



## Karakterisering av mesofile bakterier med evnen til å hydrolysere vanlige polymerforbindelser i norsk natur om vinteren

*Forfattere: Eirik Haugen og Kelly Yong Kreutzmann Teigen, Ullern videregående skole*

*En konsekvens av den massive plastproduksjonen i verden er at mye plast havner i naturen. Det har tidligere blitt forsket på om bakterier kan bryte ned disse plastene på avveie. Det har også blitt forsket på om man kan erstatte tradisjonelle petroleumsbaserte plaster med biologisk nedbrytbar plast. Tidligere forskning har undersøkt dette i mer landlige områder, mens denne studien har mer fokus på urbane områder om vinteren. For å undersøke dette nærmere ble det tatt jordprøver fra Oslo-området og testet på fire ulike agar med bioplastene; PCL, PES, PBS og PHBV. Resultatene er tilsvarende de fra tidligere forskning, når det gjelder bakterierienes evne til å bryte ned de ulike plastene. Likevel ser vi at det er færre plastnedbrytende bakterier og at noen av plasttypene brytes mindre ned, sammenlignet med tidligere studier i Norge. Mer forskning trengs på dette området, men studien gir et innblikk i hva slags plasttyper en bør bruke i kaldere bymiljøer.*

### Introduksjon

Syntetiske petroleumsplaster utgjør 99% av plastforbruket i verden (European Bioplastics, 2017). Slike polymerer er høyt stabile og brytes ikke lett ned, fordi naturlige mikroorganismer ikke er i stand til å bryte ned de intramolekylære karbonforbindelsene mellom monomerene (Andrady, 2011; Rochman, et al., 2015). Disse petroleumsplastene blir værende i naturen som mikroplast (plast mellom 0,1 cm og 1µm) (Andrady, 2011). Tilstedeværelsen av mikroplast i miljøet er vist at er skadelig for en stor gruppe planter. I tillegg virker mikroplast som bærer av mange miljøgifter, som tungmetaller og farmasøytiske giftstoffer (Wojnowska-Baryła, Bernat, & Zaborowska, 2022). Det finnes derimot biologisk nedbrytbar plast som har blitt sett på som en lovende løsning til mikroplastproblemet (Tokiwa, Calabria, Ugwu, & Aiba, 2009). Monomerene i bioplast er bundet sammen med esterbindinger. Det gjør at de lettere kan brytes ned til vann, karbondioksid og biomasse av alminnelige bakterier som eksisterer i naturen. Derfor er de godt egnet som nedbrytbare alternativer til mange petroleumsplaster (Arikan & Ozsoy, 2015). Bakteriene produserer ekstracellulære enzymer som bryter polymerer ned til monomerer via hydrolyse av esterbindingene, og andre enzymer fra bakteriene kan bryte disse ned videre (Bahl, Jigmat, Jashan, & Shankar, 2020).

For at bioplast skal være et alternativ til vanlig plast, må det være nok av bakterier som kan bryte ned disse til alle tider. Det har blitt vist at disse bakteriene eksisterer i norsk natur i ett forsøk av professor Colin Charnock i 2021 (Charnock, 2021). Dette var derimot kun en utforskende studie, og prøvene var tatt om våren. Det vil derfor være interessant å se på mengden av disse bakteriene i kaldere klima (temperatur <

o°C). Denne studien har som mål å identifisere og kvantifisere plastnedbrytende bakterier fra jordprøver i Oslo-området om vinteren. Dette vil videreutvikle forståelsen av plastnedbrytende bakterier i Norge, og gi innsikt i naturens evne til å bryte ned bioplast i kaldere klima.

