3, 4]. Grzyby mikroskopowe mineralizowały PE na poziomie od 1,85 g CO₂/l dla *Fusarium* sp. do 4,16 g CO₂/l dla *Aspergillus* sp. [3, 4]. Grzyby zgnilizny białej obniżyły wytrzymałość na zerwanie polietylenu o 70% już po 12 dniach hodowli, a także znacząco zmniejszyły masę cząsteczkową tworzywa. Dodanie do pożywki manganu znacząco zwiększyło aktywność peroksydazy manganowej, kluczowego enzymu odpowiedzialnego za rozkład tworzywa [4].

W porównaniu do LDPE, polietylen o dużej gęstości (HDPE) cechuje się wyższą masą cząsteczkową, temperaturą topnienia oraz wytrzymałością mechaniczną, stąd tylko nieliczne mikroorganizmy, głównie bakterie z rodzajów *Arthrobacter* i *Pseudomonas*, są zdolne do jego rozkładu. Degradacja HDPE przebiega wolniej niż LDPE. Po 30 dniach hodowli bakterie *Arthrobacter* powodowały 12,23% a *Pseudomonas* 15,18% ubytek masy tworzywa [4].

Polipropylen jest degradowany przez bakterie rodzajów *Alcaligenes*, *Pseudomonas* oraz *Vibrio* [20], a także przez grzyby *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotii* oraz *Scopulariopsis brevicaulis* [21] do mieszaniny węglowodorów od C₃₁H₆₄ do C₁₀H₂₂, które są następnie transportowane do wnętrza komórek. Wzrost krystaliczności folii, świadczy o degradacji regionów amorficznych tworzywa [20-21].

Do rozkładu polistyrenu zdolne są bakterie *Azotobacter beijerinckii* [22], *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp. [23], *Ochrobactrum intermedium* [24], *Paenibacillus urinalis* [23] *Pseudomonas aeruginosa* [23-24], *P. fluorescens* [25], *Rhodococcus rhodochrous* [26], *R. ruber* [27] oraz grzyby *Aspergil-*

lus terreus, *Rhizopus oryzae*, *Lentinus tigrinus* oraz *Phanerochaete chrysosporium* [28]. Polistyren ulega biodegradacji wolniej PE oraz PP. Przykładowo po 8 tygodniach inkubacji folii z *Rhodococcus rubber* ubytek masy folii wynosił 0,8% a analiza widm FT-IR nie wykazała znaczących zmian chemicznych w tworzywie [22-28].

4. Degradacja wstępnie starzonych poliolefin

W literaturze [4, 29] spotyka się prace badawcze, w których poliolefiny najpierw poddaje się działaniu czynników abiotycznych (temperatura, promieniowanie UV), które mogą przyspieszać lub opóźniać ich biodegradację [2].

Wśród czynników abiotycznych, największy wpływ na proces biodegradacji poliolefin ma promieniowanie UV. Stwierdzono, że wstępna fotodegradacja tworzyw może przyspieszyć lub utrudnić ich biodegradację [29]. Utworzone z PE i PP grupy karbonylowe, estrowe oraz kwasowe uwrażliwiają polimery na enzymatyczny atak mikroorganizmów i w konsekwencji przyspieszają ich degradację [4, 29-30].

Wykazano, że bakterie z rodzaju *Arthrobacter* i *Pseudomonas*, a także *Rhodococcus rubber* są zdolne nie tylko do przyswajania grup karbonylowych uformowanych podczas abiotycznego starzenia ale również do enzymatycznego utleniania polietylenu, o czym świadczy postępujący ubytek masy i nie zmieniający się w czasie indeks karbonylowy [4].

Jones i Prasad [4] stwierdzili, że polistyren pod wpływem promieniowania UV staje się odporniejszy na atak mikroorganizmów na skutek tworzenia wiązań krzyżowych między łańcuchami polimeru.

