UPPSALA
UNIVERSITET

I plastbergets botten:

mikroorganismernas roll för tillverkning och nedbrytning av plaster

Johannes Pohl

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2013
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

I plastbergets botten: mikroorganismernas roll för tillverkning och nedbrytning av plaster

Johannes Pohl

Självständigt arbete i biologi 2013

Sammandrag

Plast är ett mycket användbart material som ofta förekommer i många ändamål omkring oss, i allt från bärkassar till bilkarosser. Globalt används mer och mer plast för varje år, och därmed ökar plastavfallet ständigt. Plasten tillverkas i huvudsak av olja och kan inte brytas ned under överskådlig tid i miljön. Detta innebär en plastproblematik som existerar idag.
De oljebaserade plasterna bygger upp den stora diversitet av material som används. De är generellt icke- eller mycket svårnedbrutna. Nya plaster tillverkade av förnyelsebar råvara kallas bioplaster. De bioplaster som hittills har tagits fram domineras av stärkelsebaserade bioplaster, polylaktidplast (PLA) samt polyhydroxyalkaonaterna (PHA). Även plast baserad på cellulosaråvara kan tänkas bli aktuella. Den biologiska nedbrytningen sköts om av mikroorganismer inom svamp- och bakterieriket. Svampar har den största rollen initialt i nedbrytningen men även bakterierna är av stor vikt. Om polymeren bryts ned fullständigt och tas upp i cellen mineraliseras den. Nedbrytningen sköts ytterst av de enzymer som svampar och bakterier utsöndrar. Dessa bryter ned polymerens bindningar antingen med hydrolytisk eller oxidativ verkan. PHA är ett speciellt intressant exempel som tas upp närmare i arbetet då den både syntetiseras av bakterier och samtidigt lätt kan brytas ned biologiskt. I en kompostmiljö eller i en kontrollerad anaerob miljö kan det nedbrytbara avfallet behandlas och ge upphov till ny växtnäring. De nedbrytande enzymerna skulle kunna klonas in i andra mikroorganismer för att underlätta plastnedbrytningen. Bioplaster skulle kunna komposteras tillsammans med matavfall och ersätta mycket av dagens förpackningsmaterial. Det hela kan potentiellt bli en strategi för att konfrontera det växande plastavfallet. Plastproblematiken skulle alltså kunna bemötas med dels biologiskt nedbrytbara och förnyelsebara bioplaster och dels med fortsatta och fördjupade studier av de mikroorganismer som kan bryta ned dem.

Inledning

Plast används flitigt världen över för tillverkning av allt från matkassar till bilkomponenter. Materialet har närmast revolutionerat våra möjligheter att producera föremål och dess egenskaper har stor betydelse inom ett mycket brett användningsområde. Dock medför användandet av plasten två inneboende problem; beroendet av icke-förnyelsebar olja och det icke-nedbrytningsbara avfallet som genereras (Amass et al. 1998).

Olja är den huvudsakliga råvaran vid tillverkningen av dagens plaster. Det finns en risk att oljepriset kommer att stiga framöver då oljeutvinningen globalt ser ut att minska. En rapport har förutspått en möjlig fördubbling av oljepriset till år 2021 baserat på den globala oljetillgången (Benes et al. 2012). Tidsaspekten ska behandlas kritiskt, men rapporten stärker farhågorna om att oljans tillgänglighet, och därmed pris, inte kommer att förbli oföränderlig. Detta är ett av problemen med dagens plaster, och de kommer att behöva ersättas av andra råmaterial så småningom.

Den globala produktionen av syntetiska plaster uppgick till 280 miljoner ton år 2010 (PlasticsEurope 2013). Efter sig lämnar denna plast en betydande mängd avfall. Plastavfallet har benämnts som ett globalt miljöproblem. Avfallet spås vara beständigt i miljön upp mot hundratals eller tusentals år och orsakar bland annat stora problem för djurlivet på grund av bland annat kvävning (Barnes et al. 2009). Inom EU uppgick förpackningsavfallet, där plast utgör en betydande andel, till 56, 3 miljoner ton under 2004 (PIRA-ECOLAS 2005). I Sverige samlades 218 838 ton plastavfall in under året 2010, vilket var en kraftig ökning från år 2004 då 147 000 ton samlades in (Naturvårdsverket 2007, 2012). År 2010 slängde hushållen i Sverige 11 kilo plast per person (Naturvårdsverket 2012). Avfallsmängderna kommer i Sverige att fördubblas till 2030 om inga åtgärder vidtas (Östblom et al. 2010). Plastens höga volym i förhållande till dess vikt gör att den blir en relativt utrymmeskrävande fraktion på soptipparna (Palmisano & Pettigrew 1992). I USA är deponering av plastavfall den dominerande metoden för sophanteringen (Kale et al. 2007), och den växande andel mark som måste stå till förfogande för avfallsmassorna gör detta problematiskt.

EU:s avfallshierarki rangordnar olika alternativ för avfallsbearbetning. Detta ska främja ett livscykeltänkande och tillämpas så att miljön hamnar i fokus. Avfallshierarkin beskriver att högsta prioritet bör ligga på att själva mängden avfall ska minska. Därefter att återanvändning- och vinning ska premieras. Sist i rangordningen kommer förbränning och deponi (EU 2008). Dessa ska införlivas av samtliga medlemsländer. I Sverige är det sedan 2002 förbjudet att deponera brännbart material, så som plaster, enligt förordning (2001:512) om deponering av avfall. Naturvårdsverkets nationella mål för total återvinning för plast, där både energiåtervinning genom förbränning och materialåtervinning ingår, är 70 procent varav Sverige förmådde 36 procent år 2010 (Naturvårdsverket 2012)

Det fossilbaserade plastavfallet kommer som tidigare nämnts att öka i massa globalt. Då plasten påverkar både miljön och koldioxidutsläpp genom förbränning väljer jag att kalla detta för en *plastproblematik*. Hur kan denna potentiellt angripas?

I detta litteraturarbete kommer två olika aspekter av denna problematik att undersökas; bioplaster och mikrobiella nedbrytare som svampar och bakterier. Bioplaster, det vill säga plaster som inte är fossilbaserade utan görs på förnyelsebar kolråvara och är biologiskt nedbrytbara, är intressanta att undersöka då de skulle kunna ersätta vissa oljebaserade plaster. Mikrobiella nedbrytare kan ha egenskaper som kan tänkas vara nyttiga för biologisk nedbrytning av plast. För att undersöka detta kommer även ett nedslag i själva nedbrytningsmekanismen presenteras. Avslutningsvis ges bioplasten polyhydroxyalkaonat (PHA) som ett exempel på en mycket intressant kandidat bland de biologiskt nedbrytbara plasterna att diskuteras närmare. Uppsatsen tar nu avstamp i att presentera själva materialet plast.

