

Biodegradacja folii polilaktydowych przez autochtoniczne bakterie glebowe

Poly lactide foil biodegradation performed by autochthonic soil microorganisms

Streszczenie:

Wstęp

Coraz szerzej rozpowszechnione wykorzystywanie opakowań foliowych niesie ze sobą znaczne zagrożenie dla środowiska. Z tego względu coraz większym powodzeniem cieszą się folie z materiałów biodegradowalnych. Jednym z przykładów takich związków jest polilaktyd (ang. polylactide, PLA), w pełni biodegradowalny polimer kwasu mlekowego. Koniecznym warunkiem wprowadzenia opakowań biodegradowalnych do obrotu handlowego jest sprawdzenie możliwości ich biologicznej degradacji, najlepiej w środowisku naturalnym. Środowisko glebowe jest miejscem, do którego najczęściej trafiają odpady foliowe. Dlatego też w tym eksperymencie podjęto próbę oszacowania możliwości i tempa biodegradacji folii polilaktydowej w środowisku glebowym przez mikroorganizmy autochtoniczne.

Materiały i metody

W badaniach użyto komercyjnie dostępnej, biodegradowalnej folii polilaktydowej. Eksperyment mikrobiologiczny prowadzono w środowisku glebowym przez 6 miesięcy. Liczebność mikroflory zasiedlającej powierzchnię folii badano po 1, 3, i 6 miesiącach eksperymentu. Jednocześnie dokonywano mikroskopowego badania powierzchni folii w celu oszacowania stopnia jej biodegradacji.

Wyniki

Badanie wykazało, że liczebność bakterii autochtonicznych zasiedlających folię polilaktydową zwiększała się w trakcie trwania eksperymentu. Jednak dopiero po 6 miesiącach eksperymentu obserwowano na folii zmiany powierzchni.

Wnioski

Eksperyment potwierdził, że folia polilaktydowa może być biodegradowana w warunkach środowiska glebowego z użyciem naturalnie tam występującej flory bakteryjnej, jednak czas takiej biodegradacji przekracza 6 miesięcy. Oznacza to, że produkty polilaktydowe stanowią ekologiczny materiał opakowaniowy, który rozkłada się samoistnie w środowisku glebowym.

Abstract:

Introduction

The increased usage of foil packing is harmful to the environment, which is why biodegradable materials are becoming more and more popular. An example of such material is polylactide (PLA), a completely biodegradable lactic acid polymer. In order for the biodegradable material to be introduced to the market, it is essential first to analyse its biodegradation, preferably in the natural environment. The most common place where foil is disposed is the soil, therefore the aim of this experiment was to estimate the possibility and the rate of PLA foil biodegradation by autochthonic soil microorganisms.

Materials and methods

In the experiment commercially available PLA foil was used. The research was performed in a soil environment for 6 months. Estimations of the number of bacteria colonizing the foil were conducted after 1, 3, and 6 month intervals during the experiment. At the same time the foil surface was analyzed at the microscopic level to estimate the degree of its biodegradation.

* Aleksandra Ziemińska, Politechnika Śląska, Katedra Biotechnologii Środowiskowej w Gliwicach, ul. Akademicka 2, 44-100 Gliwice, tel. 32 2372694, fax. 32 237 2946, e-mail: aleksandra.ziembinska@polsl.pl

Results

The experiment revealed that soil autochthonic bacteria colonizing the PLA foil surface increased during the experiment. However, physical changes to the foil surface were observed after 6 months of incubation.

Conclusion

The experiment confirmed that PLA foil is biodegradable in a soil environment by autochthonic bacteria, but biodegradation requires more than 6 months to occur. It means that PLA products are an ecological type of polymer which will decompose spontaneously in the environment.

Słowa kluczowe: autochtoniczne bakterie glebowe, biodegradacja, polilaktyd

Keywords: autochthonic soil bacteria, biodegradation, polylactide

Wstęp

Rozwój cywilizacyjny, w tym rozwój wszelkiego rodzaju przemysłu, pociąga za sobą zwiększenie produkcji odpadów. Często odpady te są nierozkładalne lub rozkładalne w znikomym stopniu, co powoduje, że stanowią poważne zagrożenie dla środowiska [1]. Polimery stosowane w opakowaniach mogą ulegać rozkładowi w różnym stopniu pod wpływem czynników fizycznych, chemicznych lub biologicznych [2]. Rozkład biologiczny może zachodzić naturalnie w środowisku i będzie prowadzony przez występującą tam florę autochtoniczną: bakterie i grzyby. Ze względu na możliwość takiego rozkładu coraz większym powodzeniem cieszą się folie z materiałów biodegradowalnych.

