

Biodegradacija polimera: uloga bakterija i njihovih enzima

Delač, Magdalena

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:630070>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Magdalena Delač

**Biodegradacija polimera: uloga bakterija i njihovih
enzima**

**Biodegradation of polymers: the role of bacteria and
their enzymes**

Završni rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Martine Šeruge Musić.

Popis kratica:

EG – etilen glikol

FAD – flavin adenin dinukleotid

HDPE – eng. *high density polyethylene*; polietilen visoke gustoće

LDPE – eng. *low density polyethylene*; polietilen niske gustoće

MHET – mono (2-hidroksietil) tereftalna kiselina

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

PA – poliamid

PE – polietilen

PES – polietilen sukcinat

PET – polietilen tereftalat

PP – polipropilen

PS – polistiren

PUR – poliuretan

PVA – polivinil alkohol

PVC – polivinil klorid

StyA – stiren monooksigenaza

StyB – flavin adenin dinukleotid reduktaza

StyC – stiren-oksid izomeraza

StyD – fenilacetaldehid dehidrogenaza

TPA – tereftalna kiselina

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. VRSTE PLASTIKE I KAKO SE RAZGRAĐUJU	2
3. BAKTERIJA <i>Ideonella sakaiensis</i>	5
3.1. Enzimi bakterije <i>Ideonella sakaiensis</i>	6
4. ROD <i>Pseudomonas</i>	7
4.1. Enzimi roda <i>Pseudomonas</i>	8
5. ROD <i>Bacillus</i>	10
5.1. Enzimi roda <i>Bacillus</i>	10
6. OSTALE BAKTERIJE	11
7. MOGUĆE PRIMJENE U BUDUĆNOSTI	12
7.1. Problem aditiva u plastici	13
7.2. Načini poboljšanja učinkovitosti bakterija i njihovih enzima	13
8. ZAKLJUČAK	14
9. LITERATURA	15
10. SAŽETAK.....	18
11. SUMMARY	18
12. ŽIVOTOPIS	19

1. UVOD

Iako se razne vrste plastike svakodnevno koriste već stotinjak godina, njezina masovna proizvodnja počela je 1950-ih (Urbanek i sur. 2018), kada se proizvodilo 2 milijuna tona godišnje, no taj se broj do 2015. godine povećao gotovo 200 puta, dosegovši preko 380 milijuna tona. U tom se razdoblju proizvelo ukupno 7,8 milijardi tona plastike. Od ukupnog plastičnog otpada proizvedenog između 1950. i 2015. godine, reciklirano je samo 9 %, dok je 12 % spaljeno, a 79 % je bačeno, bilo na deponij, bilo u prirodu (Ritchie i Roser 2018). To predstavlja veliki ekološki problem s obzirom da plastici treba od 20 do 500 ili čak tisuće godina da se raspadne (ovisno o uvjetima i vrsti plastike) te se stoga samo nagomilava (Chamas i sur. 2020). Čak i do 50% plastike koja se proizvede svake godine je jednokratno, što znači da se koristi nekoliko minuta, a ostaje u okolišu nekoliko stotina godina (Ritchie i Roser 2018).

Postoji više vrsta plastike. Neke se lakše recikliraju, neke teže, a neke se uopće ne mogu reciklirati. Osim toga, većina plastike koja se reciklira se može reciklirati samo jednom ili dva puta, što znači da, iako je to trenutno ekološki najprihvatljivija opcija zbrinjavanja plastičnog otpada, recikliranje nije trajno rješenje, već samo privremeno. Također, često je jeftinije i isplativije jednostavno proizvesti novu plastiku nego ju reciklirati, što doprinosi nagomilavanju plastičnog otpada čije je loše zbrinjavanje vrlo štetno za okoliš jer se oslobađaju razni staklenički (poput metana i ugljikovog dioksida) i ostali toksični plinovi (poput ugljikovog monoksida i dioksina) (Ritchie i Roser 2018). Osim plinova, oslobađaju se i mnogi drugi štetni spojevi kao što su poliklorirani bifenili ili ftalati i bisfenol A (BPA) koji zagađuju lokalne rijeke i zemlju (Urbanek i sur. 2018).

Sintetička plastika čini većinu otpada koji ulazi u Zemljine oceane. Oceani pružaju važne i vrijedne resurse poput hrane, energije i vode te su glavni način međunarodne trgovine i glavni stabilizator klime. Stoga promjene u morskom ekosustavu uzrokovane antropogenim utjecajima, poput onečišćenja plastikom, mogu imati dramatičan utjecaj na globalnoj razini, a štetni su i za morsku faunu zbog uplitanja, gušenja i remećenja probave ptica, kornjača, riba i sisavaca (Urbanek i sur. 2018). Najveća nakupina smeća u oceanima naziva se veliki tihooceanski otok smeća (eng. *The Great Pacific Garbage Patch*) i čini ga 79 tisuća tona plastike na području od 1,6 milijuna kilometara kvadratnih, što je 2,5 puta veće od površine Francuske (Lebreton i sur. 2018). Još jedna uznemirujuća činjenica je da će, ako se trend

proizvodnje plastike ne promijeni, do 2050. godine u oceanima biti veća masa plastike nego riba (Ellen MacArthur Foundation 2016).

Kao rezultat abiotičke razgradnje sintetičke plastike uzrokovane UV zračenjem, temperaturom i fizičkim stresom, veliki plastični predmeti se polako razgrađuju i stvaraju čestice mikroplastike koje se mogu širiti na velike udaljenosti ne samo cirkulacijom površinskog sloja oceana, već i putem hranidbenog lanca (Urbanek i sur. 2018). Količine mikroplastike koje ljudi unose različitim putevima ukazuju na činjenicu da ljudi u prosjeku mogu unositi čak do 5 g mikroplastike tjedno, što je težina jedne kreditne kartice (Senathirajah i sur. 2021).

