

· 塑料生物降解资源的发掘 ·

陈小强 南京工业大学教授、博士生导师, 国际学术期刊 *Sensors and Actuators B: Chemical* 副主编, 国家优秀青年基金获得者。承担国家自然科学基金、国家重点研发计划、江苏省杰出青年基金等项目。以第一作者及通信作者在 *Chemical Reviews*、*Chemical Society Reviews*、*Accounts of Chemical Research*、*Nature Protocols*、*Journal of the American Chemical Society*、*Angewandte Chemie International Edition*、*Biomaterials*、*Biosensors and Bioelectronics*、*ACS Applied Materials & Interfaces*、*Chemical Communications*、*Organic Letters*、*Industrial & Engineering Chemistry Research* 等国际学术期刊发表文章 100 余篇, 他引 13 000 余次, 获授权专利 10 余项。2018–2021 年连续多年入选“中国高被引学者”榜单。



塑料生物降解检测方法的研究进展

王元波^{1,2}, 郑诗玥^{1,2}, 王凡^{1,2}, 彭俊倩^{1,2}, 周杰^{1,3}, 王芳^{1,2}, 姜岷^{1,3}, 陈小强^{1,2*}

1 南京工业大学 材料化学与工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816

2 南京工业大学化工学院, 江苏 南京 211816

3 南京工业大学生物制药与工程学院, 江苏 南京 211816

王元波, 郑诗玥, 王凡, 彭俊倩, 周杰, 王芳, 姜岷, 陈小强. 塑料生物降解检测方法的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1889-1911.

WANG Yuanbo, ZHENG Shiyue, WANG Fan, PENG Junqian, ZHOU Jie, WANG Fang, JIANG Min, CHEN Xiaoqiang. Advances in methods for detecting plastics biodegradation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1889-1911.

摘要: 塑料处理不当造成的污染问题已成为全球性难题。目前的解决办法除回收利用与使用可生物降解塑料替代之外, 最主要途径仍是寻求高效的塑料降解方法。其中, 采用微生物或酶处理塑料的方法因其具有条件温和、不产生次生环境污染的优势而受到越来越多的关注。塑料生物降解技术的核心是高效解聚微生物/酶, 然而当前的分析检测方法无法满足塑料生物降解资源的高效筛选, 因此开发准确、快速的塑料降解过程分析方法, 对于生物降解资源筛选和降解效能评价具有重要意义。本文介绍了近年来在塑料生物降解领域的常用分析检测技术, 包括高效液相色谱、红外光谱、凝胶渗透色谱以及透明圈测定等, 重点讨论了荧光分析策略在快速表征塑料生物降解过程中的应用, 为进一步规范塑料生物降解过程的表征与分析研究, 以及开发更高效的塑料生物降解资源筛选方法提供借鉴。

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2103600); 国家自然科学基金(31961133017, 22278224, 21978131)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103600) and the National Natural Science Foundation of China (31961133017, 22278224, 21978131).

*Corresponding author. E-mail: chenxq@njtech.edu.cn

Received: 2022-10-30; Accepted: 2023-01-31

关键词：塑料生物降解；荧光分析；降解酶；检测方法

Advances in methods for detecting plastics biodegradation

WANG Yuanbo^{1,2}, ZHENG Shiyue^{1,2}, WANG Fan^{1,2}, PENG Junqian^{1,2}, ZHOU Jie^{1,3},
WANG Fang^{1,2}, JIANG Min^{1,3}, CHEN Xiaoqiang^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Materials-oriented Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

2 College of Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

3 College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

Abstract: The pollution caused by improper handling of plastics has become a global challenge. In addition to recycling plastics and using biodegradable plastics, an alternative solution is to seek efficient methods for degrading plastics. Among them, the methods of using biodegradable enzymes or microorganisms to treat plastics have attracted increasing attention because of its advantages of mild conditions and no secondary environmental pollution. Developing highly efficient depolymerizing microorganisms/enzymes is the core for plastics biodegradation. However, the current analysis and detection methods cannot meet the requirements for screening efficient plastics biodegraders. It is thus of great significance to develop rapid and accurate analysis methods for screening biodegraders and evaluating biodegradation efficiency. This review summarizes the recent application of various commonly used analytical techniques in plastics biodegradation, including high performance liquid chromatography, infrared spectroscopy, gel permeation chromatography, and determination of zone of clearance, with fluorescence analysis techniques highlighted. This review may facilitate standardizing the characterization and analysis of plastics biodegradation process and developing more efficient methods for screening plastics biodegraders.