Jednym z przykładów związków wykorzystywanych w produkcji tworzyw biodegradowalnych jest polimer kwasu mlekowego – polilaktyd (ang. *polylactide*, PLA). Związek ten nadaje się do obróbki termoplastycznej, dzięki temu jest on produkowany i wykorzystywany w przemyśle opakowań na coraz większą skalę [3].

PLA otrzymany różnymi metodami ma inne właściwości. Pierwsza z metod jego otrzymywania, najbardziej tradycyjna, to polimeryzacja kondensacyjna cząsteczek powstałego w procesie fermentacji kwasu mlekowego. Proces ten jest stosunkowo tani, lecz umożliwia produkcję polimeru kwasu mlekowego o małych masach cząsteczkowych (10 000 – 20 000). Otrzymany w ten sposób PLA charakteryzuje się obniżonymi właściwościami mechanicznymi i nie znajduje większego zastosowania [4, 5].

Inny sposób otrzymywania polimeru kwasu mlekowego to polimeryzacja kondensacyjna cyklicznych laktydów. Metoda ta pozwala na otrzymanie polimerów o większej masie cząsteczkowej (50 000). Wyprodukowany w ten sposób polilaktyd charakteryzuje się większą sztywnością, stopniem krystaliczności rzędu 35% oraz wysoką wytrzymałością na rozciąganie, sięgającą 60 MPa, temperaturą topnienia w zakresie 170°C-180°C i gęstością 1200-1300 kg/m³ [4, 5].

Koniecznym warunkiem wprowadzenia opakowań biodegradowalnych do obrotu handlowego jest sprawdzenie

możliwości ich biologicznej degradacji, najlepiej w środowisku, w którym zostaną końcowo umieszczone. Środowisko glebowe jest miejscem, do którego najczęściej trafiają odpady foliowe, a występujące tam naturalnie mikroorganizmy autochtoniczne posiadają zdolności do rozkładu skomplikowanych związków chemicznych do prostszych, łatwiej przyswajalnych. W glebie naturalnie występują bakterie z rodzajów: *Bacillus*, *Micrococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Flavobacterium*, promieniowce z rodzajów: *Nocardia* i *Streptomyces* oraz grzyby z rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Mucor*. Grzyby występują obficie w glebach kwaśnych, podczas gdy bakterie preferują środowisko obojętne i zasadowe [6].

Mając na uwadze możliwości biodegradacyjne glebowych bakterii autochtonicznych, celem tego eksperymentu było oszacowanie możliwości i tempa biodegradacji komercyjnie dostępnej folii polilaktydowej, prowadzonej przez bakterie autochtoniczne w środowisku glebowym, w warunkach laboratoryjnych.

Materiały i metody

Przygotowanie eksperymentu

Eksperyment prowadzono w warunkach laboratoryjnych w pięciu powtórzeniach. Pojemniki o pojemności 1 dm³ wypełniono ziemią ogrodową. Kawałki folii polilaktydowej o wymiarach 5 cm × 5 cm umieszczono ok. 3 cm pod powierzchnią gleby. Pojemniki inkubowano pod przykryciem w temperaturze pokojowej (23±1°C) przez 6 miesięcy, utrzymując stałą wilgotność.

Oznaczenia fizykochemiczne gleby

Przed rozpoczęciem eksperymentu oznaczono wilgotność oraz odczyn gleby. Wilgotność próbki ziemi oznaczano z użyciem wagosuszarki (Radwag, model WPS1105). Odczyn pH gleby mierzono w roztworze wodnym. W tym celu próbkę gleby zawieszono w wodzie destylowanej w stosunku 1:2,5 (w:v), zworteksowano i pozostawiono do sedimentacji. Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wykonano pomiar pH za pomocą papierka wskaźnikowego (Merck).

