

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.04.012

一株聚乙烯降解菌的鉴定及其发酵条件优化

赵长乐, 林欣, 徐耀波, 严书微, 张婷婷, 李心怡, 魏静

西南大学 生命科学学院/淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室/水产科学重庆市重点实验室, 重庆 400715

摘要: 聚乙烯(polyethylene, PE)制品是当前使用最为广泛的通用塑料, 由此造成的“白色污染”成为了世界性难题. 以 PE 为唯一碳源的无机盐培养基, 从长期覆盖塑料薄膜的土壤中富集、筛选, 获得 1 株 PE 降解菌, 命名为 SW2. 其菌落呈圆形、边缘整齐、表面湿润、光滑, 革兰氏染色阴性, 球状或球杆状; 16S rRNA 基因序列分析发现其与不动杆菌属菌株 SY23 一致性达 99%; 接触酶阳性, 氧化酶与还原硝酸盐阴性, 从而初步鉴定 SW2 为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.). 在含 2% PE 的无机盐培养基中, SW2 在 24 h 可见明显生长, 72 h 其生长速率达到峰值, 而在不含 PE 的无机盐培养基中未见生长. 将 SW2 接种到含 PE 制品(农用地膜和保鲜膜)的无机盐培养基中, 培养第 30 d, 光镜下可观察到农用地膜、保鲜膜出现明显破损, 而未接种菌的对照组膜表面完好无损. 结果表明: SW2 可有效利用 PE, 并能降解 PE 制品. 在不同温度、pH 及 PE 浓度条件下检测 SW2 的生物生长量, 发现其最适生长条件为 30 °C, pH 值为 7.0, 20% PE. 研究丰富了 PE 降解菌的菌种资源, 为生物降解 PE 制品的进一步研究奠定了基础.

关键词: 聚乙烯; 生物降解; 塑料; 不动杆菌; 发酵条件

中图分类号: Q785; S965

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)04-0119-07

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification of a Polyethylene-degrading Strain and Optimization of Its Fermentation Conditions

ZHAO Changle, LIN Xin, XU Yaobo, YAN Shuwei,
ZHANG Tingting, LI Xinyi, WEI Jing

School of Life Sciences, Southwest University/Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development,
Ministry of Education/Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Chongqing 400715, China

Abstract: Polyethylene (PE) products are the most widely used general plastics, and the resulting “white pollution” has become a worldwide problem. In this study, a PE-degrading bacterium was isolated by enriching and screening the inorganic salt medium with PE as the sole carbon source from the soil covered with plastic film for a long time and named as SW2. The colony was round, with neat edge, moist and

收稿日期: 2021-07-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972776); 西南大学大学生创新创业训练项目(202110635067).

作者简介: 赵长乐, 博士研究生, 主要从事鱼类干细胞与生殖发育相关研究.

通信作者: 魏静, 教授, 博士研究生导师.

smooth surface. The bacterium is Gram stain negative, spherical or rod-shaped. The 16S rRNA gene sequence analysis showed that it had 99% identity with *Acinetobacter* strain SY23. It was positive for contact enzymes, negative for oxidase and reducing nitrate. Based on the above characteristics, SW2 was preliminarily identified as *Acinetobacter* sp. In the inorganic salt medium containing 2% PE, SW2 had obvious growth at 24 h of culture, and reached to the peak growing at 72 h, but did not grow in the inorganic salt medium without PE. SW2 was inoculated to the inorganic salt medium containing PE products (agricultural plastic film and fresh-keeping film). On the 30th day of culture, obvious damage of agricultural plastic film and fresh-keeping film was observed under light microscope, while the surface of the control group was intact. The results show that SW2 can effectively utilize PE and degrade PE products. Under different temperature, pH and PE concentration conditions, the biological mass of SW2 was detected. The results showed that the optimal growth conditions of SW2 are 30 °C, pH 7.0, and 20% PE. This research enriched the strain resources of PE-degrading bacteria and laid a foundation for the further study of biodegradable PE products.

