

**В.А. Мусієнко, магістр**  
**М.Б. Корбут, к.т.н., доц.**  
**З.М. Шелест, к.б.н., доц.**

*Державний університет «Житомирська політехніка»*

## **Дослідження аспектів біодеструкції пластику грибком *Aspergillus tubingensis***

*Проблема відходів є нагальною для всього світу. Окремою ланкою, що становить велику загрозу довкіллю, є виробництво з пластику. Все більш актуальним стає дослідження перспектив використання різноманітних методів біологічної деструкції пластику, яка є інноваційним засобом вирішення проблеми пластикових відходів. У роботі проаналізовано різні методи біодеструкції пластику, зокрема: деструкція грибком *Aspergillus tubingensis*, деструкція термофільним штамом *Brevibaccillus borstelensis* 707, метод з використанням кишкових бактерій з личинок молі (*Bacillus та Enterobacter*), використання личинок *Plodia interpunctella*, метод з використанням бактеріальних штампів *Enterobacter asburiae* YPI і *Bacillus sp. YPI*, використання личинок воскової молі. В статті детально розглянуто перспективний метод біодеструкції пластику з використанням грибка *Aspergillus tubingensis*. Метою дослідження є оцінка можливості використання методу біодеструкції пластику грибком *Aspergillus tubingensis* як способу боротьби з пластиковими відходами. Наведено дослідження аспектів деструкції пластику грибком *Aspergillus tubingensis*, яке ґрунтується на детальному аналізі методик різних дослідників щодо використання біодеструкції пластику; узагальненні методики щодо біодеструкції пластику грибком *Aspergillus tubingensis* (на основі описаних в літературі дослідів та експериментальним шляхом в лабораторних умовах) та виявленні ключових моментів методики. Запущено експеримент щодо вирощування *Aspergillus tubingensis* та використання ним поліетилену як поживного середовища в лабораторних умовах та окреслено перспективи подальших досліджень для з'ясування оптимальних параметрів деструкції пластику грибком *Aspergillus tubingensis*.*

**Ключові слова:** пластик; біодеструкція; грибкові колонії; інкубаційний період; *Aspergillus tubingensis*.

**Актуальність теми.** Погіршення стану глобального навколишнього середовища тісно пов'язане з нестійкими практиками виробництва і споживання. Надмірний ріст виробництва і споживання за останні 50 років став причиною швидкої трансформації взаємовідносин людини з природним світом – більш, ніж будь-коли за всю історію людства – супроводжуваної усеозростаючим використанням природних ресурсів, що призводить до деградації навколишнього середовища (ЮНЕП, 2015 р). Зростання виробництва призводить до утворення величезної маси відходів, які складаються з текстильної продукції, металу, скла, кераміки, гуми та, найбільше, з пластикових відходів. Значення пластику та його використання в суспільній економіці зростає постійно (особливо це помітно протягом останніх 50 років): з 1960-х років глобальне виробництво пластмас зросло в двадцять разів, досягнувши 322 млн тонн у 2015 році.

Окремою ланкою, що завдає велику загрозу довкіллю, є одноразові вироби з пластмаси, ця проблема є нагальною для всього світу. Докладаючи зусиль для зменшення забруднення довкілля пластиковими виробами, ЄС впроваджує нові жорсткі обмеження на певні одноразові вироби з пластмаси. Низка одноразових пластикових виробів, яким легко знайти заміну, буде заборонена вже до 2021 року. Водночас до 2025 року країни європейського блоку будуть змушені налагодити переробку 90 відсотків пластикових пляшок (фінансування на це надаватимуть компанії-виробники напоїв). На жаль, на даний момент повторне використання та утилізація кінцевих пластмас залишаються на недостатньо високому рівні, особливо порівняно з іншими матеріалами, такими як папір, скло або метали. Щорічно в країнах Європейського Союзу генерується близько 25,8 млн тонн пластикових відходів, менше 30 % таких відходів збирається на переробку. Таким чином, потенціал утилізації пластикових відходів в країнах Єврозою залишається невикористаним [1].

