

• 塑料生物降解资源的发掘 •

**崔中利** 南京农业大学生命科学学院微生物学系教授、博士生导师、农业农村部农业环境微生物重点实验室主任。江苏省“333 高层次人才培养工程”首批中青年科学技术带头人,“青蓝工程”中青年学术带头人培养对象,入选教育部“新世纪优秀人才资助计划”项目,江苏省杰出青年基金获得者(2012),国家科技进步二等奖获得者(第二获奖人),钟山学者计划首席教授(2019),国家重点研发计划项目首席科学家(2021)。主要从事微生物技术在农产品安全生产中的应用方面的研究。先后主持完成多项国家重点研发计划、国家“863”计划、国家自然科学基金,以及省级科研项目等。在 *ISME Journal*、*Microbiome*、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*、*Applied and Environmental Microbiology* 等期刊上发表相关科研成果论文 80 余篇。



## 聚氨酯塑料降解菌 G-11 的筛选鉴定及其塑料降解特性

江志通<sup>1</sup>, 陈雪<sup>1</sup>, 雷金晖<sup>1</sup>, 薛慧珍<sup>1</sup>, 张博<sup>1</sup>, 徐晓凡<sup>1</sup>, 耿惠京<sup>1</sup>, 李周坤<sup>1</sup>, 闫新<sup>1</sup>, 董维亮<sup>3</sup>, 曹慧<sup>1</sup>, 崔中利<sup>1,2\*</sup>

1 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

2 南京农业大学前沿交叉学科研究院, 江苏 南京 210095

3 南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211899

江志通, 陈雪, 雷金晖, 薛慧珍, 张博, 徐晓凡, 耿惠京, 李周坤, 闫新, 董维亮, 曹慧, 崔中利. 聚氨酯塑料降解菌 G-11 的筛选鉴定及其塑料降解特性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1963-1975.

JIANG Zhitong, CHEN Xue, LEI Jinhui, XUE Huizhen, ZHANG Bo, XU Xiaofan, GENG Huijing, LI Zhoukun, YAN Xin, DONG Weiliang, CAO Hui, CUI Zhongli. Screening and identification of a polyurethane-degrading bacterium G-11 and its plastic degradation characteristics[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1963-1975.

**摘 要:** 聚氨酯(polyurethane, PUR)塑料因其特殊的理化性质而被广泛应用。然而,大量废弃 PUR 塑料的不合理处置造成了严重的资源浪费和环境污染。利用微生物的手段实现废弃 PUR 塑料的高效降解和循环利用成为目前的研究热点之一,而高效降解菌是 PUR 塑料生物法处理的关键。本研究以垃圾填埋场 PUR 类废塑料样品为来源,分离到一株能够降解 PUR 类似物 Impranil DLN 的微生物,并对其 PUR 降解特性开展了研究。通过 16S rRNA 基因序列比对将该菌初步鉴定为拟无枝

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: czl@njau.edu.cn

Received: 2022-12-06; Accepted: 2023-02-28

杆菌属(*Amycolatopsis* sp.), 命名为 G-11。PUR 塑料降解实验结果表明, 菌株 G-11 对商业化 PUR 塑料的减重率达到 4.67%, 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)发现塑料结构被破坏, 表面出现侵蚀。接触角分析和热重分析(thermogravimetric analysis, TGA)结果发现, 菌株 G-11 处理后的 PUR 塑料的亲水性增强, 热稳定性下降, 该结果与减重和扫描电镜结果相一致。结果表明, 分离自垃圾填埋场的菌株 G-11 在废弃 PUR 类塑料生物降解方面具有一定的应用潜力。

关键词: 聚氨酯; 塑料污染; 生物降解; 拟无枝杆菌

## Screening and identification of a polyurethane-degrading bacterium G-11 and its plastic degradation characteristics

JIANG Zhitong<sup>1</sup>, CHEN Xue<sup>1</sup>, LEI Jinhui<sup>1</sup>, XUE Huizhen<sup>1</sup>, ZHANG Bo<sup>1</sup>, XU Xiaofan<sup>1</sup>, GENG Huijing<sup>1</sup>, LI Zhoukun<sup>1</sup>, YAN Xin<sup>1</sup>, DONG Weiliang<sup>3</sup>, CAO Hui<sup>1</sup>, CUI Zhongli<sup>1,2\*</sup>

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

2 Frontier Interdisciplinary Research Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

3 State Key Laboratory of Material Chemical Engineering, College of Biology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211899, Jiangsu, China

**Abstract:** Polyurethane (PUR) plastics is widely used because of its unique physical and chemical properties. However, unreasonable disposal of the vast amount of used PUR plastics has caused serious environmental pollution. The efficient degradation and utilization of used PUR plastics by means of microorganisms has become one of the current research hotspots, and efficient PUR degrading microbes are the key to the biological treatment of PUR plastics. In this study, an Impranil DLN-degrading bacteria G-11 was isolated from used PUR plastic samples collected from landfill, and its PUR-degrading characteristics were studied. Strain G-11 was identified as *Amycolatopsis* sp. through 16S rRNA gene sequence alignment. PUR degradation experiment showed that the weight loss rate of the commercial PUR plastics upon treatment of strain G-11 was 4.67%. Scanning electron microscope (SEM) showed that the surface structure of G-11-treated PUR plastics was destroyed with an eroded morphology. Contact angle and thermogravimetry analysis (TGA) showed that the hydrophilicity of PUR plastics increased along with decreased thermal stability upon treatment by strain G-11, which were consistent with the weight loss and morphological observation. These results indicated that strain G-11 isolated from landfill has potential application in biodegradation of waste PUR plastics.

**Keywords:** polyurethane; plastic pollution; biodegradation; *Amycolatopsis*

塑料是一类由合成或半合成的化合物聚合成长链而制成的化学材料<sup>[1]</sup>, 通常含有碳、氢、氮、氧、氟、溴等元素, 按其化学结构特点可分为聚乙烯(polyethylene, PE)、聚丙烯(polypropylene,

PP)、聚苯乙烯(polystyrene, PS)、聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)和聚氨酯(polyurethane, PUR) 6 大类<sup>[2]</sup>。塑料因可塑性强、

惰性抗分解、价格低廉,被广泛应用于人类生产生活的多个领域中<sup>[3]</sup>。然而,塑料制品在给人类带来便利的同时,伴随的污染也对全球生态环境造成了巨大的威胁,并引起了国际社会的广泛关注<sup>[4]</sup>。PUR 是一类由多异氰酸酯和多元醇缩合而成的聚合物,分为聚酯型和聚醚型<sup>[5]</sup>。PUR 产品类型丰富,在世界上占有较大的市场,2020 年仅中国就生产了 1 470 万 t,消费 1 175 万 t<sup>[6]</sup>。