## Metode

For å kunne identifisere og kvantifisere plastnedbrytende bakterier, ble bakterier fra jordprøver tatt rundt Oslo-området strøket utover plastholdig agar. Dette ble gjort for å se etter klaringssoner i agaren rundt noen av koloniene. En klaringszone betyr at bakteriekulturen har brutt ned plasten, og brukt den som næring. Metoden brukt her ble først beskrevet av Charnock som var en pioner innen bruken og produksjonen av plastholdig agar (Charnock, 2021). For å identifisere plastnedbrytende bakterier ble det først laget fire ulike agartyper med fire ulike plasttyper. Alle agarene besto av to lag, der det nederste laget var en 50 % næringsinnholdig R-2A agar (17209; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Over dette laget ble det tilført enda ett agar-lag bestående av ulike typer plast. Det ble brukt fire ulike typer plast: *Polykaprolakton* (PCL) (MW 50000; Polysciences 25090, Warrington, PA, USA); *Poly(etylenesuksinat)* (PES) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Katalog nr. 182036); *Polybutylensuccinat* (PBS) (Sigma-Aldrich, Katalog nr. 448028); *Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat)* (PHBV) (Materials Gateway, UK, solgt som ENMAT Y1000P). Allerede i dag er disse plastene brukt som alternativ til petroleumsbasert plast. Dette i form av alt fra medisinkapsler til plastposer og bildeler (McKeen, 2017; Chen & Yan, 2020).

### Laging av agar

For å lage 50 % R-2A ble 4,5 gram R-2A tilsatt i 500 mL ionbyttet vann. R-2A-løsningen ble så autoklavert, før den ble helt over i agarplater.

For å lage den plastholdige agaren ble 0,1 gram surfaktant, N-Dodecanoyl-N-methylglycin natrium salt (L5777, Sigma-Aldrich) tilsatt til 1 liter fosfat-bufret saltvann (PBS) med en pH på rundt 7,4. Overførte så 200 mL hver til 4, 250 mL pyrex Erlenmeyerkolber og tilsatte deretter 3 gram noble agar (J10907.22, Alfa Aesar, Massachusetts US) til hver kolbe. Bruken av noble agar reduserer mulige urenheter ofte funnet i agar av lavere kvalitet, og det ga oss et klarere medium som bedre vil kunne vise soner med hydrolyse. Plastagaren ble autoklavert på 121°C i 16 minutter.

3 g pulverisert PES og PHBV ble tilsatt 3 mL dimetylsulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich, W387520). 3 g PBS og PCL ble i stedet tilsatt 4 mL DMSO for lettere å kunne pipetere løsningen. En konsentrasjon med DMSO på < 5 % har en liten påvirkning på bakterier, og skal ikke påvirke kulturveksten i stor grad (Dyrda, Boniewska-Bernacka, Man, Barchiewicz, & Słota, 2019). Suspensjonen ble varmet opp til 80°C (130°C for PBS) til plasten var løst opp. PHBV ble ikke fullstendig løst opp, men dannet likevel en homogen løsning.

Plastløsningene ble tilsatt den smeltede agaren ved ca. 60°C og ved bruk av ultrasonisk homogenisering (Vibra-Cell VCX130, Sonics, Seattle, WA, USA med en standard CV18 omformer og 6 mm diameter sonde). Sonden var ikke steril, men ble desinfisert med etanol. Deretter ble sonden plassert omtrent 8 mm under overflaten. Plastløsningene ble tilsatt dråpevis med en Pasteur-pipette nærme tuppen av sonden under sonikering (40 % amplitude med 55 s på/5 s av pulser). Til slutt ble disse nye løsningene helt over den størknede næringsagaren som et nytt lag.

### Ekstraksjon av bakterier fra prøvene

For å undersøke om det finnes bakterier som kan hydrolysere plastforbindelser ble det tatt jordprøver fra 4 steder. Det ble samlet inn ca. 5 mL jord som ble holdt i tilnærmet lik temperatur som miljøet de ble hentet fra. Informasjon om prøvene er gitt i Tabell 1:

Tabell 1. Oversikt over hvor jordprøvene ble tatt, beskrivelse av hva som var i nærheten og hvor langt under jordoverflaten det ble tatt prøver fra.

