

· 塑料生物降解资源的发掘 ·

曹慧 博士，南京农业大学教授、博士生导师。主要研究方向为微生物生态学，采用多组学技术、结合单细胞分离和测序，以及同位素标记技术等，重点研究陆地生态系统碳、氮循环微生物多样性与功能。先后担任中国土壤学会土壤生物与生物化学专业委员会副主任和土壤生态学专业委员会副主任。主持和参加国家自然科学基金项目、国家科技支撑计划项目和国家重点研发项目等 30 余项，在国内外期刊发表论文 100 余篇，获得国家发明专利 6 项。



聚乙烯塑料生物降解研究进展

张李婷，张博，许维东，崔中利，曹慧*

南京农业大学生命科学学院 农业农村部农业环境微生物重点实验室，江苏 南京 210095

张李婷，张博，许维东，崔中利，曹慧. 聚乙烯塑料生物降解研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1949-1962.

ZHANG Liting, ZHANG Bo, XU Weidong, CUI Zhongli, CAO Hui. Polyethylene biodegradation: current status and perspectives[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1949-1962.

摘 要：聚乙烯(polyethylene, PE)塑料是全球通用合成树脂中产量最丰富的品种，也是最难降解的塑料之一，其在环境中大量积累已造成严重的生态污染。传统的垃圾填埋、堆肥和焚烧处理技术难以满足生态环境的保护要求，生物降解是解决塑料污染问题的一种生态友好、成本低廉、前景可行的方法。本文对 PE 塑料的化学结构、降解微生物的种类、降解酶和代谢途径等方面进行了综述，结合国内外 PE 塑料生物降解的前沿和热点问题，建议重点开展高效降解菌株筛选、人工合成菌群构建、降解酶的挖掘与改造等方面的研究，为 PE 塑料生物降解研究提供路径选择和理论借鉴。

关键词：聚乙烯塑料；生物降解；降解微生物；酶；降解机制

资助项目：国家重点研发计划(2021YFC2103600)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103600).

*Corresponding author. E-mail: hcao@njau.edu.cn

Received: 2022-11-01; Accepted: 2023-02-20

Polyethylene biodegradation: current status and perspectives

ZHANG Liting, ZHANG Bo, XU Weidong, CUI Zhongli, CAO Hui*

Key Laboratory of Agricultural Environmental Microbiology of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: Polyethylene (PE) is the most abundantly used synthetic resin and one of the most resistant to degradation, and its massive accumulation in the environment has caused serious pollution. Traditional landfill, composting and incineration technologies can hardly meet the requirements of environmental protection. Biodegradation is an eco-friendly, low-cost and promising method to solve the plastic pollution problem. This review summarizes the chemical structure of PE, the species of PE degrading microorganisms, degrading enzymes and metabolic pathways. Future research is suggested to focus on the screening of high-efficiency PE degrading strains, the construction of synthetic microbial consortia, the screening and modification of degrading enzymes, so as to provide selectable pathways and theoretical references for PE biodegradation research.

Keywords: polyethylene; biodegradation; degrading microorganisms; enzymes; degradation mechanisms

聚乙烯(polyethylene, PE)是一种常见的热塑性塑料,因其具有无臭无毒、耐低温性、高延展性、耐腐蚀性、电绝缘性和化学稳定性等特点被广泛使用^[1]。据 Plastics-The Facts 报道^[2],2021 年全球塑料产量达 3.9 亿 t,其中聚乙烯塑料占总产量的 26.9%。聚乙烯聚合过程中涉及多种生产工艺,包括气相法、淤浆法、溶液法和高压法工艺等,不同生产工艺中乙烯单体在不同压力和温度条件进行聚合,由此可分为高压聚乙烯、中压聚乙烯和低压聚乙烯 3 种。高压聚乙烯由于超高分子聚乙烯优异的综合性能,可作为工程塑料使用;中压聚乙烯以注射成型制品及中空制品为主;低压聚乙烯一半以上用于薄膜制品,其次是管材、注射成型制品和电线包裹层等。PE 塑料在潮湿土壤中保存 12–32 年仅显示部分降解和可忽略的质量损失^[3],其难降解的主要原因是 PE 的相对分子质量大、分子链长、链段结晶度高和较强的疏水性,以

及难以与生物接触从而难以进入微生物体内被代谢分解。PE 分子结构单元还存在 C–C 和 C–H 键,需要较高的能量或作用力才可发生分子键断裂,这极大地限制了微生物对 PE 的降解。

目前塑料废弃物的处理方法主要包括填埋、焚烧、机械回收和化学回收^[1]。由于填埋具有可操作性和低成本的优势,是大多数国家特别是发展中国家处理塑料垃圾的主要方式,但堆积的塑料垃圾会占据大量土地资源,同时造成资源浪费;焚烧塑料垃圾可以减少垃圾填埋场的占用并可回收热能,但焚烧过程中产生二次污染物,如二噁英、一氧化碳和氮氧化物等;机械回收广泛应用于热塑性废料的再利用,但大多数回收材料经过多次加工循环后其性能会受到严重影响,大大降低了其商业价值;化学回收方法可以获得高附加值产物,实现废弃塑料的增值化,但该方法对废弃塑料纯度要求高且生产工艺复杂。据报道,全球回收和焚烧

的塑料垃圾只有 9%和 12%，而高达 79%的塑料垃圾被丢弃到垃圾填埋场或自然环境中^[4]，探索高效无污染的塑料同级利用方法迫在眉睫。生物降解废旧聚乙烯塑料的最终产物只有 CO₂ 和 H₂O，是解决塑料污染问题的一种生态友好、成本低廉和前景可行的方法。通过筛选以 PE 为唯一碳源的降解菌株，测定 PE 降解前后物化性质变化来评价降解菌的降解效率，采用质量损失、表面形貌、力学性能、表面官能团和亲水性/疏水性等方式对菌株的降解性能进行表征，并应用稳定同位素标记技术，以便检测 PE 结构的改变和代谢产物的生成。本文概述了 PE 的结构和分类，并对国内外 PE 降解微生物、降解酶和降解机理等方面的研究进展进行了综述，旨在为 PE 塑料的生物降解研究提供借鉴。

1 PE 塑料的结构与分类

PE 塑料是由乙烯单体发生聚合反应生成的烯烃类聚合物^[5]，还包括乙烯与少量 α -烯烃的共聚物，是一种典型的热塑性塑料。PE 基本结构为 $[-CH_2-CH_2-]_n$ ，同石蜡和长链烷烃相似，为最简单的高分子量烷烃。PE 为典型的结晶聚合物，外观呈乳白色，是无臭、无味、无毒的