Materialet plast

Plast är det vardagliga namnet på ett mycket mångsidigt, tåligt och formbart material. Det stora omfånget av materialegenskaper gör plast till ett åtråvärt material i industrin. Plasterna har använts flitigt till bland annat olika typer av förpackningar och emballage och har i många fall helt ersatt andra material som metall, glas och keramik (Mohanty et al. 2000). Plast är uppbyggt av monomerer som fogas samman i långa kedjor genom polymerisation, och plast är därmed ett polymer.

Plastmaterialen kan delas in i de två huvudgrupperna termoplaster och härdplaster, där termoplasterna mjuknar och smälter vid uppvärmning medan härdplasterna inte gör detta på grund av en kemisk härdningsreaktion i tillverkningsprocessen. Härdningsreaktionen får plastens polymera kedjor att tvärbinda, det vill säga sammankopplas (Krugloff 1997). Plast kan även klassificeras med avseende på om den är baserad på fossila material (ämnen från oljeindustrin) eller förnyelsebara källor (ämnen syntetiserade av levande organismer). Dessa kallas även konventionella plaster respektive bioplaster. I andra led klassificeras den enligt den biologiska nedbrytbarheten; Icke biologiskt nedbrytbar, biologiskt nedbrytbar eller komposterbar är de tre indelningsklasserna (Song et al. 2009). Viktigt att nämna här är att den biologiska nedbrytbarheten inte alltid hänger ihop med ursprungsmaterialet *per se*; det finns både bioplaster som inte kan brytas ned biologiskt och konventionella plaster som är biologiskt nedbrytbara. De konventionella plasterna är dock i allmänhet inte nedbrytbara i någon större utsträckning. De är syntetiserade av fossilbaserad råvara i industriella tillverkningsprocesser och förekommer inte naturligt i miljön och har därmed inga direkt associerade nedbrytare, som är fallet med andra naturligt förekommande polymer som till exempel cellulosa. Oförmågan att effektivt brytas ned i miljön, persistensen, är ett problem i sig. Avvägningen mellan hållbarhet och nedbrytbarhet är uppenbar vid utvecklingen av plasterna, högre hållbarhet ger vanligtvis en lägre nivå av nedbrytbarhet (Palmisano & Pettigrew 1992).

De två typerna av plaster, konventionella och bioplaster, kommer nu kort att presenteras i en sammanfattning.

Konventionella plaster

Här presenteras ett urval av några av de mest använda plasterna, varav PE, PVC, PS, EPS och PET tillhörde världens mest producerade år 2010 (PlasticsEurope 2013).

Polyeten (PE)

PE ingår i termoplasterna. Egenskaper såsom resistens mot vatten, fysisk påverkan och låga tillverkningspris gör PE till ett populärt plastmaterial. PE tillverkas av alkenen eten, som med sin dubbelbindnings reaktivitet gör polymerisationen enkel. Molekylstrukturen, närmare bestämt den varierande längd på de sidokedjor som strålar ut från huvudkedjan, styr materialets egenskaper med avseende på bland annat transparens och hållfasthet. Ett exempel är lågdensitetspolyeten, PE-LD, som främst används för tillverkning av plastfilm vilket ofta återfinns i bärkassar (Krugloff 1997).

Polypropen (PP)

En termoplast med liknande egenskaper som PE, men som är hållfastare. Den används främst till bland annat flaskor, rör, isolering till elektronik och höljen för till exempel vitvaror (Krugloff 1997).

Polyvinylklorid (PVC)

En termoplast som främst används till byggmaterial som till exempel rör, golvmaterial och kabelisolering (Krugloff 1997). PVC brukar blandas upp med mjukgörare, till exempel ftalater, för att justera materialegenskaperna.

Polystyren (PS)

Polystyren är en termoplast och en av de vanligaste plastsorterna. Den förekommer i många olika former, däribland som expanderad polystyren (EPS) och används främst till engångsförpackningar (Krugloff 1997).

Polyetylentereftalat (PET)
PET är en termoplastisk esterplast (en polyester) med det största användningsområdet inom transparanta förpackningar, främst dryckesflaskor (Krugloff 2007). Denna plast kännetecknas av strukturell styrka och låg gaspermeabilitet vilket gör den lämplig för just kolsyrade drycker, samt låg vikt och en icke-toxisk effekt på människan (Paszun & Spychaj 1997).

Polyuretan (PUR)
Härdplasten PUR är en plast med mångfacetterad förekomst; den kan vara elastisk eller hård. Dess användningsområden är många och omfattar bland annat gjutmassa och elektriskt isoleringsmaterial (Krugloff 1997). Vissa typer av PUR är på grund av sina molekylbindningsegenskaper tämligen angripbar för nedbrytande mikrober, och utgör därmed ett undantag bland de konventionella plasterna (Nakajima-Kambe et al. 1999).

Polyamid (PA)
PA är termoplaster med amidgrupper. De har generellt en stor grad av mekanisk styrka och används ofta som slitstarka komponenter som till exempel kugghjul. De starka intermolekylära krafterna i polyamiderna på grund av dess funktionella grupper gör plasten kristallin och svår att bryta ner (Chandra & Rustgi 1998). Vissa har dock visat sig vara relativt biologiskt nedbrytbara. Polykaprolakton (PCL), även kallad PA-6, är ett exempel på en nedbrytbar PA-plast (Gross & Kalra 2002).

Oxo-biodegraderbara plaster (OXO)
Vissa företag marknadsför konventionella plaster med tillsatta additiv som ska underlätta en så kallad ”oxo-biodegradering” av plasten. Dessa additiv kan enligt marknadsförarna göra den konventionella plasten ”grön”, utan att kräva en omställning i den industriella tillverkningsprocessen. Studier av Kale et al (2007) på en av dessa plaster påvisar dock ingen synbar nedbrytning alls i kompostmiljö inom enöverskådlig tid. Därmed bör, menar författaren, ”oxo-biodegraderingens” effektivitet studeras mer (Kale et al. 2007).