使用后的 PUR 塑料品大部分被废弃在自然环境中,历经几十年甚至上百年都难以降解。同时,在风力、阳光、水流等自然因素的作用下, PUR 废弃物能形成直径小于 5 mm 的微塑料<sup>[7]</sup>。这些微塑料通过不同路径传播导致了各种生态危害,例如,微塑料随食物链在动物体内累积造成生物毒性的同时,也能转移到人类体内,危害人体健康<sup>[8]</sup>;良好的扩散性为海洋环境微塑料际(plastisphere)病原菌的传播提供了方便,对全世界的公共卫生安全形成了潜在的威胁<sup>[9]</sup>;最近,我国科学家发现微塑料可以通过新生侧根间隙进入植物体内,引起了对微塑料安全性的重新思考<sup>[10]</sup>。因此,实现对包括 PUR 在内的废弃塑料的合理处置至关重要。

目前,处理 PUR 废弃物的主要方法是填埋、焚烧、机械回收和化学回收。然而,这些处置方法会造成潜在的环境污染<sup>[11]</sup>。相较于传统的处理方法,利用微生物或酶对塑料进行生物回收被认为是最有前景的方法之一<sup>[12]</sup>。PET 塑料的生物循环利用已经进入到产业化前期<sup>[13]</sup>。利用生物方法降解 PUR 也受到了广泛的关注,已经发现了部分具有 PUR 降解能力的微生物。塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)能够以聚酯型 PUR 为唯一碳源,在两个月内 PUR 降解率达到 90%<sup>[14]</sup>;假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)菌株 AKS31 能够在 10 d 内使 PUR 薄膜失重率达到 70%<sup>[15]</sup>;假枝孢霉(*Cladosporium pseudocladosporioides*)

T1.PL.1 被发现两周内能降解 87%的 Impranil DLN<sup>[16]</sup>。短芽孢杆菌属(*Brevibacillus* sp.)菌株 P10,该菌株在 5% LB 存在的条件下,6 d 内可降解 50 mg 商业聚酯型 PUR 塑料<sup>[17]</sup>。格氏不动杆菌(*Acinetobacter gernerii*) P7 能沿着 PUR 颗粒表面聚集,和 PUR 表现出复杂的相互作用关系<sup>[18]</sup>。

迄今为止, PUR 生物降解研究多数是以 PUR 类似物 Impranil DLN 或以 Sigma 公司合成 PUR 颗粒制备的膜(PUR 膜)为底物,这些底物与商业化 PUR 产品的真实结构存在很大差异。Impranil DLN 是一种水溶性的 PUR,由 0.1–0.2 μm 的颗粒组成,具体成分不明确,较为可信的是 Biffinger 等<sup>[19]</sup>提出的 Impranil DLN 的模拟结构(图 1),其具有 PUR 典型的酯键和氨基甲酸酯键。Impranil DLN 具有不透明性和微溶性,将其作为底物加入到筛选培养基中,可以通过观察培养基浊度变化和水解圈情况筛选具有 PUR 降解能力的微生物。然而其性质与商业化 PUR 产品的结晶度、玻璃转化性质等参数存在一定差异。因此,使用 Impranil DLN 筛选 PUR 降解微生物对于获得商业化 PUR 的降解性微生物资源存在很大的限制。例如,罗伦隐球酵母(*Papiliotrema laurentii*) 5307AH<sup>[20]</sup>和芽孢杆菌(*Bacillus*) K9<sup>[21]</sup>仅具有 Impranil DLN 水解能力,而对商业化 PUR 塑料无降解效果;Brunner 等<sup>[22]</sup>从塑料碎片中分离的禾粘座孢霉、灰黄青霉等菌株也仅具有 Impranil DLN 降解能力。因此,在筛选 PUR 降解菌的研究中,必须要结合菌株对商业化 PUR 材料降解能力的评估。

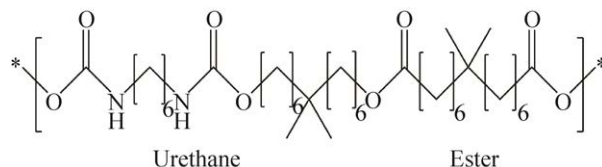


图1 Biffinger 等提出的 Impranil DLN 模拟结构<sup>[19]</sup>  
Figure 1 Tentative structure of Impranil DLN proposed by Biffinger et al<sup>[19]</sup>.

本研究从垃圾填埋场分离到一株 PUR 塑料降解菌株,能够降解商业聚酯型 PUR 泡沫塑料。结合扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)、接触角分析、热失重分析(thermogravimetric analysis, TGA)技术,表征 PUR 塑料结构和性质的变化,最终证明了 G-11 通过生物降解作用改变了商业 PUR 塑料的结构和性质,造成重量的减少。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤和废弃 PUR 塑料制品

废弃 PUR 塑料及土壤样品采集于安徽省宣城市广德市城市垃圾填埋场,该垃圾填埋场有大约 10 年的填埋史,填埋有丰富的塑料垃圾。样品采集过程中,挑选水分较多、温度较高的填埋区,选取底层的垃圾样品,观察塑料垃圾的含水量和表面腐烂情况,对 PUR 塑料样品及其周围的土壤样品进行采集。采集的所有样品放入低温保藏箱临时保藏。

### 1.2 培养基和主要化学试剂

LB 培养基(用于塑料降解细菌的筛选与培养): 10 g/L NaCl, 10 g/L 胰蛋白胨(tryptone), 5 g/L 酵母粉(yeast extract)。

无机盐培养基(用作配制富集培养基和筛选培养基的基础培养基): 0.7 g/L  $K_2HPO_4$ , 0.7 g/L  $KH_2PO_4$ , 0.7 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.005 g/L NaCl, 1.34 g/L  $NH_4Cl$ , 0.002 g/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.002 g/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.001 g/L  $MnSO_4 \cdot H_2O$ 。

富集培养基(用作 PUR 降解菌的富集): 添加 0.1% (质量体积分数)酵母粉和 0.255% (体积分数) Impranil DLN 的无机盐培养基。

筛选培养基(用作富集液中 PUR 降解菌的筛选): 无机盐培养基中添加 15 g/L 琼脂粉, 121 °C、103.4 kPa 灭菌 30 min 后加入 2 g/L Impranil DLN 和 5% (体积分数)蒸汽灭菌后的

LB 培养基。

高氏一号培养基(在稀释涂布实验中用于计数菌株菌体量): 20 g/L 可溶性淀粉, 1 g/L  $KNO_3$ , 0.5 g/L  $K_2PO_4$ , 0.5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.5 g/L NaCl, 0.01 g/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 20 g/L 琼脂粉, 调节 pH 7.4。