可燃性白色粉末。


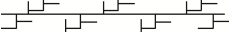

依据聚合方法、分子量和链结构的不同进行分类，PE 主要分为高密度聚乙烯(high density polyethylene, HDPE)、低密度聚乙烯(low density polyethylene, LDPE)和线性低密度聚乙烯(linear low density polyethylene, LLDPE)三种类型，如表 1 所示。HDPE 通常采用 Ziegler-Natta 催化剂在低温低压下合成，分子中支链少，结晶度高，密度大，具有较高的硬度和机械强度；LDPE 采用高压聚合法制造，分子链中存在少量的分支(约 2%的碳原子)，具有较低的密度、结晶度和刚性；LLDPE 是乙烯与少量高级 α -烯烃在催化剂作用下，经高压或低压聚合而成的一种共聚物，与 LDPE 相比具有强度高、韧性好、刚性强、耐热和耐寒等优点，还具有良好的耐环境应力开裂、耐撕裂强度等性能。

2 PE 塑料降解的微生物菌株

目前 PE 塑料相关降解菌株的筛选主要是采用选择性培养基，分离自然环境(土壤、垃圾填埋场、活性污泥和海洋等)中的 PE 塑料降解菌株，或者对分离的降解菌株进行诱变和基因改造。

表 1 PE 分子结构和理化特性

Table 1 Polyethylene molecular structure and physicochemical properties

Type		HDPE	LDPE	LLDPE
Structural features	Molecular structure			
	Number of branches	<5%	1.50%–50%	0.50%–50%
	Density	0.94–0.98 g/cm ³	0.91–94 g/cm ³	0.91–93 g/cm ³
Physical and chemical properties	Physical characteristics	High strength, toughness, rigidity	Poor mechanical strength	High strength, toughness, rigidity
	Chemical properties	Resistant to strong oxidizing agents, acids and alkalis	Resistant to strong oxidizing agents, acids and alkalis	Resistant to acids, alkalis, organic solvents
	Degradation difficulty	Difficult	Harder	Harder

2.1 参与 PE 塑料生物降解的细菌

目前有超过 20 个属的细菌可参与不同类型 PE 塑料的降解过程,其中主要包括假单胞菌(*Pseudomonas*)、罗尔斯通氏菌(*Ralstonia*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)等菌属,这些菌株大部分具有使 PE 表面劣化和(或)在 PE 表面形成生物膜的能力。Harshvardhan 等^[6]从海水中筛选出 60 种可降解 LDPE 的细菌,其中沼泽考克氏菌(*Kocuria palustris*) M16、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*) M27 和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) H1584 能够以 PE 为唯一碳源进行生长;液体孵育 30 d 后,PE 质量损失率分别为 1.00%、1.50%和 1.75%,且其表面疏水性均有不同程度地降低;同时证实微生物在 PE 表面的生长活力,通过傅里叶转换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)数据解析进一步证实了 PE 的生物降解。Skariyachan 等^[7]从污水处理厂和垃圾填埋场筛选出可降解 LDPE 和 HDPE 的短芽孢杆菌(*Brevibacillus* sp.)和解硫胺素芽孢杆菌(*Aneurinibacillus* sp.),将其混合培养 140 d, LDPE 和 HDPE 质量损失率分别为 58.21%和 46.6%;该研究发现这种新型嗜热菌群能够大规模培养,可作为 PE 降解的潜在微生物资源。Delacuvellerie 等^[8]从海水中收集了 LDPE 塑料,以其作为唯一碳源进行富集培养,并对富集菌群进行分析,发现含 LDPE 的富集液中烃类降解细菌食烷菌属(*Alcanivorax*)、海杆菌属(*Marinobacter*)和栖砂杆菌属(*Arenibacter*)的丰度明显增加,暗示这些菌属是塑料降解的潜在参与者;通过扫描电镜观察到泊库岛食烷菌

(*A. Borkumensis*)能够在 LDPE 上特异性形成网格状生物膜来降解石油基塑料,培养 80 d 后 LDPE 质量损失率为 3.5%。中国科学院海洋研究所孙超岷团队的最新研究成果,首次发现能有效降解聚对苯二甲酸乙二醇酯[poly(ethylene terephthalate), PET]和 PE 两种塑料的海洋微生物菌群和降解酶^[9]。通过对菌群组成和丰度进行定量分析,发现有 5 类细菌为优势菌群,进一步成功分离这 5 类细菌的纯培养菌株,其中微小杆菌(*Exiguobacterium* sp.)、盐单胞菌(*Halomonas* sp.)、苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.) 3 株细菌均具有明显降解 PET 和 PE 塑料的能力;以 1:1:1 比例构建细菌群落处理 PET 和 PE 薄膜 28 d,通过 X 射线衍射分析, PET 薄膜的相对结晶度从 92.55%下降到 89.85%, PE 薄膜的相对结晶度从 49.10%下降到 29.50% (表 2)。

2.2 参与 PE 塑料生物降解的真菌

参与降解 PE 的真菌以曲霉菌属(*Aspergillus*)、青霉菌属(*Penicillium*)和根霉菌属(*Rhizopus*)菌属为主,降解的塑料类型主要是 LDPE (表 3)。Awasthi 等^[23]分离获得可降解 LDPE 的菌株米根霉(*R. oryzae*) NS5,摇床培养 30 d 后,通过 FTIR、扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)和万能拉伸试验机对 LDPE 薄膜在孵育前后进行了表征,结果表明 LDPE 薄膜表面物理化学结构产生了明显变化,且薄膜表面有菌丝渗透和降解。Ojha 等^[24]通过以 LDPE 和 HDPE 为唯一碳源,从塑料倾倒地收集的土壤样品中分离出 10 株真菌菌株,筛选获得可降解 PE 的两株真菌草酸青霉菌(*P. oxalicum*) NS4 和产黄青霉菌(*P. chrysogenum*) NS10,培养 30、60 和 90 d 后, *P. oxalicum* NS4 对 HDPE 降解率分别为 24.18%、43.73%和 55.34%,而相同时段对 LDPE 降解率为 16.72%、

表 2 近 5 年报道的与 PE 生物降解相关的细菌菌株

Table 2 Bacterial strains involved in biodegradation of PE reported in the last five years