Prøve	Sted	Koordinater	Beskrivelse av området	Beskrivelse av jorden
A	Akerselva	59.93491753381055, 10.75728167262309	Oversiden av en elv i industriområde	Tatt rett under gresset
B	Lysakerelva	59.93379533464311, 10.671805075154161	Oversiden av en elv i utkanten av byen	Tatt rett under overflaten
C	Smestad gjen- bruksstasjon	59.933766744041016, 10.671879363638242	Gressplen ved siden av gjenbruksstasjon	Tatt 2-3 cm under overflaten
D	Hage	59.959988397518416, 10.640372588767832	Privat hage i utkanten av byen	Tatt 2-3 cm under overflaten

For å separere bakteriene fra jordprøvene ble 0,5 gram jord overført til et rør med en spatelsspiss med glasskuler (Ø 2 mm), og tilsatt Maximum Recovery Dilutant (MRD; Oxoid, Hampshire, UK, Katalog nr. CM0733) med 0,01 % Tween opp til 5 ml. Prøvene ble så behandlet 5 minutter i et ultralydbad, og i en vortex-mikser i 30 sekunder med avkjølingspause på 1 min, totalt 3 ganger, for å separere bakteriene fra de tyngre jordpartiklene. Videre ble det tatt 0,1 mL av den øverste fasen og overført til eppendorfrør som deretter ble tilsatt 0,9 mL MRD, til et totalvolum på 1 mL. Det ble laget en fortynningsrekke med fortynningsene 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 og 1/100000 for å unngå overvekst av bakterier på agarskålene. Likevel siden det ikke var mulig å vite hvor mange bakterier det var opprinnelig, ble det brukt flere av fortynningsene. Dette var for å forsikre minst en agarkultur med et tellbart antall kolonier. Agarskålene ble oppbevart i romtemperatur. Se Tabell 2 for de ulike fortynningsene som ble brukt.

Tabell 2. Oversikt over fortynningsene av jordprøvene som ble testet på de ulike plastene.

Fortyning	Akerselva	Lysakerelva	Smestad Gjen- bruksstasjon	Hage
1/100	x	x	x	x
1/1000	x	x*	x	x
1/10000		x		
1/100000	x	x*	x	x

x = PCL, PES, PBS og PHBV; x\* = PES

### DNA-isolering og sekvensering fra enkelte bakteriekulturer

Etter å ha sett på agarskålene som ga kolonier med klare soner, ble de som hadde minst sannsynlighet for å være kontaminert med andre kolonier plukket enkeltvis og strøket over på fersk agar med samme bioplast. Det ble gjort for å forsikre om det var akkurat denne kolonien som kunne bryte ned plasten. For å kunne identifisere bakteriekulturene, ble DNA isolert ved bruk av Quick-DNA Magbead Plus Kit (D4082; Zymo Research, Irvine, CA, USA) og sekvensert med Oxford Nanopore Technology MinION next generation sequencing (NGS). Det ble gjort som forklart i OsloMets protokoll, som innebar måling av DNA-konsentrasjon, fragmentering, barkoding, adapterlegering, sekvensering og analyse av DNA-prøvene (OsloMet, 2021). Resultatene herfra ble analysert i real time med WIMP (What's in my Pot?), for å identifisere bakteriene (Juul, et al., 2015).

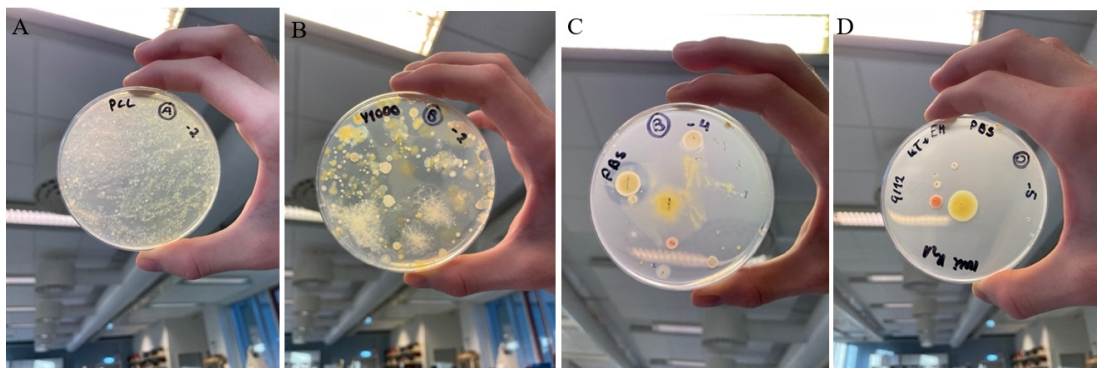
**Resultater**

Resultatene skulle helst ha inneholdt både totalt antall kolonier og antall klare soner, men på grunn av overvekst var ikke dette mulig. Overveksten gjorde det umulig å telle antall kolonier på agarskålene med fortynning 1/1000 eller lavere. Se figur 1. Det ble derfor kun telt antall klare soner på agarskålene med overvekst. Se tabell 3. Likevel viser resultatene fra agarskålene at det finnes bakterier som kan bryte ned alle plasttypene.