2 kb DNA Marker (货号 10501es60\*)、10 kb DNA Marker (货号 10505es60)以及 Hieff Cance<sup>®</sup> Gold High-Fidelity DNA Polymerase (货号 10148es76)等常规分子试剂购自羿圣生物科技(上海)有限公司。其余化学试剂(除特殊标记外)均为分析纯。

PUR 降解菌分离筛选所使用的底物为水性 PUR Impranil DLN 1098 (Bayer Materials Science, PA), 降解性能测定采用商业聚酯型 PUR 塑料(编号 JZ3065 白, 南通大工有限公司)为底物, 其原料为聚酯多元醇、甲苯二异氰酸酯(toluene diisocyanate, TDI)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 PUR 塑料降解菌种的筛选及形态观察

样品富集: 称取采集的填埋场环境样品 1.5 g 样品, 用灭菌后的剪刀剪碎废弃塑料样品, 放入 100 mL 灭菌的无机盐培养基, 28 °C、180 r/min 培养 20 d; 吸取 100  $\mu$ L 富集结束的富集液进行梯度稀释, 涂布于筛选培养基, 30 °C 培养 4–5 d, 观察菌落在筛选培养皿上形成透明圈的情况。第二次富集: 吸取 5 mL 第一次富集液于 100 mL 新鲜的富集培养基中, 28 °C、180 r/min 继续培养 20 d; 菌悬液稀释及菌落降解情况观察同上。

挑取从 2 次富集液中筛选出的能够形成较大透明圈的单菌落, 划线于新的筛选培养皿, 继续培养 4–5 d, 重复 3–4 次, 观察菌落是否能稳定水解 DLN 从而产生透明圈。选择透明圈直径与菌落直径之比最大的菌落作为出发菌株进行降解性能测定。

### 1.3.2 菌株对 Impranil DLN 的降解能力分析

配制浓度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% (体积分数)的 Impranil DLN 溶液,用去离子水稀释 5 倍后,于 400 nm 波长下的紫外分光光度计中测量吸光值,以 Impranil DLN 浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。

将菌株接种至 4 mL 无菌的 LB 培养基中,30 °C、180 r/min 培养至菌液  $OD_{600}=0.8$ ,将菌液按 10%的接种量接种至无机盐培养基,接着加入 0.4%的 Impranil DLN 作为碳源。每 4 h 取样,一部分培养基 4 000 r/min 离心 5 min,用无菌的去离子水稀释 5 倍,测量样品在 400 nm 波长下的吸光值,计算 Impranil DLN 浓度;另一部分培养基稀释涂布于高氏一号固体培养皿,30 °C 培养,用于菌落计数。

### 1.3.3 菌株 16S rRNA 基因序列测定及系统发育树分析

挑取单菌落至 4 mL 无菌的 LB 试管中,30 °C、180 r/min 培养 2 d,离心收集菌体。参考张瑞福等<sup>[23]</sup>建立的方法提取菌体总 DNA,并通过琼脂糖凝胶电泳对提取的 DNA 进行判定。使用 16S rRNA 通用引物(27F: 5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3'和 1492R:5'-TACGACTTA ACCCCAATCGC-3'),以提取的 DNA 为模板,对菌株 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。扩增反应流程为:98 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 10 s,55 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 50 s,共 32 个循环;72 °C 终止延伸 5 min。利用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检查,扩增成功的 PCR 产物送至擎科生物科技有限公司进行序列测序。

利用NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对菌株的 16S rRNA 基因序列进行序列比对分析,获取同源序列。利用软件 MEGA 7.0.26<sup>[24]</sup>进行多序列比对分析,并通过邻接法构建序列进化发育树,以初步判断分离菌株的种属地位。菌株 16S rRNA 基因 GenBank 登录号为 ON937620。

### 1.3.4 菌株对聚酯型 PUR 塑料的降解能力分析

将商业聚酯型 PUR 塑料放入 50 °C 烘箱中,每 2 h 取出用分析天平称量质量,直到 PUR 塑料质量不再变化;准确称取 0.20 g 烘干至恒重的聚酯型 PUR 塑料于 35 mL 添加到含有 5.0% (体积分数) LB 和 0.10% (质量体积分数) 酵母粉的无机盐培养基中,灭菌处理用于后续减重实验。

利用 LB 培养基培养 PUR 降解菌至  $OD_{600}$  等于 1.0,按 10% (体积分数)接种量接种 PUR 降解菌菌液至上述基础无机盐培养基中,30 °C、180 r/min 培养 60 d,每 10 d 补充添加 0.10% (质量体积分数)酵母粉的基础无机盐培养基至 35 mL,并以不添加菌液的处理组作为对照。实验每个处理组设置 3 个重复。培养完成后取出塑料,用 5.0%次氯酸钠溶液浸泡 4 h,超声波清洗 5–10 min 除去塑料上的菌体,无菌水清洗 2–3 遍后,50 °C 烘干至恒重,最后称量剩余塑料的质量<sup>[17]</sup>。

### 1.3.5 聚酯型 PUR 塑料的性质表征

#### (1) 扫描电子显微镜(SEM)分析

将经 PUR 降解菌处理过的商业 PUR 塑料放在烘箱中充分干燥,用干净的刀片切取成约 0.20 mm 厚的薄片,用黑色的双面胶带将薄片固定在扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)进样的样品台上,并用离子溅射仪在塑料薄片表面镀上一层金膜,随后将样品台固定在样品座上推进扫描电子显微镜 SU8010 (日立公司),通过调整放大倍数、焦距和观察位置对 PUR 塑料的表面形貌进行观察并拍照记录。

#### (2) 接触角分析

将 PUR 塑料样品固定在样品台上,调整样品台高度和焦距使样品清晰的出现在显示屏中,调节针筒和分配器的位置在显示屏中心的位置并固定针头;根据屏幕指示,旋转液体分配器挤出水滴至大小约为 4–5 格垂直刻度,上



升样品台高度以承接水滴,再下降样品台,在 PUR 塑料表面形成完整水滴并使水滴在屏幕中心,使用 USB3.0 高速相机定格图像并在显示屏上显示出水接触角, PUR 塑料滴加水滴 3 次并记录相应的水接触角角度。

### (3) TGA 分析

采用热重分析(thermogravimetric analysis, TGA)仪(TGA5500, 上海云谱仪器有限公司)对塑料样品的热力学特性进行测试。在氧化铝坩埚中放入 PUR 塑料样品,以氮气作为载样气体,气体流速为 50 mL/min,控温程序为:起始温度 30 °C,终止温度 700 °C,加热速率 10 °C/min。

