

KATARZYNA KRASOWSKA, ALEKSANDRA HEIMOWSKA, MARIA RUTKOWSKA¹⁾Akademia Morska
Katedra Chemii
ul. Morska 83, 81-225 Gdynia

Enzymatyczna i hydrolityczna degradacja poli(ϵ -kaprolaktonu) w warunkach naturalnych^{*)}

Streszczenie — Badania obejmowały degradację środowiskową poli(ϵ -kaprolaktonu) (PCL) w rozmaitych warunkach naturalnych, a także w środowisku eliminującym działalność organizmów żywych. Przebieg degradacji oceniano na podstawie zmian masy PCL oraz jego ciężaru cząsteczkowego i struktury powierzchni w warunkach różnej temperatury i pH środowiska. Ustalono, że w badanych naturalnych środowiskach degradacja jest rezultatem hydrolizy zarówno enzymatycznej (powodującej degradację powierzchni i zmieniającej jedynie masę, a nie ciężar cząsteczkowy próbki), jak i chemicznej (będącej przyczyną obserwowanego zmniejszenia ciężaru cząsteczkowego). Decydującą rolę w procesie przebiegającym w warunkach naturalnych odgrywa hydroliza enzymatyczna.

Słowa kluczowe: poli(ϵ -kaprolakton), biodegradacja, działanie enzymów, hydroliza, woda morska, kompost.

ENZYMATIC AND HYDROLYTIC DEGRADATION OF POLY(ϵ -CAPROLACTONE) IN NATURAL ENVIRONMENT

Summary — The studies on environment degradation of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) in various natural conditions namely in the compost with activated sludge and in seawater were done. Poly(ϵ -caprolactone) degradation has been also carried out in laboratory conditions in seawater with sodium azide addition (NaN_3 , 0.195 g/L). NaN_3 eliminated the activity of microorganisms what allowed evaluation of chemical hydrolysis part in the process of degradation in seawater. Enzymatic and chemical hydrolyses in the process of environmental degradation of PCL were evaluated based on the changes of: sample weight (Table 4), molecular weight of the polymer (Table 5) and the surface structure (Fig. 1). Effects of temperature, pH of environment and activities of dehydrogenases in the compost (Table 1—3) on the course of the process studied were determined. PCL sensitivity to biological decomposition has been confirmed. It was found that PCL degradation in the environments studied was a result of both enzymatic and chemical hydrolyses and enzymatic hydrolysis play the key role in the process.

Key words: poly(ϵ -caprolactone), biodegradation, enzymes' activity, hydrolysis, seawater, compost.

Alifatyczne poliestry stanowią bardzo interesującą grupę polimerów ulegających biodegradacji enzymatycznej bądź hydrolitycznej, zarówno w kontakcie z żywymi organizmami [1, 2], jak i w warunkach środowiska naturalnego, tj. w glebie [3, 4], kompoście [5—9], wodzie morskiej [8—11], wodzie rzecznej i wodzie z jezior [12].

Jak wynika z opublikowanych danych, degradacja poli(estrów alifatycznych) w naturalnym środowisku może być katalizowana enzymatycznie i/lub chemicznie [13].

Enzymatyczna degradacja poliestrów następuje w wyniku działania makro- i mikroorganizmów oraz

enzymów wytwarzanych przez te żywe organizmy. Przebiega ona tylko powierzchniowo, a więc wiąże się z erozją powierzchni polimeru, zaś ilościowo może być scharakteryzowana ubytkiem masy danej próbki. Podczas tego procesu ciężar cząsteczkowy polimeru nie ulega zmianie, ponieważ degradowana jest tylko powierzchnia materiału, a małowczątkowe produkty degradacji rozpraszają się w środowisku.

Natomiast podczas degradacji hydrolitycznej na wnikanie czynnika chemicznego w głąb polimeru wywierają wpływ krystaliczność, stopień usieciowania i inne właściwości związane z morfologią tego materiału. Obserwowane tu zmniejszenie ciężaru cząsteczkowego, prowadzące także do pogorszenia właściwości mechanicznych [14], jest wynikiem degradacji („ciąćcia” makrocząsteczek) w całej objętości próbki.