Tabell 3. Oversikt over resultatene fra agarskålene som viser til hvilken jordprøve, fortynning og plast som ble brukt. I tillegg til oversikt over antall kolonier totalt og antall plastspisende kolonier.

Jordprøve	Fortynning	Plast	Kolonier totalt	Plastnedbrytende kolonier
Akerselva	1/100000	PCL	31	0
	1/100000	PBS	37	0
	1/100000	PES	46	0
	1/100000	PHBV	45	2
	1/1000	PCL	>100	0
	1/1000	PBS	>100	0
	1/1000	PES	>100	6
	1/1000	PHBV	>100	Store områder
Lysakerelva	1/100000	PES	2	0
	1/10000	PCL	13	0
	1/10000	PBS	22	4
	1/10000	PES	9	0
	1/10000	PHBV	13	0
	1/1000	PES	63	0
	1/100	PCL	>100	0
	1/100	PBS	>100	1
	1/100	PES	>100	2
	1/100	PHBV	>100	Store områder
Smestad	1/100000	PCL	9	0
	1/100000	PBS	7	0
	1/100000	PES	9	0
	1/100000	PHBV	5	0
	1/1000	PCL	>100	0
	1/1000	PBS	>100	0
	1/1000	PES	>100	5
	1/1000	PHBV	>100	8

Hage	1/100000	PCL	12	0
	1/100000	PBS	9	0
	1/100000	PES	9	0
	1/100000	PHBV	8	1
	1/1000	PCL	>100	3
	1/1000	PBS	>100	2
	1/1000	PES	>100	5
	1/1000	PHBV	>100	Store områder



Figur 1. Bildene A og B viser overvekst av bakterier. I A er det ingen klare soner, mens i B ser man store områder. Blide C viser hvordan en tydelig klar sone er rundt en koloni. D viser få kolonie uten noen klare soner.

Fra sekvenseringen fant vi tre ulike bakterietyper.

Tabell 4. Oversikt over resultatene fra sekvenseringen. Hvor bakeriene ble tatt fra og resultatene fra analysen. Koloni 4 og 5 hadde ikke nok DNA til å bli sekvensert.

Koloni	Plasttype	Petriskål	DNA-konsentrasjon (ng/μg)	Bakterie
1	PCL	D -3	97,1	<i>Variovorax</i>
2	PES	C -3	439,2	<i>Bacillus altitudinis</i>
3	PES	C -3	45,2	<i>Bacillus safensis</i>
4	PHBV	D -2	8,0	-
5	PBS	B -2	12,7	-

### Diskusjon

I denne studien har vi analysert plastnedbrytende bakterier i norsk, urban jord, og hvorvidt bioplast vil bli brutt ned i kaldere miljøer. Fra resultatene kunne man se at alle jordprøvene inneholdt plastnedbrytende

bakterier, og vi så nedbrytning av alle plasttypene. Fra sekvenseringen fikk vi tre ulike bakterietyper, disse var: *Variovorax*, *Bacillus altitudinis* og *Bacillus safensis*. Dette er bakterier som tidligere er vist å ha plastnedbrytende egenskaper (Liu, et al., 2023; Roberts, et al., 2020).

*Bacillus* er en bakterieart som er kjent for å danne endosporer (Nicholson, Munakata, Horneck, Melosh, & Setlow, 2000). Det er en mekanisme bakterier bruker hvis forholdene ikke er gunstige, som ved ekstreme temperaturer. Det innebærer at bakteriene lager metabolsk inaktive sporer som er meget motstandsdyktige, og kan igjen spire til en vegetativ celle (Nicholson W. L., 2002). Det er derfor mulig at vi hadde inaktive sporer i jordprøvene. De ville ikke brutt ned plast i naturen, men spirte til plastnedbrytende *Bacillus safensis* og *Bacillus altitudinis* på agarskålene. Agarskålene ble oppbevart i romtemperatur. En videre studie hvor man dyrker bakteriene ved ulike temperaturer ville derfor vært ønskelig for å gjøre resultatene mer virkelighetsnære.