Key words: polyethylene; biodegradation; plastic; *Acinetobacter*; fermentation condition

聚乙烯(polyethylene, PE)由乙烯单体经加聚反应而成,其制品包括塑料薄膜(如农用地膜、保鲜膜)、食品袋、垃圾袋、药品包装瓶、牛奶瓶、电线电缆绝缘材料等,是当前使用最为广泛的通用塑料^[1]. 中国是目前世界上最大的 PE 消费国之一,据不完全统计,2019 年中国生产 PE 制品达到了 19 亿 t^[2]. PE 制品具有疏水性高、表面能低等特性,极难被降解,由此造成的“白色污染”成为了世界性难题^[1-3]. 传统处理方式如焚烧、填埋,可造成二次污染,并挤占生物利用空间,因此,生态友好的微生物降解策略备受关注.

目前,国内外学者已相继从农田、海洋、垃圾堆置点、昆虫肠道等分离并鉴定出了 PE 降解菌,这些研究为 PE 制品的生物降解研究奠定了基础^[4-11]. 本研究采用以 PE 为唯一碳源的无机盐培养基,成功从被农用地膜覆盖的公园土壤中筛选获得了 1 株 PE 降解菌,初步鉴定其为不动杆菌,并对其发酵条件进行了优化.

1 材料和方法

1.1 土壤样品、PE 和培养基

土壤样品:重庆马鞍溪湿地公园长期覆盖有塑料垃圾的土壤(106.415E, 29.826N). PE:平均分子质量为 4 000 的分析纯 PE 粉末,美国西格玛奥德里奇公司;农用地膜,森森塑业有限公司;保鲜膜,四川鸿昌塑胶工业有限公司;无机盐培养基与 LB 培养基,配方见参考文献[4].

1.2 PE 降解菌的富集与筛选

称取 8 g 土壤样本,与 100 mL 无菌水混匀,取 200 μ L 土壤混合液分别接种到含 0%, 2% PE 的 100 mL 无机盐培养基中,于 30 °C, 150 r/min 培养 7 d 后,取 200 μ L 富集液于新鲜培养基中进行富集,重复 4 次以上,最后采用平板划线法进行纯化培养,保存菌种.

1.3 PE 降解菌的鉴定

按常规方法对分离菌进行菌落观察、革兰氏染色观察、扫描电镜(EVO LS10, Zeiss)观察,同时进行生理生化特性检测和 16S rRNA 基因系统发育分析,具体参见文献[4]. 16S rRNA 基因通用引物序列为 27 F 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'和 1 492 R 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. PCR 反应条件为 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 100 s, 35 个循环; 72 °C 10 min. PCR 产物经纯化、回收、亚克隆、测序,样品序列在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行比对,并用 MEGA7.0 软件进行系统进化分析.

1.4 生长特性

将 200 μL 分离菌悬液分别接种到含 0%, 2% PE 的 100 mL 无机盐培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 培养, 在第 0, 24, 48, 72, 96, 120 h 分别取样 1 mL, 定性滤纸过滤去除 PE 颗粒, 滤液测定吸光度 OD_{600} , 以检测分离菌在不同时间点的生长情况。

1.5 降解特性

在无机盐培养基中加入不同 PE 制品(农用地膜、PE 保鲜膜), 以作为培养基中的唯一碳源, 将分离菌悬液接种到培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 培养, 于不同时间点显微观察 PE 制品的降解情况, 同时以不接种菌的 PE 制品为对照, 具体方法参照文献[4]。

1.6 发酵条件优化

1.6.1 温度

将 200 μL SW2 菌液接种到含 2% PE 的 100 mL 无机盐培养基中(pH 值为 6.0), 分别在 25, 30, 35, 40 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下 150 r/min 培养, 于 0, 72, 96 h 测定培养液 OD_{600} , 每组重复 3 次。

1.6.2 pH 值

将 200 μL SW2 菌液接种到不同 pH 值(4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)的含 2% PE 的 100 mL 无机盐培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 培养, 在 0, 72, 96 h 时测定培养液 OD_{600} , 每组重复 3 次。

1.6.3 PE 浓度

将 200 μL SW2 菌液接种到含不同浓度 PE(0%, 8%, 12%, 16%, 20%, 30%, 40%)的 100 mL 无机盐培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 r/min 培养, 在 0, 72, 96 h 时测定培养液 OD_{600} , 每组重复 3 次。