Teško je zamisliti život bez plastike jer je to materijal s mnogim prednostima: otporan je, jeftin i može se koristiti u razne svrhe, poput medicine ili duljeg održavanja kvalitete hrane. Stoga je, umjesto da se potpuno prekine proizvodnja i korištenje plastike, potrebno naći adekvatan način zbrinjavanja takvog otpada uz istovremeni prestanak njezinog suvišnog i nepotrebnog korištenja (Ritchie i Roser 2018). Jedan od načina za smanjenje onečišćenja plastikom mogla bi biti razgradnja pomoću mikroorganizama. Posebno je zanimljiva moguća primjena bakterija izoliranih iz hladnih područja zbog njihovih jedinstvenih karakteristika. No, interakcije između plastike i mikroorganizama još su slabo poznate (Urbanek i sur. 2018).

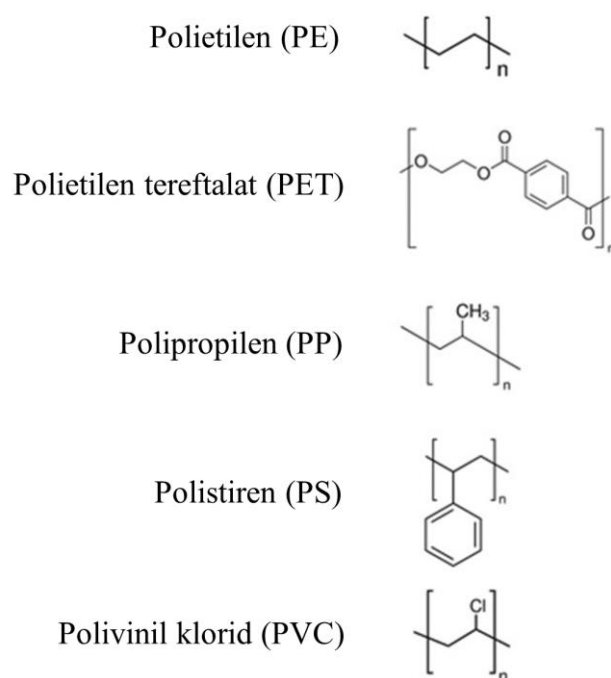
U ovom će radu biti opisana trenutna saznanja o raznim bakterijama koje razgrađuju sintetičke polimere te o njihovim enzimima i mehanizmima razgradnje. Također će biti istaknute prednosti i mogući problemi korištenja tih bakterija i enzima u svrhu uklanjanja plastičnog otpada iz ekosustava.

2. VRSTE PLASTIKE I KAKO SE RAZGRAĐUJU

Plastika je širok pojam koji obuhvaća polimere koji se, kad se zagriju ili izlože visokom tlaku, mogu lijevati u kalupe ili oblikovati na neki drugi način. Za ekstrakciju osnovnih materijala za izradu plastike koriste se sirova nafta, ugljen i zemni plin. Plastika se sastoji od monomera povezanih kemijskim vezama te je izuzetno izdržljiv materijal zbog svoje velike molekularne mase, složene trodimenzionalne strukture i hidrofobne prirode, a te ju osobine čine teško dostupnom mikroorganizmima (Swapnil i sur. 2015).

Najčešće vrste plastike su polietilen, polietilen tereftalat, polistiren, polipropilen i polivinil klorid (Slika 1).

Polietilen (PE), najčešća sintetička plastika, koristi se za proizvodnju igračaka, plastičnih vrećica, i ambalaže za hranu. To je dugolančani polimer povezan etilenskim vezama te je izrazito hidrofoban. Kad PE ima razgranate lance koji sprječavaju čvrsto pakiranje u kristalnu strukturu, naziva se PE niske gustoće (eng. *low density polyethylene*, LDPE). Kad ima malo ili uopće nema grananja, molekule se mogu uredno slagati jedna na drugu, stvaraju se jake međumolekulske interakcije te se tada takav PE naziva PE visoke gustoće (eng. *high density polyethylene*, HDPE). Polietilen tereftalat (PET) također se vrlo često koristi (npr. za plastične boce) i jako je kemijski stabilan. Njegova se višekratna upotreba ne preporučuje zbog mogućeg otpuštanja štetnih spojeva i kontaminacije bakterijama. Polistiren (PS) je lagan i krut te se koristi za pakiranje, u laboratorijskoj opremi i kao toplinski izolator. Sastoji se od fenilnih prstenova postavljenih duž ugljikovodičnog lanca. Polipropilen (PP) ima slična svojstva kao PE, ali mu metilna skupina omogućuje veću otpornost na temperaturu i veću čvrstoću. Nalazi se u čepovima od boca, jednokratnim špricama i sjedalima za aute. Polivinil klorid (PVC) je jaki linearni polimer koji se koristi u izradi cijevi, kabanica i potplata cipela. PVC i PP su jako hidrofojni i otporni na kemijsku abraziju (Wilkes i Aristilde 2017).



Slika 1. Strukturne formule najčešćih vrsta plastike. Preuzeto i prilagođeno iz Urbanek i sur. 2018.

Postoje tri vrste razgradnje polimera: fotorazgradnja, termo-oksidativna razgradnja i biorazgradnja (Venkatesh i sur. 2021). Biorazgradnja je proces kojim mikroorganizmi (uglavnom bakterije i gljive) mijenjaju (metaboličkim ili enzimskim djelovanjem) strukturu tvari unesenih u okoliš. Ovisi o mnogim biotičkim i abiotičkim čimbenicima poput svjetlosti, slanosti, temperature, pH, vlage te svojstva materijala (hrapavost površine ili hidrofobnost), ali i o sposobnosti samih mikroorganizama da se vežu na površinu i stvore biofilm (Urbanek i sur. 2018).

Mikroorganizmi poput bakterija, gljiva i algi mogu razgraditi plastiku biorazgradnjom u aerobnim ili anaerobnim uvjetima. U aerobnoj razgradnji, kisik se koristi kao akceptor elektrona, a krajnji proizvodi su ugljikov dioksid i voda. Anaerobna razgradnja ne zahtjeva kisik, već se kao akceptor elektrona koriste nitrat, sulfat, vodik, ugljikov dioksid ili željezov ion, a krajnji proizvodi su metan, ugljikov dioksid i voda. Obično je proizvodnja tih krajnjih produkata iz polimera složen proces koji se sastoji od puno koraka (Venkatesh i sur. 2021).