Studien viste ingen nye plastnedbrytende bakterier, men viste derimot en lavere konsentrasjon av plastnedbrytende bakterier enn en tidligere studie (Charnock, 2021). CFU/g (Colony forming unit/g) til jordprøvene varierte mellom og og var tilsvarende til Charnocks studie. >5 % av koloniene våre lagde klare soner i agaren, men Charnock så at ca. 10 % av koloniene brøt ned plast (Charnock, 2021). Ser man nærmere på hvilke bakterier som kom frem i den studien er det ingen overlapp mellom de bakteriene, og de som ble identifisert i denne studien. Dette kan være grunnet forskjellen i årstid og lokasjon prøvene ble tatt.

Basert på lignende klar-soneteknikker har andre sett på populasjoner av bakterier i forskjellige miljøer. En polsk studie rapporterte følgende mengde av arktiske mikroorganismer med evne til å bryte ned de ulike plastene i synkende rekkefølge: PCL > PBS (Urbanek, et al., 2017). Den samme rekkefølgen ble sett for mikrober fra jordbruksjord i Thailand (Penkhrue, et al., 2015). Ved å se på mikroorganismer i ulike økosystemer har man sett et høyt og omtrent likt antall PHBV- og PCL-nedbrytere (Nishida & Tokiwa, 1993). I Charnocks studie fant han en omtrent tilsvarende rekkefølge: PHBV > PCL > PBS = PES (Charnock, 2021). Den fullstendige rekkefølgen for biologisk nedbrytning av de ulike plastene i denne studien, basert på antall forskjellige isolater som produserte klaring i platholdig agar var som følger: PHBV > PBS = PES > PCL. Her ser vi betydelig færre PCL-nedbrytende bakterier som kan være grunnet tilfeldigheter, og at denne studien er for liten med for få prøver, men resten samsvarer med tidligere studier. Alle disse studiene dekker til sammen et bredt spekter av miljøer som kan tyde på at denne rekkefølgen gjenspeiler en generell tendens i miljøbakterieisolater. I så fall kan dette bidra til å informere framtidige valg av grønn plast med hensyn til konsekvensene for miljøet.

Ser vi i ettertid på studien så er det nok noe smalt for å kunne kartlegge norske miljøer med tanke på plastnedbrytende bakterier. Vi tok kun en prøve fra hver lokasjon, som igjen var tilfeldig valgt. Selv om resultatene viser samsvar med tidligere forskning, kunne det vært interessant og gjennomført flere DNA-sekvenseringer. Dette for å få et større innsyn i hvilke bakterier som kan bryte ned plasten. I tabell 4 er det vist til 5 kolonier, men vi kunne kun identifisere 3 av dem. Grunnet lav DNA-konsentrasjon var det lite sannsynlig at vi ville få noen konkrete svar hvis vi hadde gjennomført en DNA-sekvensering fra de to siste prøvene. Likevel ville det nok vært mer gunstig med tanke på resultatene å ha gjennomført flere DNA-sekvenseringer. Flere prøver fra flere steder og flere sekvenseringer ville gitt oss et mer helhetlig bilde av plastnedbrytende miljøbakterier i Norge.

## Konklusjon

Selv om det ikke er en endelig løsning på plastproblematikken, vil en innfasing av biologisk nedbrytbar plast spare miljøet for mer mikroplast. Flere ulike bakterier med evnen til å bryte ned plast har blitt identifisert. Denne studien viser en markant nedgang i antall kolonier med evnen til å bryte ned plast sammenlignet med tidligere undersøkelser. Det er vanskelig å si sikkert hva denne forskjellen er grunnet og mer forskning er nødvendig for å undersøke dette videre. Selv om denne studien fant en lavere konsentrasjon

av plastnedbrytende bakterier enn tidligere sett, vil det fremdeles være nok til å hindre at mikroplast blir værende i naturen. Et bytte til biologisk nedbrytbar plast vil være positivt for miljøet, selv i land med kalde klimaer som Norge.

## Anerkjennelser

Studien ble utført i samarbeid med OsloMet, som sto for utstyr og lab. Vi takker spesielt Colin Charnock og Hege Tunsjø for god veiledning gjennom hele prosjektet.