1.7 数据统计分析

采用 SPSS 22.0 对实验数据进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

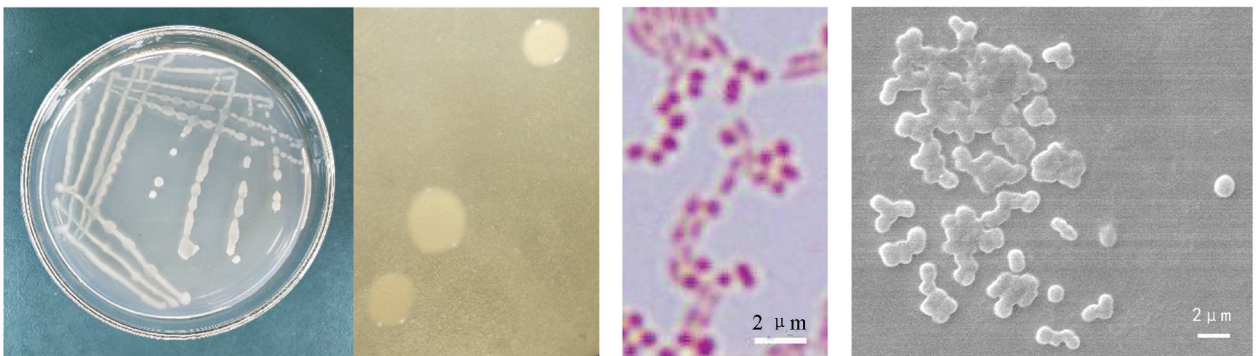
2 结果

2.1 降解菌的筛选与纯化

将土壤稀释液接种到含 PE 的无机盐培养基中进行富集与培养, 重复 3 次后, 含 PE 的无机盐培养基逐渐变得浑浊, 而不含 PE 的无机盐培养基未见变化, 进一步经平板分离、纯化, 最终获得 1 菌株, 命名为 SW2。

2.2 菌株的鉴定

将分离纯化的 SW2 菌株接种到 LB 固体培养基上进行培养, 其菌落呈乳白色、圆形、边缘整齐、微隆起、表面湿润、光滑(图 1a); 革兰氏染色阴性(图 1b); 扫描电镜成像结果显示, SW2 呈球状或球杆状, 大小为 $(0.2 \sim 1) \mu\text{m} \times (0.4 \sim 2) \mu\text{m}$ (图 1c)。



(a) 菌落形态

(b) 革兰氏染色

(c) 扫描电镜形态

图 1 菌株 SW2 菌落形态观察

16S rRNA 基因序列分析发现, SW2 与不动杆菌属菌株 SY23 一致性高达 99%。系统发育分析显示, 以诺卡氏属菌株(*Nocardia yamanashiensis*)为外类群, SW2 与不动杆菌属多个菌株聚在一起, 其中与不动杆菌属菌株 SY23 进化距离最近(图 2)。由此, 我们初步鉴定 SW2 为不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)。

接触酶、氧化酶与还原硝酸盐的特性为不动杆菌属的关键生理生化指标^[12-13]。生理生化实验结果显示, SW2 为接触酶阳性, 氧化酶与还原硝酸盐阴性(表 1), 这与不动杆菌属的特征一致, 进一步证实 SW2 为不动杆菌属菌株。

