



從環境中篩選可分解塑膠之潛力微生物

Screening of Elite Plastic Degrading Microorganisms from Environments

簡曉琳 H. L. Chien¹、蔡依庭 Y. T. Tsai¹、曾維崧 W. S. Tseng¹、
劉啟德 C. T. Liu^{2,3,4}

國立臺灣大學(NTU) 生物科技研究所 ¹研究生、²教授

國立臺灣大學(NTU) 農業化學系 ³教授

中央研究院(Academia Sinica) 農業生物科技研究中心 ⁴副研究員

摘要/Abstract

現今全世界每年產生4億噸以上的塑膠，有鑒於大量的塑膠製品被不當丟棄，而對環境造成嚴重且長遠的負面影響，已有許多國家結合禁用與收費方式以抑止不同類型的一次性塑膠之使用，並對生產傳統不可降解之塑膠產品加徵稅賦或是直接訂定使用禁令；另一方面，也積極鼓勵生物可分解塑膠原料製品的開發與使用，期能降低對環境的衝擊。塑膠依其原料來源分成石油基及生物基兩大類，不管是何種來源，可被微生物分解或降解的塑膠均稱為生物可分解塑膠。本研究團隊利用平板培養基快篩平台，從台灣各地的土壤中篩選出多株在常溫(25°C)條件下即可分解聚丁二酸丁二醇酯(PBS)系列塑膠的潛力菌株。其中從屏東萬丹土壤所分離出的真菌菌株*Aspergillus fumigatus* L30，在兩星期內可降解重量約百分之二十的PBSA塑膠薄膜，與文獻上已知的*A. oryzae* RIB40分解菌株相較，具有更顯著的分解效率。後續除將進一步探討該潛力菌株在陸地環境分解PBS系列塑膠產品的應用性外，也將評估生分解過程中對於生物與非生物環境造成的影響。

Nowadays, more than 400 million tons of plastics are produced in the world every year. In view of the fact that a large number of plastic products are improperly discarded, which has caused serious and long-term negative impacts on the environments. To reduce the use of different types of single-use plastics, many countries have banned or introduced additional charge for these items. In addition, they also impose taxes on the production of traditional non-degradable plastic products or directly set use bans. On the other hand, they also actively encourage the development and use of biodegradable plastic materials, which expect to reduce the impact on the environments. According to the source of their raw materials, plastics are divided into two categories: fossil-based and bio-based. Plastics that can be decomposed or degraded by microorganisms are called biodegradable plastics. Our team uses the clean zone method to isolate biodegrade microorganisms which can degrade PBS series plastic at room temperature (25°C) from Taiwan soil. One of them called *Aspergillus fumigatus* L30 shows more significant degrade ability than published strain *A. oryzae* RIB40. *A. fumigatus* L30 can degrade 20% of PBSA plastic film in 2 weeks. Further, we will explore the applicability of this potential strain

to degrade PBS series plastic products in terrestrial environments, and will also evaluate the impact on biological and non-biological environment.

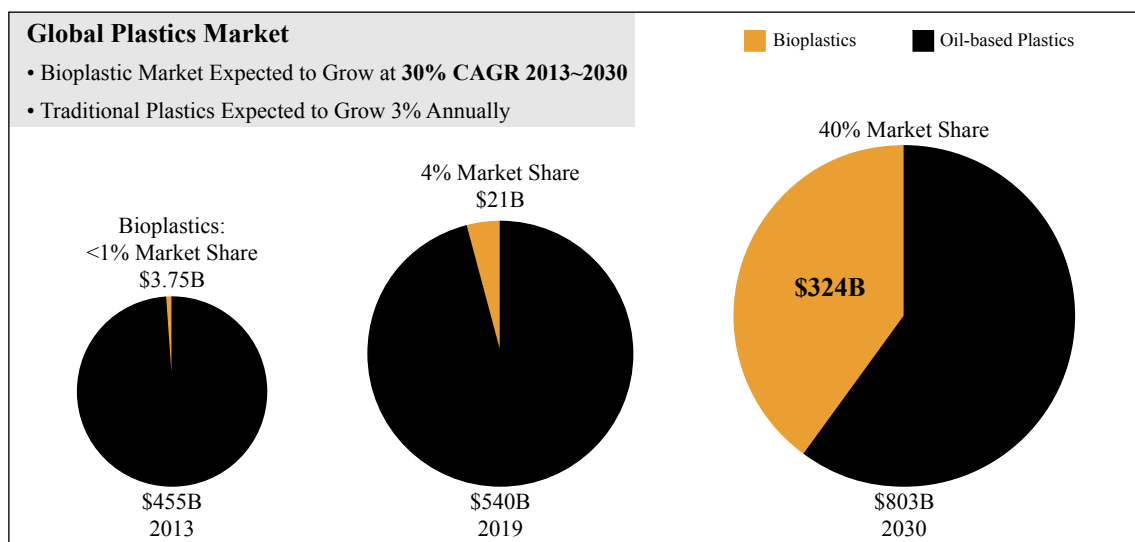
關鍵字/Keywords

生分解塑膠(Biodegrade Plastic)、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、快篩平台(Clear Zone Method)、麴黴菌(*Aspergillus*)