## Referanser

- Andrady, A. L. (2011, August 8). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, ss. 1596-1605.
- Arikan, E. B., & Ozsoy, H. D. (2015). A Review: Investigation of Bioplastics. *Journal of Civil Engineering and Architecture* 9, ss. 188-192.
- Bahl, S., Jigmat, D., Jashan, J. S., & Shankar, S. (2020). Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*.
- Charnock, C. (2021, Januar 3). Norwegian Soils and Waters Contain Mesophilic, Plastic-Degrading Bacteria. *microorganisms*.
- Chen, X., & Yan, N. (2020). A brief overview of renewable plastics. *Materials Today Sustainability*, 7-8. doi:10.1016/j.mtsust.2019.100031
- Dyrda, G., Boniewska-Bernacka, E., Man, D., Barchiewicz, K., & Słota, R. (2019, April 1). The effect of organic solvents on selected microorganisms and model liposome membrane. *Mol Biol Rep* 46, ss. 3225-3232.
- European Bioplastics. (2017). *Bioplastics-Facts and Figures*. Hentet fra [https://docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP\\_Facts\\_and\\_figures.pdf](https://docs.european-bioplastics.org/publications/EUBP_Facts_and_figures.pdf)
- Juul, S., Izquierdo, F., Hurst, A., Dai, X., Wright, A., Kulesha, E., . . . Turner, D. J. (2015). What's in my pot? Real-time species identification on the MinION™. *BioRxiv*. doi:10.1101/030742
- Liu, J., Cui, Z., Hao, T., Li, Y., Luan, X., Feng, K., & Zheng, L. (2023). Characterization and Hydrocarbon Degradation Potential of *Variovorax* sp. Strain N23 Isolated from the Antarctic Soil. *Microbiology research*, 14(1), 91-103. doi:10.3390/microbiolres14010009
- McKee, L. W. (2017). 13 - Environmentally Friendly Polymers. I *Permeability Properties of Plastics and Elastomers* (ss. 305-323). Plastics Design Library. doi:10.1016/B978-0-323-50859-9.00013-0
- Nicholson, W. L. (2002). Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(3), ss. 410-416. doi:10.1007/s00018-002-8433-7
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548 - 572. doi:10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000
- Nishida, H., & Tokiwa, Y. (1993). Distribution of Poly(p-hydroxybutyrate) and Poly(ε-caprolactone) Aerobic Degrading Microorganisms in Different Environments. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 1(3), 227-233.
- OsloMet. (2021). Neste Generasjons Sekvensering. *Laboratoriekurs BIO3200*.
- Penkhruue, W., Khanongnuch, C., Masaki, K., Pathom-aree, W., Punyodom, W., & Lumyong, S. (2015). Isolation and screening of biopolymer-degrading microorganisms from northern Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 1431-1442. doi:10.1007/s11274-015-1895-1
- Roberts, C., Edwards, S., Vague, M., León-Zayas, R., Scheffer, H., Chan, G., . . . Mellies, J. L. (2020). Environmental Consortium Containing *Pseudomonas* and *Bacillus* Species Synergistically Degrades Polyethylene Terephthalate Plastic. *mSphere*, 5(6). doi:10.1128/mSphere.01151-20
- Rochman, C. M., Kross, S. M., Armstrong, J. B., Bogan, M. T., Darling, E. S., Green, S. J., . . . Veríssimo, D. (2015, September 3). Scientific Evidence Supports a Ban on Microbeads. *Environmental Science & Technology*, ss. 10759-10761.

- Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International journal of molecular sciences*, ss. 3722-3742.
- Urbanek, A. K., Rymowicz, W., Strzelecki, M. C., Kociuba, W., Franczak, Ł., & Mirończuk, A. M. (2017). Isolation and characterization of Arctic microorganisms decomposing bioplastics. *AMB Express*, 7(148). doi:10.1186/s13568-017-0448-4
- Wojnowska-Baryła, I., Bernat, K., & Zaborowska, M. (2022). Plastic Waste Degradation in Landfill Conditions: The Problem with Microplastics, and Their Direct and Indirect Environmental Effects. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 19(20), s. <https://doi.org/10.3390/ijerph192013223>.