Celem naszej pracy było określenie różnic w procesie degradacji poli(ϵ -kaprolaktonu) w kompoście z osadem

^{*)} Artykuł przedstawia treść wystąpienia na konferencji „Materiały polimerowe, Pomerania-Plast 2004”, Międzyzdroje, 2—4 czerwca 2004 r.

¹⁾ Autor do ewentualnej korespondencji; e-mail: rutmaria@wsm.gdynia.pl

czynnym i w wodzie morskiej w rozmaitych warunkach naturalnych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Badany materiał

Badaniami objęto poli(ϵ -kapolakton) (PCL) o nazwie handlowej „CAPA 680” ($M_w = 80\ 000$), firmy Solvay.

Środowisko degradacji

Badano przebieg degradacji PCL w dwóch naturalnych środowiskach:

— W przyźnie kompostowej [utworzonej na terenie gdyńskiej oczyszczalni ścieków (PEWIK Sp. z o.o.)] z udziałem osadu czynnego, będącego wielogatunkową biocenozą złożoną z różnych drobnoustrojów (m.in. *Micrococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Cytophagaceae*, *Thiobacteriaceae*, *Arthrobacteriaceae*, *Propionibacteriaceae* i *Lactobacillaceae*).

Odwodniony osad ściekowy bezpośrednio przerebiono na kompost, wykorzystując przy tym metodę wapniową (0,45—0,55 kg CaO/1 kg suchej masy osadu), dzięki której zniszczono zawarte w osadzie chorobotwórcze bakterie i jaja pasożytów, odkwaszono środowisko oraz nadano osadowej masie ziemistą, gruzelkową strukturę. Próbkę PCL umieszczono w specjalnym koszu w środku przyzmy kompostowej, dodatkowo obłożonej słomą w celu utrzymania odpowiednich warunków rozwoju mikroorganizmów (temperatury i wilgotności).

— W wodzie morskiej (przy Nabrzeżu Norweskim w Gdyni w pobliżu statku Polskiego Ratownictwa Okrętowego „Kapitan Poinc”). Próbkę PCL umieszczono w koszu o wymiarach 40×40×20 cm, wykonanym z perforowanej blachy ocynkowanej i zawieszonym na linie, na głębokości dwóch metrów pod powierzchnią wody. Perforowana struktura kosza umożliwiała zarówno swobodny przepływ wody morskiej, jak i dostęp mikroorganizmów oraz rozpuszczonych w wodzie enzymów do poddawanego degradacji materiału. Parametry charakteryzujące wody Morza Bałtyckiego otrzymano z Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej w Gdyni.

Dodatkowo, degradację PCL prowadzono również w warunkach laboratoryjnych w wodzie morskiej z dodatkiem azydki sodu (NaN_3 , 0,195 g/l). Dodatek ten pozwolił na wyeliminowanie działalności organizmów żywych i umożliwił ocenę udziału hydrolizy chemicznej w procesie degradacji polimeru w wodzie morskiej.

Metodyka badań

Środowisko degradacji

W celu określenia warunków panujących w kompoście mierzono następujące jego charakterystyczne parametry:

- temperaturę;
- wartości pH (za pomocą pH-metru „Teleko” model N 5172f);
- procentową zawartość suchej masy (metodą suszenia w temp. 105 °C do stałej masy i oznaczania zawartości wilgoci, sposób wg BN-88/91103-07);
- aktywność dehydrogenaz w kompoście (oznaczaną na podstawie pomiaru ilości trifenylformazanu (TF) wytworzonego z chlorku trifenylotetrazoliowego (TTC) [15] metodą spektrofotometryczną, za pomocą kolorymetru „Specol”, długość fali 490 nm).