### 1.3.6 统计方法

利用软件 Origin 2021 9.80.200 计算商业 PUR 塑料表面水接触角、G-11 菌落计数和 Impranil DLN 降解率的平均值和标准偏差,并对 PUR 塑料的 TGA 曲线进行拟合和图像处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 Impranil DLN 降解菌株的筛选与分离

通过对采集的填埋场塑料样品进行多次富

集培养,一共获得能够在含 Impranil DLN 筛选培养基上产生透明圈的纯培养菌株 57 株。通过测量透明圈与菌落的直径大小之比,选择透明圈与菌落的直径大小之比最大的菌株进行后续实验,该菌株命名为 G-11。对获取的菌株 G-11 的菌落形态进行初步的观察,如图 2A 所示,菌株 G-11 菌落形态呈白色、圆形、不透明,表面干燥、略微粗糙,边缘整齐,且能在含有 2.0 g/L Impranil DLN 的无机盐筛选培养皿上降解 Impranil DLN,并产生大而透明的水解圈(图 2A 虚线箭头标记处)。菌株的形态学观察表明,其细胞形态呈现带分支的丝状结构(图 2B)。

如图 3 所示, G-11 在含有 0.4% Impranil DLN 的无机盐培养基中能有效降解亲水性 PUR Impranil DLN,在 16 h 内 Impranil DLN 几乎被完全降解(97.46%)。与此同时,观察到在 Impranil DLN 降解的时间段内, G-11 的菌体量呈上升趋势,直至 Impranil DLN 耗尽,其菌体量开始缓慢下降,表明 G-11 能降解 Impranil DLN 提供物质和能量来供给自身的生长繁殖。

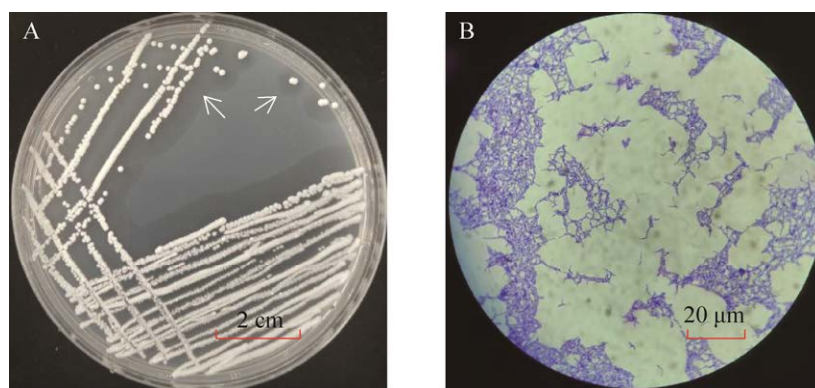


图 2 菌株 G-11 的形态学观察 A: 菌株在筛选培养皿上的菌落形态与 DLN 水解圈. B: 结晶紫染色后观察菌株细胞(10×100 倍). 白色线箭头处为 DLN 水解圈的界线

Figure 2 Morphological observation of strain G-11. A: Colony morphology and DLN hydrolysis zone of strain G-11. B: Strain G-11 cells were observed upon crystal violet staining (10×100). The white arrow indicates the boundary of the DLN hydrolysis zone.

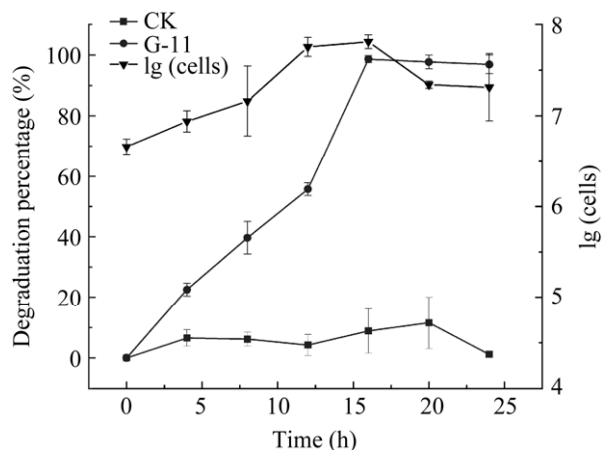


图3 在含有 Impranil DLN 液体培养基中, G-11 的菌体量和 Impranil DLN 的降解率随时间的变化关系 实心圆形和正方形为 Impranil DLN 的降解率, 实心三角形为 G-11 的菌体量变化

Figure 3 The time-course of the relationship between the biomass of strain G-11 and the degradation rate of Impranil DLN in liquid medium containing Impranil DLN. The solid circle and solid square show the degradation rate of Impranil DLN, and the solid triangle shows the change of the biomass of strain G-11.

## 2.2 菌株 G-11 的菌种鉴定

采用高盐法成功提取菌株 G-11 的基因组 DNA, 并以此为模板扩增获得其 16S rRNA 基因片段。通过序列比对分析发现, 菌株 G-11 与海洋拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis echigonensis*) PPY30 的 16S rRNA 基因序列同源性最高, 为 99.5%; 其次为海洋拟无枝酸菌 PPY32, 其 16S rRNA 序列与菌株 G-11 的同源性为 99.4%。基于所获取的 16S rRNA 基因序列, 构建系统发育树, 结果如图 4 所示, 菌株 G-11 与 PPY30、PPY32 等处于同一分支, 亲缘关系较近。由于微生物鉴定过程中, 16S rRNA 基因序列的同源性不一定是保证物种同一性的充分标准, 特别是对于最近分化的物种, 需要更多的生理和生化鉴定才能将其鉴定到种的水平<sup>[25]</sup>。综上所述, 结合菌株 G-11 形态学观察和 16S rRNA 基因序列鉴定, 初步将菌株 G-11 归类为拟无枝杆菌属 *Amycolatopsis* sp.。