Розміщення пластикових відходів у навколишньому середовищі призводить до суттєвого навантаження на довкілля в зв'язку з їх тривалим терміном розкладання – до 200 років [2, 3].

Враховуючи велику кількість пластику в навколишньому середовищі, все більш актуальним стає дослідження перспектив використання нових різноманітних методів деструкції та утилізації пластику. Найбільш інноваційним та перспективним шляхом позбавлення від пластикових відходів є використання біологічної деструкції пластику.

**Аналіз останніх досліджень та публікацій, на які спирається автор.** На сьогоднішній день у різних країнах світу досліджуються перспективи використання різних методів біологічної деструкції пластику, а саме:

- деструкція грибом *Aspergillus tubingensis*. Цей гриб виділяє ферменти, руйнівні для хімічних зв'язків у полімерах. Тобто він харчується пластиком так само, як інші живі організми харчуються речовинами рослинного і тваринного походження. На швидкість розкладання пластику під дією гриба впливають температура і кислотно-лужний баланс [4];

- деструкція термофільним штамом *Brevibacillus borstelensis* 707, що використовує поліетилен низької щільності як єдине джерело вуглецю. Інкубація поліетилену з *B. borstelensis* (30 днів, 50° С) знижувала її гравіметричні і молекулярні маси на 11 і 30 % відповідно. Максимальна біодеструкція була отримана в поєднанні з фотоокисленням, що показало, що карбонільні залишки, що утворюються при фотоокисленні, відіграють певну роль у біодеструкції [5];

- метод з використанням кишкових бактерій з личинок молі (*Bacillus* та *Enterobacter*), які інтенсивно розмножуються на поліетилені як на єдиному джерелі вуглецю [6];

- використання личинок *Plodia interpunctella*. Зокрема два бактеріальні штами, здатні розкласти поліетилен, виділяли з кишечника личинок цих комах, а саме штами *Enterobacter asburiae* Y11 і *Bacillus* sp. YP1 [7];

- використання личинок воскової молі. У досліджах було виявлено, що близько 100 личинок воскової молі можуть розкласти близько 92 міліграмів поліетиленової плівки за дванадцять годин. За оптимальних умов і при температурі близько 30° С бактерії найкраще розкладають поліетилентерефталат (лавсан) [8].

Біодеструкція пластику є інноваційним засобом вирішення проблеми утилізації пластикових відходів в цілому. Одним із найбільш ефективних та перспективних методів біодеструкції пластику, на думку авторів, є метод з використанням грибка *Aspergillus tubingensis*. Цей гриб виділяє ферменти, руйнівні для хімічних зв'язків у полімерах. Тобто він харчується пластиком так само, як інші живі організми харчуються речовинами рослинного і тваринного походження. На швидкість розкладання пластику під дією гриба впливають температура і кислотно-лужний баланс. Однак метод є суперечливим з точки зору методики та не дає чітких рекомендацій щодо параметрів його використання.

**Метою статті** є оцінка можливості використання методу біодеструкції пластику грибом *Aspergillus tubingensis* як способу боротьби з пластиковими відходами. Дослідження аспектів деструкції пластику грибом *Aspergillus tubingensis* на даному етапі дослідження ґрунтується на детальному аналізі методик різних дослідників щодо використання біодеструкції пластику; узагальненні методики щодо біодеструкції пластику грибом *Aspergillus tubingensis* (на основі описаних в літературі дослідів та експериментальним шляхом у лабораторних умовах) та виявленні експериментальним шляхом ключових моментів методики.

