

Jolanta WRÓBLEWSKA-KREPSZTUL^{a)}, Iwona MICHALSKA-POŻOGA^{a)},
Mieczysław SZCZYPIŃSKI^{b)}, Michał M.SZCZYPIŃSKI^{c)}, Tomasz RYDZKOWSKI^{a), d)}

^{a)}Politechnika Koszalińska, Wydział Mechaniczny, Koszalin,

^{b)}Przedsiębiorstwo Produkcyjno - Badawcze Technika Mieczysław Szczypiński, Koszalin,

^{c)}Technical University of Liberec, Department of Material Engineering, Liberec, Czech Republic,

^{d)}Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauk Technicznych, Olsztyn.

e-mail: tomasz.rydzkowski@tu.koszalin.pl

Biodegradacja – atrakcyjna alternatywa dla obecnych technik utylizacji odpadów tworzyw polimerowych

Streszczenie: Tworzywa polimerowe podlegają procesom biodegradacji. Zainteresowania naukowców skupiają się wokół poszukiwania metod efektywnego wykorzystania znanych już mikroorganizmów mogących wziąć udział w procesach biodegradacji tworzyw polimerowych, zarówno tych ropo- jak i bio-pochodnych. Opakowania do żywności, główne źródło odpadów tworzyw polimerowych, mogą być skutecznie degradowane przez działalność mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania enzymów, które biorą udział w reakcjach biochemicznych. Wiele gatunków mikroorganizmów (głównie grzyby i bakterie) jest zdolnych do uczestnictwa w procesie biodegradacji tworzyw i kompozytów na bazie polimerów. Badane mikroorganizmy wyizolowano z miejskiego składowiska odpadów, z gleby i z wody morskiej oraz innych środowisk. Publikacje naukowe opisują bakterię *Ideonella sakaiensis* 201-F6, która może wykorzystać poli(tetraftalan etylenu), jako źródło węgla do wytwarzania energii. W niniejszym opracowaniu na podstawie literatury opisano mechanizm biodegradacji enzymatycznej oraz mikroorganizmy degradujące PE, PET oraz organiczne napętniacze na bazie lignocelulozy.

Słowa kluczowe: tworzywa polimerowe, opakowania do żywności, biodegradacja, mikroorganizmy

BIODEGRADATION - AN ATTRACTIVE ALTERNATIVE TO CURRENT PRACTICES FOR POLYMER WASTE DISPOSAL

Abstract: Biodegradation is a process that is carried out under the influence of enzymatic biological systems of bacteria and fungi that result in the degradation of the polymer. Cracking of chemical bonds in the chain occurs under the influence of enzymatic attack by oxidation or hydrolysis mechanism. The course of the biodegradation process depends on the type of enzyme and above all on the microorganisms for which environmental pollution is the source of energy. *Pseudomonas* spp. And *Aspergillus glaucus*, which show dependence in the biodegradation process involving fungi and bacteria of one of the most common plastics – polyethylene. In case of biodegradation of lignocellulose enzymes *A. aneurinilyticus* and *Bacillus* sp can produce valuable products such as gallic acid, ferulic acid.

Keywords: bio (degradation), plastics, enzymes, microorganisms

1. WPROWADZENIE

Niekontrolowane użycie tworzyw sztucznych do różnych celów, zwłaszcza takich jak opakowania dla przemysłu spożywczego, spowodowało poważne problemy związane z rosnącą ilością odpadów i zanieczyszczeniem środowiska [1]. Tworzywa polimerowe do pakowania żywności to często różnorodne

kompozyty, z różnego rodzaju napętniaczami, w tym naturalnymi – roślinnymi. Kompozyty są zwykle kłopotliwe w recyklingu a klasycznie stosowane metody utylizacji często okazują się nieefektywne. Wzrasta więc zainteresowanie mikroorganizmami zdolnymi do skutecznego rozkładu większości materiałów organicznych i nieorganicznych takich jak: tworzywa polimerowe, ligniny, skrobia, celuloza, hemiceluloza

i inne napełniacze. Parametry środowiskowe, takie jak wilgotność, temperatura, pH, zasolenie, obecność lub brak tlenu, słońca i wody, nie tylko wpływają na efekty i tempo degradacji polimeru, ale również mają decydujący wpływ na populację bakterii i aktywność enzymów wpływających na proces biodegradacji [1 - 4].