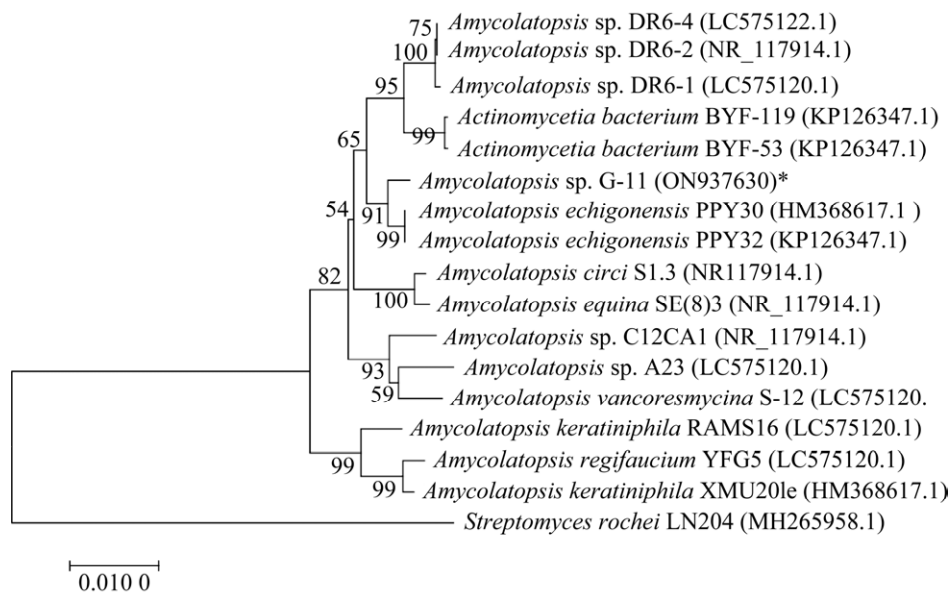


图4 基于 16S rRNA 的菌株 G-11 系统发育树 分支处的数字表示 bootstrap 值, 星号标记为菌株 G-11  
Figure 4 Phylogenetic tree of strain G-11 based on 16S rRNA sequence. The number at the branch indicates bootstrap value, and strain G-11 is marked in asterisk.

### 2.3 菌株 G-11 对聚酯型 PUR 塑料的降解效果

菌株 G-11 能够在含有 Impranil DLN 的固体平板产生大而透明的水解圈, 为验证筛选的菌株是否为“假阳性”, 本研究进一步探究了 G-11 对聚酯型 PUR 塑料的降解能力。结果表明, 菌株 G-11 在含有 5% 的 LB 和 0.1% 的酵母粉的基础培养基中, 60 d 内能够使聚酯型 PUR 塑料的重量减少 6.67%, 而非生物减重率约 2%。这表明菌株 G-11 在低量营养辅助下, 具有降解 PUR 塑料的能力。进一步通过 SEM 对菌株 G-11 处理前后的塑料表面形态进行观察, 对照组(图 5A 和 5C) PUR 塑料表面较为光滑, 而经菌株 G-11 处理 60 d 后的 PUR 塑料表面上出现了小孔和褶皱(图 5B 和 5D), 表明 PUR 塑料受到菌株 G-11 的生物降解而发生表面形貌的破坏。

### 2.4 菌株 G-11 处理后 PUR 塑料表面疏水性及热稳定性测定

接触角分析能够判断 PUR 塑料处理前后的亲水性变化。结果如图 6A 所示, 水滴加在空白对照组和 G-11 处理组的 PUR 塑料表面形成的接触角均大于  $90^\circ$ , 表明 PUR 塑料表面是疏水性的。但是经 G-11 处理后 PUR 塑料的水接触角明显小于对照组 PUR 塑料, 由  $131.5^\circ$  下降到  $113.2^\circ$ , 表明处理组中 PUR 塑料的亲水性有一定程度的增加。推测菌株 G-11 对 PUR 塑料的降解作用改变了界面的疏水特性。

PUR 材料具备优异的热稳定性从而可保持长期稳定性, 难以降解。本研究通过 TGA 分析了商业 PUR 降解前后的热稳定性, 如图 6B 所示, 随着温度的升高, 处理组和空白对照组的 PUR 塑料质量也随之减小, 相对于对照组, 处

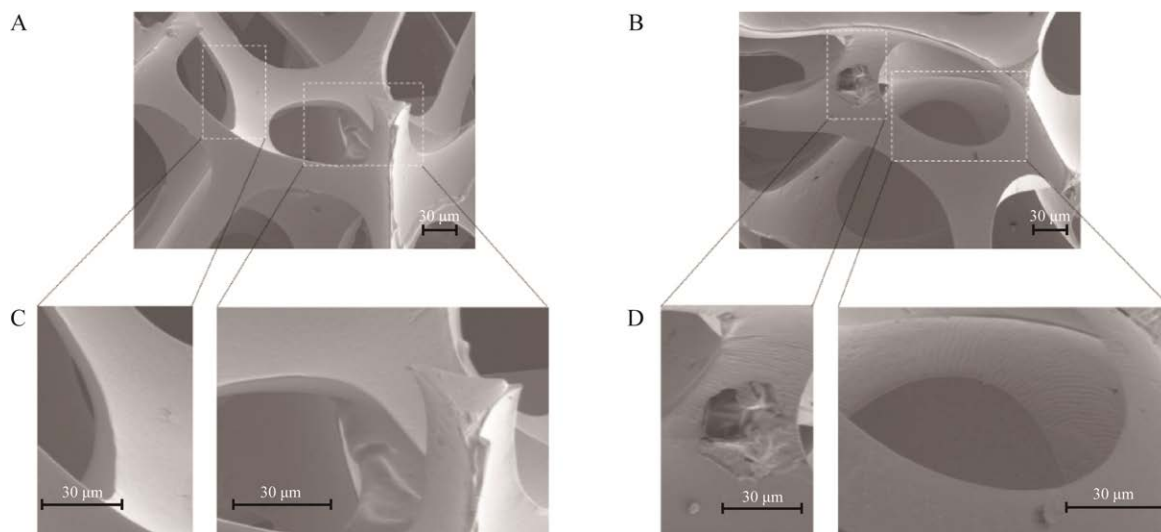


图 5 聚酯型 PUR 塑料的表面的 SEM 图像 A 和 B: 对照组和处理组的聚酯型 PUR 塑料的表面的 SEM 图像. C: 图 A 的 SEM 图像局部放大图. D: 图 B 的 SEM 图像局部放大图. 白色虚线框的区域为放大的图像区域

Figure 5 SEM image of the surface of the polyester PUR foam. A and B: SEM images of the surfaces of polyester PUR plastics in the control group and the treatment group, respectively. C: Partial enlargement of the SEM image shown in figure A. D: Partial enlargement of the SEM image shown in figure B. The area of the dashed box is the area of the enlarged image.