Próbki PCL

Stopień biodegradacji próbek PCL (w postaci pasków o wymiarach 20×150×0,03—0,06 mm) w kompoście i w wodzie morskiej oceniano badając:

— Zmiany masy (w %) próbek z wykorzystaniem wagi „Gibertini E 42s”,

— Zmiany ciężaru cząsteczkowego próbek metodą chromatografii żelowej. Wykorzystywano do tego celu chromatograf „Spectra-Physics 8800” z dwoma układami szeregowo połączonych kolumn typu „Plgel 5 μm MIXED-C Styragel”. Analizę prowadzono w chloroformie, w temp. 35 °C, stosując szybkość przepływu eluentu 1 ml/min. Wagowo średni ciężar cząsteczkowy (\overline{M}_w) i liczbowo średni ciężar cząsteczkowy (\overline{M}_n) oraz rozkład ciężarów cząsteczkowych wyrażony stosunkiem $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ wyznaczano na podstawie krzywych kalibracyjnych, dotyczących standardów polistyrenowych o małej polidispersyjności. Wyniki pomiarów w tym wypadku mogą więc być wykorzystane jedynie do celów porównawczych [16], ponieważ kalibracja polistyrenem nie pozwala na uzyskanie rzeczywistych ciężarów cząsteczkowych PCL.

— Zmiany morfologii powierzchni próbek obserwowane za pomocą mikroskopu optycznego „Alphaphot-2YS2-H” wyposażonego w aparat fotograficzny „NikonF90X” w świetle odbitym bez polaryzatora; powiększenie 270×.

WYNIKI I ICH DYSKUSJA

Warunki panujące w środowiskach naturalnych w toku badań

Podczas biodegradacji PCL oznaczano charakterystyczne parametry obu środowisk naturalnych (kompostu oraz wody morskiej, tabela 1 i tabela 2) i oceniano ich wpływ na badany proces. Średnia temperatura panująca zarówno w wodzie (około 19 °C), jak i w kompoście (około 18 °C) była niższa od optymalnej temperatury rozkładu biologicznego (20—60 °C) [17]. Stwierdzono wyraźną różnicę w odczynie poszczególnych środowisk.

Średnia wartość pH kompostu wynosiła 6,6 (odczyn lekko kwaśny), a wody morskiej — 8,49 (odczyn zasadowy), a więc nieznacznie powyżej wartości pH (5—8) za-

lecanej w procesie biodegradacji [17]. Większe wahania pH w funkcji czasu występowały w kompoście.

T a b e l a 1. Charakterystyczne parametry kompostu
T a b l e 1. Characteristic parameters of compost

Miesiąc	Parametry			
	temperatura, °C	pH	wilgotność kompostu %	aktywność dehydrogenaz mol TF/mg s.m.o. ^{*)}
Czerwiec	17,6	7,8	42,4	0,0197
Lipiec	18,2	5,8	45,8	0,0568
Sierpień	19,2	6,3	43,5	0,0485

^{*)} s.m.o. — w przeliczeniu na mg suchej masy osadu.

T a b e l a 2. Charakterystyczne parametry wody Morza Bałtyckiego

T a b l e 2. Characteristic parameters of The Baltic Sea seawater

Miesiąc	Parametry				
	temperatura, °C	pH	zawartość Cl, g/kg	zawartość O ₂ cm ³ /dm ³	zasolenie ppt
Czerwiec	17,6	8,5	2,92	7,55	5,36
Lipiec	20,3	8,2	3,28	7,57	5,58
Sierpień	19,3	8,9	3,21	7,42	6,01

Wilgotność kompostu utrzymywała się w przybliżeniu na stałym, niskim poziomie, mimo to jednak w toku prowadzonej inkubacji nastąpił znaczny wzrost aktywności dehydrogenaz. Ta aktywność enzymatyczna kompostu zależy przede wszystkim od wzrostu populacji mikroorganizmów wydzielających zewnątrzkomórkowe enzymy, biorące udział w procesie degradacji biologicznej. Jak wiadomo, w kompoście żyje liczna populacja bakterii termofilnych, promieniowców i grzybów [18]. Jednak, uwzględniając niską temperaturę kompostu i lekko kwaśne środowisko z dostępem tlenu, należało spodziewać się rozwoju głównie psychrotroficznych, tlenowych grzybów strzępkowych [19].

Ponadto należało oczekiwać, że rodzaj mikroorganizmów żyjących (bytujących) w nienapowietrzanej sztucznie, przygotowanej w naturalnych warunkach przyzmy kompostowej, będzie zależał od miejsca ich lokalizacji wewnątrz przyzmy. Mianowicie, w górnej i zewnętrznej części przyzmy panują warunki sprzyjające rozwojowi mikroflory tlenowej, u podstawy przyzmy — mikroflory beztlenowej, a w przeważającej części przyzmy (w środku) — mikroaerofilnej.