Bioplaster
Till skillnad från de konventionella plasterna, vars beståndsdelar utgår från fossila ämnen, är bioplasterna baserade på förnyelsebar råvara. De är attraktiva då de generellt är biologiskt nedbrytbara och samtidigt kan ha samma egenskaper som de konventionella plasterna (Bastioli 2001). Bioplasterna börjar också få tillämpningar för material som måste vara icke-nedbrytbara, till exempel tyger och industriella komponenter (Bastioli 2001). Bioplasterna utgör i dagens läge endast en mindre del av tillverkningsvolymen i jämförelse med de konventionella plasterna (Song et al. 2009), dels på grund av det högre priset och dels att materialet inte har nått samma tillämpnings- och nyttograd som de konventionella plasterna (Krugloff 2007).

Det råder vissa oklarheter i vilka plaster som ska få kallas bioplaster, nedbrytbara plaster, komposterbara och så vidare. Olika plaster av en enorm mångfald av ursprungsmaterial marknadsförs av flera tillverkare världen över. För att få en möjlighet att kunna överblicka dessa plasters egenskaper har olika cerifierings-standarder börjat tillämpas. Ett urval av dessa är ISO (International Organization for Standardization), ASTM och JIS (Japanese Industrial Standards). För att kunna märka en plast som till exempel komposterbar krävs det att den

genomgår utförliga labbtester där bland annat graden av mineralisering, en process som förklaras nedan, undersöks (Song et al. 2009).

Bland bioplasterna kan de två huvudgrupperna stärkelsebaserade och PLA-baserade plaster urskiljas, men även polyhydroxyalkanoater och cellulosaderivatplaster (Bastioli 2001).

Stärkelsebaserade plaster
Stärkelse är en relativt billig och lättillgänglig råvara som kan upparbetas för att skapa en termoplast-lik massa (Bastioli 2001). Denna är dock känslig för omgivningsfaktorer som till exempel luftfuktighet och måste därför blandas upp med andra plastmaterial som till exempel PCL (Bastioli 2001). Plastblandningar av PE och stärkelse kan öka nedbrytningsgraden av plasten men minskar samtidigt hållfastheten (Chandra & Rustgi 1998). Dock så kvarstår PE efter att stärkelsen har brutits ned av mikroorganismer, men denna kvarvarande plast sväller och förlorar därefter successivt sin hållfasthet (Goheen & Wool 1991). Sedan Italien förbjöd konventionella plastpåsar 2011 har en markant ökning i försäljning av bioplast-baserade plastpåsar förekommit, främst av stärkelseplastvarianten Mater-bi (MB) (Accinelli et al. 2012). MB-plastpåsar bidrar till en mindre miljöpåverkan både vid tillverkning och vid avfallshantering jämfört med PE-plastpåsar enligt en livscykel-analys som ett producentföretag utförde (Bastioli 2001).

Polylaktid (PLA)
Polylaktid är en polyester som tillverkas genom polymerisation av mjölksyra, ofta från fermenterad majs (Shah et al. 2008). Vanliga tillämpningsområden är formgjutna engångsartiklar, muggar och planteringslådor (Shah et al. 2008). PLA kan blandas upp med stärkelse i syfte att öka nedbrytbarheten och minska produktionskostnaderna (Shah et al. 2008). Detta kan dock göra den spröd och då måste andra additiv som till exempel glycerol och sorbitol tillsättas (Shah et al. 2008). Vidare är PLA relativt svår att mineraliseras i kompost; plasten behöver förbehandlas med hydrolys innan nedbrytningen tar fart (Kale et al. 2007).

Polyhydroxyalkanoater (PHA)
PHA-plasterna är en grupp termoplastiska polyestrar som härstammar från bakterier (Kale et al. 2007). De har väckt ett stort intresse som en potentiell ersättare av vissa konventionella plaster på grund av sina mångsidiga egenskaper och biologiska nedbrytbarhet (Madison & Huisman 1999). PHA kommer att behandlas närmare längre ned i avdelningen ”Exemplet polyhydroxyalkanoaterna”.

Biologisk nedbrytning

Plast som blivit kvarlämnad i miljön påverkas av faktorer såsom ljusnedbrytning och erosion (Swift 1993). Dessa abiotiska faktorer tär på plasten och kan i längden stärka fotfästet för kolonier av mikroorganismer som kan påbörja biologisk nedbrytning. Primär biologisk nedbrytning kan också påverka plasten biokemiskt och bryta ner den ytterligare (Palmisano & Pettigrew 1992). Plasten bryts således ned i mindre fragment. Dessa antingen mineraliseras, det vill säga bryts ned i beståndsdelar (som koldioxid, vatten eller metan) av biologiska nedbrytare och återgår sedan i den biologiska cykeln, eller stannar motsträvigt kvar i miljön med varierande, och i många fall oklar, effekt på omgivningen och dess organismer (Swift 1993).

Alexander (1981) beskriver mineraliseringsprocessen närmare. Det är främst bakterier och svampar som ansvarar för den största delen av mineraliseringen av främmande material i miljön. De mineraliserar ett organiskt material genom att aktivt ta upp kolet och samtidigt alstra energi vilket medför en tillväxt. Vissa material som inte kan användas direkt som energikälla och bidra till nedbrytares tillväxt kan dock också brytas ned i närvaro av ett sekundärt energigivande substrat, vid en process kallad co-metabolism. Skillnaden mellan co-metabolismens och mineraliseringens verkan är främst dess hastigheter. Co-metabolism av ett ämne sker hypotetiskt mycket långsamt och utan nämnvärd tillväxt av nedbrytarpopulationen. Mineraliseringen av ett ämne sker däremot snabbt och med en kraftig ökning av populationen. Utöver de ämnen som mineraliseras eller bryts ned i co-metabolismen finns motsträviga ämnen som verkar vara orörda av nedbrytare under överskådlig tid (Alexander 1981).

Nedbrytningen bygger alltså på att materialet är möjligt att bryta ned, samt att de faktorer som behövs för de nedbrytande mikroorganismernas arbete är uppfyllda (Kale et al. 2007).

Abiotiska faktorer som påverkar nedbrytningsprocessen

Omgivningens egenskaper
Vattentillgången är en faktor som spelar in på två olika sätt (Kale et al. 2007); dels för att tillgodose mikrobernas tillväxt och förökning och dels på grund av den hydrolytiska uppbrytningen av polymerens kedjebindningar som sker i vissa polymer. En andra abiotisk faktor som spelar in är temperaturen. När temperaturen höjs (till en viss gräns) ökar både hastigheten av mikroorganismernas aktivitet och hastigheten av hydrolysen (Kale et al. 2007). Även pH-värdet inverkar på både hydrolysen och mikroorganismernas nedbrytning (Kale et al. 2007). Syretillgången är också en viktig faktor för nedbrytningen. Aeroba mikroorganismer konsumerar polymerens kol under användningen av syrgas med biprodukterna koldioxid och vatten som följd (Kale et al. 2007). Syrefattiga miljöer präglas av anaeroba nedbrytare som ger metan och koldioxid som biprodukter vid konsumeringen av polymerens kol.