Source	Strains	Degradation time (d)	Temperature/PE type	Degradation effect	References
Ocean	<i>Exiguobacterium</i> sp., <i>Halomonas</i> sp., <i>Ochrobactrum</i> sp.	14	26 °C, PE film	Crystallinity decreased from 49.10% to 29.50%	[9]
	<i>Marinobacter</i> sp. (KF021894, KF021896), <i>Bacillus subtilis</i> (KF021898)	90	30 °C, LDPE film	Weight loss rates were 1.46%, 1.68%, 1.54%	[10]
	<i>Aneurinibacillus</i> sp. (mixed flora)	140	50 °C, LDPE film	Weight loss rate was 58.21%	[7]
Soil	<i>Enterobacter cloacae</i> AKS7	45	30 °C, LDPE film	Weight loss rate was 9%	[11]
	<i>Lysinibacillus</i> sp. JJY0216	26	30 °C, PE film	Weight loss rate was 7.50%	[12]
	<i>Pseudomonas knackmussii</i> N1-2,	56	28 °C, PE film	Weight loss rate were 5.95%, 3.62%	[13]
Sewage treatment site	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RD1-3				
Landfill	<i>Ralstonia</i> sp. strain SKM2 (MN33476.1), <i>Bacillus</i> sp. strain SM1 (MN33475.1)	180	30 °C, LDPE film	Weight loss rates were 39.20% and 18.90%	[14]
	<i>Bacillus tropicus</i> (MK318648)	40	37 °C, LDPE film	Weight loss rate was 10.15%	[15]
	<i>Pseudomonas</i> sp. MMP1,	42	37 °C, LDPE film	Weight loss rate was 3.75%	[16]
	<i>Acinetobacter</i> sp. MGP1, <i>Bacillus</i> sp. MMP10, <i>Bacillus</i> sp. MGP1				
	<i>Paenibacillus</i> sp. (mixed flora)	60	30 °C, PE pellets	Weight loss rate was 14.70%	[17]

表 3 近 5 年报道的与 PE 生物降解相关的真菌菌株

Table 3 Fungal strains involved in biodegradation of PE reported in the last five years

Source	Strains	Degradation time (d)	Temperature/PE type	Degradation effect	References
Ocean	<i>Alternaria alternata</i> FB1 (PRJNA672824)	120	25 °C, PE film	Crystallinity decreased from 62.79% to 52.02%	[18]
Soil	<i>Trichoderma viride</i> RH03	45	24–28 °C, LDPE film	Weight loss rate was 5.13%	[19]
Sewage treatment site	<i>Aspergillus flavus</i> ,	60	25 °C, LDPE film	Weight loss rates were 17%, 19%, and 13%	[20]
	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Fusarium solani</i>				
	<i>Aspergillus oryzae</i> strain A5,1 (MG779508)	112	28 °C, LDPE film	Weight loss rate was 36.40%	[21]
	<i>Aspergillus carbonarius</i> MH 856457.1, <i>A. fumigatus</i> MF 276893	112	30 °C, LDPE film	Weight loss rate was 39.10% (heat treatment)	[22]

26.70%和 36.60%; *P. chrysogenum* NS10 培养 30、60 和 90 d 后, 对 HDPE 的降解率分别为 17.06%、48.00%和 58.60%, 而对 LDPE 降解率为 19.32%、33.33%和 34.35%。Paço 等^[25]从海洋中分离一株可高效降解 LDPE 的沿海涛旋孢

菌(*Zalerion maritimum*), 培养 14 d 后 PE 质量损失率为 56.7%。近期, 中国科学院海洋研究所孙超岷团队分离到一株在 PE 薄膜上具有显著定殖能力的链格孢菌(*Alternaria ternate*) FB1^[18], 通过 X 射线衍射仪分析发现, 菌株 FB1

处理 28 d 后的 PE 薄膜的相对结晶度从 62.79% 下降到 52.02%; 利用 GC-MS 鉴定出一种四碳产物(二甘醇胺), 其占有降解产物的 93.28%。

2.3 参与 PE 塑料生物降解的肠道微生物

一些昆虫能够咀嚼和食用塑料外包装或蜡, 并将它们作为唯一的碳源, 这为 PE 降解提供多样性的后备微生物资源^[26]。Kannan 等^[26]从印度谷螟(*Plodia interpunctella*)幼虫体内成功分离出的两种 PE 降解菌 *Bacillus* sp. YP1 和阿氏肠杆菌(*Enterobacter asburiae*) YT1, 能够在 60 d 内分别降解约 6.10% 和 10.70% 的 PE 薄膜; Bombelli 等^[27]发现 100 只大蜡螟(*Galleria mellonella*)幼虫在 12 h 内可导致 PE 塑料袋的质量损失率达 13%。最近, Ali 等^[28]在小蜡螟(*Achroia grisella*)幼虫肠道分离两株 LDPE 降解菌株费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*) LDPE-DB1 和 *Bacillus* sp. LDPE-DB2, 孵育 30 d 后, LDPE 薄膜拉伸强度分别降低 51.30% 和 58.30%。这些结果表明昆虫肠道微生物富含 PE 降解微生物, 是分离 PE 降解菌的良好场所。

3 PE 塑料降解功能基因

通过基因组、转录组和蛋白质组等生物信息学技术, 对微生物进行基因组成分分析和基因功能注释, 挖掘参与 PE 降解过程中的功能基因, 能够从分子水平解析 PE 的生物降解途径。Yoon 等^[29]克隆 *Pseudomonas* sp. E4 的烷烃羟化酶基因(*alkB*)在大肠杆菌 BL21 中表达, 37 °C 孵育 80 d, 能够将约 20% 的低分子量 PE 样品转化为 CO₂, 验证了 *alkB* 基因对 PE 具有降解活性。Zampolli 等^[30]通过测定以 PE 为唯一碳源的培养基上清液的酶活性和生物信息学分析, 证实了编码漆酶样多铜氧化酶基因的激活。Gao 等^[9]通过基因表达分析同样发现了多种漆酶和过氧化物酶基因表达的显著上调。此外, Kong 等^[31]对

食用蜂蜡(类似于 PE 结构)的蜡螟进行转录组分析, 发现编码催化长链烃 C-H 键羟基化的细胞色素 P450 酶, 羧酸酯酶、脂肪酶和与脂肪酸代谢相关的酶基因上调, 这些酶基因可能与 PE 降解有关。上述研究中的烷烃羟化酶、漆酶、过氧化物酶等相关基因的作用表明 PE 生物降解的过程可能存在定殖、解聚、同化和矿化这 4 个步骤。