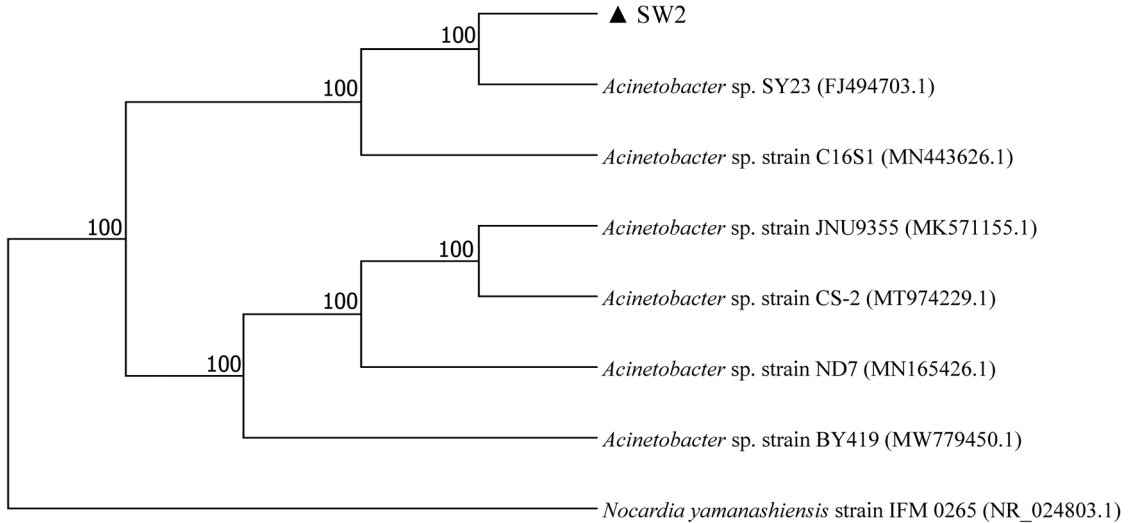


图 2 菌株 SW2 的 16S rRNA 基因系统发育树

表 1 菌株 SW2 的生理生化鉴定实验结果

指标项目	SW2	<i>Acinetobacter</i> sp.
接触酶	+	+
氧化酶	-	-
还原硝酸盐	-	-

注: + 为阳性, - 为阴性。

2.3 SW2 生长特性

在含 2% PE 的无机盐培养基中, SW2 的 OD_{600} 值在第 24 h 显著高于 0 h ($p < 0.05$), 表明已开始进入对数生长期, 到第 72 h 达到稳定期 ($p < 0.05$), 而在不含 PE 的无机盐培养基中未见 OD_{600} 值发生明显变化 ($p > 0.05$) (表 2), 表明 SW2 的生长依赖于 PE。

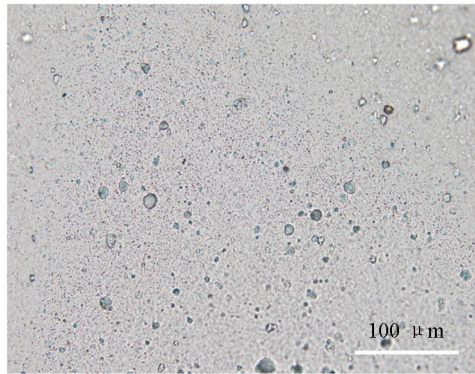
表 2 菌株 SW2 在不同培养时间下的 OD_{600} 值

培养时间/h	对照组	实验组
0	0.044 ± 0.000a	0.046 ± 0.001a
24	0.047 ± 0.002a	0.079 ± 0.004b
48	0.048 ± 0.002a	0.093 ± 0.002c
72	0.049 ± 0.002a	0.120 ± 0.008d
96	0.049 ± 0.001a	0.123 ± 0.006d
120	0.046 ± 0.001a	0.120 ± 0.002d

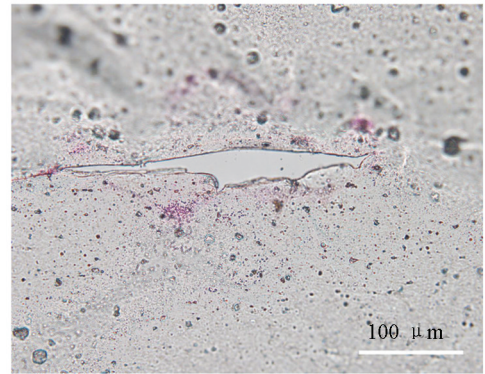
注: 表中数据为 $\bar{x} \pm s$, $n = 3$; 小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

