

## Ispitivanje rasta bakterija *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* i *Escherichia coli* na biorazgradivim plastičnim kesama kao jedinom izvoru hrane

---

*Cilj ovog istraživanja bio je da se potvrdi mogućnost uobičajenih bakterija da žive na plastičnim kesama kao jedinom izvoru hrane (ugljenika) i da time učestvuju u procesima biodegradacije. Zasejana su tri soja bakterija (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* i *Escherichia coli*) u supstrat koji je činila minimalna podloga (bez glukoze i drugih potencijalnih izvora ugljenika) i isitnjena plastična kesa. Rezultati su očitavani nakon 2 dana, nakon 18 dana i nakon 35 dana inkubacije. Vijabilnost bakterija proveravana je zasejavanjem inkuluma iz eksperimentalnih epruveta u epruvete sa bogatom hranljivom LB podlogom. Istraživanje je pokazalo da aditiv D2W koji se dodaje polietilenu katalizuje prirodan proces razgradnje pomoću mikroorganizama i da plastične kese predstavljaju pogodan supstrat za rast korišćenih bakterija. Takođe je pokazalo da se bakterija *P. aeruginosa* potpuno prilagodila postavljenim uslovima i pokazala najveća degradabilna svojstva.*

---

### Uvod

Plastične kese, koje su u masovnoj upotrebi od šezdesetih godina prošlog veka, danas predstavljaju globalni ekološki problem. U poslednjih deset godina nekoliko biorazgradivih plastika bilo je predstavljeno tržištu. Međutim, nijedna od njih se nije pokazala kao efikasna na deponijama. Iz tog razloga

nijedan od ovih produkata nije stekao široku upotrebu (Barber 1999). Procenjuje se da količina plastičnog otpada godišnje iznosi 57 miliona tona (Bollag *et al.* 2000).

Plastične kese predstavljaju tip ambalaže koja je izgrađena iz mnogobrojnih lanaca makromolekulskih jedinjenja u koja se mogu dodati druga jedinjenja male molekulske mase, u cilju poboljšavanja karakteristika i omogućavanja lakše prerade. Plastične kese se najčešće prave od polietilena i/ili polipropilena. Polietilen je jedan od najpoznatijih i najvažnijih polimera. Proizvodi se polimerizacijom etilena, otporan je na delovanje hemijskih materija (kiselina, baza). Zbog ugljovodonične strukture, potpuno je otporan na delovanje vode i ne apsorbuje je. Na sobnoj temperaturi se ne rastvara. Polietilen podleže hemijskoj termičkoj oksidaciji. Degradacija se ubrzava na povišenim temperaturama i dugim izlaganjem delovanju atmosferskih uslova. Zbog dobrih mehaničkih karakteristika, hemijske postojanosti, nepropusnosti za vodu i relativno niske cene, polietilen je vrlo cenjeni tehnički materijal i ima vrlo raznoliku primenu (Vujković 1997).

Primarna biodegradacija je biohemijska transformacija organskih jedinjenja od strane mikroorganizama. Proces na kraju rezultuje njihovom mineralizacijom ili pretvaranjem u bakterijsku biomasu. Biodegradacijom organskih jedinjenja u aerobnim uslovima nastaju ugljen-dioksid i voda, dok se u anaerobnim uslovima stvaraju ugljendioksid i metan (Palmisano i Pettigrew 1992).

Danas su u širokoj upotrebi plastične kese koje nastaju dodavanjem aditiva D2W polietilenu. Ovaj aditiv ne utiče na kvalitet plastičnih kesa, ali katalizuje prirodan proces razgradnje skraćujući ga sa nekoliko stotina godina na nekoliko meseci. Kao krajnji produkti razgradnje plastike sa D2W aditi-

---

*Nikola Škorić (1992), Beočin, Naselje Alasovac 9, učenik 3. razreda Gimnazije „Jovan Jovanović Zmaj” u Novom Sadu*

*MENTOR: Jelena Savić, dipl. biolog*

vom nastaju ugljen-dioksid, voda i zanemarljiva količina biomase.

Vršena su ispitivanja da bi se utvrdilo da li bakterije mogu koristiti plastične kese kao hranu. U sastavu plastičnih kesa je od elemenata u najvećem procentu zastupljen ugljenik, koji je i osnovni gradivni element svih biomolekula. Bakterije koriste produkte razgradnje plastike u toku oksido-redukcionih procesa kako bi izgradile sva važna ugljenikova jedinjenja koja sačinjavaju njihove delove (Karakašević 1986). Između ostalog, vršena su ispitivanja da li bakterije iz komposta mogu kolonizovati biorazgradivi polietilen sa D2W aditivom i da li ga mogu koristiti kao hranu, kao i stepen biorazgradivosti ovog materijala. Nakon nanošenja bakterija na polietilen sa D2W, posmatranjem tretiranog materijala elektronskim mikroskopom, utvrđeno je da su naneti mikroorganizmi razgradili plastiku. Takođe je dokazano da metali dodati kao katalizatori procesu razgradnje ne deluju toksično na bakterije. Takođe je utvrđeno je i da neke mezofilne bakterije iz rodova *Pseudomonas* i *Bacillus* imaju biodegradabilna svojstva (Tezuka *et al.* 2003). Mezofilne i koliformne bakterije grade većinu bakterijskih zajednica u zemljištima oko čovekovih domova.