Polymerernas egenskaper
Polymerens egenskap kan också betraktas som en abiotisk faktor i den biologiska nedbrytningen. Här spelar dess struktur, flexibilitet, kristallinitet, molekylvikt, komposition och form roll (Kale et al. 2007). Strukturen och flexibiliteten hos en polymer påverkar hydrolysen och det nedbrytande enzymets nedbrytningseffektivitet; Då en flexiblare polymerkedja böjs frigörs områden som kan angripas av hydrolysen och enzymer (Kale et al. 2007). Flexibiliteten hos en polymer beror dels på vilken typ av kemiska bindningar som utgör dess huvudkedja och dels på längd och storlek på eventuella sidokedjor (Kale et al. 2007). Kristalliniteten är ett mått på molekylens ”ordning”. En hög kristillinitet försvårar nedbrytning (Kale et al. 2007). Molekylvikten spelar en stor roll som faktor vid nedbrytningen av en plast. Om en polymer-molekyl är för stor kan den inte tas upp av mikroorganismen (Kale et al. 2007). Endast små fragment av en polymer kan tas in i cellen och omsättas till metaboliter av mikroorganismen (Chandra & Rustgi 1998). Därmed bryts en polymer med liten molekylvikt lättare ner biologiskt, alternativt om en stor molekyl först faller sönder genom spontan hydrolys genom vatten eller enzymatisk verkan. Polymerens komposition betecknar hur den är uppbyggd och vilka co-monomerer den innehåller. Exempel på co-monomerer är tillsatta aromatiska, det vill säga ringformiga, grupper till huvudkedjan som gör polymeren mer rigid och svårare nedbrytbar (Kale et al. 2007). Andra co-monomerer kan påverka plasten så att kristalliniteten minskar och nedbrytningsförmågan ökar. Plastens

form spelar också roll med avseende på hur stor yta som vatten samt mikroorganismerna och dess enzymer kan komma åt (Kale et al. 2007).

Huvudkedjans uppbyggnad i sig är betydelsefull för plastens nedbrytbarhet. Fossilbaserade konventionella plaster har ofta en huvudkedja som endast består av kolatomer. Denna bindning motstår vattenhydrolysen och enzymatisk verkan och gör dessa plaster generellt oangripbara för mikroorganismer (Kale et al. 2007). Andra plaster, och däribland många bioplaster som PLA, PHA och PCL, består av huvudkedjor där andra atomer utöver kolatomer ingår. Dessa kan vara syre- eller kväveatomer. Denna typ av kedja, heterokedja, genomgår spontan hydrolys snabbare och är lättare angripbar för mikroorganismer än kolkedjor (Kale et al. 2007). Viktigt att nämna här är att plaster med en hetero-kedja som huvudkedja inte i sig är lätta att bryta ned. Det är även en fråga om plastens grad av kristallinitet. Vatten får svårare att tränga in och hydrolysera plasten i en kristallin plast än en amorf plast (Kale et al. 2007). Ett exempel på en mycket kristallin polymer med en hetero-kedja är PLA som kan brytas ned biologiskt endast genom hydrolytisk efterbehandling (Kale et al. 2007).

Biotiska faktorer som påverkar nedbrytningsprocessen

Mikrobiotans egenskaper, såsom dess lokala artrikedom, diversitet och adaptivitet, är så klart fundamentala faktorer vid den biologiska nedbrytningen av plast. De kan agera nedbrytande i populationer eller i ett konsortium av olika populationer tillsammans. Större djur, till exempel gnagare, kan fragmentera plasten och på så vis understödja den fortsatta biologiska nedbrytningen av den (Palmisano & Pettigrew 1992). Svamparnas och bakteriernas användning av polymeren som kolkälla utgör den huvudsakliga processen i den biologiska nedbrytningen av plast (Chandra & Rustgi 1998).

Mikroorganismer som bryter ned plast

Mikroberna huserar i stort sätt alla tänkbara miljöer på jordklotet. Dessa bryter ner organiskt material för att tillgodoräkna sig kolet och energin. Det finns även mikroorganismer (arkéer) som kan leva av icke-organiska material, t.ex vissa extremofiler. För att ta reda på vilka mikroorganismer som kan växa på och därmed bryta ned plasten görs vanligtvis ett jordinkubationstest (Chandra & Rustgi 1998). Detta går ut på att en bit plast av ett visst slag lämnas att bli koloniserad av mikrobiota varefter den ytskrapas och biomassan analyseras genetiskt. Det verkar som att vissa grupper av svampar och bakterier är särskilt välrepresenterade vid många försök och dessa har studerats närmare. Många helt nya mikroorganismer har också upptäckts och katalogiserats. Nu kommer en överblick ges över några av dessa nedbrytande mikroorganismer.

Svamp

Barratt et al. (2003) gjorde en studie på nedbrytbarheten av plasten PUR i jordinkubation som visade att svampen *Geomyces pamorum* (Ascomycota) var den avgörande faktorn för plastens nedbrytning. Efter 44 dagar kunde man genom svepelektronmikroskop (SEM) se nätverk av hyfer och sporer som omgärdade plaststyckena. Under dessa kunde skador, sprickor och missfärgning märkas. En signifikant försvagning av polymeret (upp till 60 %) skedde i en jordfuktighet mellan 20 och 80 %. Tio och 90 % fuktighet gav inte underlag till mikrobiell nedbrytning. Därmed kan det konstateras att jordens fuktighet spelar roll vid nedbrytningen. Dessa jordar härbärgerade även störst mängd svamptillväxt. Sammansättningen av dessa svampar bestod till största delen av filamentösa svampar (Barratt et al. 2003). Cosgrove et al. (2007) utförde ett liknande försök där en neutral respektive sur jord i ett trädgårdsland nära Manchester, Storbritannien, undersöktes med avseende på nedbrytbarheten av plasten PUR *in*

situ. Efter fem månader hade den brutits ned relativt kraftigt. *Geomyces pamorum* växte mest i den sura jorden och en art av släktet *Phoma* i den pH-neutrala. Diversiteten av svamparna på själva plastbiten var lägre än i den omgivande jorden vilket visar på att plasten inte kan brytas ned av alla svampar utan av vissa specifika arter (Cosgrove et al. 2007).