Literatura

- Shah A. i inni *Biological degradation of plastics: a comprehensive review*. Biotech Adv, 2008, 26, 246-265
- Zheng Y., Yanful E. *A Review of Plastic Waste Biodegradation*. Crit Rev Biotechnol, 2005, 25, 243-250
- Sangale M. K., Shahnawaz M., Ade A. B. *A review on biodegradation of polythene: the microbial approach*. J Bioremed Biodeg, 2012, 3, doi:100164
- Restrepo-Flórez J. M., Bassi A., Thompson M. R. *Microbial degradation and deterioration of polyethylene – A review*. Int Biodeter Biodegr, 2014, 88, 83-90
- Sen S. K., Raut S. *Microbial degradation of Low density polyethylene (LDPE): A review*. J Environ Chem Eng, 2015, 462-473
- Guillet J. E., Regulski T. W., McAneney T. B. *Biodegradability of photodegraded polymers. II. Tracer studies of biooxidation of Ecolyte PS polystyrene*. Environ Sci Technol, 1974, 8, 923-925
- Gardette, M. i inni *Photo-and thermal-oxidation of polyethylene: Comparison of mechanisms and influence of unsaturation content*. Polym Degrad Stab, 2013, 98, 2383-2390
- O'Leary N. D., O'Connor K. E., Dobson A. D. *Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation*. FEMS Microbiol Rev, 2002, 26, 403-417
- Schnabel W. *Polymer degradation*. Akademie Verlag, Berlin, 1981
- Rojo, F. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, 2010
- Guzik U. i inni *Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych*. Nafta-Gaz, 2010, 66, 1019-1027
- Kwapisz E. *Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej*. Biotechnologia, 2006, 2, 166-188
- Łabużek S., Pająk J., Nowak B. *Biodegradacja modyfikowanego polietylenu w glebie w warunkach laboratoryjnych*. Polimery, 2009, 9, 675-681
- Rutkowska M. i inni *Biodegradability of polyethylene starch blends in sea water*. Polish J Environ Stud, 2002, 11, 267-272
- Sudhakar M. i inni *Biofouling and biodegradation of polyolefins in ocean waters*. Polym Degrad Stab, 2007, 92, 1743-1752
- Arévalo-Niño K. i inni *Starch-based extruded plastic films and evaluation of their biodegradable properties*. Biodegradation, 1996, 7, 231-237
- Harshvardhan K., Jha B. *Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India*. Mar Pollut Bull, 2013, 77, 100-106
- Bhatia M. i inni *Implications of a novel Pseudomonas species on low density polyethylene biodegradation: an in vitro to in silico approach*. SpringerPlus, 2014, 3, 497
- Das M. P., Kumar S. *Microbial Deterioration of Low Density Polyethylene by Aspergillus and Fusarium sp.* Int J Chem Tech Res, 2014, 6, 299-305
- Cacciari I. i inni *Isotactic polypropylene biodegradation by a microbial community: physicochemical characterization of metabolites produced*. App Environ Microbiol, 1993, 59, 3695-3700
- Strömberg E., Karlsson S. *The effect of biodegradation on surface and bulk property changes of polypropylene, recycled polypropylene and polylactide biocomposites*. Int Biodeter Biodegr, 2009, 63, 1045-1053
- Nakamiya K. i inni *Enzymatic degradation of polystyrene by hydroquinone peroxidase of Azotobacter beijerinckii HM121*. J Ferment Bioeng, 1997, 84, 480-482
- Atiq N. i inni *Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil*. Afr J Microbiol Res, 2010, 4, 1537-1541
- Li G. C. i inni *Isolation and Characterization of a Styrene Trimer Degrading Microorganism*. Adv Mat Res, 2015, 1073, 666-671
- Baggi G. i inni *Styrene catabolism by a strain of Pseudomonas fluorescens*. Syst Appl Microbiol, 1983, 4, 141-147
- Warhurst A. M. i inni *Metabolism of styrene by Rhodococcus rhodochrous NCIMB 13259*. Appl Environ Microbiol, 1994, 60, 1137-1145
- Mor R., Sivan A. *Biofilm formation and partial biodegradation of polystyrene by the actinomycete Rhodococcus ruber*. Biodegradation, 2008, 19, 851-858
- Tahir L. i inni *Production and Characterization of Esterase in Lentinus tigrinus for Degradation of Polystyrene*. Polish J Microbiol, 2013, 62, 101-108
- Aravinthan A. i inni *Synergistic Growth of Bacillus and Pseudomonas and Its Degradation Potential on Pretreated Polypropylene*. Prep Biochem Biotech, 2014, doi: 10.1080/10826068.2014.985836
- Longo C. i inni *Degradation study of polypropylene (PP) and bioriented polypropylene (BOPP) in the environment*. J Mater Res, 2011, 14, 442-448