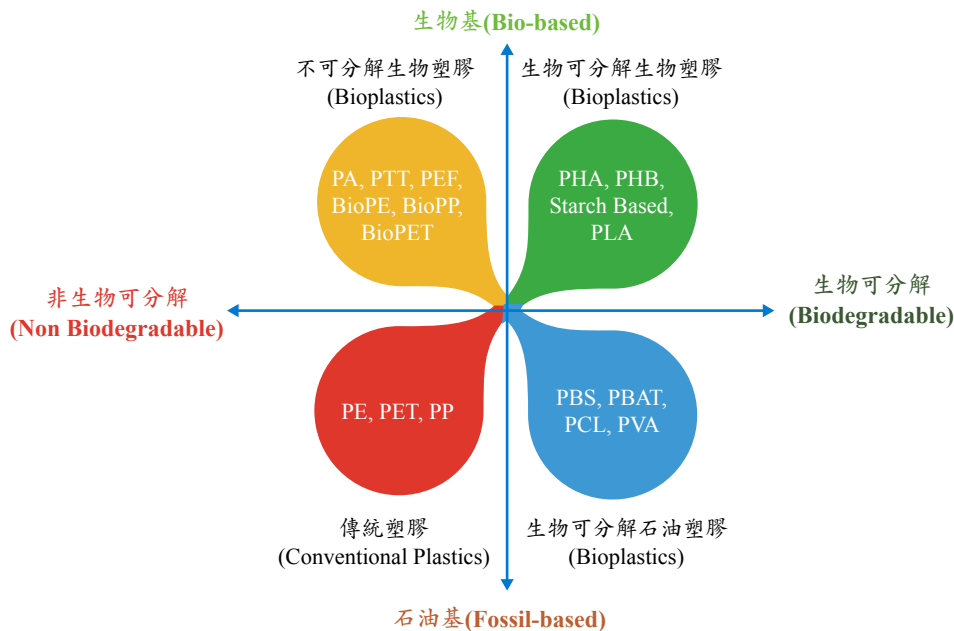
塑膠為全球工業製造與民生需用的重要高分子材料。塑膠的大規模生產可追溯到二次世界大戰後，非軍事用途的塑膠產品開始被大量製造，年產量從1950年的230萬噸急遽上升到2020年的4億公噸左右⁽¹⁾，其中最大宗用途是作為包裝容器材料，約占整體塑膠產業的26%⁽²⁾。全球塑膠產值自2013至2019年已由4,550億美元成長至5,400億美元，預估將以30%的複合年均成長率(CAGR)擴大，於2030年達到8,030億美元的

市場規模(圖一)⁽³⁾。

塑膠依其成分來源可分為石油基(Fossil-based)與生物基(Bio-based)這兩大類。傳統塑膠的原料大都提煉自石化燃料(石油)，例如塑膠袋及各式容器使用的聚乙烯(PE)、汽車零件與耐熱容器原料為聚丙烯⁽⁴⁾以及寶特瓶的原料聚對苯二甲酸乙二酯(PET)等。有鑒於石化燃料的資源有限性與提煉過程伴隨大量溫室氣體的排放，近年來利用植物油、玉米澱粉或微生



▲圖一 全球塑膠產業市場與前景⁽³⁾



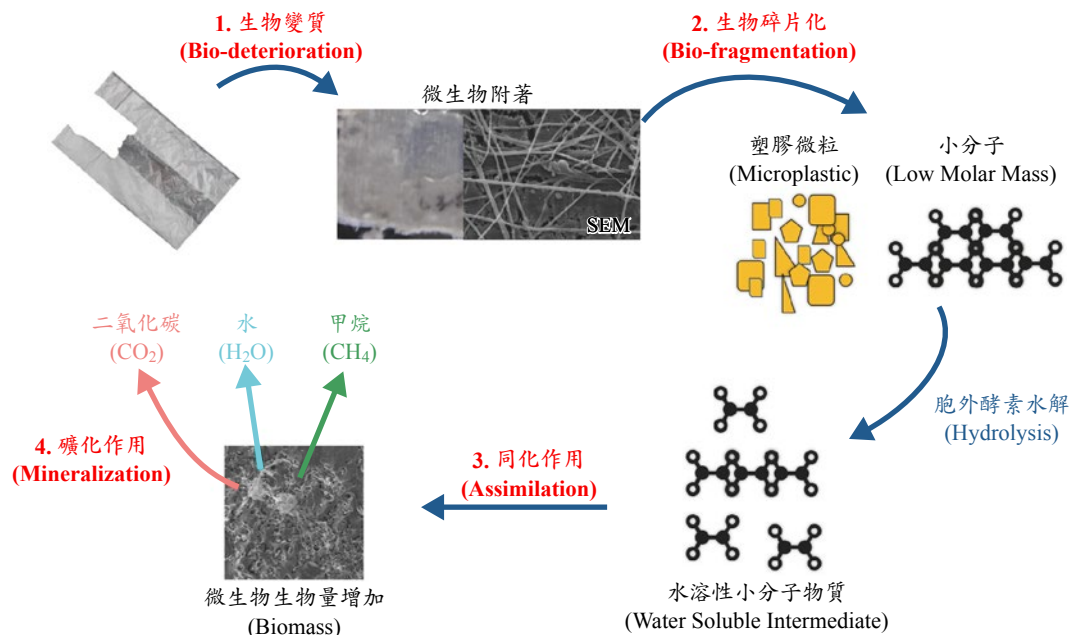
資料來源：European Bioplastics

▲圖二 生物塑膠(Bioplastic)之分類

物等原料的塑膠原料受到矚目。依照定義，無論是上述使用全部或部分來自生物基塑膠(Bio-based Plastic)或是生物可分解塑膠(Biodegradable Plastic)皆可稱為生物塑膠(Bioplastic)⁽⁵⁾。然而如圖二所示，並非所有的生物塑膠都屬於生物可分解(Biodegradable)，以BioPE為例，雖然是使用甘蔗來源的高分子材料作為聚合單體，但是卻無法被分解。常見的生物可分解塑膠，例如使用石油基原料的Polybutylene Succinate (PBS)、Poly(Butylene Succinate-co-Butylene Adipate) (PBSA)、Polycaprolactone (PCL)與Polybutylene Adipate Terephthalate (PBAT)，以及使用生物基的Polylactic Acid (PLA)、Polyhydroxybutyrate (PHB)、纖維素(Cellulose)等會隨著環境條件而呈現不同的