2.4 SW2 降解特性

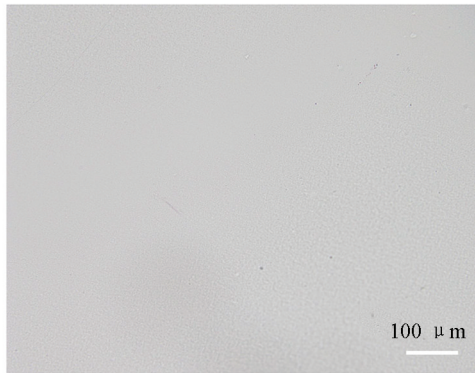
将 SW2 接种到以农用地膜或保鲜膜为唯一碳源的无机盐培养基中, 于 30 °C, 150 r/min 的摇床中振荡培养. 培养 30 d 后, 显微观察结果显示, 对照组膜表面完整(图 3a, 3c), 而 SW2 组可见大量菌嵌入膜内或附着于膜表面生长, 并且农用地膜和保鲜膜出现明显破损(图 3b, 3d). 结果表明, SW2 可有效降解 PE 制品.



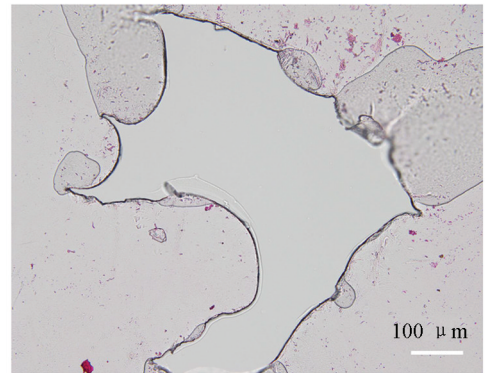
(a) 对照组农用地膜



(b) SW2组农用地膜



(c) 对照组保鲜膜



(d) SW2组保鲜膜

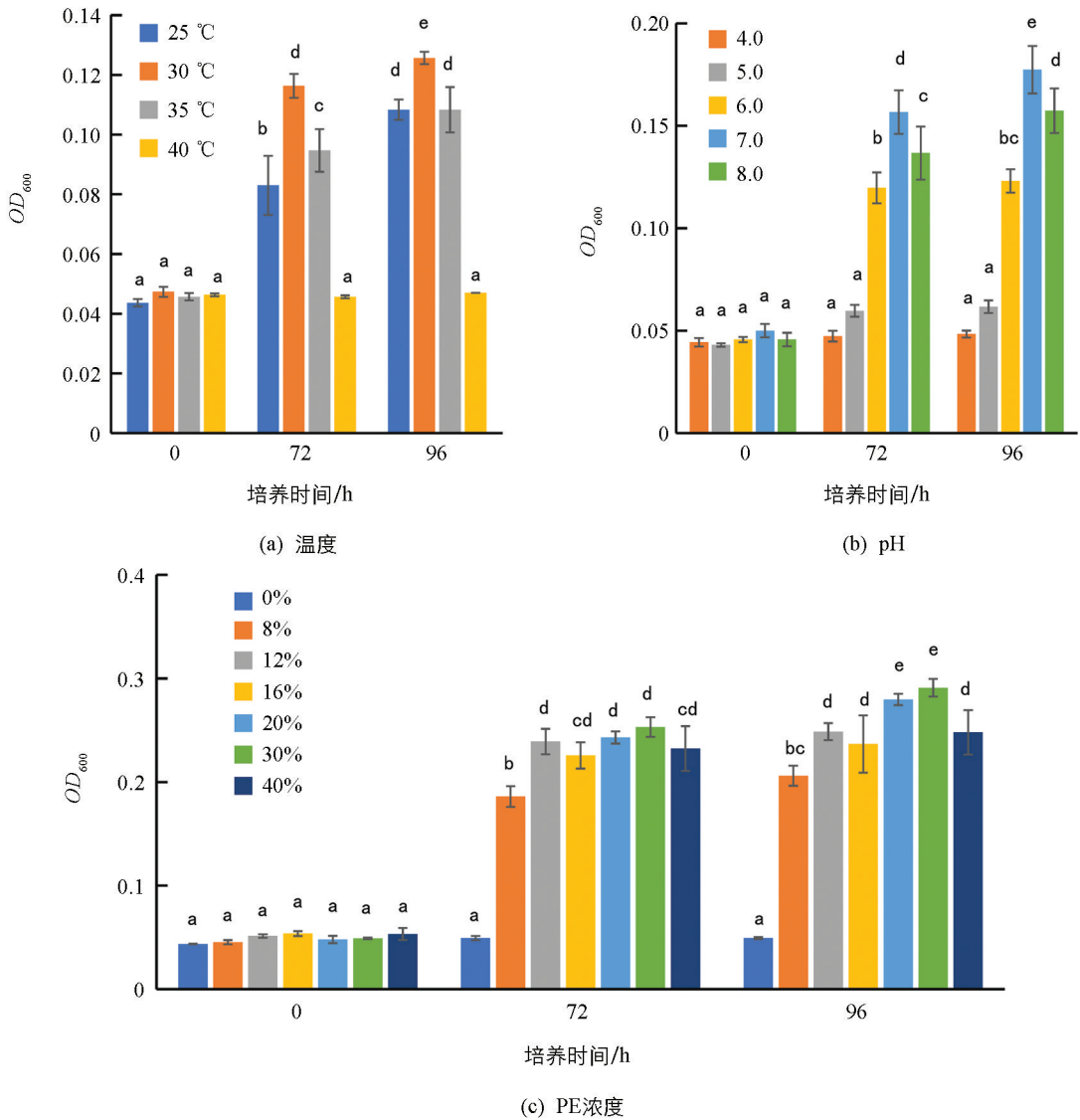
图3 分离菌株 SW2 对 PE 制品的生物降解

2.5 发酵条件优化

在不同发酵条件下, 测定 SW2 在不同培养时间培养液的 OD_{600} 值, 以优化其发酵条件. 在不同培养温度(25, 30, 35, 40 °C)条件下, 分离菌在 30 °C 时生长最佳, 在 40 °C 几乎不能生长(图 4a). 在不同 pH 值条件下, SW2 在 pH 值为 7.0 时生长最佳, 其他依次为 8.0 > 6.0 > 5.0(图 4b). 在无 PE 的无机盐培养基中, SW2 不能生长, 随着 PE 浓度的增加, 菌体浓度增加, 在 96 h 时, PE 浓度为 20% 的菌生长速率达到稳定, 同时与 PE 浓度为 30% 差异无统计学意义($p > 0.05$), PE 浓度为 40% 时, 生长速率开始降低($p < 0.05$)(图 4c). 综上, SW2 最适发酵条件: 30 °C, pH 值为 7.0, 20% PE.