Keywords: biodegradation of plastics; fluorescence analysis; degrading enzyme; detection method

合成塑料是人工的高分子聚合分子^[1], 因其优越的性能, 在包装、建筑、汽车、电气电子、家庭、休闲体育、农业等领域得到广泛应用。常见的合成塑料类型包括聚乙烯(polyethylene, PE)、聚丙烯(polypropylene, PP)、聚苯乙烯(polystyrene, PS)、聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)、聚氨酯(polyurethane, PUR)、聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)、聚对苯二甲酸丁二醇酯(polybutylene

terephthalate, PBT)和聚酰胺(polyamide, PA)等^[1]。然而, 迄今人类生产了近 80 亿 t 塑料, 其中约 80%废塑料被焚烧、填埋或丢弃^[2], 造成了巨量碳资源浪费和严重环境污染, 威胁全球生态安全。因此, 在过去的几十年里, 越来越多的塑料降解方法被研究开发出来, 例如, 光催化降解、化学热降解和电催化降解等, 然而, 这些方法不仅需要消耗大量能量, 还存在降解不完全、产生二次污染等问题^[3]。塑料生物降解是

指在特定环境中,利用微生物或微生物产生的酶来降解塑料的方式。因其能耗低、降解条件温和、对环境友好,是理想的废塑料处置方法之一^[4]。而塑料生物降解资源的发掘和筛选,离不开对塑料降解过程的分析,特别是材料领域的分析技术也被应用于塑料降解领域,例如借助显微镜、失重测量等检测手段可获取直观、可量化的塑料降解信息。X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)和差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)可以通过塑料结晶度的变化来反映塑料降解过程;凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)和质谱(mass spectrometry, MS)等则通过塑料分子量的变化,反映塑料从大分子聚合物向小分子寡聚物的变化趋势。然而,这些技术尚不能满足塑料降解微生物/酶的高效筛选^[5]。荧光分析法因其高灵敏度和高时空分辨率,适用于高通量筛选塑料降解微生物。例如,利用基于微流控平台的荧光激活液滴分选(fluorescence-activated droplet sorting, FADS)已被开发用于塑料降解微生物的高通量筛选^[6];通过荧光标记蛋白酶,示踪塑料降解酶的催化过程^[7],为探索酶与塑料的反应机理提供新的技术手段。本文将对目前常用的塑料生物降解的表征与分析方法及其应用范围进行综述,并重点阐述荧光分析法在筛选塑料降解微生物或表征塑料降解/老化过程的重要应用潜力与价值,最后,对塑料生物降解检测方法的发展前景进行了展望。

1 塑料生物降解的检测与表征

塑料的生物降解主要包括解聚和矿化两个步骤。解聚^[8]指在各种因素(热、光、机械力等)影响下,高分子聚合物的分子链末端或中间某处断裂,聚合物裂解为单体和低聚物的过程,这会导致塑料的外观质地、物理化学性能和物

质结构组成发生变化。矿化指有机污染物(塑料)转化为矿物质,比如水、二氧化碳和无机盐等的过程,这会导致重量减轻和二氧化碳、甲烷等气体的释放^[9]。以上这些降解过程中的变化均可用于表征塑料的降解程度^[10]。本文对常用的塑料降解的检测方法进行归纳总结(表1)。

1.1 质量损失和气体释放

1.1.1 失重测量

失重测量^[53]被广泛用于塑料降解测试^[1]。在不同的环境条件下,塑料被分解并转化为CO₂或CH₄。重量的损失通常可直接表示塑料的矿化程度,这可以通过高精度天平直接测量。但重量减轻也可能是由于添加剂的释放导致的,使用¹⁴C等放射性同位素标记的聚合物,通过液体闪烁计数(liquid scintillation count, LSC)测量降解过程中放射性的变化,可以表征塑料的矿化过程^[54]。然而,放射性同位素标记的聚合物合成复杂,并非适用于所有塑料,且可能存在安全问题^[10]。