Enzymy istnieją w każdej żywej komórce, a więc są obecne we wszystkich mikrobach. Względne ilości różnych enzymów wytwarzane przez drobnoustroje różnią się w zależności od gatunku a nawet pomiędzy poszczególnymi odmianami drobnoustrojów. Enzymy są bardzo specyficzne w działaniu na substraty, więc różne enzymy mogą pomóc w degradacji określonych substancji. Enzymy mikrobiologiczne powodują biodegradację tworzyw sztucznych, skutecznie i bez szkody dla środowiska. Popularne szczepy przyczyniające się do degradacji polimerów to *Brevibacillus spp.* i *Bacillus spp.* W przypadku tych dwóch szczepów bakteryjnych w procesach biodegradacji uczestniczą proteazy. O danej grupie mikroorganizmów i szybkości szlaków biodegradacji decydują warunki środowiska. Polimery o wysokiej masie cząsteczkowej najpierw rozkładają się na oligomery – niektóre z nich mogą być rozpuszczalne w wodzie i dalej rozkładane w organiczne produkty pośrednie, które mogą stanowić kwasy, alkohole, ketony [1,5]

Tworzywa sztuczne są hydrolizowane przez enzymy, tworząc grupy funkcyjne poprawiające hydrofilność. Skutkuje to degradacją łańcucha polimeru i spadkiem jego masy cząsteczkowej i właściwości mechanicznych, co czyni go bardziej dostępnym dla dalszej asymilacji przez drobnoustroje [1, 6]. Proces biodegradacji tworzyw sztucznych przebiega dzięki działaniu enzymów prowadzących do skracania łańcucha polimeru i przekształcenia go do oligomeru i monomerów lub dalszych przemian w pośrednie związki organiczne takie jak: kwasy, alkohole i ketony [1, 5]. Rozpuszczalne w wodzie produkty są absorbowane przez komórki bakteryjne, w których są metabolizowane. Wpływ na proces biodegradacji mają

parametry fizyczne takie jak: temperatura, ciśnienie i wilgoć poprzez stymulowanie procesów i czynników biologicznych takich jak działanie enzymów [1].

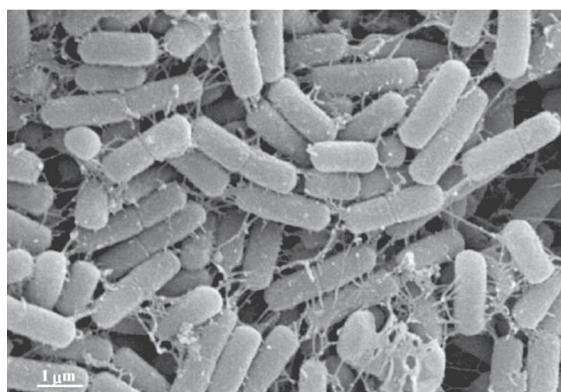
Wiele mikroorganizmów może istnieć bez tlenu, używając procesu zwanego oddychaniem beztlenowym - anaerobowym. W oddechu beztlenowym azotan (NO_3^-), siarczan (SO_4^{2-}), metale takie jak żelazo (Fe^{3+}) i mangan (Mn^{4+}), a nawet dwutlenek węgla, mogą odgrywać rolę tlenu, przyjmując elektrony z degradowanego zanieczyszczenia. Takie mikroorganizmy idealnie nadają się do usuwania zanieczyszczeń, ponieważ zawierają enzymy, które traktują zanieczyszczenia środowiskowe jako źródło energii. Dodatkowo ze względu na niewielkie rozmiary mogą łatwo kontaktować się z substancjami zanieczyszczającymi [7].