Natomiast niska temperatura i zasadowy odczyn środowiska wody morskiej prawdopodobnie sprzyjały rozwojowi głównie bakterii psychrotroficznych, zdolnych do adaptacji w tak zmiennych warunkach [19].

Produkcja materii organicznej przez mikroorganizmy pobierające do procesów rozkładu tlen znajdujący się w wodzie była związana z jego różną zawartością: na

początku okresu inkubacji (czerwiec) zawartość tlenu w wodzie była nieznacznie większa niż pod koniec tego okresu (sierpień) [20].

T a b e l a 3. Parametry wody morskiej z dodatkiem azydki sodu (NaN₃)

T a b l e 3. Parameters of seawater with sodium azide (NaN₃) addition

Miesiąc	Parametry	
	temperatura, °C	pH
Lipiec	22	7,1
Sierpień	21	7,8
Luty	19	7,6

Inkubacja prowadzona w wodzie morskiej z NaN₃ (tabela 3) w warunkach laboratoryjnych przebiegała w stabilnej temperaturze (ok. 21 °C) i w warunkach prawie obojętnego odczynu środowiska.

Zmiany masy próbek po biodegradacji

Postęp degradacji środowiskowej PCL prowadzonej w kompoście z udziałem osadu czynnego, w wodzie morskiej i w wodzie morskiej z NaN₃ oceniano na podstawie zmian masy. Wyniki przedstawiono w tabeli 4.

T a b e l a 4. Ubytki masy PCL po degradacji w środowisku kompostu, w naturalnej wodzie morskiej i w wodzie morskiej z dodatkiem NaN₃

T a b l e 4. PCL weight loss (wt. %) after degradation in compost, natural seawater and seawater with NaN₃ addition

Środowisko	Ubytki masy (%) po czasie degradacji (tygodnie)						
	1	2	3	4	5	6	32
Kompost	1,3	5,6	77,6	86,3	rozproszczenie		
Woda morska	1,7	3,5	10,7	20,7	33,8	rozproszczenie	
Woda morska z NaN ₃	0,6	1,2	1,3	1,4	1,5	1,5	1,4

Degradacja PCL w obu środowiskach naturalnych postępowała bardzo szybko i potwierdziła wrażliwość tego polimeru na atak żywych organizmów. Po 5 tygodniach inkubacji PCL w kompoście nastąpiło rozproszenie próbki, natomiast w wodzie morskiej rozproszenie nastąpiło w 6. tygodniu.

Zaobserwowane w pierwszym tygodniu biodegradacji w kompoście i w wodzie morskiej porównywalne ubytki masy PCL były prawdopodobnie spowodowane taką samą temperaturą panującą w tym czasie (czerwiec) w obu środowiskach, oraz stosunkowo niewielką aktywnością dehydrogenaz (0,0197 molTF/mg s.m.o.) w kompoście. W kolejnych tygodniach inkubacji warun-

ki naturalne panujące w kompoście były prawdopodobnie korzystniejsze do wzrostu populacji mikroorganizmów wydzielających zewnątrzkomórkowe enzymy (biorące udział w procesie rozkładu biologicznego poliestrów), niż warunki panujące w wodzie morskiej. Dlatego też obserwowane zmiany masy w środowisku kompostu były większe, a rozproszenie PCL nastąpiło szybciej. W okresie tym w kompoście zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost aktywności dehydrogenaz i lekko kwaśny odczyn środowiska (tabela 1), co sprzyja wzrostowi grzybów, podczas gdy warunki panujące w wodzie morskiej były korzystne do rozwoju bakterii.

Po długotrwałej inkubacji prowadzonej w wodzie morskiej z NaN_3 zaobserwowano jedynie nieznaczne zmiany masy PCL, znacznie mniejsze niż zmiany masy po degradacji w naturalnej wodzie morskiej. Wskazuje to na przebieg bardzo powolnej hydrolizy chemicznej PCL w tym środowisku. Fakt ten zgodny jest z doniesieniami literaturowymi, z których wiadomo, że degradacja hydrolityczna PCL zachodzi bardzo powoli z powodu hydrofobowego charakteru tego polimeru [21, 22].