生分解效率⁽⁵⁾。

塑膠的生分解過程可以分成四個階段⁽⁶⁾，如圖三所示：第一階段為生物變質(Bio-deterioration)，是指微生物藉由物理、化學作用或是酵素的幫助使其可以在塑膠表面或是內部著生，因而造成塑膠材質的劣化⁽⁷⁾；第二階段為生物碎片化(Bio-fragmentation)，主要依靠微生物分泌的特定氧化還原酶、水解酶等酵素或甚至是自由基將聚合物進一步切割成小分子⁽⁸⁻¹⁰⁾；第三階段為同化作用(Assimilation)，指的是前兩階段的分解產物可以直接或是經由分解代謝路徑後再被微生物當作營養源或能量來使用⁽¹¹⁾；最終階段為礦化作用(Mineralization)，塑膠聚合物中的原子會全部被轉換形成二氧化碳、甲烷、氮氣、鹽

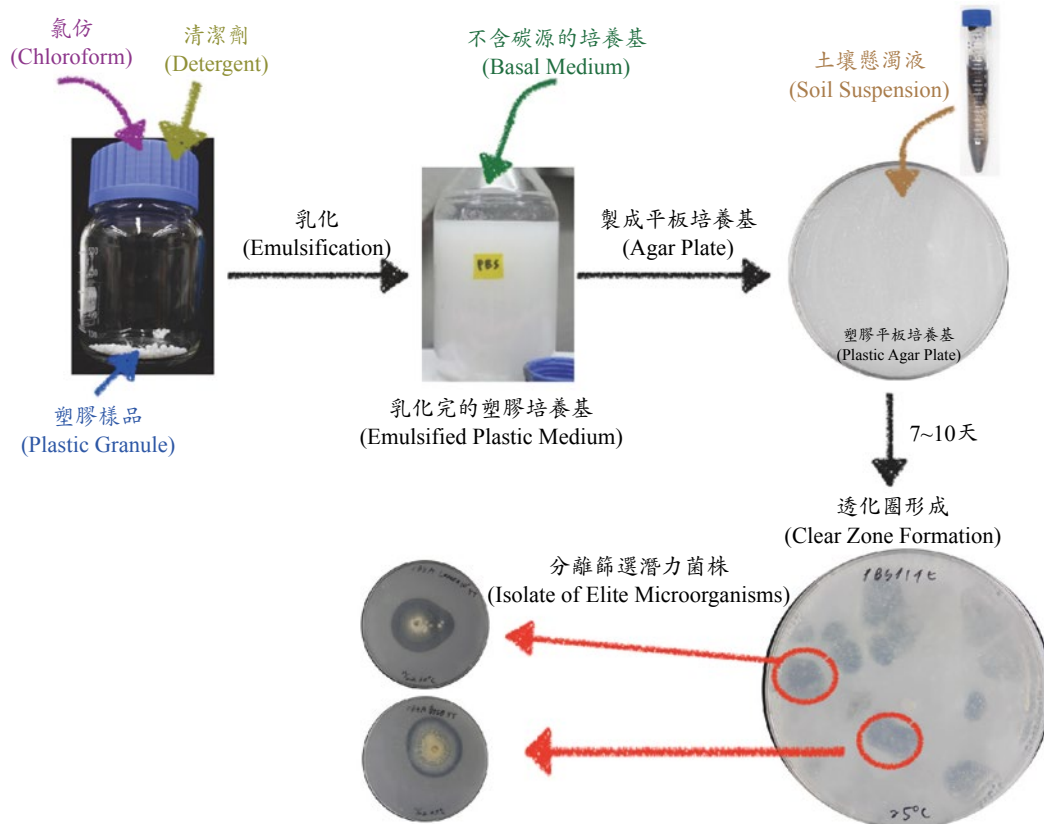


▲圖三 塑膠生物分解的四個主要階段

類等化合物，並且再被循環利用⁽¹²⁾。

至今已有多具有優異分解塑膠能力的微生物從環境中被篩選出來，例如：2016年《Science》刊登一篇由日本京都工藝纖維大學(Kyoto Institute of Technology)與慶應義塾大學(Keio University)的聯合研究團隊從塑料瓶回收設施中篩選出一株可分解PET的大阪堺菌(*Ideonella sakaiensis* 201-F6)⁽¹³⁾，他們將這株菌與PET薄膜(60 mg, 20 mm × 15 mm × 0.2 mm)共同培養在30°C環境，發現在六星期內PET薄膜幾乎被完全分解，因這株菌可有效地水解PET酯鍵，該團隊將這個新發現的酵素命名為PET酶(PETase)；中國科學院物理研究所的團隊則由堆肥中分離出一株雜色麴黴菌(*Aspergillus versicolor*)，其可在30°C條件下，於25天

內分解90.5%的PBSA塑膠片(2 cm × 2 cm × 40 μm)⁽⁹⁾。此外，也有其他微生物所分泌的酵素可降解各式塑膠，例如根霉菌(*Rhizopus delemar*)、麴黴菌屬(*A. flavus*, *A. niger*)及鐮孢菌屬(*Fusarium* sp.)等微生物所分泌的脂酶(Lipase)、糖苷酶(Glycosidase)、過氧化氫酶(Catalase)、蛋白酶(Protease)或是角質酶(Cutinase)皆可降解聚己內酯(Polycaprolactone; PCL)^(5, 14-15)；小孢擬盤多毛孢菌(*Pestalotiopsis microspore*)所分泌的錳過氧化物酶(Manganese Peroxidase)可降解聚乙烯(Polyethylene; PE)；施氏假單胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)所分泌的絲氨酸水解酶(Serine Hydrolase)則可分解聚羥基烷酸酯(Polyhydroxyalkanoate; PHA)⁽¹⁵⁾。