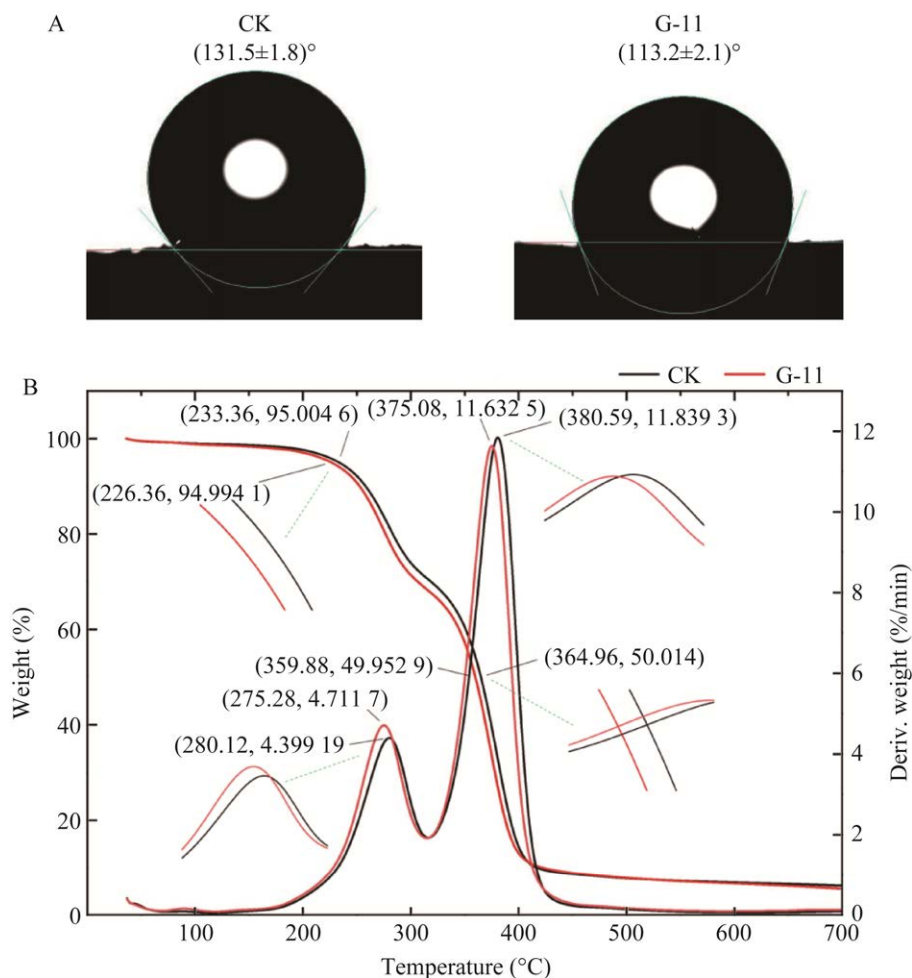


图 6 聚酯型 PUR 塑料的接触角分析图像和 TGA 图像 A: 对照组和处理组的水接触角. B: 对照组和处理组的 TGA 曲线. 黑色实线标记出的坐标为 PUR 塑料的各项材料热稳定性参数所对应的点, 绿色虚线标出的图像是该处相应的放大图

Figure 6 Contact angle analysis image and TGA image of the polyester PUR foam. A: Water contact angle of the control group and the treatment group. B: TGA curves of the control group and the treatment group. The coordinates marked by the solid line in black are the points corresponding to the thermal stability parameters of various materials of PUR plastics, and the image marked by the dotted line in green is an enlarged picture of the corresponding place.

理组的 TGA 曲线整体相对向左, 表明其更容易在温度的作用下损失质量。对照组的材料热稳定性参数分别为  $T_{5\%}=233.36$ ,  $T_{50\%}=364.96$ ,  $T_{\max 1}=280.12$ ,  $T_{\max 2}=380.59$ , 而处理组的材料热稳定性参数分别为  $T_{5\%}=226.36$ ,  $T_{50\%}=359.88$ ,  $T_{\max 1}=275.28$ ,  $T_{\max 2}=375.08$  ( $T_{5\%}$  为失重 5% 的温度, 代表起始分解温度;  $T_{50\%}$  为失重 50% 的温

度, 代表链结构失稳温度;  $T_{\max}$  为分解速率最大温度)<sup>[26]</sup>, 表明经菌株 G-11 处理后, PUR 塑料的各项材料热稳定性参数都有所下降, 热稳定性降低。PUR 的热稳定性取决于硬段和软段的结构、PUR 连接程度、硬段与软段的比例、物理交联的程度以及分子量及其分布<sup>[27]</sup>, 推测由于菌株 G-11 发挥的生物降解作用对 PUR 硬

段和软段的结构、PUR 连接程度等性质造成影响,从而使稳定性有所下降。

### 3 讨论

传统的焚烧、填埋等废弃塑料处理方法易产生污染<sup>[28]</sup>和温室气体排放<sup>[29]</sup>,相比之下,利用微生物降解具有反应条件温和、环境友好和能产生高价值的“下游产品”的优点<sup>[30]</sup>,已成为一种有前景的回收废弃塑料的替代方法。本研究围绕PUR的生物降解进行了微生物菌株的筛选,在采集到良好的废弃PUR样品的基础上,经过为期40 d的两次富集,分离到一株水解Impranil DLN能力较强的拟无枝杆菌G-11。菌株G-11能够在一定的营养条件下,两个月内使商业化PUR塑料失重率达到4.67%。结合表面形态学观察、接触角和TGA分析,确定菌株G-11具有降解商业化PUR塑料的能力。

目前,已报道的DLN和PUR膜降解微生物包括细菌和真菌,且真菌对这些PUR底物的降解能力总体上要高于细菌<sup>[31]</sup>。对DLN降解能力最强的真菌小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspor*) E2712A能在2周内降解99%的DLN<sup>[32]</sup>,恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) A12对DLN的降解效率可达92%<sup>[33]</sup>。对于结构更接近真实塑料的PUR膜,微生物的降解效率呈下降趋势。曲霉属(*Aspergillus*)真菌对PUR膜表现出强的降解能力,黄曲霉(*Aspergillus flavus*) ITCC 6051在30 d内可使PUR膜失重60.6%<sup>[34]</sup>,*A. tubingensis*甚至在2个月内使得PUR膜分解为碎片<sup>[14]</sup>。细菌也表现了一定的PUR膜的降解能力,芽孢杆菌S10-2在9周内能使聚酯型PUR薄膜减重19%<sup>[35]</sup>,枯草杆菌(*Bacillus subtilis*) MZA-75和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) MZA-85组成的混合菌群表现出更强的PUR膜降解能力,可以在30 d内降解40%

的PUR<sup>[36]</sup>。目前已报道的PUR降解细菌中多数为芽孢杆菌(*Bacillus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、短芽孢杆菌(*Bacillus breve*)等<sup>[17,15,35]</sup>,其他属的菌株如木糖葡萄球菌(*Staphylococcus xylose*)、红球菌(*Erythrococcus*)也有少量报道。能高效降解PUR塑料的细菌资源仍然较少,本研究首次发现拟无枝杆菌也具有PUR塑料降解能力,为PUR塑料生物降解提供了新的微生物资源。