1.1.2 气体释放分析

此外,还可通过检测塑料降解过程中CO₂或CH₄产生量获得塑料矿化程度^[55]。在有氧条件下,微生物以塑料为碳源,产生的CO₂作为主要代谢物之一。因此,氧气的消耗(呼吸测试)^[56]或CO₂的形成(Sturm测试)是聚合物降解的良好指标,常使用气相色谱(gas chromatography, GC)或带有红外检测器的呼吸测定系统进行定量。此外,CH₄是作为微生物厌氧降解塑料的重要指标^[57],可以通过GC进行分析。

1.2 外观和质地的变化

降解过程中塑料外观和质地的变化,如塑料的颜色、光泽、雾度和黄度等,可以通过肉眼或者分光光度计等进行观察或测量。

1.2.1 透明圈测定

在塑料生物降解中,通过琼脂平板测试的

表 1 常用的塑料降解检测方法

Table 1 Commonly used methods for detecting plastics degradation

Detection methods	Mechanism	Applicable plastic types	Qualitative/Quantitative	Reference
Weight loss measurement	Plastic mineralization	PE, PET, PLA, PS, PBAT, PCL, PBS, PHB, PUR, etc.	Quantitative	[11-15]
Gas release	Plastic mineralization	PE, PET, etc.	Quantitative	[12]
Determination of zone of clearance	Plastic depolymerization	PET, PLA, PBS, PBAT, PHA, PCL, PBSA, etc.	Semiquantitative	[16-21]
Microscope (OM/SEM/AFM)	Surface morphology change of plastic	PE, PET, PLA, PBS, PS, PBAT, PHA, PBSA, PETG, etc.	Qualitative	[22-30]
X-ray diffraction (XRD)	Crystallinity change of plastic	PE, PCL, etc.	Qualitative	[31-32]
Differential scanning calorimetry (DSC)	Crystallinity change of plastic	PE, PCL, PLA, etc.	Quantitative	[32-33]
Thermogravimetric analysis (TGA)	Thermal performance change of plastic	PBAT, PLA, PCL, PS, etc.	Quantitative	[33-34]
Loss of mechanical performance	Mechanical performance change of plastic	PE, etc.	Qualitative	[35]
Hydrophobicity test	Hydrophobic change of plastic	PET, etc.	Qualitative	[12,17]
Surface charge analysis	Surface charge change of plastic	PE, PP, etc.	Qualitative	[36]
Gel permeation Chromatography (GPC)	Molecular weight change	PE, PLA, PCL, PBS, PHB, PS, PUR, PBAT, etc.	Quantitative	[37-38]
Mass spectrometry (MS)	Molecular weight change	PE, PET, PBAT, PBS, PLA, PCL, PHB, etc.	Qualitative	[39-40]
Liquid chromatography/ Gas chromatography (LC/GC)	Material composition change	PET, PBAT, PBS, PLA, PCL, PHB, etc.	Quantitative	[41-42]
Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)	Chemical bond change	PE, PET, PCL, PLA, PBAT, etc.	Semiquantitative	[43-44]
Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)	Chemical bond change	PET, etc.	Quantitative	[43]
Fluorescence detection	Change of fluorescent marker	PET, PBT, PBS, PBAT, PUR, etc.	Quantitative	[6,45-49, 50-52]

透明圈法^[1]是一种半定量方法。首先将塑料粉末作为能源物质涂布在琼脂平板上,此时琼脂平板是浑浊的,在接种微生物后,若菌落周围形成透明圈,表明微生物至少能够解聚聚合物,这是生物降解的第一步。该方法通常用于筛选可降解某种聚合物的生物体^[58],同时也可以通过分析透明带的生长来获得半定量结果^[59]。