▲圖四 利用平板培養基篩選塑膠分解潛力菌株之試驗流程圖 (彩圖請見材料世界網)

從環境中篩選可分解塑膠的潛力微生物

常見方法為先將土壤、底泥或海水等環境樣本懸濁後均勻塗抹在含有欲分解之高分子聚合物(塑膠)平板培養基上，藉由觀察分解圈來判斷該樣本中是否具有分解能力的微生物存在，再進一步將潛力菌株分離純化⁽¹⁶⁻¹⁷⁾；另外也可在不含有碳源的平板培養基貼附所欲分解之塑膠薄膜，觀察薄膜周圍是否有微生物菌落生成⁽¹⁸⁻¹⁹⁾，若有則可推估該微生物可利用此種塑膠作

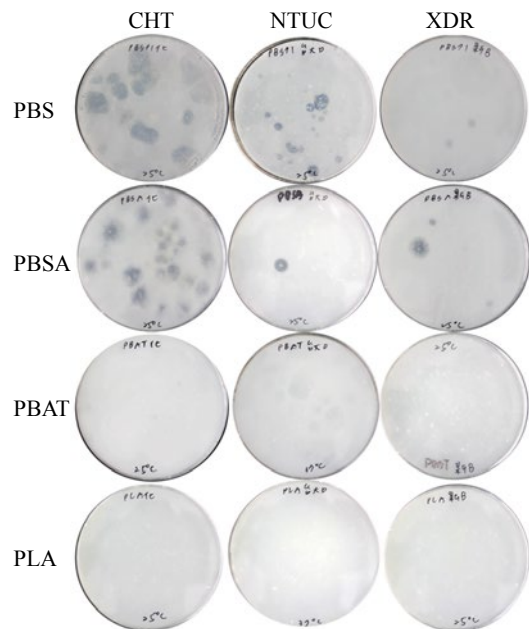
為其營養源供生長所需。

本研究團隊先前利用平板培養基快篩平台(Plate Screening)欲從土壤中分離可降解PBS、PBSA、PBAT或PLA等塑膠的潛力微生物，其試驗流程如圖四所示。我們分別從彰化縣秀水鄉的番茄農田、台灣大學農學院試驗田以及新北市新店溪河濱農地採取土壤樣本，以蒸餾水懸濁後塗抹在以上述塑膠原料作為主要碳源的平板培養基上。各種塑膠原料顆粒先經乳化後添加至含有洋菜膠的基礎培養基(Basal Medium)中，待凝結成為固態平板培養基(Agar



Plate)。將土壤懸濁液均勻塗抹在塑膠平板培養基上，參考國際測試標準ISO-17556的試驗條件放置於25°C環境中培養，數日後觀察培養基上是否有透化溶解圈(Clear Zone)形成，若有則推測該土壤樣本中含有可降解標的塑膠原料的微生物。接下來將形成透化溶解圈的菌落以分區劃線法(Streaking Method)於新的塑料固態培養基上進行菌落分離步驟，至確認單一菌落具有分解圈為止。最後將完成分離的菌株進行菌種分子鑑定【註：細菌以16S rRNA基因，真菌則是以18S rRNA或是ITS (Internal Transcribed Spacer，轉錄間隔區) 基因序列】(20-22)，並以甘油保存在-80°C冰箱或液態氮槽中長期保存。

由實驗結果得知，在上述三處供試農地土壤中均有可降解PBS及PBSA塑膠的微生物存在(圖五)。其中PBS平板培養基上的透化圈因較PBSA多且明顯，因而推測供試土壤中可能存在較多可分解PBS塑膠的微生物或酵素。PBAT是一種被認為可完全生分解的塑膠材料⁽¹⁷⁾，然而在本實驗中三處農地土壤所對應的培養基上均無法觀察到明顯的透化圈，我們推測供試土壤中沒有可分解PBAT的微生物與酵素，或是含量低於檢出極限。此外，我們在PLA原料的試驗中也未觀察到明顯的透化圈。根據文獻資料，PLA生分解的最適溫度通常需達到58°C以上⁽²³⁾，即適合在堆肥的高溫期條件下進行。因本實驗所設定的溫度為25°C，推測可能是反應溫度太低以至於未能降解。根據上述平板培養基快篩平台的實驗結果，我們初步推測PBS系列(PBS與PBSA)的塑

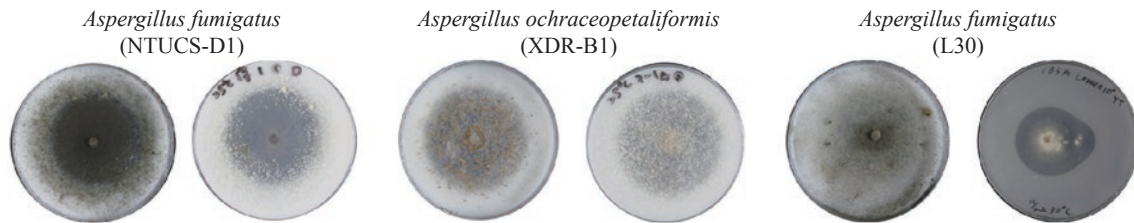


註：CHT：彰化秀水鄉番茄農田土壤
NTUC：台灣大學試驗田土壤
XDR：新北市新店河濱農田土壤

▲圖五 使用平板培養基快篩平台評估農田土壤的分解塑膠原料潛力

膠在台灣農地土壤中應是較易被分解，但有待進一步驗證。

我們進一步從分離菌株中篩選出三株可降解PBS以及PBSA塑膠的潛力菌株，由其菌落形態判斷屬於絲狀真菌，經ITS序列鑑定這三株皆為麴黴菌屬(*Aspergillus* spp.)⁽²⁰⁻²²⁾，分別是分離自台灣大學試驗田土壤的*Aspergillus fumigatus* NTUCS-D1以及分離自新店河濱農地土壤之*Aspergillus ochraceopetaliformis* XDR-B1菌株，此外也從屏東萬丹土壤分離出*Aspergillus fumigatus* L30(圖六)。三株菌株均可在25°C~37°C的溫度範圍內生長。