Oznaczenia mikrobiologiczne

Przed rozpoczęciem inkubacji folii w glebie przeprowadzono analizę obecności i liczebności mikroorganizmów autochtonicznych w glebie. W tym celu próbkę gleby o masie 5 g zawieszono w warunkach sterylnych w 45 cm³ ml soli fizjologicznej, całość zwortekowano i pozostawiono do sedymentacji. Z zawiesiny wykonano szereg rozcieńczeń w soli fizjologicznej do 10⁻⁵. Materiał bakteriologiczny posiewano metodą płytek tartych na podłoże bulionowe (BTL, Łódź) w celu oznaczenia liczebności bakterii oraz podłoże Czapek-Dox (BTL, Łódź) w celu oznaczenia liczebności grzybów. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h i w 24°C przez 7 dni, odpowiednio dla bakterii i grzybów. Policzono wyrosłe kolonie bakterii. Nie uzyskano wzrostu grzybów na podłożu Czapek-Dox. Założono jednocześnie, że na próbkach folii poddanych inkubacji w glebie liczebność autochtonicznych bakterii glebowych wynosi zero.

Analizę liczebności bakterii zasiedlających folię polilaktydową przeprowadzono po 1, 3 i 6 miesiącach inkubacji. W tym celu badaną folię wyjęto z gleby, spłukano sterylną solą fizjologiczną i umieszczono w probówkach (końcowa objętość zawiesiny w soli fizjologicznej wynosiła 9 cm³). Probówki zawierające kawałki folii wytrząsano w celu przeniesienia bakterii z folii do zawiesiny. Następnie wykonano szereg rozcieńczeń próbek do 10⁻³. Z poszczególnych rozcieńczeń wykonano w 2 powtórzeniach posiew metodą płytek tartych na podłoże bulionowe (BTL, Łódź). Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Po inkubacji policzono kolonie bakteryjne wyrosłe na płytkach.

Liczbę bakterii, które wyrosły na płytce z 0,1cm³ posiadanego materiału bakteriologicznego (*A*) policzono ze wzoru (1):

$$A = \text{liczba wyrosłych kolonii} \cdot \frac{1}{\text{rozcieńczenie}} \quad (1)$$

Obserwacje makro- i mikroskopowe

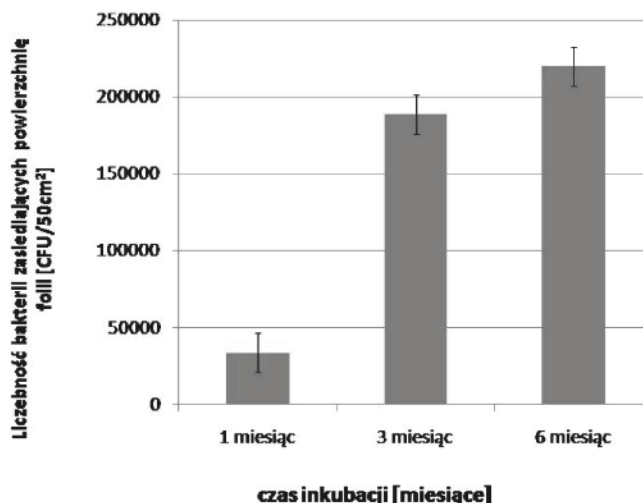
W każdym etapie eksperymentu dokonywano obserwacji makroskopowych powierzchni folii (z użyciem lupy) oraz mikroskopowych z użyciem świetlnego mikroskopu laboratoryjnego w celu oszacowania uszkodzeń mechanicznych i zmian fizycznych badanego materiału.

Wyniki

W trakcie trwania eksperymentu w pojemnikach utrzymywano stałą wartość wilgotności (70%). Wartość pH badanej gleby wynosiła 7,0.

W analizach mikrobiologicznych nie uzyskano wzrostu grzybów na podłożu Czapek-Dox. Natomiast liczebność bakterii autochtonicznych, kolonizujących badaną folię, oznaczano po 1, 3 i 6 miesiącach trwania badań. Analizę mikrobiologiczną prowadzono wysiewając metodą płytek

tartych 0,1 cm³ materiału na podłoże bulionowe. Po 24-godzinnej inkubacji zliczano wyrosłe kolonie bakteryjne. Rysunek 1 przedstawia liczebność autochtonicznych mikroorganizmów glebowych, zasiedlających badaną folię w kolejnych etapach eksperymentu wyrażoną jako jednostki tworzące kolonię (CFU, ang. *colony forming unit*) na dwóch stronach powierzchni próbki folii.