Sabev et al. (2006) undersökte PVC-plast med och utan ftalat-tillsats, begravd i jorden i gräsmark och blandskog i Bulgarien. Studien visade en kraftig myceltillväxt på plastens yta med hyfer som hade borrat sig likt kanaler in i plastens innandöme, och totalt 42 olika stammar av svampar isolerades genom rDNA-sekvensering. Hos plasten i gräsmark stod *Penicillium janthinellum* (Ascomycota) som den i allmänhet störst förekommande kolonisatören, dock utan förekomst på den ftalat-tillsatta PVC-plasten. I blandskogsjord förekom *Penicillium sweicickii* mest, även den dock utan tillväxt på den ftalat-tillsatta PVC-plasten. Sabev et al. (2006) konstaterar, liksom Barratt et al. (2003), att svampkoloniseringen stod för den viktigaste faktorn i plastens nedbrytning *in situ*.

Studier av MB-plastens nedbrytning in vitro i prover från fyra olika italienska miljöer gjordes av Accinelli et al. (2012). Dessa prov bestod av jord från åkermark, mogen kompostjord samt vattenprover från en sötvattenslagun respektive det Adriatiska havet. Proven valdes ut för att få en överblick över nedbrytningsprocessen i dessa skiftande men troliga platser för slängda plastpåsar. Parallellt sattes plastbitar ut *in situ* för att jämföra eventuella skillnader mellan labbet och utemiljön. Efter 90 dagar hade plasten brutits ned väsentligt i kompostjorden och i åkerjorden. I åkerjorden *in situ* skedde dock en betydligt långsammare nedbrytning, enligt författarna troligtvis på grund av den låga jordfuktigheten vid försöket som påverkade nedbrytarna i jorden negativt. Vatteninkubationen visade inte heller på någon kraftig mikrobiell nedbrytning. Filamentösa svampar stod för den huvudsakliga nedbrytningen av MB, men även bakterier visade sig kunna använda MB som exklusiv kolkälla. Arter ur genus *Aspergillus* var här vanligt förekommande (Accinelli et al. 2012).

Lignin-nedbrytande svampar som vitrötesvampen *Phanerochaete chrysosporium* (Ascomycota) och *Trametes versicolor* (Basidomycota) samt IZU-154 (Deuteromycotina) är mycket effektiva nedbrytare av ved och verkar också kunna ha de egenskaper som krävs för plastnedbrytning (Iiyoshi et al. 1998). Detta kommer att nämnas nedan i samband med oxidativa enzymer. Svamparna spelar följaktligen en stor roll i den biologiska nedbrytningen men är ofta inte ensamma aktörer i denna process. Bakterier har också visat sig vara betydelsefulla för den biologiska nedbrytningen av plast.

Bakterier

Arter ur *Pseudomonas*-släktet (Proteobacteria) har uppmärksammats av flera forskare på grund av sina möjliga plastnedbrytningsegenskaper. Kyaw et al. (2012) undersökte plasten lågdensitetspolyeten (PE-LD) för sin nedbrytningsverksamhet. Efter 40 dagar bildades en biofilm på PE-LD vilket indikerar att substratet kan användas som kolkälla av bakterierna. Frilevande bakterieceller visade på en parallell tillväxt i samma hastighet. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 hade bäst nedbrytningsförmåga då den orsakade viktminsking av substratet på 20 %, samt gjorde plasten betydligt sprödare (Kyaw et al. 2012). Lefèvre et al. (1999) undersökte hur 13 olika arter av *Pseudomonas* skulle lyckas bryta ned olika estrar som bygger upp olika polyestrar såsom PET. De olika arter som undersöktes hade isolerats från kompost- och trädgårdsjord. Alla utom en av de undersökta stammarna visade sig bryta ner estern TA effektivt, men ingen av dessa bröt ned polyestern PET (Lefèvre et al. 1999). Detta skulle kunna indikera att bakterier, till exempel ur släktet *Pseudomonas*, kan bryta ned kortare beståndsdelar, eller monomerer, av en plast men inte en hel kedja. Mergaert et al. (1996)

isolerade nya stammar av *Pseudomonas lemoignei* vid en nedbrytningsstudie av en PHA-plast.

Nagarajan et al. (2006) undersökte mikroorganismers nedbrytningseffektivitet på plasten Biomax®, som marknadsförs som en komposterbar PE-baserad plast. I bioreaktorer inkuberades monomerer av plasten med ett mikrobkonsortium från kompostjord med tillsats respektive avsaknad av extra näring. Studien visade på att nedbrytningen av Biomax® skulle kunna vara co-metabolisk, då den skedde i närvaro av extra tillsatt näring men inte utan (Nagarajan et al. 2006). I en kompostmiljö kan det antas att en näringstillsats blir onödig då annat avfall i komposten bidrar som kolkälla (Nagarajan et al. 2006). Nedbrytningen hade enligt studien ett samband med bakteriella faktorer då kontrollen i vattenlösning inte hade brutits ned alls efter mer än ett år. Mikroberna som isolerades av Nagarajan et al. (2006) visade sig tillhöra 35 olika stammar av bakterier, varav en *Xanthomonas sp* (Proteobacteria) var synnerligen välrepresenterad. Dock hade denna, och flera andra av de isolerade bakterierna, en ganska låg identifieringsgrad (Stackebrandt & Goebel 1994) vilket antyder att det här kan röra sig om helt nya arter (Nagarajan et al. 2006).

Polyuretan (PUR), det biologiskt nedbrytbara undantaget bland de konventionella plasterna, kan användas helt som kol och kväve källa av den gram-negativa bakterien *Comamonas acidovorans* TB-35 (Nakajima-Kambe et al. 1995). Även *Pseudomonas chlororaphis* kan utnyttja PUR som enda kol- och energikälla (Ruiz et al. 1999).

Enzymer

Enzymerna är centrala i plastnedbrytningen då biologisk nedbrytning i sin yttersta form är en enzymatisk reaktion (Kale et al. 2007). En polymer är biologiskt nedbrytbar först då den innehåller funktionella grupper som är angripbara och åtkomliga för nedbrytande enzym som utsöndras av mikrobiotan (Palmisano & Pettigrew 1992). Enzymer katalyserar kemiska reaktioner genom att reducera aktiveringsenergin för dessa. Katalysens effektivitet bygger dels på att substratet binder specifikt till enzymens aktiva centrum och dels att pH- och temperaturparametrar är optimala för enzymet. Enzymer är därmed specifika till sina substrat, som måste passa in i enzymets aktiva centrum, och är även beroende av faktorer i sin omgivande miljö.