3 讨论

本研究采用以 PE 为唯一碳源的无机盐培养基, 从长期覆盖塑料薄膜的土壤中分离获得了 1 株 PE 降解菌, 通过菌落形态观察、革兰氏染色观察、16S rRNA 基因序列的系统分析、生理生化特性检测, 初步鉴定分离菌株 SW2 为不动杆菌. 进一步研究表明, SW2 可有效降解 PE 制品, 并且对其最适发酵条件进行了优化. 不动杆菌属分布广泛, 已有研究表明, 该属菌株能够降解多种环境污染物, 如石油烃、酚酸类化合物、氯氰菊酯等^[14-16]. 本研究我们成功分离获得了 1 株降解 PE 的不动杆菌属菌株 SW2, 不仅丰富了 PE 降解菌的菌种资源, 而且为进一步研究其 PE 降解奠定了重要基础.



小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义。

图 4 SW2 在不同发酵条件下的生长情况

本课题组前期还从覆盖塑料薄膜的土壤中成功分离获得 1 株降解 PE 的诺卡氏菌 (*Nocardia* sp.) SW1^[4]. 该菌对 PE 具有明显的浓度依赖, 并且在 PE 浓度为 2% 时生长最快^[4]. 本研究中, SW2 生长同样有 PE 浓度依赖, 但其最适 PE 达到了 20% (图 4c), 同时菌液 OD_{600} 值明显高于 SW1, 提示 SW2 可更有效地利用 PE. 在对 PE 制品降解效能研究中, SW1 在培养的第 60 d 光镜观察可见膜明显破损, 出现空洞^[4]; 钟越等^[5]报道从土壤中分离获得 1 株降解 PE 的放线菌属菌株, 该菌在培养的第 60 d, 扫描电镜观察可发现膜片表面出现孔洞; 在本研究中, SW2 在第 30 d 光镜下即可观察到农用地膜、保鲜膜出现明显破损 (图 3), 提示 SW2 可能具有更高效的 PE 制品降解效能.