Rys. 1. Średnia liczebność bakterii glebowych zasiedlających powierzchnię badanej folii w trakcie trwania eksperymentu

Fig. 1. Average number of soil bacteria on PLA foil during the experiment

Strukturę folii obserwowano makro- i mikroskopowo po każdym etapie eksperymentu. Po 1 i 3 miesiącach na folii nie obserwowano żadnych fizycznych zmian (folia była nieprzeźroczysta, mleczna, w kolorze żółto-zielonym, bez perforacji i innych uszkodzeń fizycznych). Dopiero po 6 miesiącach inkubacji folii w glebie zaobserwowano na jej powierzchni zaciemnienia i drobne, brunatne plamy, jednak nie obserwowano rozerwania powierzchni lub innych uszkodzeń (wyników nie zamieszczono).

Dyskusja o wynikach

Badania biodegradacji folii polilaktydowej prowadzono w środowisku glebowym, w celu oszacowania możliwości prowadzenia takiej degradacji przez bakterie autochtoniczne. W analizach nie uzyskano wzrostu grzybów autochtonicznych na podłożu bakteriologicznym. Prawdopodobnym wyjaśnieniem takiego zjawiska może być obojętne pH gleby użytej do eksperymentu. Grzyby preferują odczyn kwaśny, stąd prawdopodobnie problemy z uzyskaniem materiału grzybowego.

W eksperymencie wykazano natomiast, że powierzchnia badanej folii była stopniowo zasiedlana przez bakterie glebowe, prowadząc do zmiany jej barwy (a po dłuższej inkubacji prawdopodobnie również struktury). Takie wyniki

pozwalają przypuszczać, że folia polilaktydowa może być degradowana w środowisku glebowym przez obecne tam bakterie autochtoniczne w stosunkowo szybkim tempie (powyżej 6 miesięcy), jednak nie tak szybko jak rozkładane są inne dostępne komercyjnie polimery. Przykładem może być alifatyczny poliester o nazwie handlowej Bionolle, rozkładający się w kompoście w przeciągu 45 dni [7]. Uzyskane dla PLA wyniki potwierdzają wcześniejsze doniesienia [8, 9], w których wykazano, że folia z polimeru kwasu mlekowego była rozkładana do związków humusowych, ditlenku węgla i wody, będąc inkubowana w środowisku glebowym dłużej niż 6 miesięcy (nawet do kilku lat).

Eksperyment prowadzono w temperaturze pokojowej, w której najlepiej rozwijają się bakterie psychrofilne. Jednak wykazano wcześniej [10], że wyższa temperatura znacząco wpływa na stopień degradacji folii polilaktydowej w glebie kompostowej. W temperaturze 48°C zmiany strukturalne powierzchni folii pojawiły się zdecydowanie szybciej (już po dwóch miesiącach kompostowania) niż w 30°C. Po tym czasie zaobserwowano na powierzchni badanej folii ubytki, podczas gdy w temperaturze 30°C zmiany powierzchni były widoczne dopiero po sześciu miesiącach inkubacji, tak samo, jak w przypadku wyników tego eksperymentu.

Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych, z zachowaniem stałej temperatury i wilgotności. W środowisku natomiast wiele czynników może wpływać na szybkość lub stopień biodegradacji. Można wśród nich wymienić, prócz temperatury i nawodnienia gleby, odczyn gleby (który może się zmieniać w zależności od procesów biochemicznych zachodzących w glebie), różne gatunki roślin wydzielających substancje chemiczne wspomagające rozkład folii poprzez stymulację wzrostu bakterii zdolnych do rozkładu tego polimeru. Optymalizacja warunków szybkiego rozkładu folii z PLA wymaga więc dalszych badań.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonego w warunkach laboratoryjnych eksperymentu można stwierdzić, że poddana doświadczeniu folia polilaktydowa, zgodnie z informacją podaną przez producenta, jest podatna na procesy biodegradacji przez bakterie glebowe. Liczebność bakterii kolonizujących folię rosła w czasie, co może sugerować, że bakterie glebowe są zdolne do degradacji folii polilaktydowej. Brak obecności grzybów natomiast sugeruje, że w pH obojętnym jedynie bakterie są odpowiedzialne za rozkład degradowanej folii. Zmiany w strukturze folii można było zaobserwować dopiero po 6 miesiącach inkubacji w ziemi, co jest zgodne z informacją uzyskaną od producenta. Jednak niewykluczone, że zmiana warunków środowiskowych (pH i temperatury) przyspieszy procesy rozkładu. Założenie to wymaga jednak potwierdzenia eksperymentalnego.