**Викладення основного матеріалу.** Незаперечною перевагою застосування біологічних методів для деструкції пластикових відходів є їх енергоефективність та відсутність токсичних продуктів розкладання. Суттєвим недоліком є відсутність методик та рекомендацій щодо застосування цієї групи методів. Тому першим кроком на даному етапі дослідження став детальний аналіз методик різних дослідників щодо використання біодеструкції пластику. В статті «Diagnostic tools to identify black aspergilli» [9] зазначалося, що культури вводили триточковим носієм в 9-сантиметровий пластиковий посуд Петрі з використанням щільної суспензії конідію та інкубували в темряві при 25° С, за винятком випадків, коли не зазначено інше. Також на СУА вирощували гриби при 15, 30 та 37° С. Культури досліджували після 7 днів росту і далі досліджували після 14 днів. Діаметр колонії вимірювали за допомогою лінійки. В журналі «CanadaWorld – WCI student isolates microbe that lunches on plastic bags» [4] було зазначено, що необхідно подрібнити пластикові пакети в порошок. Далі, використовуючи звичайну побутову хімію, дріжджі та водопровідну воду, створити розчин, який би стимулював ріст дріжджів. Після трьох місяців підвищення концентрації грибка *Aspergillus tubingensis* відфільтрувати пластиковий порошок, що залишився, і покласти грибок в три колби зі смужками пластику, вирізаними з поліетиленових пакетів. Під час дослідження було встановлено, що стрічки з грибом, порівняно із контрольними, важили в середньому на 17 відсотків менше. Як зазначав автор статті «Safety evaluation of certain food additives and contaminants» [10], під час дослідження різних видів грибків, вони здатні рости в середовищі без достатнього вмісту вуглецю, доповненому рідким воском. Автор дослідив, що декілька різних грибків використовують і деградують віск, як це було видно з чітких зон навколо цих колоній. Один з них *Aspergillus tubingensis* – термофільний, грампозитивний, спороутворюючий гриб з оптимальним ростом при 27° С. Автор статті «Discovery of plastic-eating bacteria may speed waste reduction» [11] зазначав, що при інкубуванні даних видів на невеликих аркушах поліетилену вже через 28 днів листи виявляли ознаки деструкції: їх міцність на розрив знизилася на 50 %, а їхня здатність відштовхувати краплі води знизилася на 30 %. Через 60 днів маса пластику зменшилася на 10 %, а молекулярні маси полімерних ланцюгів знизилася на 13 %. У статті «Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy» [12] зазначалося, що протягом 28-денного періоду інкубації *Aspergillus tubingensis* на поліетиленових плівках утворювалися життєздатні біоплівки, і знижувалася гідрофобність поліетиленових плівок. На поверхнях плівок за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM) та атомно-силової мікроскопії (АСМ) спостерігали очевидне

пошкодження, включаючи ямки і порожнини (глибиною 0,3–0,4 мкм). У статті «Polyethylene biodegradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*» [8] автор вказував, що помірна деструкція пластику спостерігалася після обробки азотною кислотою та інкубації протягом 3 місяців у рідкій культурі гриба *Penicillium simplicissimum*. Повільна деструкція також була зафіксована після 4–7 місяців впливу бактерії *Nocardia asteroides*.

На основі ретельного аналізу було узагальнено методику та запущено експеримент щодо вирощування *Aspergillus tubingensis* та використання ним поліетилену як поживного середовища в лабораторних умовах (що стало другим кроком на цьому етапі досліджень).

Для досліду необхідно: 12 чашок Петрі, зразки виноградин трьох різних сортів, ватні диски, дистильована вода, термошафа, 45 грамів сухого агару Чапека, автоклав, мікроскоп, зразки поліетилену, 100 мл розбавленої азотної кислоти, 49 грамів сухого солодового агару.