1.2.2 显微镜分析

降解过程中塑料表面会出现裂缝、孔洞和凹槽纹理等,这些形貌的变化可以通过光学显微镜(optical microscope, OM)^[60]、扫描电子显微

镜(scanning electron microscope, SEM)^[61]和原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)^[62]等捕捉到。光学显微镜通过可见光和透镜系统来放大物体,其分辨率极限为 200–250 nm。SEM 使用聚焦的高能电子束作为探针,通过扫描材料表面生成样品图像,其分辨率可低至 1 nm^[63]。SEM 景深大,视野大,成像立体效果好。AFM 是一种扫描探针显微镜,通过检测微型力敏感元件和待测样品表面之间的极微弱的原子间相互作用力来研究物质的表面结构及性质,能够提供纳米级甚至亚纳米级的高分辨率图像,用

于表征塑料降解过程中表面形貌变化^[64]。

1.3 物理性质的变化

1.3.1 结晶度分析

在降解过程中,塑料的物理性质(如结晶度、热性质、和力学性质等)会发生改变。例如,塑料中的聚合物链以无定形或结晶形式存在,无定形聚合物链是无序的随机排列结构;而结晶聚合物链则是短程有序的规则结构。其中,结晶度反映了塑料中结晶聚合物链的比例,且决定其刚性和熔融温度(T_m)。在光降解的早期阶段能观察到塑料结晶度的增加,这是因为无定形区域通常更容易受到影响而优先降解^[65]。塑料的结晶度通常使用 X 射线衍射(XRD)^[66]和差示扫描量热法(DSC)^[67]来确定。X 射线衍射是通过其空间分布的方位和强度与晶体结构的密切关系来分析物质的结晶度,其可获得相对准确的聚合物结晶度信息,用于测量由于链堆积而导致的分子间顺序。DSC 是一种基于熔化聚合物所需热量来确定聚合物结晶度的快速方法。可以通过分析物与已知结晶度的聚合物所需热量的比值来评估结晶度百分比^[68]。

1.3.2 热稳定性分析

热稳定性是材料在热作用下保持其物质组成和机械性能稳定的能力,它可以通过热重分析(thermogravimetric analysis, TGA)^[69]来确定。该方法是在程序控制的温度下,测量物质的质量与温度或时间的关系。聚合物的热稳定性与其组成结构、结晶度和分子量有关。此外, TGA 可与傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)或质谱(MS)结合使用,同时测量塑料的热稳定性并表征其在热降解不同阶段产生的降解产物^[70]。

1.3.3 机械性能分析

机械性能的损失也被用作塑料降解的指标^[71]。拉伸性能(断裂伸长率和拉伸模量)以及剪切特

性(剪切强度和剪切模量)可以从应力-应变实验中得出结果^[53]。塑料的机械性能受其物质成分和结构的影响,例如分子量、结晶度、交联度和添加剂等。塑料降解时,其机械性能会发生退化^[72]。

1.3.4 其他物理性质分析

另外,塑料表面的一些特性变化,如疏水性、表面电荷等也能反映其降解过程。疏水性反映了塑料表面排斥水的能力,可以通过测角仪测量水滴与表面之间的接触角来确定。对于一些高度疏水的塑料,通过在聚合物链中引入亲水性官能团来降低疏水性以达到降解的目的,同时这有利于微生物的进攻^[73]。塑料表面上的电荷取决于聚合物中的端基和可电离部分的电离。研究发现原始 PE 在海水 pH 值下呈电中性,但风化的 PE 由于羰基的形成而带负电荷^[36]。表面电荷可以通过 zeta 电位分析或电位滴定进行测量。

1.4 物质结构组成的变化

1.4.1 凝胶渗透色谱(GPC)分析

降解导致合成塑料的断链和交联,直接影响其分子量的变化,可通过凝胶渗透色谱(GPC)^[74]检测其分子量分布。GPC 色谱柱中可供分子通行的路径有较大的凝胶间隙和较小的凝胶内通孔。当待测物随流动相流经色谱柱时,较大的分子(体积大于凝胶孔隙)只能从凝胶间隙通过,在孔中停留时间较短;较小的聚合物则需要花费更多的时间穿过凝胶通孔,故停留时间较长。GPC 的主要参数为数均分子量(M_n)、重均分子量(M_w)和分子量分布(molecular weight distribution, MWD)。按分子数目统计的平均分子量为数均分子量;而按重量统计的平均分子量为重均分子量;分子量分布是指不同分子量分子的分散程度。GPC 被广泛应用于测定高分子塑料在降解前后的分子量分布和平均分子量