除了上述提到 PE 降解相关的基因外, Sanluis-Verdes 等^[32]报道的蜡虫唾液来源的 PE 降解酶似乎有着不同的降解方式, 对已发表的 2 种来源蜡虫唾液的 PE 降解酶 Demetra (XP_026756396.1) 和 Ceres (XP_026756459.1) 进行结构分析, 发现 2 种 PE 降解酶均有相同的 3 个血蓝蛋白(hemocyanin)结构域: 血蓝蛋白 M 超家族(hemocyanin M superfamily)、血蓝蛋白 C 超家族(hemocyanin C superfamily)和血蓝蛋白 N 超家族(hemocyanin N superfamily) (图 1)。通常来说血蓝蛋白 M、C、N 会组成一个功能单元, 该功能单元的 C 端具有铜还原蛋白结构域, 该结构域具有氧结合作用^[33]。因此推测该蛋白 C 端的铜还原蛋白结构域提供了富氧环境, 富氧环境会加速 PE 的降解速率。

PE 塑料降解关键酶的鉴定相对于其他塑料仍很匮乏, 功能基因研究鲜有报道, 在一定程度上限制了微生物降解 PE 塑料的研究。因此, 后续研究过程中应注重相关降解关键酶的功能研究与降解机制的解析, 进一步丰富和完善 PE 塑料降解功能基因的数据库。

4 参与 PE 降解的微生物酶

微生物通过分泌胞外酶提高 PE 表面的亲水性, 促进 PE 的氧化或水解, 在塑料生物降解过程中发挥着至关重要的作用, 目前已报道的具有 PE 降解效果的降解酶如表 4 所示。

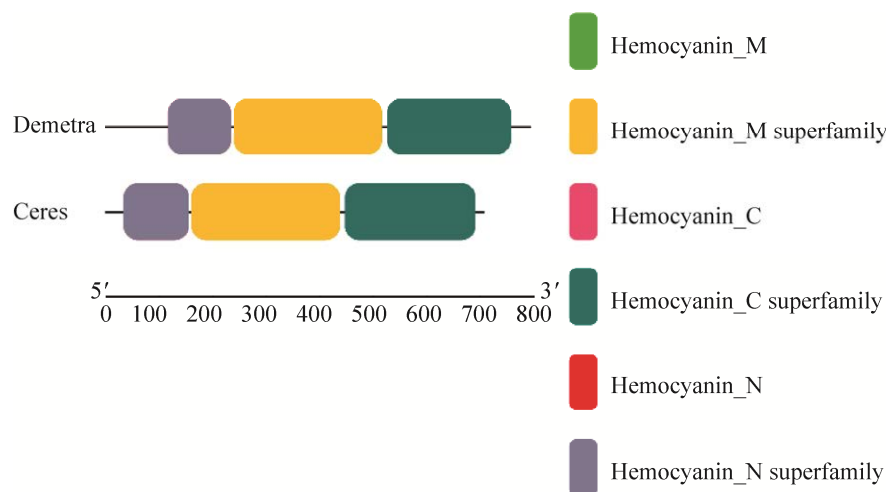


图 1 两种蜡虫唾液来源PE降解酶的结构分析
Figure 1 Structural analysis of two waxworm saliva-derived PE degrading enzymes.

表 4 PE降解酶

Table 4 PE degrading enzymes

Enzymes	Prosthetic group	Substrate	Optimal temperature (°C)	Optimal pH	Main enzyme-producing microorganisms	References
Laccase	O ₂ as electron acceptor	LDPE	70	7.0	<i>Rhodococcus ruber</i> C208	[34]
Manganese peroxidase	Hemoglobin	Decane	30	5.0	<i>Penicillium</i> sp. CHY-2	[35]
Dioxygenase	FAD	13-44 carbon n-alkanes	30	7.5	<i>Acinetobacter</i> sp. strain M-1	[36]
Monooxygenase	NADPH	n-alkanes	37	7.0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> E7	[37]
Peroxidase	Iron porphyrin	PE	30	4.6	<i>Trichoderma harzianum</i>	[38]

已经证明能够降解含有可氧化 C—C 键的木质素聚合物的微生物酶可参与 PE 的生物降解，其中包括木质素过氧化物酶(LiP，EC 1.11.1.14)、锰过氧化物酶(MnP，EC 1.11.1.13)和漆酶(Lac，EC 1.10.3.2.)^[39]。Pometto 等^[40]将降解木质纤维素的链霉菌属富集液与 PE 塑料薄膜振荡孵育 21 d，通过傅里叶变换红外光谱、机械性能和 PE 分子量的变化证明了 LiP 活性是造成 PE 降解的主要原因，这是首份参与 PE 降解的胞外酶活性报告。Iiyoshi 等^[41]发现木质素降解真菌黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)分泌的 MnP 可以降低 PE 薄膜的

拉伸强度和平均分子量，且在 Tween 80、Mn(II)和 Mn(III)螯合剂存在下，部分纯化的 MnP 导致 PE 膜的显著降解。Lac 不仅能够催化各种多芳香族化合物的氧化，也能作用于非芳香族底物^[42]。据报道，来自红球菌(*R. ruber*) (C208)的铜依赖性漆酶可以降解经紫外线预处理的 PE 薄膜，Lac 介导 PE 膜氧化裂解，使得中间产物中羰基生成量增加以及 PE 薄膜质量损失率达 75%^[34]。虽然研究已经证实过氧化物酶和漆酶能够催化 PE 的降解，但它们在 PE 微生物降解过程中的催化机制仍不清楚。

烷烃羟化酶 AlkB 家族是 β -氧化途径中参

与 PE 降解的最重要的酶,可以通过末端或亚末端氧化途径降解烃类低聚物^[43]。Yoon 等^[29]的研究表明,在 *Pseudomonas* sp. E4 中重组表达的烷烃羟化酶 37 °C 孵育 80 d,能够将约 20% 的低分子量 PE 样品转化为 CO₂。Jeon 等^[37]从滩涂土壤分离到可以高效降解 PE 的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) E7,通过 PCR 和序列分析,检测到编码完整的烷烃化酶系统的蛋白质基因 *alkB*、*rubA1*、*rubA2* 和 *rubB*,它们分别编码烷烃羟化酶、红素氧还蛋白和红素氧还蛋白还原酶。烷烃羟化酶 AlkB 在烷烃降解的第一步中起作用,并参与电子传递红素氧还蛋白和红素氧还蛋白还原酶系统^[44],是烷烃羟化酶家族中最重要的关键酶。这些结果表明,烷烃羟化酶 AlkB 可能是 PE 降解的有效候选酶^[37]。