Послідовність виконання дій:

1. Стерилізують чашки Петрі в термошафі при 160° С протягом 2 годин.
2. Поміщують у простерилізовані чашки вологий ватний диск із трьох різними сортами винограду, герметизують їх.
3. Готують агар Чапека. Для цього 45 грамів сухого агару Чапека розчиняють у 1000 мл киплячої в колбі води і до повного розчинення. Далі колбу поміщають в автоклав для стерилізації на 15 хв при температурі 121 градус і тиску 1,1 атм.
4. Через 7 днів відбирають найкраще порослі грибокми виноградини і поміщають їх в нові чашки Петрі із 20 мл агару Чапека, пророщують 7 днів при температурі близько 27 градусів.
5. Підозрілі колонії, що схожі за морфологічними характеристиками на *Aspergillus Tubingensis*, переміщують в нові чашки Петрі із 20 мл агаром Чапека ще на 7 днів (для більшої точності різні чашки Петрі з однаковим грибом можна одночасно помістити в середовище з температурою 27, 30 і 40 градусів).
6. Найбільш підозрілі колонії, що добре проросли, мікроскопують. Спорангії, що мають бути ідеальною круглою форми з невеликими промінцями по периметру, на якому розвиваються спори ідеальною круглою форми. Це робиться для впевненості в тому, що проріс саме *Aspergillus Tubingensis*.
7. Готують поліетилен як поживне середовище для *A. Tubingensis*. Для початку поліетилен окислюють розбавленою азотною кислотою при температурі 80–100 градусів у термошафі протягом 5–6 годин.
8. Переносять грибок на підготовлений поліетилен, коригують температуру, вміст поживних середовищ та інші параметри таким чином, щоб досягти максимального ефекту біодеградації.
9. Готують солодовий агар. Для цього розчиняють 49 грамів сухого солодового агару в 1000 мл киплячої в колбі води, до розчинення, ставлять колбу в автоклав для стерилізації на 15 хв при температурі 118 градусів і тиском 0,9 атм.
10. Поміщають грибок на солодовий агар і порівнюють ефективність його проростання, порівняно із агаром Чапека. Це робиться з метою встановлення, яке саме середовище найкраще підходить для виведення цього грибка.

Третім кроком стало виявлення ключових моментів методики. З'ясувалося, що для виведення грибка достатньо лише агару Чапека. Інші два середовища (солодовий агар та дріжджовий агар) можна використати наприкінці дослідження, щоб вирахувати економічну доцільність того, на якому саме середовищі вирощувати грибок краще. Щоб не переплутати *Aspergillus Tubingensis* з якимось іншим грибом, схожим за морфологічними характеристиками, рекомендується виявлений грибок помістити термошафу із температурою близького 40 градусів, де інші види грибків ростуть повільно або не ростуть взагалі. Оскільки навіть після підвищеної температури не можна бути точно впевненим про сам грибок, необхідно виявлений грибок мікроскопіювати (тобто подивитися під мікроскопом на його міцелії та спори), оскільки спори мають ідеальну круглу променевою форму, що відрізняє *Aspergillus Tubingensis* серед інших грибів.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** Біодеструкція пластику є інноваційним засобом вирішення проблеми утилізації пластикових відходів. Одним із найбільш ефективних та перспективних методів біодеструкції пластику, на думку авторів, є метод з використанням грибка *Aspergillus tubingensis*. Авторами статті узагальнено методику щодо біодеструкції пластику грибом *Aspergillus tubingensis*. Запущено експеримент щодо вирощування *Aspergillus tubingensis* та використання ним поліетилену як поживного середовища в лабораторних умовах. З'ясовано, що на швидкість розкладання пластику під дією гриба впливають температура і кислотно-лужний баланс, що окреслює перспективи подальших досліджень для з'ясування оптимальних параметрів деструкції пластику грибом *Aspergillus tubingensis*.

#### Список використаної літератури:

1. Legal Limits on Single-Use Plastics and Microplastics: A Global Review of National Laws and Regulations / UN Environment. – 2018.
2. Anaerobic Biodegradation of polymer composites filled with natural fibers / A.Iwańczuk, M.Kozłowski, M.Lukaszewicz, S.Jabłoński // Journal of Polymers and the Environment. – June, 2015. – Vol. 23, No. 2. – P. 277–282.
3. Bankim C.R. Fibrous polymeric composites: environmental degradation and damage / C.R. Bankim, K.P. Rajesh, K.R. Dinesh. – Boca Raton : CRC Press, 2018. – 222 p.