Potpuna biorazgradnja plastičnih polimera prvo zahtijeva razgradnju polimera na manje oligomere i na kraju na monomere koji mogu proći kroz staničnu membranu, nakon čega se uključuju u metabolizam stanice. Izvanstanični enzimi poput depolimeraza i hidrolaza djeluju na velike plastične polimere razgrađujući ih na manje molekule. Hidrolitičko cijepanje može se dogoditi na kraju polimernog lanca (egzo-napad) ili negdje duž polimernog lanca (endo-napad). Ta dva načina cijepanja stvaraju različite produkte. Egzo-napad stvara male oligomere ili monomere koji se mogu unijeti u stanicu, dok endo-napad prvenstveno smanjuje molekularnu masu polimera, pri čemu nastaju veći produkti koji vjerojatno neće biti uneseni bez daljnje razgradnje (Wilkes i Aristilde 2017).

To je ekološki prihvatljiva, isplativa i globalno prihvaćena metoda zbrinjavanja plastičnog otpada. Međutim, s obzirom na to da nije prošlo puno vremena od kad su sintetički polimeri postali široko rasprostranjeni, organizmi nisu imali dovoljno vremena za razvijanje visoko aktivnih enzima. Bakterijska razgradnja polimera koje je napravio čovjek vrlo je spor proces kojeg ograničavaju mnoge već spomenute poteškoće. Usprkos tome, otkrivene su brojne bakterije i drugi organizmi (poput gljiva) koji mogu razgrađivati različite vrste plastike (Venkatesh i sur. 2021).

3. BAKTERIJA *Ideonella sakaiensis*

Pretraživanjem uzoraka zemlje, mulja, vode i sedimenta prikupljenih u reciklažnom objektu u gradu Sakai u Japanu, znanstvenici su 2016. godine uspjeli izolirati bakterijsku zajednicu koja je vrlo uspješno razgrađivala i rasla na PET-u. Iz te zajednice izoliran je soj 201-F6^T koji je sadržavao bakteriju koja je najviše degradirala PET i koristila ga kao glavni izvor ugljika i energije. Taj soj bio je od velike važnosti jer je razgrađivao PET puno brže od svih organizama koji su do tada otkriveni. Prema fiziološkim, biokemijskim i filogenetskim podacima, utvrđeno je da taj soj pripada rodu *Ideonella*, ali se znatno razlikuje od svih poznatih vrsta. Stoga je taj soj nove, do sada nepoznate bakterije, dobio ime *Ideonella sakaiensis* (Tanasupawat i sur. 2016).

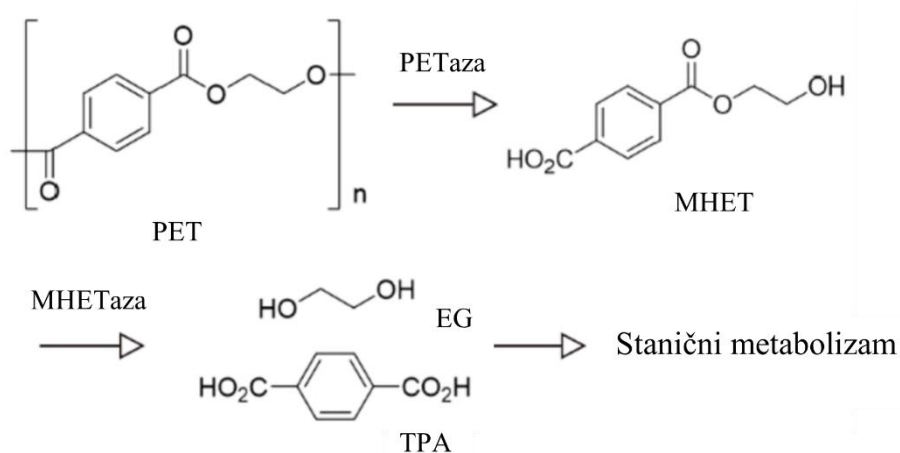
Kao i ostale bakterije roda *Ideonella*, aerobna je, asporogena i Gram-negativna. Njene stanice štapićastog su oblika te se pokreću pomoću jednog biča (Tanasupawat i sur. 2016). Promatrane stanice su međusobno povezane duljim končastim tvorevinama (Slika 2, E), a za PET su povezane kraćim končastim tvorevinama nalik fimbrijima koje vjerojatno pomažu pri donošenju izlučenih enzima na površinu PET-a (Slika 2, F). Film PET-a na kojem su rasli je jako oštećen (Slika 2, G) i nakon 6 tjedana pri 30°C je gotovo potpuno razgrađen (Yoshida i sur 2016).