2. MECHANIZM BIODEGRADACJI ENZYMATYCZNEJ

Reakcja najbardziej znacząca w enzymatycznej degradacji polimerów to reakcja dwumolekularna, w której enzym katalizuje interakcje polimeru i odczynnika o niskiej masie cząsteczkowej. Te reakcje mogą zachodzić w mechanizmie pojedynczego lub podwójnego przesunięcia. W mechanizmie pojedynczego przemieszczenia dwa substraty A i B są związane z wolnym enzymem przez odwracalne reakcje. Ostateczny kompleks dwóch substratów i enzymu dzieli się na produkty C i D oraz wolny enzym [8]. W mechanizmie podwójnego przesunięcia kompleks związany z enzymem ulega dysocjacji jednocząsteczkowej w odpowiednią grupę funkcyjną w celu utworzenia nowego kompleksu enzym – substrat. Kompleks pośredni łączy się z drugim substratem i przenosi grupę, która uległa dysocjacji do substratu B. Złożoność materiałów polimerowych i ich struktura są najważniejszymi aspektami, które decydują o biodegradacji. Materiały polimerowe mogą być chemicznie jednorodne lub mogą zawierać mieszanki polimerów, lub dodatki, które mogą służyć jako dobre składniki odżywcze dla mikroorganizmów [8, 9].

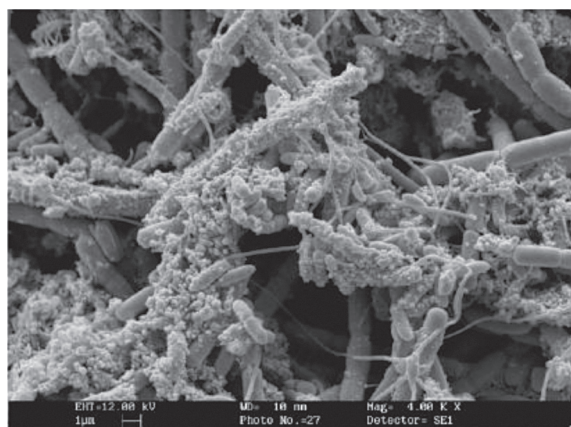
Różne struktury polimeru mogą mieć wpływ na dostępność materiału podlegającego reakcji enzymatycznej [9]. Mikroorganizmy nie są w stanie transportować polimerów przez swoje błony do wnętrza komórek, w których zachodzi większość procesów biochemicznych – ze względu na brak rozpuszczalności w wodzie i długość cząsteczek polimeru. Mikroorganizmy opracowały specjalną strategię i używają materiały takie jak polimery jako źródło węgla i energii. Mikroby wydzielają enzymy pozakomórkowe, które depolimeryzują polimery, znajdujące się poza komórkami mikrobów [8, 10]. Mikroorganizmy wydzielają także enzymy polihydroksyalkanozowe, które ułatwiają

degradację tworzyw sztucznych [11]. Bakterie gromadzą cząsteczki polimerowe (do 80% masy własnej) jako „pożywienie na okres głodu”. W zależności od użytych mikroorganizmów oraz rodzaju pożywki powstają polihydroksyalkaniany o różnej strukturze cząsteczkowej. Enzymy mikrobiologiczne hydrolizują tylko niskocząsteczkowe i rozpuszczalne makrocząsteczki. Te rozpuszczalne związki są wykorzystywane przez mikroorganizmy do produkcji energii [12]. Rysunek 1 przedstawia przykład bakterie wykorzystujące glikol polietylenowy do wytworzenia energii [13]. Rysunek 2 przedstawia biofilm bakterii pokrywający materiał polimerowy [14].



Rys. 1. Zdjęcie SEM obrazujące czystą kulturę bakterii zdolnych do wykorzystania glikolu polietylenowego jako źródła węgla i energii [13]

Fig. 1. SEM photo demonstrating the pure culture of bacteria capable of using polyethylene glycol as a source of carbon and energy [13]



Rys. 2. Naturalny biofilm bakterii powstały na powierzchni materiału polimerowego [14]

Fig. 2. Natural bacteria biofilm created on the surface of polymeric material [14]