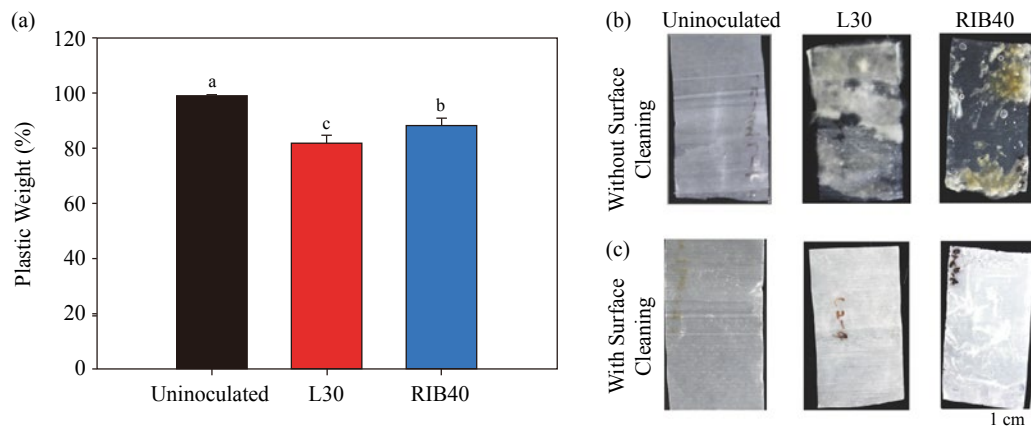
註：從平板培養基正面可觀察到各種麴黴菌的菌絲生長形態（左），從背面則可觀察到標的塑膠被麴黴菌分解形成的透化圈（右）

▲圖六 潛力菌株於PBS系列塑膠平板培養基上的生長形態與透化溶解圈。從平板培養基正面可觀察到各種麴黴菌的菌絲生長形態（左），從背面則可觀察到標的塑膠被麴黴菌分解形成的透化圈（右）

評估單一潛力菌株的 塑膠降解效果

為了量化分離菌株降解塑膠的效果，會將潛力菌株與高分子聚合物薄膜或是塑膠成品進行共同培養以評估分解能力。因培養過程不添加或僅添加少量碳源，故分離菌株僅能利用標的塑膠作為主要碳源。常見的分解能力評估方式包括：①直接測量降解過程中聚合物的重量變化⁽²⁴⁻²⁵⁾；②以電子顯微鏡觀察聚合物表面受到微生物侵蝕或降解程度⁽¹³⁾，並同時量測降解過程中聚合物的物性，例如張力變化等⁽¹⁶⁾；③此外也會利用傅立葉轉換紅外光譜(Fourier-Transform Infrared Spectroscopy; FTIR)分析經微生物降解後的聚合物組成改變，藉以推測微生物進行聚合物降解時之作用位置⁽²⁶⁻²⁷⁾；④而經微生物代謝過之聚合物中間產物則可利用液相層析質譜儀(Liquid Chromatography Mass Spectrometry; LC-MS)分析其共培養液體中的化學組成分⁽²⁸⁻²⁹⁾，除了可推測代謝路徑外，也可藉以評估其代謝中間產物是否會對環境產生危害；⑤另一常用來評估微生物降解能力的方式是

將潛力菌株與聚合物共同培養於一密閉空間中，分析降解過程中微生物的礦化作用。礦化作用原指微生物將土壤中有機態的氮轉變成無機氮化合物的過程，在有氧條件下的塑膠生分解過程則是指微生物透過消耗大氣中的氧氣將塑膠材料轉化成為二氧化碳、水和生物質(Biomass)⁽³⁰⁾。塑膠高分子聚合物被分解轉換所生成的二氧化碳可以藉由滴定分析⁽³¹⁾、氣相層析熱導偵測器(GC-TCD)⁽³²⁾、FTIR⁽³³⁾等方法來檢測量化微生物的呼吸作用而得知；然而該呼吸測定法只能評估CO₂釋放量，並無法估算微生物在降解塑膠過程中所增加的生物量或是副產物量⁽³⁴⁾。若需更直接觀察塑膠是否有進入到微生物體內供其代謝，可利用穩定同位素標定塑膠聚合物（例如¹³C）來分析礦化作用，可以解決傳統測量方法的限制。¹³C標定的塑膠聚合物被微生物分解後釋出的碳，再經微生物同化利用到菌體內可藉由奈米級二次離子質譜儀(Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry; NanoSIMS)或是拉曼光譜分析儀(Raman Microspectroscopy)來直接觀察聚合物同化到菌體內的位置⁽³⁵⁻³⁸⁾。



▲圖七 比較*A. fumigatus* L30菌株以及*A. oryzae* RIB40對照組菌株分解PBSA塑膠薄膜的能力與其生薄膜表面的生長形態。(a)塑膠薄膜與菌株共培養14天後之重量變化；(b)附著在塑膠薄膜表面的菌絲；(c)清洗掉菌絲後之塑膠薄膜表面(彩圖請見材料世界網)