Enzymer från mikroorganismer eroderar plastens yta, så kallad yterosion. Bindningar inuti plasten bryts ned av antingen spontan hydrolys av vatten, eller av utsöndrade enzymer, så kallad volymerosion. Dessa två typer av erosion sker ibland parallellt i en nedbrytbar plast (Kale et al. 2007). Enzymatisk aktivitet sker oftast i en vattenlösning med lösta ämnen som enzymerna lätt kommer åt (Nakajima-Kambe et al. 1999). Enzymer som kan bryta ned solida icke-vattenlösliga material som plast måste därmed vara speciellt anpassade för detta (Nakajima-Kambe et al. 1999).

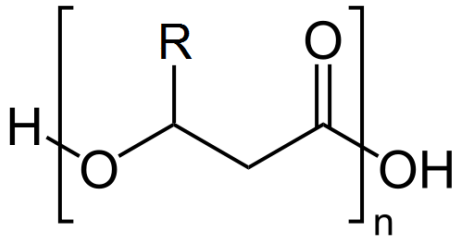
Den biologiska nedbrytningens enzymatiska mekanism kan generellt delas in två kategorier; enzymatisk oxidation samt enzymatisk hydrolys. Enzymatisk oxidation utförs endast av aeroba mikroorganismer (Kale et al. 2007). Lignolytiska svampar som kan bryta ned cellulosa och annan växtmassa har väckt intresse då deras lignolytiska förmågor skulle kunna appliceras på konventionell plast. De lignolytiska egenskaperna hos ett enzym som kan bryta ned ved bygger i huvudsak på grundämnet mangan (Mn) som ingår i enzymet manganperoxidas (Iiyoshi et al. 1998). Manganperoxidas kan bryta ned plasterna Nylon-66 och PE (Deguchi et al. 1997), (Iiyoshi et al. 1998))

Enzymatisk hydrolys kan utföras av både aeroba och anaeroba mikroorganismer (Kale et al. 2007). Två hydrolas som bryter ned PUR träder fram som intressanta att här lyfta fram som exempel. Den första är ett extracellulärt enzym som isoleras från bakterien *Pseudomonas chlororaphis* som hydrolytiskt delar upp PUR-kedjan i mindre bitar som i sin tur förstärker nedrytningen av PUR (Ruiz et al. 1999). Den andra är ett membranbundet enzym som har beskrivits av Akutsu et al (1998). Den tidigare nämnda bakterien *Comamonas acidovorans* TB-35 kan angripa och bryta ned PUR genom en två-stegsprocess. Först fäster sig bakteriecellen på plastens yta via det membranbundna enzymets hydrofoba domän. Därefter börjar den katalytiska domänen hydrolysera ester-föreningarna i PUR-huvudkedjan och påbörjar nedbrytningsprocessen (Akutsu et al. 1998).

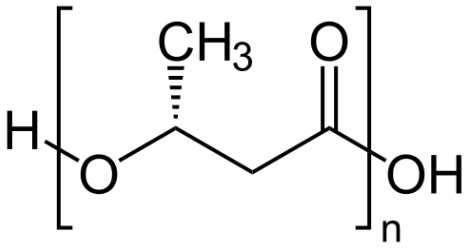
Efter att ha konstaterat enzymernas centrala roll i plastens nedbrytning kommer ett exempel på en intressant bioplast nu att förklaras djupare. Syftet med denna exempelstudie är att integrera mikroorganismernas betydelse för framtida utveckling av biologiskt nedbrytbar bioplast. Exemplet som nu presenteras är polyhydroxyalkaonat (PHA).

Exemplet Polyhydroxyalkaonaterna

Polyhydroxyalkaonaterna (PHA) är en uppsättning av makromolekyler som syntetiseras av flera olika bakterier. Så mycket som 90 % av en bakteries torrmassa kan bestå av PHA, och anledningen till PHA-syntesen verkar vara dels att spara kol i fast form inuti cellen och dels att reglera bakteriecellens osmos (Madison & Huisman 1999). PHA kan också polymeriseras till kornformade strukturer som kallas för granula vilka förvaras inuti bakterien som ett energiförråd inför sämre tider. PHA är i allmänhet linjära polyestrar med en uppsjö av olika typer av kedjekonfigurationer som skänker dem en stor variation i egenskaper (Madison & Huisman 1999). Bland annat substitueras R-gruppen i polyhydroxyalkaonat (figur 1) med olika funktionella grupper som i sin tur orsakar denna variation. Sampolymerisation av olika PHA med andra ämnen kan ge en betydande mängd helt nya biologiska polymermaterial som uppvisar identiska egenskaper i förhållande till många av de konventionella plasterna (Madison & Huisman 1999).



Figur 1: Grundstrukturen av polyhydroxyalkaonat, PHA



Figur 2: Polyhydroxybutyrat, P(3HB)

Den vanligaste och mest studerade medlemmen i PHA-gruppen är polyhydroxybutyrat P(3HB) (Madison & Huisman 1999). P(3HB) kännetecknas av en substituerad metylgrupp (figur 2). Den franske vetenskapsmannen Maurice Lemoigne var år 1926 den förste att upptäcka att monomerer av P(3HB) producerades av bakterien *Bacillus magetarium* (Prieto 2006). P(3HB) befinner sig i en flytande, amorf, form inuti cellen men formar en starkt kristallin och spröd struktur när den väl extraheras från cellen (Madison & Huisman 1999). Denna kristallina och spröda egenskap kan dock kringgås med bioteknologiska hjälpmedel.

Till exempel kan sprödheten och gas- och vattenpermeabiliteten minska om man får P(3HB) att sampolymerisera med andra ämnen, som till exempel ketonkroppen 3-hydroxyalvaorat (Madison & Huisman 1999). Den kan då mäta sig med plasten polypropylen (PP) med avseende på dess egenskaper (Mousavioun et al. 2012). P(3HB) är en så kallad kort-sidokedje-PHA. Det finns även bakterier som syntetiserar PHA med längre sidkedjor, mellan- och lång-sidokedje-PHA. Bakterier som kan producera P(3HB) kan generellt inte producera PHA av den längre varianten och vice versa (Luengo et al. 2003). När *Pseudomonas oleovorans* får växa på n-oktan, från bensin, bildar den granula som består av längre sidokedje-PHA (Smet et al. 1983).

Biosyntesen av P(3HB) sker i bakterien *Ralstonia eutropha* med hjälp av tre genprodukter; PhaA och PhB som gör acetyl-CoA till (R)-3-hydroxybutyryl och PHB-polymeras som polymeriserar (R)-3-hydroxybutyryl till slutprodukten P(3HB) (Luengo et al. 2003). Generna regleras av halten acetyl-CoA då en hög halt acetyl-CoA i cellen motverkar syntesen av PHB (Luengo et al. 2003). Detta återspeglar hur citronsyrecykelns aktivitet, och därmed cellens energitillgång, styr lagringen av extraenergi. När acetyl-CoA börjar minska i koncentration ökar syntesen av granula. Biosyntesen av PHA-varianter med längre sidkedjor är liknande men verkar vara mer komplexa processer.