细胞色素 P450 酶(cytochrome P450, P450)是一类亚铁血红素-硫醇盐蛋白的超家族,可识别多种底物并催化多种反应,例如 C-H 键羟基化、C=C 双键氧化和 C-C 键裂解等反应,是一种潜在的 PE 降解羟化酶。对以 PE 为唯一碳源生长的浑浊红球菌(*R. opacus*) R7 菌进行反转录分析显示,R7 P450 羟化酶的氨基酸序列与催化碳氢化合物甲基支链末端羟基化的 CYP124 具有 32% 的同一性,推测 R7 P450 酶可能参与 PE 链的氧化^[30]。Pinto 等^[45]对以 LDPE 为唯一的碳源的生物膜群落进行宏基因组分析表明,随着时间的推移,编码细胞色素 P450 酶的基因显著增加。此外,Yeom 等^[46]研究认为 P450 酶比烷烃羟化酶 AlkB 更易进行酶工程改造,更适用于构建降解 PE 的合成细菌。

随着对 PE 降解回收的深入研究,微生物酶降解法显示出良好的应用前景,但这些酶的降解效率仍有待提高。现阶段,定向设计和改造解聚酶元件是提高酶结合能力和稳定性的有效手段,这为提高酶降解 PE 效率提供了可靠的思

路和方法。应用蛋白质工程技术来提高塑料降解酶的催化性能是目前热门的研究方向之一,主要包括提高酶的热稳定性,增强底物与酶活性位点的结合,强化底物和酶表面之间的相互作用以提高催化能力。由于对酶结构-功能关系的了解有限,目前对蛋白质进行合理设计大多是经验性的,存在不确定性。但随着人们对酶结构-功能关系的认识不断加深,以及计算机辅助建模和模拟技术的不断发展,将极大地推动塑料降解酶工程的快速发展。

5 PE 塑料的生物降解途径

虽然已有证据表明微生物可降解 PE 塑料,但对该降解机制仍缺乏全面系统的了解。由于 PE 的主要分子结构与烷烃相似,因此基于烷烃的生物降解机理及有关降解酶参与 PE 生物降解过程的报道,提出 PE 塑料的生物降解途径(图 2)^[39,46,49]。

PE 塑料的生物降解过程可分为 4 个阶段:定殖、解聚、同化和矿化。在定殖阶段,微生物在 PE 塑料表面附着形成生物膜,通过分泌多糖、蛋白等多聚物,降低塑料表面疏水性,促进微生物分泌的胞外酶与 PE 塑料表面的分子链的相互作用^[50]。然后,微生物通过一系列氧化酶的催化,自由基与 PE 塑料结合,促成聚合物长链的断链,转化为具有 10-50 个碳的含氧低聚物^[51-52]。这些酶主要包括细胞色素 P450 酶、烷烃羟化酶 AlkB、漆酶和过氧化物酶等氧化酶^[49]。其中,细胞色素 P450 酶通过末端、亚末端和链内羟基化 PE^[46]。烷烃羟化酶 AlkB 可以通过末端或亚末端氧化途径降解 PE,生成 1-烷醇或 2-烷醇^[37,43]。漆酶和过氧化物酶可以通过末端氧化途径降解 PE,漆酶通过将电子从底物 PE 转移到分子氧来催化 PE 的氧化,而过氧化物酶以 H₂O₂ 为电子受体催化底物 PE 氧化,

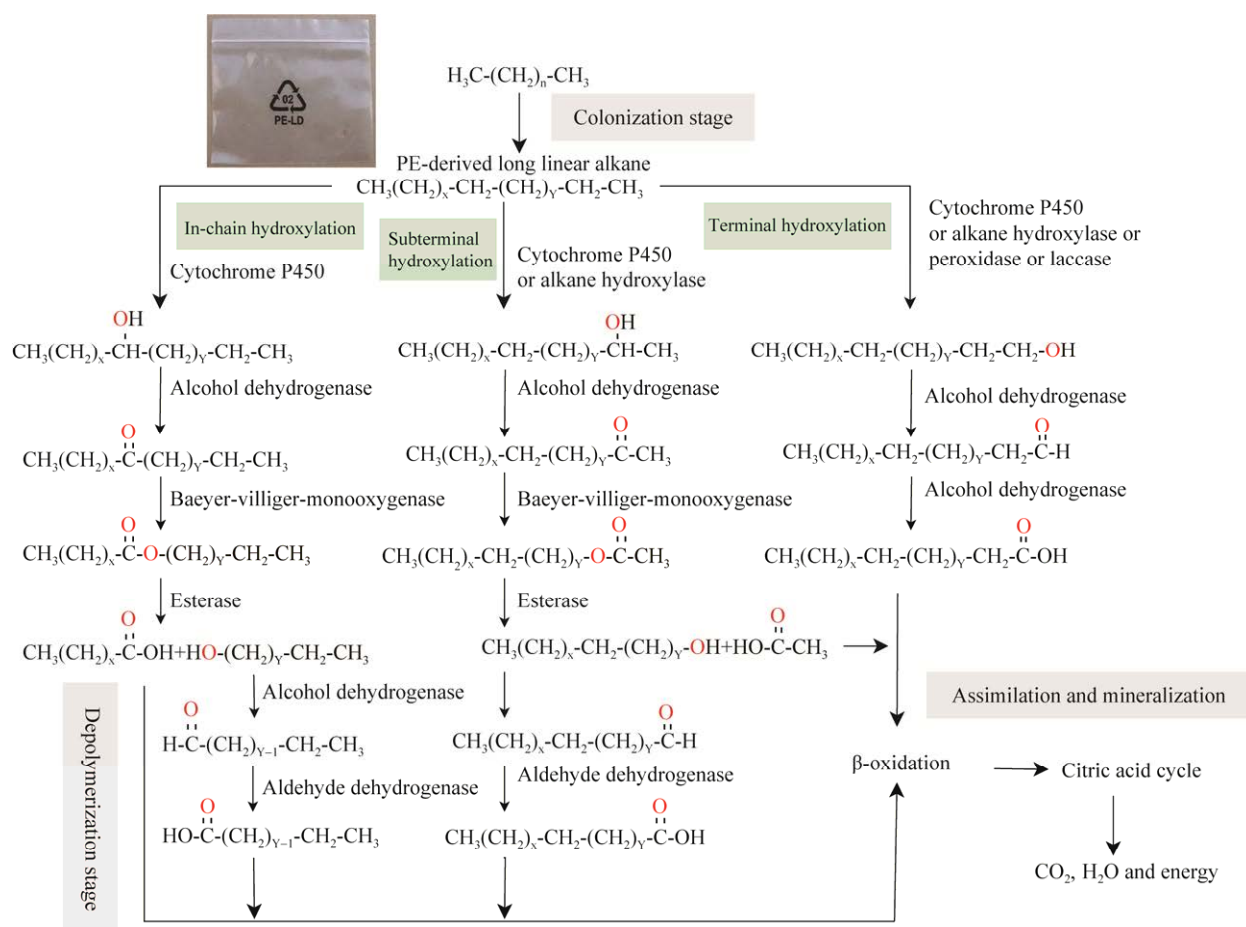


图2 聚乙烯生物联合降解的途径和机理^[18,46-48]

Figure 2 The pathways and mechanism of biotic combine degradation of polyethylene^[18,46-48].