關於塑膠被降解後的相關物性分析，本團隊將潛力菌株接種至液態基礎培養基中，再將一定大小、重量的塑膠薄膜(2.5 cm × 5 cm × 50 μm)置入三角搖瓶進行共培養，因培養過程中不額外添加碳源，潛力菌株僅能使用受試塑膠作為唯一碳源。藉由量測培養過程中塑膠薄膜的重量變化以及觀察表面形態，評估其分解程度。本實驗除了評估*A. fumigatus* L30潛力菌株的PBSA降解能力外，亦使用一株已發表在文獻上具有降解PBSA塑膠能力之*Aspergillus oryzae* RIB40菌株(ATCC-42149)作為對照⁽³⁹⁾。如圖六所示，*A. fumigatus* L30菌株以及對照組*A. oryzae* RIB40菌株均可使用PBSA作為唯一碳源而將其降解。培養14天後可看到L30處理組的塑膠薄膜重量下降約20%，RIB40處理則下降約11.8% (圖七(a))。將塑膠薄膜取出觀察，可明顯看到接種L30潛力菌株的菌絲附著於塑膠薄膜上形

成大塊灰色棉絮狀，而RIB40組別則是有黃褐色菌絲附著在表面(圖七(b))；進一步將塑膠薄膜以蒸餾水清洗過後，雖在L30組別未看到塑膠薄膜有明顯破損形成孔洞的情形，但可觀察到塑膠片的厚度變薄，透明度增加(圖七(c))，說明其總體塑膠薄膜重量減少量較RIB40來得多。

模擬環境生分解試驗

上述評估潛力菌株的塑膠生分解能力均是在最少的外在環境或生物影響因子下所進行的試驗，然而實際環境中有許多影響因子，例如固有微生物族群、動植物、環境理化因子等，均會影響到潛力菌株在環境中的生分解效果，且塑膠分解過程的產物對於環境影響也需要評估。海洋塑膠污染雖是近年備受關注的環保議題，但是被丟棄並保留在陸地環境中的塑膠廢棄物估計是釋放到海洋的4到23倍⁽⁴⁰⁾。然而，相



對於河海湖泊，目前針對陸地環境所做的調查報告仍顯不足⁽⁴¹⁻⁴⁷⁾，因此有必要積極投入研究。

針對陸地環境所進行的塑膠生分解影響評估，以土壤為例，一般會將塑膠掩埋在標的土壤中，再接種潛力菌株，觀察塑膠在潛力菌株以及固有微生物族群的協同作用下之生分解情形⁽²⁵⁾。對環境的影響評估可分成兩部分，第一部分是針對土壤本身的影響程度，主要是分析土壤中的非生物因子，例如土壤pH值、土壤團粒、土壤中有機物及有效氮等理化性質變化⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾；第二部分是針對環境中生物受影響程度⁽⁵⁰⁾，主要是分析土壤微生物菌相、線蟲及蚯蚓的生長發育以及植物的生長是否受到抑制或是促進⁽⁴⁴⁾。

結語與展望

現今全世界每年產生4億噸以上的塑膠，廢棄的塑膠中僅約9%可被完全回收，30%則是焚燒處理，其餘60%以上是被堆棄在垃圾掩埋場甚至是自然環境中，預估至2040年將會累計13億噸以上的廢棄塑膠被丟棄在陸地與海洋環境中⁽⁵¹⁾。有鑒於大量的塑膠製品被不當丟棄而對環境造成長遠重大的負面影響，已有許多國家結合禁用與收費方式，藉以抑止不同類型的一次性塑膠之使用，並對生產傳統不可降解之塑膠產品加徵稅賦或是直接訂定使用禁令；另一方面，也積極鼓勵生分解塑膠(Biodegrade Plastic)原料製品的開發與使用，期能降低對環境的衝擊。

塑膠生分解速度主要取決於微生物水

解(Hydrolysis)聚合物的能力，而聚合物本身的化學結構、分子量、鍵柔韌性及結晶度等因子都會影響其水解活性⁽⁵²⁾。因此，生分解塑膠原料的研發趨勢將會是依產品耐久性需求與分解期望速率做聚合物組成調整，以達到可調控其生分解的目的。另一方面則是針對標的塑膠篩選具有分解潛力的微生物或是酵素，藉由不同施用劑量達到調控在環境中生分解的速度。

目前對於生物可分解塑膠的研究，國際間尚未有完整的標準規範可供遵循，大多數的實驗都以實驗室內的類比條件下進行探討，缺乏考量自然環境中的生物以及非生物因子，因此即使是通過認證的生物可分解塑膠產品也不能保證能在各種環境條件下達到預期分解效果。有鑑於此，本研究團隊與工研院材料與化工研究所目前以生物可分解塑膠農膜為標的，藉由分析各地農田的土壤潛在塑膠分解能力、土壤理化性質與酵素活性，以及土壤微生物群落等資料，期能建立一套可預測農地對於塑膠農膜生分解能力的系統。對於生分解塑膠材料的開發廠商而言，可以根據分析資料預知不同地區的農田土壤是否具有足夠分解特定生分解塑膠農膜的潛力，抑或需要額外添加可有效分解的微生物或酵素。也可以依照作物栽培時間長短需求，作為調整單體或是相溶劑配方的驗證，生產出合適的分(崩)解時間的農膜。此外，這樣的資料對於農民而言，更是可以按照自己農地條件與栽培作物種類選擇適合的生分解農膜，兼顧農地環境永續與經濟合理性。❁