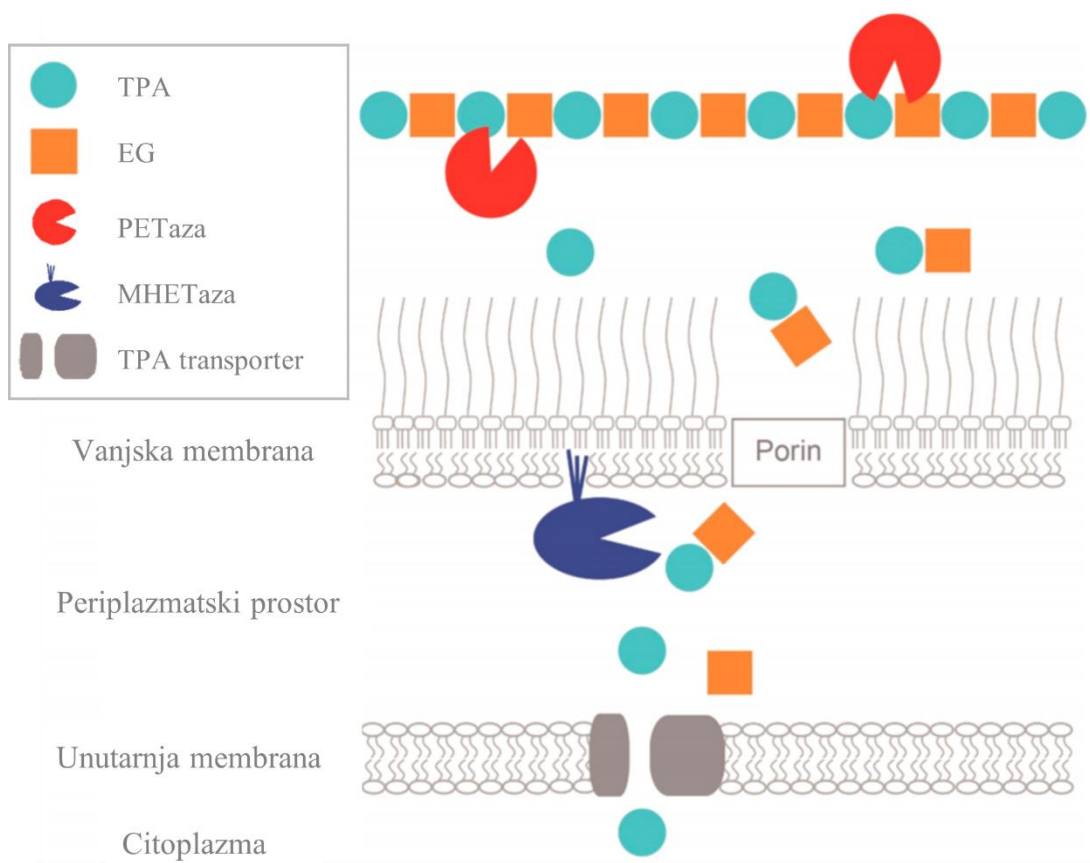
SLIKA 2. Slike bakterije *Ideonella sakaiensis* nakon 60 sati rasta na filmu PET-a snimljene skenirajućim elektronskim mikroskopom. Bijela crta označava duljinu od 1 μ m. Slika označena slovom E prikazuje bakterije međusobno povezane duljim končastim tvorevinama. Na slici označenoj slovom F strelice označavaju mjesta kontakta između stanica i filma PET-a ostvarenog preko kraćih končastih tvorevina. Slika označena slovom G prikazuje površinu filma PET-a nakon ispiranja adheriranih stanica, dok slika umetnuta u gornjem desnom kutu prikazuje netaknuti film PET-a. Preuzeto i prilagođeno iz Yoshida i sur. 2016.

3.1. Enzimi bakterije *Ideonella sakaiensis*

Katabolički put PET-a najbolje je istražen upravo u bakteriji *Ideonella sakaiensis* te su dva enzima odgovorna za njegovu degradaciju: PETaza i MHETaza. Iako je PETaza otkrivena i u drugim bakterijskim vrstama, MHETaza je enzim jedinstven za ovu bakteriju (Yoshida i sur 2016). PETaza se, vjerojatno uz pomoć već spomenutih kraćih končastih tvorevina, luči na površinu PET-a te ga razgradi na mono (2-hidroksietil) tereftalnu kiselinu (MHET) uz manje količine tereftalne kiseline (TPA). Zatim se ti produkti prenesu u periplazmatski prostor preko proteina na vanjskoj staničnoj membrani, poput porina. Drugi enzim, MHETaza, koji pretvara MHET u dva monomera, TPA i etilen glikol (EG) (Slika 3), vjerojatno se nalazi usidren u vanjsku staničnu membranu u periplazmatskom prostoru. TPA se unese u citoplazmu preko TPA transportera spojenog s TPA-vezujućim proteinom te se nakon toga preko protokatehuinske kiseline uključuje u Krebsov ciklus (Slika 4) (Taniguchi i sur. 2019).



Slika 3. Metabolički put PET-a u bakteriji *Ideonella sakaiensis* prikazan strukturnim formulama. Preuzeto i prilagođeno iz Taniguchi i sur. 2019.



SLIKA 4. Shematski prikaz metaboličkog puta PET-a u bakteriji *Ideonella sakaiensis*. Preuzeto i prilagođeno iz Taniguchi i sur. 2019.

U počecima je razgradnja PET-a bila relativno spora. Trebalo je 6 tjedana da se potpuno razgradi mali PET film, no u novijim istraživanjima otkriveno je da se ciljanim mutagenizacijama u PETazi može dobiti beži enzim, pa čak i enzim koji hidrolizira i druge polimere. Također su pojačali enzimatsku aktivnost PETaze promjenom uvjeta rasta, poput temperature, pH te koncentracije soli i glicerola. Iako PETaza iz bakterije *Ideonella sakaiensis* može hidrolizirati PET u većoj stopi od ostalih enzima, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se optimizirala upotreba PETaze u velikim razmjerima. (Liu i sur. 2019).

4. ROD *Pseudomonas*

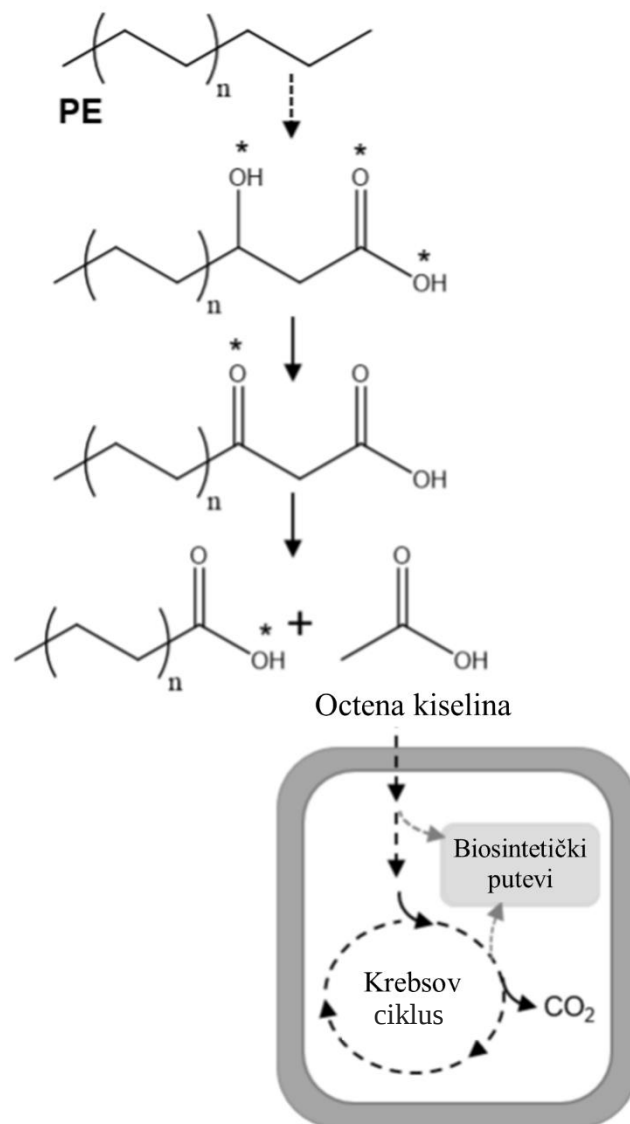
Zbog njihove sposobnosti razgradnje i metaboliziranja raznih vrsta plastika, zanimljive su i bakterije roda *Pseudomonas*, koje su sveprisutne i u vodenom i u kopnenom okolišu. Utvrđeno je da, s različitim stupnjevima učinkovitosti, mogu razgraditi PE, PET, PP, PVC, PS, poliuretan (PUR), polietilen sukcinat (PES), poliamid (PA) i polivinil alkohol (PVA). Bakterije roda *Pseudomonas* su, kao i vrste roda *Ideonella*, štapićastog oblika, Gram-negativne,