2.1. MIKROBY DEGRADUJĄCE POLIETYLEN

Jednym z popularniejszych tworzyw masowo stosowanych jest polietylen. W 1961 roku stwierdzono, że kilka mikroorganizmów może używać parafiny jako źródło węgla. Publikacje naukowe opisują zależności pomiędzy degradacją z udziałem grzybów i bakterii. Obserwacje prowadzono przez jeden miesiąc przy obecności *Pseudomonas spp.* i *Aspergillus glaucus*. Po upływie wyznaczonego czasu stwierdzono 20,54% degradacji polietylenu przez *Pseudomonas spp.* podczas gdy grzyb *Aspergillus glaucus* zdegradował 28,80% polietylenu i 7,26% pozostałych tworzyw [1, 7]. Termofilna bakteria *Brevibaccillus borstelensis* wyizolowana z gleby została użyta do degradacji LDPE przez 30 dni w temperaturze 50°C. Podczas doświadczenia zaobserwowano zmniejszenie ciężaru grawimetrycznego i cząsteczkowego o odpowiednio 11 i 30%. Przy użyciu FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) zaobserwowano, że działanie bakterii *Brevibaccillus borstelensis* powoduje, że polietylen wykazuje redukcję grup karbonylowych [8]. Degradacja polietylenu przez grzyby *Phanerochaete chrysosporium* i *Trametes versicolor* degradujące ligninę w różnych warunkach wykazała, że peroksydaza manganu jest głównym enzymem biorącym udział w degradacji polietylenu. W ramach metabolizmu wtórnego mikroorganizmy posiadają naturalną zdolność przekształcania lub gromadzenia różnych związków, w tym węglowodorów, substancji farmaceutycznych i metali [1, 9]

2.2. BIODEGRADACJA NAPEŁNIACZY LIGNOCELULOZOWYCH

Biokonwersja lignocelulozy do substancji chemicznych przez działanie mikroorganizmów umożliwia otrzymywanie odnawialnych i opłacalnych produktów przemysłowych pochodzących z lignocelulozy. Biotransformacja jest możliwa ponieważ bakterie posiadają enzymy uniwersalnych szlaków metabolicznych, na dro-

dze których rozkładane są złożone substancje, w tym substancje aromatyczne od prostych fenoli do kompleksów polimerów ligninowych [15]. Niektóre bakterie zostały wyizolowane z celulozy, które zawierają enzymy degradujące lignocelulozę, mogą produkować cenne produkty przemiany materii. *A. aneurinilyticus* i *Bacillus sp.* mogą produkować przy odpowiednich warunkach kwas galusowy, kwas ferulowy, kwas cynamonowy i benzaldehyd [16].

Systemy bioremediacji reagują na drobno-ustroje natywne w zanieczyszczonych miejscach, zachęcając je do pracy poprzez dostarczanie im optymalnych poziomów składników odżywczych i innych substancji chemicznych niezbędnych dla ich metabolizmu [17]. Grzyby są najszybszymi degradatorami lignocelulozy. Z tego powodu były szeroko stosowane do przemysłowego przetwarzania odpadów i produkcji enzymów degradujących lignocelulozę [1, 18]. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus* i *Sporotrichum pulverulentum* stosowano do biodegradacji materiału lignocelulozowego lub do produkcji handlowej enzymów do degradacji lignocelulozy [1, 18, 19]. Degradacja lignocelulozy przez grzyby następuje przez działanie enzymów pozakomórkowych, które rozkładają polisacharydy [15]. Enzymy grzybów mają wyższą aktywność niż enzymy bakteryjne, lecz zazwyczaj są mniej aktywne w różnych środowiskach takich jak: wysokie pH, wysokie stężenie ligniny, lub ograniczenie tlenu [1, 20].

Większość bakterii izolowanych z papieru celulozowego jest γ -proteobakteriami (*Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Providencia*, *Pseudomonas* i *Serratia*). Niektóre z tych szczepów należą do rodziny Enterobacteriaceae składającej się z gram-ujemnych fakultatywnych bakterii beztlenowych, które mogą fermentować cukry do różnych produktów końcowych, w tym kwasu mlekowego. Inne bakterie gram-ujemne, które wyizolowano z celulozy należą do rodziny α -Proteobacteriaceae (*Novosphingobium* i *Pseu-*

dochrombactrum) i są scharakteryzowane przez niektóre istotne zdolności metaboliczne, do których zaliczamy degradację związków aromatycznych. Dwie β -proteobakterie, które są również gram-ujemne, wyizolowano z bambusa (*Cupriavidus* i *Pandoraea*). Dodatkowe bakterie izolowane z celulozy należą do rodziny *Bacillaceae* (*Aneurinibacillus*, *Bacillus* i *Paenibacillus*), które są gram-pozytywnymi bakteriami tworzącymi zarodniki, które są również fakultatywnie beztlenowe [1]. Z gleby wyizolowano gatunek *Paenibacillus*, który jest zdolny do rozkładania karboksymetylocelulozy i papieru filtracyjnego przez wytwarzanie pozakomórkowych enzymów [21]. Stwierdzono, że *Paenibacillus curdlanolyticus* wykazuje również zdolność do depolimeryzacji cukrów w różnych typach odpadów lignocelulozowych takich jak: łupiny kukurydzy, trzcina cukrowa czy słoma ryżowa [22].