的变化,可测分子量范围为 300–300 万,其可用于佐证塑料降解之后的重量损失或者产生的 CO₂ 是否是来自塑料高分子长链的解聚和降解^[75]。

1.4.2 质谱(MS)-气相(GC)/液相(LC)分析

质谱(MS)也可以用来检测塑料降解中产生的小分子化合物。质谱分析是一种测量离子质荷比(质量-电荷比)的分析方法,其基本原理是使试样中各组分在离子源中发生电离,生成不同质荷比的带电离子,经加速电场的作用,形成离子束,进入质量分析器^[76]。而随着高分辨率质谱(high resolution mass spectrometry, HRMS)的出现,如飞行时间(time of flight, TOF)、傅里叶变换离子回旋共振(Fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR)和静电场轨道阱(electrostatic field orbital trap)等,可实现更准确的质量测量,这有助于识别降解产物。

质谱还可以与气相色谱^[77](GC)或液相色谱(liquid chromatography, LC)结合来定量分析小分子降解产物和释放的添加剂。气相质谱联用(GC-MS)可以分析非极性和挥发性化合物,而液相质谱联用(LC-MS)通常用于分析极性和非挥发性化合物。

1.4.3 傅里叶变换红外光谱(FTIR)和核磁共振波谱(NMR)分析

傅里叶变换红外光谱(FTIR)^[78]和核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance, NMR)^[79],是检测聚合物分子键的有力工具。红外吸收光

谱是利用分子的振动(转动)能级跃迁吸收的红外光对物质进行定性、定量分析的方法。塑料的 FTIR 特征吸收谱带(表 2)常用于表征塑料和微塑料降解过程中的化学变化^[80]。羰基指数(carbonyl index, CI)的定义为羰基的吸收带面积与亚甲基的吸收带面积之比,可使用 FTIR 确定并用于指示聚合物的氧化水平^[81]。核磁共振波谱是利用具有磁性原子核的跃迁对射频辐射的吸收作用来定性、定量分析物质的方法,实质上是测量强磁场下有机化合物中核自旋的相互作用。核磁可以根据塑料降解前后的分子结构中的氢、碳等元素的化学环境的变化来反映降解过程。

1.4.4 荧光比色分析

近年来,荧光分析法得到越来越多的关注。分子在吸收能量后,电子从基态激发到激发态,激发态的电子会以两种形式返回基态,即非辐射跃迁和辐射跃迁。非辐射跃迁主要以热能形式传递给介质;而辐射跃迁则伴随着光子的发射,产生荧光或磷光。荧光是第一电子激发单重态产生辐射跃迁伴随的发光现象^[82]。荧光分析法因其高灵敏度、强特异性和良好的时空分辨率,而被广泛应用于生命科学^[83]、环境科学^[84]和材料科学^[85]等研究领域。荧光分析法也是表征塑料降解的一种重要手段,利用塑料降解前后与所加的荧光染料^[45]或探针分子^[46]反应,监测吸收或荧光变化表征降解过程,为塑料降

表 2 常见塑料聚合物的红外特征谱带

Table 2 Infrared characteristic bands of common plastic polymers

Plastic polymers	Abbreviation	Characteristic bands (cm ⁻¹)
Polyethylene	PE	2 919, 2 851, 1 467, 725
Polypropylene	PP	2 935, 2 917, 2 873, 2 845, 1 459, 1 377, 1 156, 971
Polyvinyl chloride	PVC	2 970, 2 911, 1 426, 1 334, 1 254, 1 099, 962, 693, 614
Polyamide	PA	3 299, 2 934, 2 858, 1 633, 1 540, 1 473, 1 276
Polyethylene terephthalate	PET	1 715, 1 504, 1 453, 1 408, 1 339, 1 241, 1 102, 1 015, 723
Polymethyl methacrylate	PMMA	1 730, 1 479, 1 443, 1 378, 1 268, 1 240, 1 190, 1 150, 844, 755