asporogene i aerobne te se također pokreću pomoću jednog ili više bičeva (Wilkes i Aristilde 2017).

4.1. Enzimi roda *Pseudomonas*

Hidrolaze poput esteraza, kutinaza i lipaza ključne su u razgradnju plastike. Esteraze mogu hidrolizirati estere koji su već prisutni u polimeru (ili koji su proizvedeni oksidacijskim reakcijama) u alkohole, fenole i kiseline. Takve enzime ima bakterija *Pseudomonas aeruginosa* koja proizvodi velike količine izvanstaničnih esteraza i lipaza koje razgrađuju aromatske i alifatske poliestere i poliamide. Zanimljiva je i izvanstanična kutinaza iz bakterije *Pseudomonas mendocina* koja razgrađuje PET i u reakciji stvara samo dva produkta, TPA i EG, koji zatim ulaze u stanicu i uključuju se u njen metabolizam (Wilkes i Aristilde 2017).

Dosadašnja istraživanja su se usredotočivala na izvanstanične enzime koji su uključeni u prve korake razgradnje, no potrebno je dodatno istražiti što se događa u samoj stanici, tj. kako se asimiliraju plastični oligomeri i monomeri koji se transportiraju preko stanične membrane. Neki od tih spojeva vjerojatno se prerade putem metabolizma bakterije kako bi se na kraju mogli mineralizirati kao ugljikov dioksid ili kako bi ušli u druge metaboličke puteve koji se koriste za sintezu hranjivih tvari. Na primjer, razgradnjom PE, nakon nekoliko koraka oksidacije i dehidrogenacije, stvara se octena kiselina koja može ući u Krebsov ciklus (Slika 5). Neke bakterije roda *Pseudomonas* izlučuju esteraze koje razgrađuju PES i stvaraju sukcinat, još jedan metabolit Krebsovog ciklusa (Wilkes i Aristilde 2017).



Slika 5. Metabolički put PE-a u nekim bakterijama roda *Pseudomonas* prikazan strukturnim formulama. Isprekidane strelice označavaju odvijanje više od jedne reakcije. Zvezdicom su označena mjesta u polimeru na koja se u svakom koraku dodala nova funkcionalna grupa. Preuzeto i prilagođeno iz Wilkes i Aristilde 2017.

Neke vrste roda *Pseudomonas* mogu razgraditi PUR te je predložen put razgradnje u kojem sudjeluju brojni enzimi. Jedan od prvih takvih opisanih enzima je lipaza PueB iz bakterije *Pseudomonas chlororaphis*. Ta bakterija kodira za (najmanje) još jedan enzim koji razgrađuje PUR, nazvan PueA. Oba enzima su lipaze koje kataliziraju hidrolizu estera te stoga razgrađuju samo PUR povezan esterskim vezama (Danso i sur. 2019).

Iako nekoliko istraživanja govori o bakterijskoj razgradnji PVC-a i PP-a, ne zna se dovoljno o samim enzimima i metabolitima koji nastaju u tom procesu. Do sada se mjerila uglavnom samo promjena mase plastike, no pretpostavlja se da bakterije za koje se smatralo da razgrađuju PVC i PP, poput *Pseudomonas citronellolis*, zapravo razgrađuju aditive iz tih materijala, a ne sam materijal. Kako bi se saznali enzimi i metabolički putevi uključeni u razgradnju PVC-a, PP-a i njihovih aditiva, potrebna su dodatna istraživanja (Giacomucci i sur. 2019).

Puno vrsta bakterija roda *Pseudomonas* razgrađuje razne vrste plastika te je stoga potrebno detaljnije istražiti i opisati enzime i same procese unutarstanične obrade metabolita razgradnje kako bi se jednog dana mogli koristiti u svrhe zbrinjavanja plastičnog otpada.

5. ROD *Bacillus*

Bakterije roda *Bacillus* su štapićaste, Gram-pozitivne, sporogene te mogu biti obligatni aerobi ili fakultativni anaerobi (Madigan i Martinko 2005). Za mnogo njih je potvrđeno da mogu razgrađivati nekoliko vrsta plastike.

5.1. Enzimi roda *Bacillus*

Biorazgradnja mikroplastike od PP-a potvrđena je strukturnim, morfološkim i kemijskim promjenama uočenim na samoj mikroplastici koju su bakterije roda *Bacillus* koristile kao izvor ugljika (Auta i sur. 2018). Dokazana je i sposobnost bakterija *Bacillus safensis* i *Bacillus amyloliquefaciens* da koriste LDPE kao jedini izvora ugljika i energije koristeći vlastiti enzimatski sustav koji je potrebno dodatno opisati (Waqas i sur. 2021).