2.3. BIODEGRADACJA PET

Najnowsze publikacje naukowe opisują nową wyizolowaną bakterię *Ideonella sakaiensis* 201-F6, która może wykorzystać poli(tetraftalan etylenu), jako źródło węgla do wytworzenia energii. Bakterie te wytwarzają dwa typy enzymów zdolne do hydrolizy PET. Obydwa enzymy konwertują poli(tetraftalan etylenu) skutecznie na dwa przyjazne dla środowiska monomery kwas tereftalowy i glikol etylenowy. *Ideonella sakaiensis* 201-F6 jest w stanie metabolizować poli(tereftalan etylenu). W celu uzyskania energii z PET bakteria najpierw hydrolizuje poli(tetraftalan etylenu) za pomocą enzymu o nazwie *PETase* (hydrolaza PET) do kwasu mono(2-hydroksyetylo)tereftalowego (MHET), który potem w kolejnym kroku hydrolizuje przy użyciu enzymu *MHETase* (hydrolaza MHET) na monomery wyjściowego tworzywa sztucznego: glikol etylenowy i kwas tereftalowy. [23]. W doświadczeniach nad degradacją kopolimerów PET z poli(glikolem etylenowym) o ciężarze cząsteczkowym od 400 do 20 000 g/mol stosowano lipazy szcze-

pów *Candida cylindracea*, *Fusarium heterosporum* i *Rhizopus arrhizus* oraz esterazy *Pseudomonas* sp. i *Comamonas acidovorans*. Stwierdzono, że kopolimer był degradowany do poli(glikolu etylenowego) oraz jednostek tereftalowych. Największą aktywność degradacyjną wykazywała esteraza *Comamonas acidovorans*. Jedynie lipaza *Fusarium heterosporum* nie posiadała aktywności hydrolitycznej [24, 25].

3. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wiele rodzajów grzybów np. *Acremonium*, *Cladosporium*, *Debaryomyces*, *Emericellopsis*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pullularia*, *Rhodosporidium*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Aureobazidium*, *Chaetomium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Thermoascus*, *Penicillium roqueforti*, *Album Tritirachium* itp. i bakterii z rodzajów (*Brevibacillus*, *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Clostridium*, *Schlegelella*, *Pseudomonas*) jest w stanie degradować tworzywa sztuczne [22]. Udowodniono, że niektóre gatunki mikroorganizmów mogą degradować również szkodliwe pestycydy. Najsilniejszą aktywnością charakteryzują się bakterie z rodzajów: *Arthobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* i *Pseudomonas*; *Actinomycetale* z rodzaju *Nocardia* i *Streptomyces*; i grzyby *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* [24].

Biodegradacji najłatwiej ulegają polimery odznaczające się brakiem bocznych odgałęzień i możliwie jak największą liniowością, które zwiększają podatność makrocząstek na działanie enzymów. Poza tym podatność ta jest tym większa, im więcej w makrocząsteczce jest grup chemicznych wrażliwych na ich działanie (np. grupy estrowe, hydroksylowe, karboksylowe, eterowe). Na proces ten wpływają również: stopień krystaliczności, ciężar cząsteczkowy i brak wiązań sieciujących. Poza tym degradacja zależy także od takich czynników, jak rodzaj czynnych mikroorganizmów, warunki środowiskowe oraz kształt gotowego wyrobu [49].

Na podstawie przeprowadzonych analiz sformułowano następujące wnioski:

1. Wyniki badań dowodzą, że zarówno bakterie jak i grzyby są zdolne do przeprowadzania procesu biodegradacji tworzyw polimerowych.
2. Biodegradacji podlegają zarówno tworzywa ropo- jak i biopochodne.
3. Wśród polimerów syntetycznych najbardziej podatne na rozkład mikrobiologiczny są alifatyczne poliestry.
4. Obecność polimeru skłania lub zwiększa drobnoustrojową syntezę enzymów, które wydzielone do środowiska i zaadsorbowane na powierzchni tworzywa, rozrywają jego wiązania polimerowe.
5. Biodegradacja odpadów tworzyw sztucznych może rozwiązać wiele problemów związanych z ochroną środowiska, zwłaszcza w przypadku odpadów opakowań po środkach spożywczych jak i kompozytów.