LITERATURA

- [1] Nowak B., Pająk J., Płociniczak T., Łabużek S.: Enzymy uczestniczące w biodegradacji polimerów, *Biotechnologia*, 2008; 80: 45-52.
- [2] Łabużek S., Pająk J., Nowak B.: Biodegradacja tworzyw sztucznych, 2006, dostępny w: <http://www.invertebrata.yoyo.pl/biodegradacja%20tworzyw%20sztucznych.htm> [pobrano 10.01.2012].
- [3] Malinowski R., Żenkiewicz R., Richert S.: Niektóre właściwości modyfikowanego polilaktydu, XI Międzynarodowa Konferencja Naukowo-Techniczna: Polimery i Kompozyty Konstrukcyjne, Olsztyn, 16 – 19 maj, 2011; 228 – 306.
- [4] Stasiak A., Dzwonkowski J., Łubowski D.: Badania procesu wyłaczania folii z biodegradowalnego polimeru poli(kwasu mlekowego) PLA. *Przetwórstwo tworzyw* 2008; 14/1: 17-20.
- [5] Belgacem N., Gandini A.: *Monomers, Polymers and Composites from renewable resources*. Wydawnictwo Elsevier, Oxford 2008.
- [6] Kołwzan B., Adamiak W., Grabas K. i wsp.: *Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska*, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005.
- [7] Jayasekara R., Sheridan S., Lourbakos E. i wsp.: Biodegradation and ecotoxicity evaluation of a bionolle and starch blend and its degradation products in compost. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2003; 51/1: 77-81.
- [8] Gołębiewski J., Gibas E., Malinowski R.: Wybrane polimery biodegradowane – otrzymywanie, właściwości, zastosowanie, *Polimery*. 2008; 53/11-12: 799-806.
- [9] Leszczyński W.: Materiały opakowaniowe z polimerów biodegradowalnych. *Przemysł Spożywczy*. 2001; 55/8: 81-84.
- [10] Szumigaj J., Żakowska Z., Klimek L. i wsp.: Stopień rozkładu folii z poli(kwasu mlekowego) a warunki biodegradacji. *Problemy Ekologii*. 2008; 12/1: 49-53.

Kalendarium

MAJ

- | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3 maja | Międzynarodowy Dzień Astmy i Alergii |
| 5 maja | Światowy Dzień Ochrony Środowiska Naturalnego, Leśnika i Drzewiarza |
| 5 maja | Europejski Dzień Walki z Dyskryminacją Osób Niepełnosprawnych (<i>Dzień Godności Osoby z Niepełnosprawnością Intelektualną</i>) |
| 5-12 maja | Tydzień PCK |
| 8 maja | Światowy Dzień Czerwonego Krzyża i Czerwonego Półksiężyca |
| 12 maja | Światowy Dzień Ptaków Wędrownych – International Migratory Bird Day |
| 12 maja | Międzynarodowy Dzień Pielęgniarek (<i>Międzynarodowy Dzień Pielęgniarek i Położnych</i>) |
| 12 maja | Światowy Dzień Syndromu Chronicznego Zmęczenia i Zaburzeń Immunologicznych |
| 14 maja | Dzień Farmaceuty |
| 15 maja | Święto Polskiej Niezapominajki |
| 15 maja | Światowy Dzień Chorych na Mukopolisacharydozę i Choroby Rzadkie |
| 19 maja | Światowy Dzień Wirusowego Zapalenia Wątroby – World Hepatitis Day |
| 22 maja | Dzień Praw Zwierząt (org. Klub Gaja) |
| 22 maja | Międzynarodowy Dzień Różnorodności Biologicznej |
| 23 maja | Światowy Dzień Żółwia |
| 24 maja | Europejski Dzień Parków Narodowych |
| 31 maja | Światowy Dzień bez Papierosa – Anti Tobacco Day |
| 31 maja | Dzień Bociana Białego |