**Cilj** ovog istraživanja bio je da se potvrdi mogućnost ovih, uobičajenih, bakterija expliciraj da žive na plastičnim kesama kao jedinom izvoru hrane (ugljenika) i da time učestvuju u procesima biodegradacije.

## Materijal i metode

Biorazgradive plastične kese iz domaćih supermarketa iseckane su makazama u najsitnije moguće delove. Ovako iseckane plastične kese držane su 1 h pod UV-lampom (talasne dužine 254 nm, jačine 30 W) radi sterilizacije. Zatim je pripremljena minimalna hranljiva podloga (recept podloge prema Knežević-Vukčević i Simić 1997) i pomešana sa isitnjenom plastikom, a razlivena u 23 epruvete sa Duramovim cevčicama. Minimalna podloga ne poseduje glukozu, niti druge potencijalne izvore ugljenika. Epruvete sa podlogama su sterilisane u autoklavu na 121°C, čime je i sav vazduh bio istisnut iz Duramovih cevčica. Dvadeset minuta nakon vađenja iz autoklava, kada su podloge ohlađene, ali i dalje tečne, u njih su zasejani bakterijski sojevi *Escherichia coli* SY252, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus thuringiensis*. Svaki soj zasejan je u po se-

dam epruveta. Dve epruvete su bile kontrolne, u njih nije zasejan nijedan soj, da bi se proverila sterilnost prethodnog rada sa hranljivom podlogom. Epruvete su stavljene na inkubaciju u termostat (37°C).

Rezultati su očitavani nakon 2 dana, nakon 18 dana i nakon 35 dana inkubacije. Mogućnost korišćenja razgradivih plastičnih kesa kao izvora ugljenika utvrđivana je prisustvom gasa u Duramovim cevčicama. Vijabilnost bakterija proveravana je zasejavanjem inokuluma iz eksperimentalnih epruveta u epruvete sa bogatom hranljivom LB podlogom (recept podloge prema Knežević-Vukčević i Simić 1997)

## Rezultati i diskusija

Dva dana nakon postavljanja eksperimenta presejane su bakterije sva tri soja u LB podlogu. Bakterije svakog soja su presejane u epruvete sa LB podlogom. Sledećeg dana je uočeno zamućenje u svih devet LB epruveta.

Rezultati su prvi put očitani 25. 07. 2010. Na osnovu ovih rezultata konstatovana je pojava mehurića u tri Duramove cevčice za soj bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, u jednoj Duramovoj cevčici za soj *Escherichia coli* i u dve cevčice za soj *Bacillus thuringiensis*, dok u ostalim Duramovim cevčicama nisu konstatovani mehurići.

Rezultati su drugi put očitani 10. 08. 2010. Na osnovu ovih rezultata konstatovana je pojava mehurića u svim Duramovim cevčicama za soj bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, dok se u Duramovim cevčicama za druga dva soja nisu pojavili novi mehurići. Bakterije su ponovo presejane iz tri epruvete od svakog soja u epruvete sa LB podlogom. Sledećeg dana je uočeno zamućenje u svih devet LB epruveta.

Metoda korišćena u ovom radu podrazumeva rast mikroorganizama na supstratu u kome je plastika jedini izvor ugljenika, u anaerobnim uslovima. Da bi bakterije preživele moraju da koriste ugljenik iz plastike. S obzirom da su se LB podloge zamutile nakon presejavanja sojeva bakterija, zaključuje se da su bakterije uspele da prežive u ispitivanim uslovima bez prisustva kiseonika.

Na osnovu rezultata (tabela 1) možemo zaključiti da su bakterije iz roda *P. aeruginosa* kolonizovale površinu degradabilne plastike. Takođe iz dobijenih rezultata možemo videti da su se ove bakterije potpuno prilagodile postavljenim uslovima.