LITERATURA:

6. Swapnil K. et al., *Microbial degradation of plastic: a review.*, J Biochem Tech., 2015, 6(1) s.952-961
7. Tokiwa Y., Calabia B., P., *Degradation of microbial polyesters.*, Biotechnol Lett., 2004, 26, s. 1181-1189
8. Seneviratne G., Tennkoon N., S., Weerasekara., *Polythene biodegradation by a developed Penicillium- Bacillus biofilm.*, Curr Sci., 2006., 90., s. 20-21
9. Rutkowska M., Heimowska A., Krasowska K., Janik H. *Biodegradability of Polyethylene Starch Blends in Sea Water.* Pol J Environ Stud., 2002, 11., s. 267-274
10. Arutchelvi J., et al., *Biodegradation of polyethylene and polypropylene.* Indian J Biotechnol., 2008, 7, s.9-22
11. Shah A., Hasan F., Hameed A., Akhter J., *Isolation of Fusarium sp. AF4 from sewage sludge, with the ability to adhere the surface of polyethylene.* Afr J Microbiol Res. 2009, 3(10), s. 658-663
12. Rajendran S. et al., *The Role of Microbes in Plastic Degradation.*, 2016
13. Krishna Mohan S., Srivastava T., *Microbial deterioration and degradation of polymeric materials.*, J Biochem Tech., 2010, 2(4), s. 210-215
14. Kyrikou I., Briassoulis E., *Biodegradation of agricultural plastic films: A critical review.* J Polym Engg., 2007., 15, s. 125-150
15. Gu J., D., *Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances.* Inter Biodete Biodeg., 2003, 52, s. 69-91
16. Mukherjee S., Chatterjee S., *Int J Curr Microbiol App Sci.*, 2014, 3(5), s. 318-325.
17. Gallert C., Winter J., *Bacterial metabolism in wastewater treatment systems.* Wiley-VCH, Weinheim, 2005, s. 1-48.
18. Ji-Dong Gu, *Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: Recent research advances.*, 2003 https://www.researchgate.net/publication/222967402_Microbiological_deterioration_and_degradation_of_synthetic_polymeric_materials_Recent_research_advances
19. Ji-Dong Gu, *Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review.*, International Biodeterioration & Biodegradation 59, 2007, s. 170-179
20. Chen Y., et al., *Kraft lignin biodegradation by Novophinogobium sp. B-7 and analysis of the degradation process.* Bioresour Technol., 2012, 123, s. 682-685
21. Raj A., et al., *Identification of low molecular weight aromatic compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) from kraft lignin degradation by three Bacillus sp.* Int Biodeterior Biodegrad., 2007, 59, s. 292-296
22. Kathiresan K., *Polythene and Plastics-degrading microbes from the mangrove soil.* Rev Biol Trop., 2003, 51(3), s.629-634
23. Sanchez C., *Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi.* Biotechnol Adv., 2009, 27, s. 185-194
24. Sun Y., Cheng J., *Hydrolysis of lignocellulose materials for ethanol production: a review.* Bioresour Technol., 2002, 82, s.1-11
25. Chandra R., Abhishek A., *Bacterial decolorization of black liquor in axenic and mixed condition and characterization of metabolites.* Biodegradation, 2011, 22, s. 603-611
26. Emtiazi G., Pooyan M., Shamalnasab M., *Cellulase activities in nitrogen fixing Paenibacillus isolated from soil in N-free media.* World J Agric Sci., 2007, 3(5), s. 602-608
27. Pakdeedachakiat W., Leelavatcharamas V., Piyatherawong W., *Effect of lignocellulose waste on xylanase and cellulose induction in Paenibacillus curdlanolyticus B6.* Thai J Biotechnol. 2008, 8, s. 10-14
28. Yoshida S., et al., *A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate).* Science, 2016, 351 ISSUE 6278.
29. Müller R. et al., *J. Biotechnol.*, 2001, 86, s. 87-95.
30. Kawai F., *J. Environ. Polym. Degrad.*, 1996, 4, s. 21-30.

Data wpłynięcia artykułu do redakcji: 19-07-2017

Data akceptacji publikacji do druku: 27-09-2017