解提供一种高通量检测策略。目前荧光检测的应用主要集中于聚酯类塑料,分为两种策略:一种是酯酶识别策略,其机制是利用酯酶对于羧酸酯键的切割引起的探针荧光的变化来达到筛选酯酶的效果,这种策略大多将荧光团修饰在塑料寡聚物两端^[47]或直接在荧光团上连接小分子酯^[6],此时处于荧光猝灭状态,在被酶或微生物水解以后,释放出荧光;另一种是降解产物或其衍生物识别策略,其主要基于荧光探针与降解产物的反应,然而聚酯的主要降解产物(羧酸或醇)的识别探针难以设计,故目前的策略是识别降解产物的衍生产物,例如通过萤光素酶识别PET降解产物对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)还原产生的醛而产生生物发光^[48],或PET降解产物乙二醇(ethylene glycol, EG)在酮还原酶(ketoreductases, KREDs)和心肌黄酶的级联循环反应引起染料分子发生荧光变化^[49]。通过荧光法结合酶联免疫分析或微流控系统可以实现对塑料降解微生物的高通量筛选,这为塑料降解微生物资源的挖掘提供了有力工具。

1.5 分析方法的比较及适用的塑料种类

近年来,多种塑料降解的方法被开发并应用于实际的检测过程中,但是各方法针对不同的塑料降解检测依旧存在着明显的优劣。质量损失只能粗略地显示塑料在降解过程中质量的整体变化情况;气体释放是塑料矿化过程的重要标志,但其测量较复杂;显微镜等手段可以通过塑料外观的直观变化来分析其解聚过程,但其无法反映塑料分子结构的变化。上述3种分析方法几乎适用于所有种类的塑料,如PET^[6,12,25,28,86]、PE^[11,13-14,23-24,29]、聚乳酸(poly(lactic acid), PLA)^[15,17,26,33-34,37]、聚己二酸/对苯二甲酸丁二酯[poly(adipic acid)/butylene terephthalate, PBAT]^[17,26,34]、聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxy fatty acid ester, PHA)^[17,26]、聚丁二

酸丁二醇酯(polybutylene succinate, PBS)^[17,37]、聚丁二酸-己二酸丁二酯(polybutylene succinate adipate, PBSA)^[21]、PS^[22]、PET-乙二醇共聚物(PET-ethylene glycol copolymer, PETG)^[30]、聚己内酯(polycaprolactone, PCL)^[37]、聚羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)^[37]、PUR^[37]和PBT^[46]等。另外,通过XRD、DSC、TGA等方法分析材料各种性质的变化也可侧面反映降解过程,但不够直观,操作较复杂。XRD因其工作原理不适用于PS、PVC等非结晶型塑料,而在PE^[31]、PCL^[32]等结晶型或半结晶塑料的降解分析中则可以使用。DSC和TGA的操作过程涉及到高温,故需要避免塑料成分中含有硫、卤素等易产生腐蚀性气体的元素,不适用于PVC等塑料,但对于其他类型塑料,则比较通用,如PE^[14,23]、PS^[22]、PCL^[32]、PLA^[33-34]、PBAT^[34]等。塑料样品在溶剂中的溶解性能也大大影响分析检测方法的适用性,如透明圈测定、GPC、MS和LC等。透明圈测定是一种筛选塑料降解微生物的有效方法,然而其筛选效率较低,不适用于高通量筛选有效微生物。透明圈测定需要将塑料小颗粒涂布在琼脂平板上,其适用于PET^[16,19]、PLA^[17]、PBS^[17]、PBAT^[17]、PHA^[17]、PCL^[20]、PBSA^[21]等在水中溶解性差的塑料,而不适用于聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)等在水中溶解性良好且澄清透明的塑料。在GPC测试中,塑料需要在水、N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)或氯仿等溶剂中有较好溶解性,如聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)等溶解性差的塑料不可使用,而适用于PS^[22]、PE^[31,35]、PCL^[32,37]、PLA^[34,37]、PBAT^[34]、PBS^[37]、PHB^[37]、PUR^[37]等。由于塑料的主要成分是碳、氢、氧等,NMR和FTIR分析适用于大部分种类的塑料,如PE^[11,23,31,35]、PET^[12,43,86]、PCL^[32]、PLA^[33-34]、PBAT^[34]等。