Tabela 1. Preživljavanje i oslobađanje mehurića gasa u eksperimentalnim epruvetama

Soj	Epruveta	Nakon 2 dana		Nakon 18 dana		Nakon 35 dana	
		Varijabilnost	Gas	Varijabilnost	Gas	Varijabilnost	Gas
<i>E. coli</i> SY252	1	+	-	+	+	+	+
	2	+	-	+	-	+	-
	3	+	-	+	-	+	-
	4	+	-	+	-	+	-
	5	+	-	+	-	+	-
	6	+	-	+	-	+	-
	7	+	-	+	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	1	+	-	+	+	+	+
	2	+	-	+	+	+	+
	3	+	-	+	+	+	+
	4	+	-	+	-	+	+
	5	+	-	+	-	+	+
	6	+	-	+	-	+	+
	7	+	-	+	-	+	+
<i>B. thuringiensis</i>	1	+	-	+	+	+	+
	2	+	-	+	+	+	+
	3	+	-	+	-	+	-
	4	+	-	+	-	+	-
	5	+	-	+	-	+	-
	6	+	-	+	-	+	-
	7	+	-	+	-	+	-
Kontrolna epruveta 1		-	-	-	-	-	-
Kontrolna epruveta 2		-	-	-	-	-	-

Na osnovu vijabilnosti bakterija iz sojeva *E. coli* i *B. thuringiensis* možemo zaključiti da su i ove bakterije uspele da se prilagode korišćenom supstratu, ali da je njihov metabolizam mnogo sporiji od metabolizma bakterija iz soja *P. aeruginosa* i da je to razlog odsustva mehurića u Duramovim cevčicama. S obzirom da su bakterije iz roda *E. coli* i *B. thuringiensis* uspele da prežive u ispitivanim uslovima, može se pretpostaviti da vreme trajanja eksperimenta nije bilo dovoljno da se pojave mehurići u Duramovim cevčicama, ali da bi i one posle dužeg vremenskog perioda takođe pokazale degradabilno svojstvo.

## Zaključak

Na osnovu rezultata eksperimenta možemo zaključiti da aditiv D2W koji se dodaje polietilenu katalizuje prirodan proces razgradnje pomoću mikroorganizama.

Plastične kese predstavljaju supstrat za rast korišćenih bakterija. Rast ovih bakterija nije bio inhibiran dodavanjem metala, kao katalizatora za procese raspadanja polimera.

Na osnovu ranijih istraživanja utvrđeno je da samo određene vrste bakterija koje se mogu naći u vodi i zemljištu mogu da razlažu biorazgradive plastične kese (Tezuka *et al.* 2003). Zbog toga su veoma važni rezultati koji pokazuju da se bakterija

*Pseudomonas aeruginosa* potpuno prilagodila postavljenim uslovima i pokazala najveća degradabilna svojstva, pre svega zbog toga što je to bakterija koja je veoma rasprostranjena u vodi i zemljištu.

Vreme trajanja eksperimenta nije bilo dovoljno da bi se biorazgradive plastične kese potpuno razložile na ugljen-dioksid i vodu. Međutim, na osnovu dobijenih rezultata možemo samo pretpostaviti da bi proces razgradnje trajao sve dok bakterije ne bi potpuno razgradile plastične kese.

U daljim istraživanjima trebalo bi utvrditi koliko traje proces degradacije biorazgradivih plastičnih kesa usled dejstva ove bakterije i koji faktori utiču na taj proces.

---

## Literatura

Barber T. R. 1999. Ecological assessment of ECM plastics. Cleveland: Microtech Research Inc. & ChemRisk

Bollag W. B., Dec J., Bollag J. M. 2000. Biodegradation. U *Encyclopedia of Microbiology* (ur. J. Laderberg). Academic Press, vol. 1, str. 461–471.

Karakašević B. 1986. *Mikrobiologija i parazitologija*. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga

Knežević-Vukčević J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji, prvi deo*. Beograd: Biološki fakultet

Palmisano A. C., Pettigrew C. A. 1992. Biodegradability of plastics. *Bioscience*, 42: 680.

Tezuka Y., Ishii N., Kasuya K., Mitomo H. 2003. Degradation of poly(ethylene succinate) by mesophilic bacteria. *Polymer Degradation and Stability*, 84: 115.

Vujković I. 1997. *Polimerna i kombinovana ambalaža*. Novi Sad: Poli

---

Nikola Škorić

## Growth of Common Bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*) on Biodegradable Plastic Bags as the Only Food Source

The aim of this study was to test the ability of common bacteria to live on plastic bags as their only source of nutrition (carbon), and consequently to be involved in the processes of biodegradation. Three strains of bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli*) were grown on a medium that consisted of a minimal medium (without glucose and other potential sources of carbon) and ground plastic bags. The results were read after two, eighteen and thirty-five days of incubation. The viability of bacteria was tested by growing the inoculums from the experimental test tubes into test tubes with a highly nutritious "LB" medium. The results have shown that the D2W additive, which is added to polyethylene bags, accelerates the natural process of degradation and that plastic bags represent a substrate suitable for the growth of common bacteria. Furthermore, *Pseudomonas aeruginosa* has completely adapted to the new conditions and has shown the greatest potential for degrading plastic.