在无机盐培养基中, PE 颗粒悬于培养基的表面, 一定程度影响了培养液 OD_{600} 的测定, 因此我们采用了直接定性滤纸过滤法, 以滤除培养液中的 PE 颗粒, 然后测定滤液的 OD 值. 为了验证该方法的可靠性, 我们通过提取已知浓度倍比稀释的培养液菌株基因组, 测定吸光值 OD_{260} 以检测其核酸量. 结果表明, 一方面, 核酸量与菌液浓度具有很好的线性关系, 其相关系数 R 值达到了 0.99; 另一方面, 直接滤纸过滤法与菌液浓度相关系数 R 值略低于核酸量测定法, 但与其与菌液浓度同样具有良好线性关系, 其 R 值达到了 0.90. 因此, 直接滤纸过滤法可用于 PE 降解菌在不同发酵条件下生物生长量的快速检测. 此外, SW2 降解 PE 的关键酶如何? 影响因素有哪些? 其降解机制如何? 这些均有待进一步研究.

参考文献:

- [1] 梁兴泉,王继虎.堆肥环境下聚乙烯生物降解特性研究[J].广西大学学报(自然科学版),2003,28(1):69-70,76.
- [2] 任慧勇.我国聚乙烯产业现状及未来发展分析[J].化工新型材料,2020,48(7):47-51.
- [3] 韩秋霞,王庆昭,张萌.改性PE膜的生物可降解性研究[J].塑料工业,2009,37(10):48-51.
- [4] 刘宇飞,徐耀波,袁泽,等.土壤中聚乙烯降解菌的筛选、鉴定及降解特性[J].微生物学报,2020,60(12):2836-2843.
- [5] 钟越,李雨竹,张榕麟,等.一株聚乙烯降解菌的筛选及其降解特性研究[J].生态环境学报,2017,26(4):681-686.
- [6] SUDHAKAR M, DOBLE M, MURTHY P S, et al. Marine Microbe-Mediated Biodegradation of Low-and High-Density Polyethylenes [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 61(3): 203-213.
- [7] MATHUR G, MATHUR A, PRASAD R. Colonization and Degradation of Thermally Oxidized High-Density Polyethylene by *Aspergillus Niger*(ITCC No. 6052) Isolated from Plastic Waste Dumpsite [J]. Bioremediation Journal, 2011, 15(2): 69-76.
- [8] YIN C F, XU Y, ZHOU N Y. Biodegradation of Polyethylene Mulching Films by a Co-Culture of *Acinetobacter* sp. Strain NyZ450 and *Bacillus* sp. Strain NyZ451 Isolated from *Tenebrio Molitor* Larvae [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2020, 155: 105089.
- [9] BALASUBRAMANIAN V, NATARAJAN K, HEMAMBIKA B, et al. High-Density Polyethylene (HDPE)-Degrading Potential Bacteria from Marine Ecosystem of Gulf of Mannar, India [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(2): 205-211.
- [10] 王鱼名,李强文,罗涛,等.昆虫体内聚乙烯降解研究简介[J].云南化工,2021,48(2):6-7,11.
- [11] 罗贝旭.聚乙烯降解菌的筛选、鉴定和降解特性的研究[D].成都:四川师范大学,2013.
- [12] 布坎南 R E,吉本斯 N E.伯杰细菌鉴定手册[M].中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组,译.8版.北京:科学出版社,1984.
- [13] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [14] 杨劫,宋东辉.一株不动杆菌降解石油烃的特性及关键烷烃降解基因分析[J].微生物学通报,2020,47(10):3237-3256.
- [15] 李敏,屈欢,刘建利,等.不动杆菌 K7 对酚酸类化合物的降解效能[J].南京农业大学学报,2019,42(4):689-696.
- [16] 陈春琳,张莉,龙娜娜,等.鲁氏不动杆菌降解高效氯氰菊酯条件的响应面优化[J].成都医学院学报,2020,15(5):557-562.

责任编辑 周仁惠