引发PE长链的断链,并引入含氧官能团^[24,52-53]。含氧低聚物再进一步被醇脱氢酶、醛脱氢酶、单加氧酶和酯酶作用,形成的脂肪酸进入微生物体内通过 β -氧化途径和三羧酸循环分解为 CO_2 、 H_2O 与能量物质^[54]。

6 PE塑料人工降解菌设计与构建

随着对代谢工程和合成生物学领域探索的不断深入,人工构建微生物工程菌在提高微生物降解性能具有独特的优势,利用基因编辑、蛋白质工程、基因工程等技术提升PE降解酶的催

化性能,构建降解PE塑料的工程菌,是生物修复PE塑料污染环境的发展方向^[55]。Chen等^[56]应用基因编辑技术对降解塑料的关键PETase酶进行了定点改造,成功提高了这种酶分解塑料的效率和热稳定性。基于转录因子TF的生物传感器具有高灵敏度和配体特异性,是目前蛋白质工程筛选新型酶或进化酶的新策略。Liang等^[57]在研究迪茨氏菌(*Dietzia* sp.) DQ12-45-1b菌株烷烃羟化酶-红素氧还蛋白融合基因 $alkW1$ 的转录调控中,利用生物传感器监测PE单体的产生并转化成可量化的信号比如荧光强度。这种利用生物传感器的高通量筛选将加快寻找新

型羟化酶(如 P450 或 AlkB)或改进现有羟化酶的速度,以提高酶在 PE 生物降解中的活性和稳定性,最终达到解决塑料污染的目的。王玉琪^[58]通过分子生物学方法将编码生物表面活性剂鼠李糖脂 *rhLAB* 基因插入到具有降解烷烃能力的贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) Fast30 的染色体上,使其对原油的降解效率显著提高了 32.05%。谢云^[59]采用三亲结合法将目的基因 *C23O* 从恶臭假单胞菌(*P. putida*) BNF1 的质粒 DNA 中转移至宿主菌不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) BS3 的染色体中,成功构建了具有较高的遗传稳定性的基因工程菌 BS3-C23O。与原始菌株相比,重组菌 BS3-C23O 对烷烃和芳香烃均具有更好降解性能和更为广泛的底物特异性。

目前筛选到的微生物能够分泌降解 PE 塑料的降解酶,但其酶产量低且在自然环境中对 PE 塑料的降解受诸多环境条件的限制,难以达到高效降解的要求。通过基因编辑、蛋白质工程、基因工程等合成微生物学技术在构建 PE 塑料人工降解菌,提高酶的产量、催化活性和稳定性,并进行工业化生产,以帮助减少塑料污染并改善环境具有重要意义。

7 结论与展望

PE 塑料是典型的人工合成或人工优化过的高分子化合物,由于其极高的疏水性和化学稳定性,生物降解十分困难,同级回收利用技术也不够成熟,因而塑料生物降解成为国内外研究的热点和难点。迄今为止,虽然已报道了诸多能够降解 PE 的微生物菌株,但降解效率总体不高;在筛选对 PE 具有不同程度降解效果的微生物时,现有的筛选方法往往通过将 PE 作为选择培养基中的唯一碳源,忽视了那些在降解 PE 过程中起协同作用的微生物。目前,塑料生物降解已成为全球瞩目的研究热点,PE 生物降

解研究仍存在诸多亟待解决的关键科学问题,为此特别要注意开展以下方面的研究。

(1) 建立 PE 降解微生物高通量筛选技术。传统 PE 降解微生物的筛选方法不仅通量低、耗时长,还无法有效获得关键降解微生物,因此有必要建立 PE 降解微生物高通量筛选技术。为规避传统分选方法的劣势,现已研发出新型微生物分选技术,如基于光学镊子结合拉曼光谱的细胞分选技术、荧光活化细胞分选技术和基于激光诱导向前转移技术的细胞分选技术等。这些技术可从复杂样本中识别并分离单个目标微生物细胞,PE 降解菌的筛选可借助这些技术从而获得更多的目标降解微生物,既提高成功率,又减少了时间和人力成本。

(2) 集成现代分子生物学技术挖掘 PE 降解酶或基因。当前已发现 4 种 PE 降解酶,其中烷烃单加氧酶通过末端或亚末端氧化降解烃类低聚物,是 β -氧化途径中参与 PE 降解的关键酶。虽然有文章报道部分酶(如 AlkB、漆酶、锰过氧化物酶)参与塑料的生物降解过程,但其塑料降解效率仍有待提高。因此,从塑料降解微生物中挖掘更多的 PE 降解酶和提高酶的降解效率的工作亟待加强。通过多组学挖掘关键代谢产物及降解相关基因,借助基因工程手段对关键降解酶进行克隆、表达、基因敲除与功能验证,以及降解机制解析。

(3) 解析和重构 PE 降解酶提高催化效率。目前已报道的 PE 降解酶仍较少,研究者缺少对 PE 降解酶结构与功能的相关认知,这为酶的工业应用带来困难。随着计算机和人工智能的发展,研究者可利用计算机技术对酶结构进行预测和解析。自然界存在的降解酶往往具有稳定性差、活性和表达量低等现象,可通过定向诱变筛选突变体等蛋白质工程方法来重构 PE 降解酶,从而增强酶活性、特异性和稳定性等,

提高 PE 降解酶的催化效率。

(4) 耦合 PE 降解酶开展级联催化途径研究。虽然许多生物催化步骤可通过单酶催化完成,但催化过程可能会受到中间代谢产物的反馈抑制,为解除这种抑制作用,往往需要多酶协同催化才能实现,耦合 PE 降解酶开展多酶生物催化级联反应研究对解析 PE 的代谢途径有重要意义。PE 代谢途径的解析可深化对 PE 降解过程的理解,提高 PE 塑料的降解效率,有利于资源回收及高值化再利用,大幅减少中间代谢产物的产生,降低环境污染风险。