Bakterija *Bacillus subtilis* koristi unutarstanične i izvanstanične esteraze pri degradaciji PUR-a. Unutarstanične esteraze daju pristup bakteriji na površinu PUR-a, dok se izvanstanične esteraze vežu na površinu PUR-a i degradiraju ga na metabolite poput 1,4-butandiola i adipinske kiseline koje bakterija kasnije koristi kao izvor ugljika (Shah i sur. 2013). Također je dokazano da ista bakterija, *Bacillus subtilis*, može degradirati PE u slanoj vodi, ali taj proces se brže odvija u slatkoj vodi (degradacija je obrnuto proporcionalna slanosti). Istraživanja pokazuju da salinitet smanjuje mikrobnu biomasu jer osmotski stres rezultira isušivanjem i liziranjem stanica. Zahvaljujući boljoj degradaciji PE-a u slatkoj vodi, moguće je da će se degradirajuće sposobnosti bakterija koristiti u slatkim vodama (npr. u ušćima rijeka) kako bi se spriječilo nizvodno širenje zagađenja plastikom u more i oceane (Tadimeti 2020).

6. OSTALE BAKTERIJE

Osim bakterija roda *Pseudomonas*, i ostale Gram-negativne bakterije razgrađuju PE, poput rodova *Ralstonia* i *Stenotrophomonas*, kao i neke Gram-pozitivne bakterije poput rodova *Rhodococcus*, *Staphylococcus* i *Streptomyces*. Također, razgradnja PE-a povezana je i s mikroorganizmima u mikrobiomima nekih bezkralježnjaka. Nažalost, enzimi i biokemijski mehanizmi uključeni u razgradnju PE-a još nisu detaljno opisani (Danso i sur. 2019).

Zbog mogućeg korištenja raznih monomera pri izradi PA-a, postoji više vrsta sintetičkih PA-a od kojih je najpoznatiji najlon. Do sada nije pronađena nijedna bakterija koja može potpuno razgraditi netaknuti PA velike molekularne mase, ali otkriveno je nekoliko bakterija koje mogu razgrađivati kraće linearne ili cikličke oligomere najlona, poput bakterija roda *Arthrobacter* i bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterije roda *Arthrobacter* kodiraju za različite hidrolaze i nekoliko aminotransferaza koje sudjeluju u početnoj degradaciji oligomera i kasnijem metabolizmu. Otkrivena su tri glavna enzima koja sudjeluju u početku hidrolize cikličkih i linearnih oligomera 6-aminoheksanoata. Prvi je hidrolaza cikličkih dimera, NylA, drugi je hidrolaza dimera, NylB, a treći je hidrolaza oligomera endo-tipa, NylC. Nakon razgradnje se monomeri u stanici metaboliziraju različitim aminotransferazama (Danso i sur. 2019).

Kao i za PA, do sada nije pronađen nijedan bakterijski enzim koji može potpuno razgraditi netaknuti PS velike molekularne mase, iako neki organizmi mogu koristiti sam stiren kao izvor ugljika. Razgradnja stirena dobro je proučena kod rodova *Pseudomonas*, *Xanthobacter*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* i mnogim drugima i čini se da je taj metabolički put dosta raširen među raznim bakterijama (Danso i sur. 2019). U jednom istraživanju, biofilter koji se sastoji od bakterija *Brevibacillus* sp. uklanjao je čak 3 kg stirena dnevno (Ho i sur. 2017).

U aerobnim uvjetima stiren se oksidira preko dva glavna puta. Prvi uključuje napad na bočni lanac, a drugi uključuje napad na nespecifični aromatski prsten čime se stvore intermedijeri 3-vinilkatehol, fenilacetatna kiselina i 2-feniletanol. Nakon cijepanja prstena, ti intermedijeri ulaze u Krebsov ciklus. Za razgradnju bočnog lanca potrebna su tri enzima: stiren monooksigenazni kompleks (StyA i StyB), stiren-oksid izomeraza (StyC) i fenilacetaldehid dehidrogenaza (StyD). Monooksigenazni kompleks se sastoji od dvodjelnog flavoproteina koji katalizira NADH- i FAD-ovisnu oksidaciju stirena. StyB, flavin adenin dinukleotid (FAD) reduktaza, prenosi elektrone s NADH na FAD⁺ kako bi opskrbila StyA, monooksigenazu, s elektronima. Stiren monooksigenaza zatim napada bočni lanac pri čemu nastaje epoksistiren

kojeg StyC izomerizira i nastaje fenilacetaldehid. Nakon toga, StyD oksidira fenilacetaldehid u fenilacetatnu kiselinu (Danso i sur. 2019).

Dosadašnja istraživanja o bakterijskoj razgradnji PVC-a i PP-a rijetko su se posvećivala mehanizmima razgradnje ili izolaciji enzima te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se oni mogli detaljno opisati (Danso i sur. 2019).

7. MOGUĆE PRIMJENE U BUDUĆNOSTI

Raznolikost poznatih bakterija i njihovih enzima koji djeluju na sintetičke polimere još nije velika, te bi se stoga buduća istraživanja trebala baviti identifikacijom novih bakterija i enzima koji razgrađuju plastiku (Danso i sur. 2019).

Budući da se korištenjem današnjih tehnologija uzgoja još nisu identificirali visoko aktivni enzimi za većinu plastika, raznolikost nekultiviranih mikroorganizama, tj. globalni metagenomi, čine se kao obećavajući izvor za identifikaciju takvih enzima. Stoga je potreban daljnji razvoj algoritama pretraživanja za obradu podataka metagenoma (Danso i sur. 2019). Genetska i molekularna analiza za identifikaciju gena odgovornih za proizvodnju enzima koji razgrađuju plastiku i tehnologija rekombinantne DNA također mogu poboljšati i ubrzati pronalaženje novih i boljih enzima (Venkatesh i sur. 2021).

Također, razumijevanje mehanizama razgradnje i dalje je oskudno te se, kako bi se mogli koristiti u svrhe zbrinjavanja plastičnog otpada, moraju savladati mnoge prepreke.

Korištenje enzima na neobrađenoj plastici ima mnogo ograničenja. Jedno od njih je velika molekularna masa jer su takvi polimeri manje osjetljivi na napad bakterijskih enzima, što rezultira manjom količinom stvorenih oligomera ili monomera koji su potrebni za kasniju razgradnju i ulazak u metabolizam bakterije. Plastika s razgranatijom strukturom sklonija je bakterijskoj razgradnji od tvrdih plastika kristalne strukture. Osim toga, sintetički polimeri često imaju vrlo hidrofobnu površinu sa stabilnim funkcionalnim skupinama te je stoga potrebno povećati hidrofilnost tih materijala kako bi se olakšala mikrobna razgradnja. Na učinkovitost biorazgradnje mogu utjecati i drugi abiotički čimbenici poput pH, temperature, slanosti i vlažnosti te je stoga potrebno održavati povoljne uvjete kako bi enzimi djelovali što učinkovitije (Wilkes i Aristilde 2017).