然而PUR膜和真实的PUR泡沫类塑料表面结构、固液接触面积等均存在较大的差别。目前报道的能够降解PUR泡沫的微生物较少。枝孢霉属(*Cladosporium*)的真菌表现出对PUR泡沫较强的降解能力,极细枝孢霉(*Cladosporium tenuissimum*) A2.PP.5能够在21 d内造成PUR泡沫减重65.3%<sup>[16]</sup>。链格孢属(*Alternaria*)菌株PURDK2能在70 d内使PUR泡沫减重27.5%<sup>[37]</sup>。*Alternaria* sp. P2a1、青霉属(*Penicillium*)菌株MMP3b和曲霉属菌株MMP31能在两个月内可使合成的PUR塑料分别减重3.2%、8.9%和1.5%<sup>[16]</sup>。本文评估了G-11对聚酯型PUR泡沫塑料的降解能力,并对降解后塑料的表面形貌、疏水性和热稳定性进行了分析。相较于其他的PUR降解菌,G-11对PUR泡沫塑料的减重率达到4.67%。此外,G-11对聚酯型PUR塑料的降解会伴随小面积的表面形貌的破坏,水接触角从131.5°减小至113.2°,热解温度均下降4~5 °C。表明菌株G-11具有降解商业化PUR泡沫的能力。

目前,已有报道推测酯酶、脂肪酶、脲酶和酰胺酶等酶的酶解作用在PUR生物降解过程中发挥着重要的作用<sup>[28]</sup>。聚酯型PUR塑料能被酯酶、蛋白酶降解,已有研究表明木瓜蛋白酶能切割聚酯型PUR中的酯键<sup>[38]</sup>;此外,来自于绿针假单胞菌的酯酶PueA和PueB<sup>[39]</sup>能够水解聚酯型PUR中的酯键,马红球菌(*Rhodococcus*

*equi*) TB-60 分泌的一种氨基甲酸酯酶能水解 PUR 塑料中的氨基甲酸酯键<sup>[40]</sup>。聚醚型 PUR 由于其长链中含有较多的醚键, 常见的酯酶、蛋白酶等 PUR 降解酶对其难以发挥降解作用, 而脲酶可以对聚醚型 PUR 起到良好的酶解效果<sup>[38]</sup>。此外, Magnin 等<sup>[41]</sup>发现酯酶和酰胺酶能够协同降解 PUR。在菌株 G-11 降解 Impranil DLN 和聚酯型 PUR 塑料的过程中, 本研究在胞外检测到酯酶活性, 而酯酶是目前降解 PUR 的主要酶类之一。因此, 在后续研究中, 将围绕菌株 G-11 所分泌的酯酶进行探索研究, 进一步阐明其解聚 PUR 的分子机理。

## REFERENCES

- [1] ALI SHAH A, HASAN F, HAMEED A, AHMED S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review[J]. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(3): 246-265.
- [2] 李程, 吴子刚, 王晓彤, 闫静, 邵凯. 聚氨酯行业的现状及发展趋势[J]. *粘接*, 2016, 37(11): 63-67.  
LI C, WU ZG, WANG XT, YAN J, SHAO K. Current situation and development trend of polyurethane industry[J]. *Adhesion*, 2016, 37(11): 63-67 (in Chinese).
- [3] ZHENG Y, YANFUL EK, BASSI AS. A review of plastic waste biodegradation[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2005, 25(4): 243-250.
- [4] VINCE J, DENISE HARDESTY B. Plastic pollution challenges in marine and coastal environments: from local to global governance[J]. *Restoration Ecology*, 2017, 25(1): 123-128.
- [5] MAGNIN A, POLLET E, PHALIP V, AVÉROUS L. Evaluation of biological degradation of polyurethanes[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 39: 107457.
- [6] MAHAJAN N, GUPTA P. New insights into the microbial degradation of polyurethanes[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(52): 41839-41854.
- [7] 刘军, 李振敏, 张君楚, 杨俊伟, 李文青. 微塑料污染研究进展[J]. *山东化工*, 2022, 51(2): 67-70.  
LIU J, LI ZM, ZHANG JC, YANG JW, LI WQ. Research progress of microplastic pollution[J]. *Shandong Chemical Industry*, 2022, 51(2): 67-70 (in Chinese).
- [8] 熊飞, 黄庆辰, 何玉虹, 汤铭杰, 孙蓉丽. 微塑料污染现状及其毒性效应和机制研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2021, 16(5): 211-220.  
XIONG F, HUANG QC, HE YH, TANG MJ, SUN RL. Research progress on current status of microplastics pollution and its toxic effects and mechanisms[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2021, 16(5): 211-220 (in Chinese).
- [9] BOWLEY J, BAKER-AUSTIN C, PORTER A, HARTNELL R, LEWIS C. Oceanic hitchhikers-assessing pathogen risks from marine microplastic[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(2): 107-116.
- [10] LI LZ, LUO YM, LI RJ, ZHOU Q, PEIJNENBURG WJGM, YIN N, YANG J, TU C, ZHANG YC. Effective uptake of submicrometre plastics by crop plants *via* a crack-entry mode[J]. *Nature Sustainability*, 2020, 3(11): 929-937.
- [11] MIRI SB, SAINI R, DAVOODI SM, PULICHARLA R, BRAR SK, MAGDOULI S. Biodegradation of microplastics: better late than never[J]. *Chemosphere*, 2022, 286: 131670.
- [12] WIERCKX N, PRIETO MA, POMPOSIELLO P, LORENZO V, O'CONNOR K, BLANK LM. Plastic waste as a novel substrate for industrial biotechnology[J]. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8(6): 900-903.
- [13] 钱秀娟, 刘嘉唯, 薛瑞, 刘豪杰, 闻小红, 杨璐, 徐安明, 许斌, 信丰学, 周杰, 董维亮, 姜岷. 合成生物学助力废弃塑料资源生物解聚与升级再造[J]. *合成生物学*, 2021, 2(2): 161-180.  
QIAN XJ, LIU JW, XUE R, LIU HJ, WEN XH, YANG L, XU AM, XU B, XIN FX, ZHOU J, DONG WL, JIANG M. Synthetic biology boosts biological depolymerization and upgrading of waste plastics[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(2): 161-180 (in Chinese).
- [14] KHAN S, NADIR S, SHAH ZU, ALI SHAH A, KARUNARATHNA SC, XU JC, KHAN A, MUNIR S, HASAN F. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 225: 469-480.
- [15] ROY R, MUKHERJEE G, 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.
- [16] ÁLVAREZ-BARRAGÁN J, DOMÍNGUEZ-MALFAVÓN L, VARGAS-SUÁREZ M, GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ R, AGUILAR-OSORIO G, LOZA-TAVERA H.

- Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(17): 5225-5235.
- [17] 何洁, 徐安明, 刘嘉唯, 周杰, 崔中利, 董维亮, 姜岷. 一株聚氨酯降解菌的分离及其降解特性解析[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(10): 3675-3684.  
HE J, XU AM, LIU JW, ZHOU J, CUI ZL, DONG WL, JIANG M. Isolation and characterization of a polyurethane-degrading bacterium[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(10): 3675-3684 (in Chinese).
- [18] HOWARD GT, NORTON WN, BURKS T. Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme[J]. *Biodegradation*, 2012, 23(4): 561-573.
- [19] BIFFINGER JC, BARLOW DE, COCKRELL AL, CUSICK KD, HERVEY WJ, FITZGERALD LA, NADEAU LJ, HUNG CS, CROOKES-GOODSON WJ, RUSSELL JN Jr. The applicability of Impranal®DLN for gauging the biodegradation of polyurethanes[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2015, 120: 178-185.
- [20] HUNG CS, BARLOW DE, VARALJAY VA, DRAKE CA, CROUCH AL, RUSSELL JN Jr, NADEAU LJ, CROOKES-GOODSON WJ, BIFFINGER JC. The biodegradation of polyester and polyester polyurethane coatings using *Papiliotrema laurentii*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019, 139: 34-43.
- [21] ALDILA F, SUSILOWATI A, SETYANINGSIH R. Polyurethane degrading bacteria isolated from decayed teak wood (*Tectona grandis* Linn. f.)[J]. *J Biodjati*, 2019, 4(2):225-235.
- [22] BRUNNER I, FISCHER M, RÜTHI J, STIERLI B, FREY B. Ability of fungi isolated from plastic debris floating in the shoreline of a lake to degrade plastics[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0202047.
- [23] 张瑞福, 曹慧, 崔中利, 李顺鹏, 樊奔. 土壤微生物总 DNA 的提取和纯化[J]. *微生物学报*, 2003, 43(2): 276-282.  
ZHANG RF, CAO H, CUI ZL, LI SP, FAN B. Extraction and purification of soil microbial total DNA[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(2): 276-282 (in Chinese).
- [24] MUZUNI, NINGSIH R, ARFA YANTI N, ASNIAH. Molecular identification of *Phytophthora* sp. from Indonesian cocoa using phylogenetic analysis[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2022, 25(3): 245-253.
- [25] JANDA JM, ABBOTT SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(9): 2761-2764.
- [26] 王新宇. 功能化水性聚氨酯制备及其涂层性能研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2021.  
WANG XY. Preparation of functional waterborne polyurethane and coating properties[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [27] BAYAN R, KARAK N. Renewable resource modified polyol derived aliphatic hyperbranched polyurethane as a biodegradable and UV-resistant smart material[J]. *Polymer International*, 2017, 66(6): 839-850.
- [28] JIN XR, DONG JX, GUO XF, DING MZ, BAO R, LUO YZ. Current advances in polyurethane biodegradation[J]. *Polymer International*, 2022, 71(12): 1384-1392.
- [29] MEYS R, KÄTELHÖN A, BACHMANN M, WINTER B, ZIBUNAS C, SUH S, BARDOW A. Achieving net-zero greenhouse gas emission plastics by a circular carbon economy[J]. *Science*, 2021, 374(6563): 71-76.
- [30] QIN ZH, MOU JH, CHAO CYH, CHOPRA SS, DAOUD W, LEU SY, NING Z, TSO CY, CHAN CK, TANG SX, HATHI ZJ, HAQUE MA, WANG X, LIN CSK. Biotechnology of plastic waste degradation, recycling, and valorization: current advances and future perspectives[J]. *ChemSusChem*, 2021, 14(19): 3981.
- [31] LIU JW, HE J, XUE R, XU B, QIAN XJ, XIN FX, BLANK LM, ZHOU J, WEI R, DONG WL, JIANG M. Biodegradation and up-cycling of polyurethanes: progress, challenges, and prospects[J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 48: 107730.
- [32] RUSSELL JR, HUANG J, ANAND P, KUCERA K, SANDOVAL AG, DANTZLER KW, HICKMAN D, JEE J, KIMOVEC FM, KOPPSTEIN D, MARKS DH, MITTERMILLER PA, NÚÑEZ SJ, SANTIAGO M, TOWNES MA, VISHNEVETSKY M, WILLIAMS NE, VARGAS MPN, BOULANGER LA, BASCOM-SLACK C, et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(17): 6076-6084.
- [33] PENG YH, SHIH YH, LAI YC, LIU YZ, LIU YT, LIN NC. Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain[J]. *Environmental*

- Science and Pollution Research, 2014, 21(16): 9529-9537.
- [34] MATHUR G, PRASAD R. Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) isolated from soil[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167(6): 1595-1602.
- [35] 彭瑞婷. 聚氨酯塑料降解菌的筛选鉴定及降解特性研究[D]. 武汉: 武汉理工大学硕士学位论文, 2018.
- PENG RT. The study of screening identification and degradation characteristics of polyurethane plastic degrading strain[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan University of Technology, 2018 (in Chinese).
- [36] SHAH Z, GULZAR M, HASAN F, ALI SHAH A. Degradation of polyester polyurethane by an indigenously developed consortium of *Pseudomonas* and *Bacillus* species isolated from soil[J]. Polymer Degradation and Stability, 2016, 134: 349-356.
- [37] MATSUMIYA Y, MURATA N, TANANBE E, KUBOTA K, KUBO M. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp.[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(6): 1946-1953.
- [38] PHUA SK, CASTILLO E, ANDERSON JM, HILTNER A. Biodegradation of a polyurethane *in vitro*[J]. Journal of Biomedical Materials Research, 1987, 21(2): 231-246.
- [39] RUIZ C, MAIN T, HILLIARD NP, HOWARD GT. Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 1999, 43(1/2): 43-47.
- [40] AKUTSU-SHIGENO Y, ADACHI Y, YAMADA C, TOYOSHIMA K, NOMURA N, UCHIYAMA H, NAKAJIMA-KAMBE T. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 70(4): 422-429.
- [41] MAGNIN A, HOORNAERT L, POLLET E, LAURICHESSE S, PHALIP V, AVÉROUS L. Isolation and characterization of different promising fungi for biological waste management of polyurethanes[J]. Microbial Biotechnology, 2019, 12(3): 544-555.

(本文责编 郝丽芳)