Zmiany ciężaru cząsteczkowego próbek po biodegradacji

W tabeli 5 przedstawiono wartości \overline{M}_w i \overline{M}_n PCL oraz stosunku $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ przed i po inkubacji w trzech badanych przez nas środowiskach. Można zaobserwować, że po degradacji nastąpiło zmniejszenie średnich ciężarów cząsteczkowych (\overline{M}_w i \overline{M}_n) oraz wzrost polidispersyjności PCL. Wyraźna zmiana ciężaru cząsteczkowego PCL po degradacji w warunkach naturalnych może wskazywać na udział również hydrolizy chemicznej w procesie degradacji środowiskowej PCL. Zgodnie bowiem z literaturą, degradacja PCL w środowisku naturalnym może być powodowana reakcją hydrolizy enzymatycznej lub chemicznej wiązania estrowego, bądź też obu tymi procesami zachodzącymi jednocześnie [13, 23].

Po inkubacji w środowisku wody morskiej, w której spodziewano się większego udziału, zmniejszającej ciężar cząsteczkowy, degradacji hydrolitycznej, nieoczeki-

wanie odnotowano znacznie mniejsze zmiany średnich wartości \overline{M}_n i \overline{M}_w niż po inkubacji w kompoście.

Warunki mikrobiologiczne kompostu z osadem czynnym mogły sugerować większy udział, niezmienną ciężaru cząsteczkowego, hydrolizy enzymatycznej w procesie degradacji polimeru. Na podstawie wyników analiz GPC [24, 25] wiadomo bowiem, że hydroliza enzymatyczna PCL prowadzi do powstania kwasu 6-hydroksykapronowego, a następnie, poprzez α i β -utlenianie, do acetylo-S-koenzymu ulegającego dalszej degradacji [26].

Tezę tę potwierdzają wyniki naszych badań laboratoryjnych. Po inkubacji PCL w wodzie morskiej z NaN_3 stwierdzono mniejsze zmiany średnich ciężarów cząsteczkowych niż po inkubacji w wodzie morskiej w warunkach naturalnych, nawet po wielokrotnie dłuższym czasie inkubacji, co wskazuje na wspomnianą już powolną hydrolizę chemiczną PCL w tym środowisku. Zatem w procesie degradacji środowiskowej PCL w kompoście z osadem czynnym i w naturalnej wodzie morskiej dominującą rolę odgrywa degradacja enzymatyczna.

Morfologia powierzchni próbek

Postęp degradacji środowiskowej PCL w kompoście i w wodzie morskiej w warunkach naturalnych określano również na podstawie zmian zachodzących na powierzchni próbek. Z przeprowadzonych badań mikroskopowych wynika, że degradacja środowiskowa PCL w warunkach naturalnych nie przebiegała jednakowo na całej powierzchni polimeru. W związku z tym wykonano zdjęcia najczęściej powtarzających się fragmentów (rys. 1).

Struktura powierzchni PCL przed degradacją jest drobnoziarnista i ma charakter dwufazowy (faza jasna — krystaliczna i ciemna — amorficzna) (rys. 1a).

W początkowym okresie degradacji środowiskowej odnotowano wzrost krystaliczności na powierzchni PCL (pojawienie się większej liczby jasnych miejsc), co świadczy o degradacji fazy amorficznej (rys. 1b, c). Natomiast, po kolejnych tygodniach inkubacji zaobserwowano liczne spękania i dziury (rys. 1b', c') oraz zmniejszenie się liczby miejsc krystalicznych na powierzchni, co oznacza rozpoczęcie degradacji fazy krystalicznej. Pod koniec obserwowanego przez nas procesu degradacyjnego na powierzchni pojawiły się duże skupiska mikroorganizmów w postaci ciemnych nalotów, często zajmujące całą analizowaną powierzchnię (rys. 1b'', c''). Tak wyraźne zmiany w wyglądzie powierzchni PCL po degradacji środowiskowej w warunkach naturalnych wskazują na przebiegającą w wyniku działania organizmów żywych degradację enzymatyczną, prowadzącą do zniszczenia (erozji) powierzchni folii PCL.