誌 謝

本文實驗內容感謝工研院材化所張勝隆博士、黃淑娟博士及郭信良博士提供材料及技術支援。

參考文獻

1. 聯合國環境署United Nations Environment Programme.
2. Geyer, R., Jambeck, J.R., and Law, K.L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances* 3, e1700782.
3. Grand View Research 2014, European Bioplastic 2013, BBC Research 2014, Nexant Inc 2012.
4. Thirunavukarasu, K., Purushothaman, S., Sridevi, J., Aarthy, M., Gowthaman, M.K., Nakajima-Kambe, T., and Kamini, N.R. (2016). Degradation of poly (butylene succinate) and poly (butylene succinate-co-butylene adipate) by a lipase from yeast *Cryptococcus* sp. grown on agro-industrial residues. *International Biodeterioration & Biodegradation* 110, 99-107.
5. Tokiwa, Y., Calabia, B.P., Ugwu, C.U., and Aiba, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International journal of molecular sciences* 10, 3722-3742.
6. Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., and Nava-Saucedo, J.-E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere* 73, 429-442.
7. Gu, J.-D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52, 69-91.
8. Green, F., and Highley, T.L. (1997). Mechanism of brown-rot decay: Paradigm or paradox. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39, 113-124.
9. Zhao, J.-H., Wang, X.-Q., Zeng, J., Yang, G., Shi, F.-H., and Yan, Q. (2005). Biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate) by *Aspergillus versicolor*. *Polymer Degradation and Stability* 90, 173-179.
10. Mueller, R.-J. (2006). Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry* 41, 2124-2128.
11. Krzan, A., Hemjinda, S., Miertus, S., Corti, A., and Chiellini, E. (2006). Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics. *Polymer Degradation and Stability* 91, 2819-2833.
12. Dommergues, Y., and Mangenot, F. (1970). "Ecologie microbienne du sol". Masson).
13. Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., and Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351, 1196-1199.
14. Abou-Zeid, D.-M., Müller, R.-J., and Deckwer, W.-D. (2001). Degradation of natural and synthetic polyesters under anaerobic conditions. *Journal of biotechnology* 86, 113-126.
15. Muhamad, W., Othman, R., Shaharuddin, R.I., and Irani, M.S. (2015). Microorganism as plastic biodegradation agent towards sustainable environment. *Adv Environ Biol* 9, 8-14.
16. Hsieh, W.C., Wada, Y., and Chang, C.P. (2009). Fermentation, biodegradation and tensile strength of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Delftia acidovorans*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40, 143-147.
17. Jian, J., Xiangbin, Z., and Xianbo, H. (2020). An overview on synthesis, properties and applications of poly(butylene-adipate-co-terephthalate)–PBAT. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* 3, 19-26.
18. Bailes, G., Lind, M., Ely, A., Powell, M., Moore-Kucera, J., Miles, C., Inglis, D., and Brodhagen, M. (2013). Isolation of Native Soil Microorganisms with Potential for Breaking Down Biodegradable Plastic Mulch Films Used in Agriculture. *Jove-Journal of Visualized Experiments*.
19. Bonifer, K.S., Wen, X.F., Hasim, S., Phillips, E.K., Dunlap, R.N., Gann, E.R., Debruyne, J.M., and Reynolds, T.B. (2019). *Bacillus pumilus* B12 Degrades Poly(lactic Acid) and Degradation Is Affected by Changing Nutrient Conditions. *Frontiers in Microbiology* 10.
20. Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., and Wellington, E.M.H. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3233-3241.
21. Manter, D.K., and Vivanco, J.M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods* 71, 7-14.
22. Ragonezi, C., Caldeira, A.T., Martins, M.R., Salvador, C., Santos-Silva, C., Ganhao, E., Klimaszewska, K., and Zavatieri, A. (2013). Molecular approach to characterize ectomy-corrhizae fungi from Mediterranean pine stands in Portugal. *Braz J Microbiol* 44, 657-664.
23. Vasile, C., Pamfil, D., Rapa, M., Darie-Nita, R.N., Mitelut, A.C., Popa, E.E., Popescu, P.A., Draghici, M.C., and Popa, M.E. (2018). Study of the soil burial degradation of some PLA/CS biocomposites. *Composites Part B-Engineering* 142, 251-262.
24. Yamamoto-Tamura, K., Hiradate, S., Watanabe, T., Koitabashi, M., Sameshima-Yamashita, Y., Yarimizu, T., and Kitamoto, H. (2015). Contribution of soil esterase to biodegradation of aliphatic polyester agricultural mulch film in cultivated soils. *Amb Express* 5.
25. Zhang, J., Chen, J., Jia, R.M., Dun, Z.H., Wang, B.T., Hu, X.P., and Wang, Y. (2018). Selection and evaluation of microorganisms for biodegradation of agricultural plastic film. *3 Biotech* 8.
26. Phukon, P., Saikia, J.P., and Konwar, B.K. (2012). Bio-plastic (P-3HB-co-3HV) from *Bacillus circulans* (MTCC 8167) and its biodegradation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 92, 30-34.
27. Xia, W., Zhu, N., Ni, Z., and Chen, M. (2017). Fabrication and characterization of biodegradable composites from poly (butylene succinate-co-butylene adipate) and