Mikroorganismer kan bryta ned PHA i miljön med diverse PHA-hydrolas och depolymeras (Madison & Huisman 1999). Hastigheten och effektiviteten beror på de faktorer och betingelser som har redovisats tidigare i texten. PHA-depolymeras från *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas picketti* och *Comamonas testosteroni* bryter ner P(3HB) effektivt genom en två-stegsprocess via en hydrofob enzymdomän som fäster vid den solida plasten och en katalytisk domän som börjar bryta ned kedjorna (Mukai et al. 1993). Intressant nog är detta samma process som även föreslogs av Akutsu et al. (1998) för PUR-depolymeras. Skillnaden mellan dem består dock i att PHA-depolymeras är extracellulärt och PUR-depolymeras är membranbundet. Sammantaget är PHA-plasterna i sig en mikrobiell energikälla och därmed välanpassad för biologisk nedbrytning. Förpackningar av P(3HV) mineraliseras efter sex veckor i avloppsslam, 75 veckor i jord samt 350 veckor i havsvatten (Lee 1996). När P(3HV) blandas upp med lignin sker nedbrytningen långsammare. Ligninet binder starkt till P(3HV) med vätebindningar, och blandningen får plastbiten att mineraliseras till hälften inom 52 veckor (Mousavioun et al. 2012).

Både mikroorganismer och transgena växter skulle med fördel kunna användas för storskalig produktion av PHA-plaster (Lee 1996). Till och med den konventionella plasten PET skulle kunna användas som ett råmaterial. Tereftalatsyran som bygger upp polymeren PET kan användas exklusivt av vissa mikroorganismer för att biosyntetisera PHA (Kenny et al. 2008). PHA är minst sagt relevant utifrån ett kretsloppsperspektiv, då den helt kan återgå i ekosystemet och kolcykeln (Lee 1996).

Diskussion

Forskningsläget kring nedbrytbara plaster och deras nedbrytare är idag aktivt och växande. Flera olika nedbrytbara plaster utvecklas och används i flertalet länder, bland annat i Sverige där det kan finnas en framtid för svensk förnyelsebar plast baserad på cellulosa (Gissy 2007). Då framtiden för den fossilbaserade plasten är oviss, främst på grund av den begränsade tillgången på fossil råvara, är de förnyelsebara och nedbrytbara plasterna högst intressanta att uppmärksamma som alternativ. Dessutom anser jag att forskningen behövs för att främja

kretsloppsprinciperna. Genom att använda plaster som bygger på förnyelsebara råvaror och de mikrobiella plastmaterialen som PHA så menar jag att plastens kretslopp därigenom kan underlättas. Om konventionell skulle ersättas med nedbrytbart plastmaterial blir mängden av icke-nedbrytbart avfall från hushållen bli mindre. Återvinning av själva plastmaterialet i sig är så klart eftersträvansvärt men nya sätt att hantera plastavfallet biologiskt kan också vara viktigt att beakta för att möta det jag i inledningen benämnde som *plastproblematiken*.

Biologisk nedbrytning som en metod för att ta hand om plastförpackningar verkar helt klart möjlig. Som EU-direktivet och den Svenska lagen om deponiförbud visade så är deponering i sig inte en tänkbar väg för bioplast i Sverige eller EU, men genom kompostering så skulle metoden kunna bli användbar. Lämpligast skulle hushållen kunna separera det biologiska avfallet, inklusive bioplasten som omsluter det, från det icke-nedbrytbara avfallet och antingen slänga detta i en kompost i trädgården eller lämna för uppsamling till industriell anaerob efterbehandling (Song et al. 2009). Detta bidrar även till att energirik odlingsgödning kan utvinnas.

Det finns alltså fördelar inom flera användningsområden i att använda mikroorganismer. Kim & Rhee (2003) menar att svamp förmodligen kommer att spela en allt större roll i framtida plastnedbrytningsmodeller. Den växande kunskapen kring svamp kommer förhoppningsvis även innebära vidare möjligheter att tackla avfallsproblematiken samt bidra till biokemisk kunskap om enzymer och biotekniska applikationer (Kim & Rhee 2003). Framtida forskning rörande möjligheten att klona in membranbundna enzymer som kan binda till plaster, som bland annat Akutsu et al. (1998) har visat möjligheten på, är mycket intressant för en framtida tillämpning vid utvecklingen av nya och bättre plastnedbrytande mikroorganismer. Utöver detta kan, som Accinelli (2012) föreslår, mikroorganismer komma till användning för att utvinna värdefull kemisk råvara från polymerer som i sin tur kan användas att göra nya plaster. Uttjänta PET-flaskor skulle också kunna ”uppvärderas” till bioplasten PHA som Kenny et al (2008) beskrev.

Swift (1993) menar att de fossilbaserade plastmaterialen kommer vara svåra att ersätta med bioplaster med avseende på dess speciella och eftertraktade egenskaper så som pris och hållfasthet. Däremot lär den positiva trenden inom industri och akademi fortsätta utvecklingen av attraktiva nedbrytbara bioplaster (Swift 1993). Utvecklingen av PHA, tycker jag, är ett tydligt steg framåt inom området då det är en mikrobiell bioplast som har potential att kunna massproduceras.

Arbetet har i huvudsak behandlat biologiskt nedbrytbara plaster ur ett avfalls-perspektiv: hur skulle nedbrytbara bioplaster kunna avhjälpa sophanteringen? Dock finns det även ett stort intresse för biologiskt nedbrytbara plaster och dess applikationer inom läkemedelsindustrin och hälsovården (Amass et al. 1998). Här finns det förmodligen en stor potential för dessa material. Olika metoder för bioremediering av platser med stor plastförorening, med hjälp av plastnedbrytande mikroorganismer, skulle också kunna vara ett område att forska vidare på. Listan över mikrober som bryter ned plast effektivt kan göras lång och lär med största sannolikhet bli längre i takt med fortsatta studier. Flera helt nyupptäckta arter lär också kunna läggas till i listan. Den centrala frågan är hur dessa mikroorganismer och deras enzymer utför sin nedbrytning av plast. Avslutningsvis kan sägas att mångfalden av studier på nedbrytning av plaster *in situ* och *in vitro* visar på diversiteten av de mikroorganismer som kan komma väl till pass för att lösa plastproblematiken.