4. CanadaWorld – WCI student isolates microbe that lunches on plastic bags / The Record.com [Electronic resources]. – Archived from the original on 18 July 2011. – Retrieved 20 February 2014.
5. Hadad D. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis* / D.Hadad, S.Geresh, A.Sivan. – 2005.
6. Balster L. Discovery of plastic-eating bacteria may speed waste reduction / L.Balster / Fondriest.com [Electronic resources]. – 27 January, 2015.
7. Yang Jun Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms / Jun Yang, Yu Yang, Wu. – 2014.
8. Bombelli P. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella* / P.Bombelli, Ch.J. Howe, F.Bertocchini // *Current Biology*. – 2017.
9. Diagnostic tools to identify black aspergilli / R.A. Samson, P.Noonim, M.Meijer and others // *Studies in Mycology*. – 2007. – № 59. – P. 129–145.
10. Safety evaluation of certain food additives and contaminants / World Health Organization. – Geneva, 2008.
11. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri* / J.Varga, J.C. Frisvad, S.Kocsubé et al. // *Studies in Mycology*. – 2011.
12. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy / D.M. Silva, L.R. Batista, E.F. Rezende et al. // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2011.

**References:**

1. UN Environment (2018), «Legal Limits on Single-Use Plastics and Microplastics: A Global Review of National Laws and Regulations».
2. Iwańczuk, A., Kozłowski, M., Łukaszewicz, M. and Jabłoński, S. (2015), «Anaerobic Biodegradation of polymer composites filled with natural fibers», *Journal of Polymers and the Environment*, from June, Vol. 23, No. 2, pp. 277–282.
3. Bankim, C.R., Rajesh, K.P. and Dinesh, K.R. (2018), *Fibrous polymeric composites: environmental degradation and damage*, CRC Press, Boca Raton, 222 p.
4. The Record.com (2011–2014), «CanadaWorld – WCI student isolates microbe that lunches on plastic bags», [Online], archived from the original on 18 July, retrieved 20 February.
5. Hadad, D., Geresh, S. and Sivan, A. (2005), *Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium Brevibacillus borstelensis*.
6. Balster, L. (2015), «Discovery of plastic-eating bacteria may speed waste reduction», *Fondriest.com*, [Online], from 27 January.
7. Yang, J., Yang, Y. and Wu (2014), *Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms*.
8. Bombelli P., Howe Ch.J. and Bertocchini F. (2017), «Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*», *Current Biology*.
9. Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J.C., Frisvad, J. and Varga, J (2007), «Diagnostic tools to identify black aspergilli», *Studies in Mycology*, No. 59, pp. 129–145.
10. World Health Organization (2008), «Safety evaluation of certain food additives and contaminants», Geneva.
11. Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S. and others (2011), «New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*», *Studies in Mycology*.
12. Silva, D.M., Batista, L.R., Rezende, E.F. and others (2011), «Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy», *Brazilian Journal of Microbiology*.

**Мусієнко** Володимир Анатолійович – магістр II курсу Державного університету «Житомирська політехніка».

Наукові інтереси:

- поводження з пластиковими відходами;
- біодеструкція.

**Корбут** Марія Броніславівна – кандидат технічних наук, доцент кафедри екології Державного університету «Житомирська політехніка».

Наукові інтереси:

- поводження з відходами;
- менеджмент відходів;
- сталий розвиток;
- екологічна освіта.

**Шелест** Зоя Михайлівна – кандидат біологічних наук, доцент кафедри екології Державного університету «Житомирська політехніка».

Наукові інтереси:

- лісові екосистеми;
- радіоекологічні проблеми Українського Полісся;
- реабілітація радіоактивно забруднених територій;
- екологічна освіта.

Стаття надійшла до редакції 11.09.2019.