Ponadto, potwierdziła się dwuetapowość procesu degradacji enzymatycznej PCL. Najpierw bowiem degradacji ulegała faza amorficzna (wspomniany chwilowy

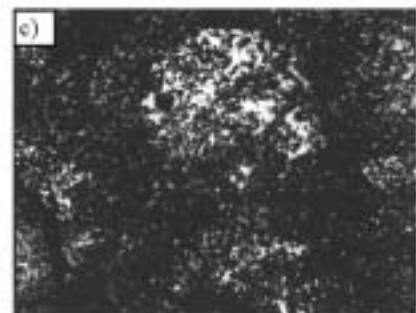
T a b e l a 5. Zmiany wartości \overline{M}_w , \overline{M}_n oraz polidispersyjności ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) PCL po inkubacji w kompoście, w naturalnej wodzie morskiej i w wodzie morskiej z dodatkiem NaN_3

T a b l e 5. Values of \overline{M}_w , \overline{M}_n and polydispersity $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ of PCL after incubation in compost, natural seawater and sea water with NaN_3 addition

Czas i środowisko degradacji	\overline{M}_w	\overline{M}_n	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$
Przed degradacją	177 728	76 143	2,3341
Po 28 dobach degradacji w kompoście	139 747	32 300	4,3266
Po 28 dobach degradacji w wodzie morskiej	151 186	43 803	3,4515
Po 32 tygodniach degradacji w wodzie morskiej z NaN_3	159 947	46 526	3,4378



Rys. 1. Mikrofotografie powierzchni (powiększenie 270×, bez użycia polaryzatora) przed (a) oraz po inkubacji w kompoście (b, b', b'') i w wodzie morskiej (c, c', c''); czasy inkubacji (w tygodniach): b, c — 2, b' — 3, c' — 4, b'' — 4, c'' — 5
 Fig. 1. Microphotographs of the surface before (a) and after incubation in compost (b, b', b'') and in seawater (c, c', c''). Incubation time (in weeks): b, c — 2; b' — 3; c' — 4; b'' — 4; c'' — 5 (magnification 270 times, without polarizer use)



wzrost krystaliczności), następnie zaś rozpoczynała się degradacja fazy krystalicznej [27, 28].

PODSUMOWANIE

Degradacja środowiskowa PCL w kompoście z osadem czynnym i w wodzie morskiej w warunkach naturalnych przebiega bardzo szybko, co potwierdza dużą wrażliwość tego polimeru na działanie żywych organizmów, przy czym szybkość degradacji PCL w tych warunkach zależy od rodzaju środowiska naturalnego. Rozproszenie próbek PCL szybciej następuje w kompoście z osadem czynnym, niż w wodzie morskiej.

Wyraźne zmiany masy próbek PCL oraz erozja ich powierzchni po inkubacji w naturalnych środowiskach są wynikiem enzymatycznej degradacji wiązań estrowych.

Zmiany mikroskopowe powierzchni PCL po inkubacji w warunkach naturalnych wskazują, że degradacja enzymatyczna PCL jest procesem dwuetapowym — najpierw degradacji ulega faza amorficzna, czemu towarzyszy chwilowy wzrost krystaliczności, a następnie degraduje się faza krystaliczna.

Zmiany ciężarów cząsteczkowych PCL po degradacji w warunkach naturalnych mogą świadczyć o udziale

hydrolizy chemicznej w tym procesie. Jednak nieznaczne ubytki masy i mniejsze (niż w naturalnej wodzie morskiej) zmiany ciężarów cząsteczkowych po długotrwałej inkubacji w wodzie morskiej z NaN_3 dowodzą, że hydroliza chemiczna PCL jest procesem bardzo powolnym.

Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że degradacja PCL w naturalnym środowisku kompostu i wody morskiej jest rezultatem hydrolizy zarówno enzymatycznej, jak i chemicznej wiązań estrowych PCL, przy czym dominującą rolę w tym procesie odgrywa hydroliza enzymatyczna.