- Taihu Lake blue algae. *Advanced Composites Letters* 26, 096369351702600501.
28. Shah, A.A., Eguchi, T., Mayumi, D., Kato, S., Shintani, N., Kamini, N.R., and Nakajima-Kambe, T. (2013). Degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic co-polyesters by depolymerases from *Roseateles depolymerans* strain TB-87 and analysis of degradation products by LC-MS. *Polymer degradation and stability* 98, 2722-2729.
 29. Sato, S., Saika, A., Shinozaki, Y., Watanabe, T., Suzuki, K., Sameshima-Yamashita, Y., Fukuoka, T., Habe, H., Morita, T., and Kitamoto, H. (2017). Degradation profiles of biodegradable plastic films by biodegradable plastic-degrading enzymes from the yeast *Pseudozyma antarctica* and the fungus *Paraphoma* sp. B47-9. *Polymer Degradation and Stability* 141, 26-32.
 30. Andrady, A.L. (1994). Assessment of environmental biodegradation of synthetic polymers. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 34, 25-76.
 31. Tosin, M., Barbale, M., Chinaglia, S., and Degli-Innocenti, F. (2020). Disintegration and mineralization of mulch films and leaf litter in soil. *Polymer Degradation and Stability* 179, 109309.
 32. Adrados, A., De Marco, I., Caballero, B.M., López, A., Laresgoiti, M.F., and Torres, A. (2012). Pyrolysis of plastic packaging waste: A comparison of plastic residuals from material recovery facilities with simulated plastic waste. *Waste Management* 32, 826-832.
 33. Jin, W., Shen, D., Liu, Q., and Xiao, R. (2016). Evaluation of the co-pyrolysis of lignin with plastic polymers by TG-FTIR and Py-GC/MS. *Polymer Degradation and Stability* 133, 65-74.
 34. Bettas Ardisson, G., Tosin, M., Barbale, M., and Degli-Innocenti, F. (2014). Biodegradation of plastics in soil and effects on nitrification activity. A laboratory approach. *Frontiers in microbiology* 5, 710.
 35. Herrmann, A.M., Ritz, K., Nunan, N., Clode, P.L., Pett-Ridge, J., Kilburn, M.R., Murphy, D.V., O'donnell, A.G., and Stockdale, E.A. (2007). Nano-scale secondary ion mass spectrometry—A new analytical tool in biogeochemistry and soil ecology: A review article. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1835-1850.
 36. Huang, W.E., Stoecker, K., Griffiths, R., Newbold, L., Daims, H., Whiteley, A.S., and Wagner, M. (2007). Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function. *Environmental Microbiology* 9, 1878-1889.
 37. Eichorst, S.A., Strasser, F., Woyke, T., Schintlmeister, A., Wagner, M., and Woebken, D. (2015). Advancements in the application of NanoSIMS and Raman microspectroscopy to investigate the activity of microbial cells in soils. *FEMS microbiology ecology* 91, fiv106.
 38. Zumstein, M.T., Schintlmeister, A., Nelson, T.F., Baumgartner, R., Woebken, D., Wagner, M., Kohler, H.-P.E., McNeill, K., and Sander, M. (2018). Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO₂ and microbial biomass. *Science advances* 4, eaas9024.
 39. Maeda, H., Yamagata, Y., Abe, K., Hasegawa, F., Machida, M., Ishioka, R., Gomi, K., and Nakajima, T. (2005). Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 778-788.
 40. Horton, A.A., Walton, A., Spurgeon, D.J., Lahive, E., and Svendsen, C. (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the Total Environment* 586, 127-141.
 41. Machado, A.a.D., Lau, C.W., Till, J., Kloas, W., Lehmann, A., Becker, R., and Rillig, M.C. (2018). Impacts of Microplastics on the Soil Biophysical Environment. *Environmental Science & Technology* 52, 9656-9665.
 42. Qi, Y.L., Yang, X.M., Pelaez, A.M., Lwanga, E.H., Beriot, N., Gertsen, H., Garbeva, P., and Geissen, V. (2018). Macro- and micro- plastics in soil-plant system: Effects of plastic mulch film residues on wheat (*Triticum aestivum*) growth. *Science of the Total Environment* 645, 1048-1056.
 43. Serrano-Ruiz, H., Martin-Closas, L., and Pelacho, A.M. (2018). Application of an in vitro plant ecotoxicity test to unused biodegradable mulches. *Polymer Degradation and Stability* 158, 102-110.
 44. Boots, B., Russell, C.W., and Green, D.S. (2019). Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground. *Environmental Science & Technology* 53, 11496-11506.
 45. Gao, M.L., Liu, Y., and Song, Z.G. (2019). Effects of polyethylene microplastic on the phytotoxicity of di-n-butyl phthalate in lettuce (*Lactuca sativa* L. var. ramosa Hort). *Chemosphere* 237.
 46. Machado, A.a.D., Lau, C.W., Kloas, W., Bergmann, J., Bacher, J.B., Faltin, E., Becker, R., Gorlich, A.S., and Rillig, M.C. (2019). Microplastics Can Change Soil Properties and Affect Plant Performance. *Environmental Science & Technology* 53, 6044-6052.
 47. Rillig, M.C., Lehmann, A., Machado, A.a.D., and Yang, G. (2019). Microplastic effects on plants. *New Phytologist* 223, 1066-1070.
 48. Blöcker, L., Watson, C., and Wichern, F. (2020). Living in the plastic age-Different short-term microbial response to microplastics addition to arable soils with contrasting soil organic matter content and farm management legacy. *Environmental Pollution* 267, 115468.
 49. Wiedner, K., and Polifka, S. (2020). Effects of microplastic and microglass particles on soil microbial community structure in an arable soil (Chernozem). *SOIL* 6, 315-324.
 50. Serrano-Ruiz, H., Martin-Closas, L., and Pelacho, A.M. (2021). Biodegradable plastic mulches: Impact on the agricultural biotic environment. *Sci Total Environ* 750, 141228.
 51. Lau, W.W., Shiran, Y., Bailey, R.M., Cook, E., Stuchtey, M.R., Koskella, J., Velis, C.A., Godfrey, L., Boucher, J., and Murphy, M.B. (2020). Evaluating scenarios toward zero plastic pollution. *Science* 369, 1455-1461.
 52. Wang, G.X., Huang, D., Ji, J.H., Volker, C., and Wurm, F.R. (2021). Seawater-Degradable Polymers-Fighting the Marine Plastic Pollution. *Advanced Science* 8.