Tack

Tack till Åsa Kruys, min handledare under uppsatsarbetet, samt Linda Petersson och Frida Karlsson, mina medstudenter, för återkoppling och uppmuntran. Jag är även mycket tacksam för korrekturläsningen och hjälpen med layout och grafik som Johanna Rayner bistod mig med. Dessutom vill jag skänka tack till min medstudent Benjamin Gustavsson för hjälpen med Zotero-mallen.

Referenser

Accinelli C, Saccà ML, Mencarelli M, Vicari A. 2012. Deterioration of bioplastic carrier bags in the environment and assessment of a new recycling alternative. Chemosphere. 89: 136–143.

Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T. 1998. Purification and Properties of a Polyester Polyurethane-Degrading Enzyme from Comamonas acidovorans TB-35. Applied and environmental microbiology. 64: 62–67.

Alexander M. 1981. Biodegradation of Chemicals of Environmental Concern. Science. 211: 132–138.

Amass W, Amass A, Tighe B. 1998. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. Polymer International. 47: 89–144.

Barnes DKA, Galgani F, Thompson RC, Barlaz M. 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 364: 1985–1998.

Barratt S r., Ennos A r., Greenhalgh M, Robson G d., Handley P s. 2003. Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. Journal of Applied Microbiology. 95: 78–85.

Bastioli C. 2001. Global Status of the Production of Biobased Packaging Materials. Starch - Stärke. 53: 351–355.

Chandra R, Rustgi R. 1998. Biodegradable polymers. Progress in Polymer Science. 23: 1273–1335.

Benes J, Chauvet M, Kamenik O, Kumhof M, Laxton D, Marsula S, Selody J. 2012. The Future of Oil: Geology versus Technology. IMF working paper (WP/12/109).

Cosgrove L, McGeechan PL, Robson GD, Handley PS. 2007. Fungal Communities Associated with Degradation of Polyester Polyurethane in Soil. Applied and Environmental Microbiology. 73: 5817–5824.

Deguchi T, Kakezawa M, Nishida T. 1997. Nylon biodegradation by lignin-degrading fungi. Applied and Environmental Microbiology. 63: 329–331.

Goheen SM, Wool RP. 1991. Degradation of polyethylene–starch blends in soil. Journal of Applied Polymer Science. 42: 2691–2701.

Gross RA, Kalra B. 2002. Biodegradable Polymers for the Environment. Science. 297: 803–807.

Iiyoshi Y, Tsutsumi Y, Nishida T. 1998. Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. Journal of Wood Science. 44: 222–229.

Kale G, Kijchavengkul T, Auras R, Rubino M, Selke SE, Singh SP. 2007. Compostability of Bioplastic Packaging Materials: An Overview. Macromolecular Bioscience. 7: 255–277.

Kenny ST, Runic JN, Kaminsky W, Woods T, Babu RP, Keely CM, Blau W, O'Connor KE. 2008. Up-Cycling of PET (Polyethylene Terephthalate) to the Biodegradable Plastic PHA (Polyhydroxyalkanoate). Environmental Science & Technology. 42: 7696–7701.
Kim DY, Rhee YH. 2003. Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. Applied Microbiology and Biotechnology. 61: 300–308.
Kyaw BM, Champakalakshmi R, Sakharkar MK, Lim CS, Sakharkar KR. 2012. Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by Pseudomonas Species. Indian Journal of Microbiology. 52: 411–419.
Lee SY. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and bioengineering. 49: 1–14.
Lefèvre C, Mathieu C, Tidjani A, Dupret I, Vander Wauven C, De Winter W, David C. 1999. Comparative degradation by micro-organisms of terephthalic acid, 2,6-naphthalene dicarboxylic acid, their esters and polyesters. Polymer Degradation and Stability. 64: 9–16.
Luengo JM, García B, Sandoval A, Naharro G, Olivera ER. 2003. Bioplastics from microorganisms. Current Opinion in Microbiology. 6: 251–260.
Madison LL, Huisman GW. 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63: 21.
Mohanty AK, Misra M, Hinrichsen G. 2000. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. Macromolecular Materials and Engineering. 276-277: 1–24.
Mousavioun P, George GA, Doherty WOS. 2012. Environmental degradation of lignin/poly(hydroxybutyrate) blends. Polymer Degradation and Stability. 97: 1114–1122.
Mukai K, Yamada K, Doi Y. 1993. Kinetics and mechanism of heterogeneous hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHA depolymerases. International journal of biological macromolecules. 15: 361–366.
Nagarajan V, Singh M, Kane H, Khalili M, Bramucci M. 2006. Degradation of a Terephthalate-containing Polyester by a Thermophilic Microbial Consortium. Journal of Polymers and the Environment. 14: 281–287.
Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. FEMS microbiology letters. 129: 39–42.
Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara T. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. Applied Microbiology and Biotechnology. 51: 134–140.
Palmisano AC, Pettigrew CA. 1992. Biodegradability of Plastics. BioScience. 42: 680–685.
Paszun D, Spychaj T. 1997. Chemical Recycling of Poly(ethylene terephthalate). Industrial & Engineering Chemistry Research. 36: 1373–1383.
PIRA-ECOLAS. 2005. Study on the Implementation of Directive 94/62/EC on Packaging and Packaging Waste and Options to Strengthen Prevention and Re-use of Packaging.
Prieto MA. 2006. From Oil to Bioplastics, a Dream Come True? Journal of Bacteriology. 189: 289–290.
Ruiz C, Main T, Hilliard NP, Howard GT. 1999. Purification and characterization of twopolyurethanase enzymes from Pseudomonas chlororaphis. International Biodeterioration & Biodegradation. 43: 43–47.
Sabev HA, Handley PS, Robson GD. 2006. Fungal colonization of soil-buried plasticized polyvinyl chloride (pPVC) and the impact of incorporated biocides. Microbiology. 152: 1731–1739.
Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnology Advances. 26: 246–265.

Smet MJ de, Eggink G, Witholt B, Kingma J, Wynberg H. 1983. Characterization of intracellular inclusions formed by Pseudomonas oleovorans during growth on octane. Journal of Bacteriology. 154: 870.

Song JH, Murphy RJ, Narayan R, Davies GBH. 2009. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 364: 2127–2139.

Stackebrandt E, Goebel B. 1994. A Place for Dna-Dna Reassociation and 16s Ribosomal-Rna Sequence-Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology. 44: 846–849.

Swift G. 1993. Directions for environmentally biodegradable polymer research. Accounts of Chemical Research. 26: 105–110.