LITERATURA

1. Tsuji H., Ikada Y.: w „Current Trends in Polymer Science” (red. De Vries K. L.), Research Trends, 27, Trivandrum, Indie 1999.
2. Ikada Y., Tsuji H.: *Macromol Chem. Rapid. Commun.* 2000, **21**, 117.
3. Gallet G., Lempiainen R., Karlsson S.: *Polym. Degrad. Stab.* 2001, **71**, 147.
4. Kim M-N., Lee A-R., Yoon Y-S., Chin I-Y.: *Eur. Polym. J.* 2000, **36**, 1677.
5. Eldsater C., Erlandsson B., Renstad R., Albertsson A. C., Karlsson S.: *Polymer* 2000, **41**, 1297.

6. Imam S. H., Gordon S. H., Shorgen R. L., Tosteson T. R., Govind N. S., Greene R. V.: *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, **65**, nr 2, 431.
7. Ohtaki A., Akakura N., Nakasaki K.: *Polym. Degrad. Stab.* 1998, **62**, 279.
8. Rutkowska M., Krasowska K., Heimowska A., Stein-ka I.: *Polimery* 2002, **47**, 262.
9. Rutkowska M., Krasowska K., Heimowska A., Stein-ka I., Janik H., Haponiuk J., Karlsson S.: *Pol. J. Envi-ron. Stud.* 2002, **11**, nr 4, 413.
10. Tsuji H., Suzuyoshi K.: *Polym. Degrad. Stab.* 2002, **75**, 347.
11. Tsuji H., Suzuyoshi K.: *Polym. Degrad. Stab.* 2002, **75**, 357.
12. Kasuya K., Takagi K., Ischiwatari S., Yoshida Y., Doi Y.: *Polym. Degrad. Stab.* 1998, **59**, 327.
13. Li S., Vert M.: w „Degradable Polymers” (red. Scott G., Gileat D.), Chapman and Hall, Londyn 1995, rozdz. 4, str. 43.
14. Mochizuki M., Hiramami M.: *Polym. Advan. Technol.* 1997, **8**, 203.
15. Hermanowicz W., Dojlido J., Dożańska W., Kozio-rowski B., Zerbe J.: „Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków”, Arkady, Warszawa 1999, str. 498.
16. Tillier D., Lefebvre H., Tessier M.: *Macromol. Chem. Physic.* 2004, **205**, nr 5, 581.
17. Lenz R. W.: *Adv. Polym. Sci.* 1993, **107**.
18. Haug R. T.: „The Practical Handbook of Compost Engineering”, Lewis, Londyn 1993, str. 121.
19. Encyklopedia biologiczna. Wszystkie dziedziny nauk przyrodniczych, tom III, Agencja Publicystycz-ko-Wydawnicza Opres, Kraków 1998.
20. Hakanson L.: „Środowisko Morza Bałtyckiego. Cha-rakteryzacja fizycznogeograficzna zlewiska Morza Bałtyckiego”, Zeszyt 1, Uppsala University, Sweden 1991.
21. Li S., Mc Carthy S. P., Downey M. J., Gross R. A.: *Macromolecules* 1990, **32**, 4454.
22. Pitt C. G., Chasalow F. I., Hibionada Y. M., Klimas D. M., Schindler A. J.: *J. Appl. Polym. Sci.* 1981, **26**, 3779.
23. Pitt C. G., Gratzel M. M., Kimmel G. L. i in.: *Biomate-rials* 1981, **2**, 215.
24. Tilstra L., Johnsonbaugh D.: *J. Environ. Polym. Deg-rad.* 1993, **1**, 257.
25. Benedict C. V., Cook W. J., Jarrett P., Cameron J. A., Huang S. J., Bell J. P.: *J. Appl. Polym. Sci.* 1983, **28**, 327.
26. Mucha M.: „Polimery a ekologia”, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź 2002.
27. Pitt C. G., Gu Z. W.: *J. Control. Rel.* 1987, **4**, 283.
28. Fredericks R. J., Melveger A. J., Dolegiewtz L. J.: *J. Polym. Sci.: Polym Phys. Ed.* 1984, **22**, 57.