7.1. Problem aditiva u plastici

Sintetički polimeri često sadrže razne aditive, poput ftalata, koji se puno lakše i brže razgrađuju od same okosnice polimera (Danso i sur. 2019). No, aditivi u plastici mogu djelovati i kao inhibitori. Na primjer, materijali od PUR-a mogu sadržavati otrovne spojeve koji djeluju kao antimikrobna sredstva. Osim toga, drugi izvori ugljika, poput glukoze, mogu ometati bakterijsku razgradnju plastike. Na primjer, prisutnost glukoze smanjuje aktivnost enzima koji razgrađuju PES u bakteriji roda *Pseudomonas* (Wilkes i Aristilde 2017).

Inhibitorni ili stimulacijski učinci raznih aditiva na različite vrste razgradnje plastike nisu jasno definirani, što često dovodi do krivih rezultata te je stoga potrebno standardizirati i optimizirati cjelokupnu metodologiju povezanu s analizom bakterijske razgradnje plastike. Također, potrebno je bolje razumjeti učinke aditiva kako bi se osiguralo stvaranje optimalnih uvjeta za bakterijsku razgradnju te bi se, u slučajevima u kojima je to moguće, trebala smanjiti uporabu aditiva u proizvodnji plastike (Wilkes i Aristilde 2017).

7.2. Načini poboljšanja učinkovitosti bakterija i njihovih enzima

Povećanje učinkovitosti enzimske aktivnosti veliki je izazov koji se može savladati genetičkim inženjerstvom, kao što je već spomenuto u slučaju bakterije *Ideonella sakaiensis*. Još jedno od mogućih rješenja može biti korištenje sintetičke biologije za stvaranje mikroorganizama koji bi razgrađivali plastiku i proizvodili oligomere i monomere iz plastičnog otpada koji bi se kasnije koristili za proizvodnju novih, a možda čak i biorazgradivih polimera (Ru i sur. 2020).

Psihrofilni mikroorganizmi imaju jedinstveni potencijal zbog okolišnih uvjeta polarnih oceana, jer bakterije iz ovih regija brzo reagiraju na promjene u okolišu. Rastuća količina plastičnog otpada mogla bi natjerati takve mikroorganizme da se prilagode novim podlogama. Unatoč ovoj mogućnosti, prirodna adaptacija mikroorganizama predugo bi potrajala. No, takvi mikroorganizmi pružaju brojne mogućnosti za biotehnološku upotrebu jer im je potrebna niža temperatura za rast i optimalnu enzimsku aktivnost, što može biti velika prednost zbog smanjenja potrošnje električne energije za grijanje (Urbanek i sur. 2018).

Enzimi koji se koriste u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji su također bili sporog djelovanja kada su prvi puta otkriveni, ali tijekom godina istraživanja su unaprijeđeni i sada je njihovo djelovanje čak i nekoliko stotina puta brže. Stoga nije tako nerealno očekivati skori razvoj visoko aktivnih enzima koji razgrađuju plastiku. Kada bi se enzimi koji razgrađuju sintetičke polimere mogli masovno proizvesti, mogli bi se pomiješati s odgovarajućim

polimerom te bi na kraju ostali samo oligomeri i monomeri koji bi se ponovno mogli koristiti za proizvodnju novih polimera. Tada ne bi bilo potrebe za dobivanjem novih monomera iz fosilnih izvora te bi se mogla uspostaviti kružna uporaba plastike, čime bi se moglo značajno smanjiti godišnje zagađenje plastikom (Danso i sur. 2019).

8. ZAKLJUČAK

Iako je otkriveno puno bakterijskih vrsta koje mogu razgrađivati plastiku, potrebno je provesti još puno istraživanja kako bi se identificirale nove i učinkovitije bakterije, enzimi i mehanizmi razgradnje. Također, potrebno je razviti bolje metode za pravilno mjerenje količine razgrađene plastike, kako ne bi došlo do objave krivih podataka. Obećavajuće izgledaju i istraživanja koja se bave genetskom modifikacijom enzima koji razgrađuju razne vrste plastika, poput enzima PETaze iz bakterije *Ideonella sakaiensis*, koji se do sada pokazao najučinkovitijim. Na taj način mogli bi se dobiti visoko-aktivni enzimi koji bi se u budućnosti mogli koristiti u recikliranju i razgradnji znatne količine plastike.

Sve navedene tehnologije neće biti tako skoro spremne i potrebno je provesti još puno istraživanja, a do tad je važno prvo ukloniti uzrok zagađenja, a ne posljedicu. Tvrtke se moraju poticati na korištenje ekološki prihvatljivijih alternativa i izbjegavanje korištenja plastike gdje god je to moguće. Također je vrlo bitno educirati ljude i potaknuti svijest o zagađenju plastikom i njegovim štetnim učincima na sve žive organizme. Trebalo bi uvelike povećati obrazovanje o ovoj temi na školskoj razini, ukazujući učenicima na iznimnu važnost održivog načina života. Treba poticati upotrebu ekološki prihvatljivijih proizvoda, poput krutih šampona i regeneratora pakiranih u karton, boca za vodu za višekratnu upotrebu i raznih proizvoda od drveta (četke za kosu, britvice, četkice za zube). Također treba poticati održive životne navike, poput kupovine u rinfuzi, nošenja vlastitih torbi i vrećica na tržnicu i u dućan te prestanka prekomjernog i impulzivnog kupovanja nepotrebnih proizvoda. Pravila i razlozi za pravilno odlaganje plastike moraju se prenijeti ljudima koristeći sve dostupne medijske platforme kako bi došli do svih uzrasta. Potrebno je shvatiti kako ovo nije problem koji samo treba prepustiti velikim kompanijama, jer i sami možemo putem svojih navika uvelike doprinijeti njegovom rješenju.