(5) 构建稳定共生的合成微生物群落。协同互补的微生物群落的人工组合在降解 PE 过程中有良好的效果。事实上,使用单一细菌菌株对环境污染物进行生物降解和生物修复的效率仍然非常有限^[60]。由于微生物协同效应互作强化了生物系统中物质转化与能量流动关系,混合菌群具有更高的降解效率。相比之下,关于微生物群落的塑料降解潜力的研究很少,特别是具有高效 PE 降解功能的微生物组合培养研究。未来可借助多菌种联合、环境宏基因组和共现网络分析等方式发掘在 PE 降解过程中起着重要协同作用微生物,从而提高微生物降解 PE 的效率,以及深化对 PE 微生物降解机制的理解。

REFERENCES

- [1] 王佳蕾, 霍毅欣, 杨宇. 聚乙烯塑料的微生物降解[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3329-3341.
WANG JL, HUO YX, YANG Y. Microbial degradation of polyethylene[J]. Microbiology China, 2020, 47(10): 3329-3341 (in Chinese).
- [2] EUROPE P. Plastics-the Facts 2022 an analysis of European plastics production, demand and waste data[R]. Brussels-Belgium, 2022.
- [3] AKHIR MAM, MUSTAPHA M. Formulation of biodegradable plastic mulch film for agriculture crop protection: a review[J]. Polymer Reviews, 2022, 62(4): 890-918.
- [4] GEYER R, JAMBECK JR, LAW KL. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. Science Advances, 2017, 3(7): e1700782.
- [5] KALE SK, DESHMUKH AG, DUDHARE MS, PATIL VB. Microbial degradation of plastic: a review[J]. Journal of Biochemical Technology, 2015, 6: 952-961.
- [6] HARSHVARDHAN K, JHA B. Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India[J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 77(1/2): 100-106.
- [7] SKARIYACHAN S, PATIL AA, SHANKAR A, MANJUNATH M, BACHAPPANAVAR N, KIRAN S. Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants[J]. Polymer Degradation and Stability, 2018, 149: 52-68.
- [8] DELACUVELLERIE A, CYRIAQUE V, GOBERT S, BENALI S, WATTIEZ R. The plastisphere in marine ecosystem hosts potential specific microbial degraders including *Alcanivorax borkumensis* as a key player for the low-density polyethylene degradation[J]. Journal of Hazardous Materials, 2019, 380: 120899.
- [9] GAO RR, SUN CM. A marine bacterial community capable of degrading poly(ethylene terephthalate) and polyethylene[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 416: 125928.
- [10] KHANDARE SD, AGRAWAL D, MEHRU N, CHAUDHARY DR. Marine bacterial based enzymatic degradation of low-density polyethylene (LDPE) plastic[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2022, 10(3): 107437.
- [11] SARKER RK, CHAKRABORTY P, PAUL P, CHATTERJEE A, TRIBEDI P. Degradation of low-density poly ethylene (LDPE) by *Enterobacter cloacae* AKS7: a potential step towards sustainable environmental remediation[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(8): 2117-2125.
- [12] JEON JM, PARK SJ, CHOI TR, PARK JH, YANG YH, YOON JJ. Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JJY0216 isolated from soil grove[J]. Polymer Degradation and Stability, 2021, 191: 109662.
- [13] HOU L, XI J, LIU J, WANG P, XU T, LIU T, QU W, LIN YB. Biodegradability of polyethylene mulching

- film by two *Pseudomonas* bacteria and their potential degradation mechanism[J]. *Chemosphere*, 2022, 286: 131758.
- [14] BIKI SP, MAHMUD S, AKHTER S, RAHMAN MJ, RIX JJ, AL BACHCHU MA, AHMED M. Polyethylene degradation by *Ralstonia* sp. strain SKM2 and *Bacillus* sp. strain SM1 isolated from land fill soil site[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 22: 101495.
- [15] SAMANTA S, DATTA D, HALDER G. Biodegradation efficacy of soil inherent novel sp. *Bacillus tropicus* (MK318648) onto low density polyethylene matrix[J]. *Journal of Polymer Research*, 2020, 27(10): 1-16.
- [16] KUNLERE IO, FAGADE OE, NWADIKE BI. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by certain indigenous bacteria and fungi[J]. *International Journal of Environmental Studies*, 2019, 76(3): 428-440.
- [17] PARK SY, KIM CG. Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site[J]. *Chemosphere*, 2019, 222: 527-533.
- [18] GAO RR, LIU R, SUN CM. A marine fungus *Alternaria alternata* FB1 efficiently degrades polyethylene[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 431: 128617.
- [19] MUNIR E, HAREFA R, PRIYANI N, SURYANTO D. Plastic degrading fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* isolated from local landfill soil in Medan[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2018, 126: 012145.
- [20] DAS MP, KUMAR S, DAS J. Fungal-mediated deterioration and biodegradation study of low-density polyethylene (LDPE) isolated from municipal dump yard in Chennai, India[J]. *Energy, Ecology and Environment*, 2018, 3(4): 229-236.
- [21] MUHONJA CN, MAKONDE H, MAGOMA G, IMBUGA M. Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0198446.
- [22] EL-SAYED MT, RABIE GH, HAMED EA. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) using the mixed culture of *Aspergillus carbonarius* and *A. fumigatus*[J]. *Environment, Development and Sustainability*, 2021, 23(10): 14556-14584.
- [23] AWASTHI S, SRIVASTAVA N, SINGH T, TIWARY D, MISHRA PK. Biodegradation of thermally treated low density polyethylene by fungus *Rhizopus oryzae* NS 5[J]. *3 Biotech*, 2017, 7(1): 1-8.
- [24] OJHA N, PRADHAN N, SINGH S, BARLA A, SHRIVASTAVA A, KHATUA P, RAI V, BOSE S. Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 39515.
- [25] PAÇO A, DUARTE K, DA COSTA JP, SANTOS PSM, PEREIRA R, PEREIRA ME, FREITAS AC, DUARTE AC, ROCHA-SANTOS TAP. Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 586: 10-15.
- [26] KANNAN M, MUBARAKALI D, THIYONILA B, KRISHNAN M, PADMANABAN B, SHANTKRITI S. Insect gut as a bioresource for potential enzymes-an unexploited area for industrial biotechnology[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019, 18: 101010.
- [27] BOMBELLI P, HOWE CJ, BERTOCCHINI F. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*[J]. *Current Biology*, 2017, 27(8): R292-R293.
- [28] ALI SS, ELSAMAHY T, ZHU D, SUN J. Biodegradability of polyethylene by efficient bacteria from the guts of plastic-eating waxworms and investigation of its degradation mechanism[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 443: 130287.
- [29] YOON MG, JEON HJ, KIM MN. Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and AlkB cloned recombinant cell[J]. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 2012, 3(4): 1-8.
- [30] ZAMPOLLI J, ORRO A, MANCONI A, AMI D, NATALELLO A, DI GENNARO P. Transcriptomic analysis of *Rhodococcus opacus* R7 grown on polyethylene by RNA-seq[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 21311.
- [31] KONG HG, KIM HH, CHUNG JH, JUN J, LEE S, KIM HM, JEON S, PARK SG, BHAK J, RYU CM. The *Galleria mellonella* hologenome supports microbiota-independent metabolism of long-chain hydrocarbon beeswax[J]. *Cell Reports*, 2019, 26(9): 2451-2464.e5.
- [32] SANLUIS-VERDES A, COLOMER-VIDAL P, RODRIGUEZ-VENTURA F, BELLO-VILLARINO M, SPINOLA-AMILIBIA M, RUIZ-LOPEZ E, ILLANES-VICIOSO R, CASTROVIEJO P, CIGLIANO RA, MONTOYA M. Wax worm saliva and the enzymes