9. LITERATURA

- Auta H. S., Emenike C. U., Jayanthi B., Fauziah S. H. (2018): Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin* 127: 15-21.
- Chamas A., Moon H., Zheng J., Qiu Y., Tabassum T., Jang J. H., Abu-Omar M., Scott S. L., Suh S. (2020): Degradation rates of plastics in the environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 8 (9): 3494-3511.
- Danso D., Chow J., Streit W. R. (2019): Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Journal of Applied Microbiology* 85 (19).
- Ellen MacArthur Foundation (2016): The new plastics economy: Rethinking the future of plastics. http://www3.weforum.org/docs/WEF_The_New_Plastics_Economy.pdf (pristupljeno 20. 8. 2021.)
- Giacomucci L., Raddadi N., Soccio M., Lotti N., Fava F. (2019): Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. *New Biotechnology* 52: 35-41.
- Ho B. T., Roberts T. K., Lucas S. (2017): An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: The microbial approach. *Critical Reviews in Biotechnology* 38: 308-320.
- Lebreton L., Slat B., Ferrari F., Sainte-Rose B., Aitken J., Marthouse R., Hajbane S., Cunsolo S., Schwarz A., Levivier A., Noble K., Debeljak P., Maral H., Schoeneich-Argent R., Brambini R., Reisser J. (2018): Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific Reports* 8: 4666.
- Liu C., Shi C., Zhu S., Wei R., Yin C. C. (2019): Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508: 289-294.
- Madigan J. M., Martinko M. T. (2006): *Brock biology of microorganisms*. Pearson; Prentice Hall.
- Ritchie H., Roser M. (2018): Plastic Pollution. *Our World In Data*, <https://ourworldindata.org/plastic-pollution> (pristupljeno 18. 8. 2021.)

- Ru J., Huo Y., Yang Y. (2020): Microbial degradation and valorization of plastic wastes. *Frontiers in Microbiology* 11: 442
- Senathirajah K., Attwood S., Bhagwat G., Carbery M., Wilson S., Palanisami T. (2021): Estimation of the mass of microplastics ingested – A pivotal first step towards human health risk assessment. *Journal of Hazardous Materials* 404: 124004
- Shah Z., Krumholz L., Aktas D. F., Hasan F., Khattak M., Shah A. A. (2013): Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75. *Biodegradation* 24: 865-877.
- Swapnil K. K., Deshmukh A. G., Mahendra S. Dudhare M. S., Patil V. B. (2015): Microbial degradation of plastic: a review. *Biochem Tech* 6 (2): 952-961.
- Tadimeti A. (2020): The effects of different aquatic environments on the rate of HDPE and LDPE degradation by *Bacillus subtilis*. *Columbia Junior Science Journal* 5: 19-20.
- Tanasupawat S., Takehana T., Yoshida S., Hiraga K., Oda K. (2016): *Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (8).
- Taniguchi I., Yoshida S., Hiraga K., Miyamoto K., Kimura K., Oda K. (2019): Biodegradation of PET: Current status and application aspects. *ACS Catalysis* 9 (5): 4089-4105.
- Urbanek A. K., Rymowicz W., Mirończuk A. M. (2018): Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 7669–7678.
- Venkatesh S., Mahboob S., Govindarajan M., Al-Ghanim K. A., Ahmed Z., Al-Mulhm N., Gayathri R., Vijayalakshmi S. (2021): Microbial degradation of plastics: Sustainable approach to tackling environmental threats facing big cities of the future. *Journal of King Saud University – Science* 33: 101362.
- Waqas M., Haris M., Asim N., Islam H. ul, Abdullah A., Khan A., Khattak H., Waqas M., Ali S. (2021): Biodegradable potential of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus safensis* using low density polyethylene thermoplastic (LDPE) substrate. *European Journal of Environment and Public Health* 5 (2).

- Wilkes R. A., Aristilde L. (2017): Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *Journal of Applied Microbiology* 123 (3): 582-593.
- Yoshida S., Hiraga K., Takehana T., Taniguchi I., Yamaji H., Maeda Y., Toyohara K., Miyamoto K., Kimura Y., Oda K. (2016): A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351: 1196-1199.

10. SAŽETAK

Plastika je materijal koji je vrlo koristan i ima široku primjenu, ali njezina sve veća proizvodnja i nepravilno odlaganje dovelo je do velikog zagađenja kopna, oceana i rijeka. Jedno od ekološki prihvatljivih rješenja ovog problema moglo bi biti korištenje bakterija koje razgrađuju plastiku. Otkrivene su mnoge takve bakterijske vrste te su one, njihovi enzimi i poznati mehanizmi razgradnje opisani u ovom radu. Također su opisani i načini na koje bi se navedene bakterije i njihovi enzimi mogli u budućnosti koristiti u svrhu recikliranja plastičnog otpada. Kako bi to bilo moguće ostvariti, potrebno je provesti još mnoga istraživanja usmjerena prema pronalaženju novih bakterija i enzima te genetičkoj modifikaciji već poznatih enzima u svrhu proizvodnje njihovih visoko aktivnih varijanti koje bi se mogle koristiti u recikliranju i razgradnji velike količine plastike.

KLJUČNE RIJEČI: plastika, bakterije, enzimi, razgradnja, recikliranje

11. SUMMARY

Plastic is a material that is very useful and has wide applications, but its increasing production and improper disposal has led to great pollution of land, oceans, and rivers. One of the environmentally friendly solutions to this problem could be to use plastic-degrading bacteria. A large number of such bacterial species have been discovered and they, their enzymes and known degradation mechanisms are described in this paper. Ways in which these bacteria and their enzymes could be used in the future for the purpose of recycling plastic waste are also described. In order to achieve this, much more research needs to be directed towards finding new bacteria and enzymes and genetically modifying already known enzymes for the purpose of producing their highly active variants and using them in recycling and degrading large amounts of plastic.

KEY WORDS: plastic, bacteria, enzymes, degradation, recycling

12. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25. svibnja 1999. godine u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu Silvija Strahimira Kranjčevića, a potom sam upisala Drugu gimnaziju. Nakon završetka srednje škole, 2018. godine upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Tijekom studiranja sudjelovala sam u Noći biologije. Laboratorijsku stručnu praksu obavila sam na Zavodu za biokemiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Jasmine Rokov Plavec. Vrlo dobro se služim engleskim jezikom u govoru i pisanju, talijanskim se služim dobro, a njemački poznajem na bazičnoj razini.