- therein are the key to polyethylene degradation by *Galleria mellonella*[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5568.
- [33] KATO S, MATSUI T, GATSOGIANNIS C, TANAKA Y. Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology[J]. *Biophysical Reviews*, 2018, 10(2): 191-202.
- [34] SANTO M, WEITSMAN R, SIVAN A. The role of the copper-binding enzyme-laccase-in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 84: 204-210.
- [35] GOVARTHANAN M, FUZISAWA S, HOSOGAI T, CHANG YC. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons using the filamentous fungus *Penicillium* sp. CHY-2 and characterization of its manganese peroxidase activity[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(34): 20716-20723.
- [36] MAENG JH, SAKAI Y, TANI Y, KATO N. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(13): 3695-3700.
- [37] JEON HJ, KIM MN. Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 103: 141-146.
- [38] SOWMYA H, KRISHNAPPA M, THIPPESWAMY B. Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR, and NMR analyses[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2014, 186(10): 6577-6586.
- [39] WEI R, ZIMMERMANN W. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?[J]. *Microbial Biotechnology*, 2017, 10(6): 1308-1322.
- [40] POMETTO AL, LEE B, JOHNSON KE. Production of an extracellular polyethylene-degrading enzyme(s) by *Streptomyces* species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(2): 731-733.
- [41] IYOSHI Y, TSUTSUMI Y, NISHIDA T. Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase[J]. *Journal of Wood Science*, 1998, 44(3): 222-229.
- [42] MAYER AM, STAPLES RC. Laccase: new functions for an old enzyme[J]. *Phytochemistry*, 2002, 60(6): 551-565.
- [43] ROJO F. Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes[M]//Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 781-797.
- [44] LIU C, WANG W, WU Y, ZHOU Z, LAI Q, SHAO Z. Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(5): 1168-1178.
- [45] PINTO M, ZHAO Z, KLUN K, LIBOWITZKY E, HERNDL GJ. Microbial consortiums of putative degraders of low-density polyethylene-associated compounds in the ocean[J]. *mSystems*, 2022, 7(2): e01415-21.
- [46] YEOM SJ, LE TK, YUN CH. P450-driven plastic-degrading synthetic bacteria[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(2): 166-179.
- [47] SANTACRUZ-JUÁREZ E, BUENDIA-CORONA RE, RAMÍREZ RE, SÁNCHEZ C. Fungal enzymes for the degradation of polyethylene: molecular docking simulation and biodegradation pathway proposal[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 411: 125118.
- [48] ZHANG Y, PEDERSEN JN, ESER BE, GUO Z. Biodegradation of polyethylene and polystyrene: from microbial deterioration to enzyme discovery[J]. *Biotechnology Advances*, 2022, 60: 107991.
- [49] CAPPELLETTI M, FEDI S, ZANNONI D. Degradation of Alkanes in *Rhodococcus*[M]//Biology of Rhodococcus. Cham: Springer International Publishing, 2019: 137-171.
- [50] RESTREPO-FLÓREZ J-M, BASSI A, THOMPSON MR. Microbial degradation and deterioration of polyethylene—a review[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 88: 83-90.
- [51] WU H, LIU Q, SUN W, LU Y, QI Y, ZHANG H. Biodegradability of polyethylene mulch film by *Bacillus paramycoides*[J]. *Chemosphere*, 2023, 311: 136978.
- [52] ROY R, MUKHERJEE G, DAS GUPTA A, TRIBEDI P, SIL AK. Isolation of a soil bacterium for remediation of polyurethane and low-density polyethylene: a promising tool towards sustainable cleanup of the environment[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(1): 1-14.
- [53] ZHANG A, HOU Y, WANG Q, WANG Y. Characteristics and polyethylene biodegradation function of a novel cold-adapted bacterial laccase from Antarctic Sea ice psychrophile *Psychrobacter* sp.

- NJ228[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 439: 129656.
- [54] KAWAI F, WATANABE M, SHIBATA M, YOKOYAMA S, SUDATE Y, HAYASHI S. Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi[J]. Polymer Degradation and Stability, 2004, 86(1): 105-114.
- [55] 李恒昌, 丁明珠. 石油烃生物降解过程的研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(8): 2765-2778.
LI HC, DING MZ. Advances in biodegradation of petroleum hydrocarbons[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(8): 2765-2778 (in Chinese).
- [56] CHEN K, HU Y, DONG X, SUN Y. Molecular insights into the enhanced performance of alkylated petase toward PET degradation[J]. ACS Catalysis, 2021, 11(12): 7358-7370.
- [57] LIANG JL, NIE Y, WANG M, XIONG G, WANG YP, MASER E, WU XL. Regulation of alkane degradation pathway by a TetR family repressor *via* an autoregulation positive feedback mechanism in a Gram-positive *Dietziabacterium*[J]. Molecular Microbiology, 2016, 99(2): 338-359.
- [58] 王玉琪. 基于芽孢杆菌染色体编辑的烷烃降解研究[D]. 南京: 南京理工大学硕士学位论文, 2021.
WANG YQ. Degradation of alkanes based on *Bacillus* genome editing[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing University of Science and Technology, 2021 (in Chinese).
- [59] 谢云. 高效石油烷烃降解菌及原油降解基因工程菌构建研究[D]. 西安: 西北大学博士学位论文, 2014.
XIE Y. Study on the construction of highly efficient petroleum alkane degrading bacteria and genetic engineering bacteria for crude oil degradation[D]. Xi'an: Doctoral Dissertation of Northwest University, 2014 (in Chinese).
- [60] QIAN X, CHEN L, SUI Y, CHEN C, ZHANG W, ZHOU J, DONG W, JIANG M, XIN F, OCHSENREITHER K. Biotechnological potential and applications of microbial consortia[J]. Biotechnology Advances, 2020, 40: 107500.

(本文责编 郝丽芳)