MS 和 LC/GC 主要用于分析塑料降解产生的寡聚物或单体, 对其降解产物的溶解性或高温下稳定性有要求, 适用于 PE^[23,31]、PBAT^[39]、PCL^[39]、PHB^[39]、PLA^[39]、PBS^[39]和 PET^[41-42,49]等。GPC、NMR、FTIR、MS 和 LC/GC 等常用的仪器分析手段, 具有灵敏度高、分析速度快等优点, 但是样品处理比较麻烦。荧光比色分析具有灵敏度高、特异性强、时空分辨率高、分析检测速度快、操作简单等优势, 且可以结合微流控平台实现微生物的高通量筛选。荧光探针开发的关键在于精巧的分子结构设计, 从而使其兼具有高的灵敏度和选择性。荧光比色分析还处于起步阶段, 目前的研究主要集中于聚酯类塑料的降解分析, 如 PET^[6,48-50]、PBT^[46]、PUR^[47]、PBAT^[51]等, 其他种类塑料受其分子结构影响, 目前的研究暂时未发现理想的荧光分析策略。以上分析方法单一使用时存在局限性, 需要联合使用多种分析策略来获得更全面、准确的信息。

2 检测分析方法的应用

2.1 失重测量&气体释放

Khandare 等^[11]分离出 4 种能够降解低密度聚乙烯(low density polyethylene, LDPE)的海洋细菌菌株: H-237、H-255、H-256 和 H-265, 并以 LDPE 薄膜作为唯一碳源孵育 90 d。培养 30 d 后 LDPE 薄膜的干重损失分别为 1.0%、0.78%、0.22%和 0.46%, 培养 90 d 后的干重损失分别为 1.4%、1.72%、1.26%和 0.97%。结果表明, 与其他细菌分离物相比, 细菌分离株 H-237 和 H-255 在 30 d 和 90 d 明显表现出更高的 LDPE 重量损失, 而这正是 LDPE 膜中的碳被细菌消耗引起的。另外, LDPE 薄膜的生物降解也通过 SEM、AFM 和 FTIR 等分析方法得到证实。

Kumari 等^[12]发现海洋芽孢杆菌(marine

Bacillus sp. AIIW2)黏附生长在 PET 表面并引发其结构退化。为了确定其对标准 PET 薄膜的降解情况, 通过质量损失测定, 发现在 90 d 降解过程中, PET 的重量损失百分比一直在增加。然后通过估计 CO₂ 释放以证实细菌菌株 AIIW2 对 PET 的同化和矿化。发现在第 5、10、15、20、30 和 35 天时, PET 转化为 CO₂ (累积)分别为 11.78、41.50、74.29、96.16、116.49 和 128.07 mg CO₂ g/C。此外, 通过 SEM、FTIR 和水接触角测试等也验证了海洋芽孢杆菌 AIIW2 对 PET 的降解效果。

Khruengchai 等^[13]和 Joshi 等^[14]通过失重测量和 CO₂ 释放量分别评估了真菌和由多种细菌配制的细菌联合体对 LDPE 的降解能力。Beltrán-Sanahuja 等^[15]通过失重测量评估了常规材料和 PLA 材料在不同环境下(包括在透光/无光条件下模拟水柱环境及污染/无污染条件下模拟海底环境)一年中的降解情况, 发现材料的不同降解率主要取决于环境, 而光照或污染的影响较小。

2.2 透明圈测定&显微镜

Charnock^[16]介绍了一种基于琼脂平板培养的快速筛选方法, 用于探究嗜温细菌对于 PET 的水解活性。结果显示 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 (一种能降解并利用 PET 生长的细菌)的菌落周围可以观察到透明圈(图 1)。而其他 74 种菌株均未在琼脂中产生透明圈。与传统筛选 PET 水解活性的技术相比, 透明圈法具有简单、实用的特性, 可实现对环境样品中的生物降解资源进行高通量筛选。此外透明圈法还可用于在表达系统中克隆后的 PET 水解酶活性检验。

Shin 等^[17]改进了传统的琼脂板制备方法, 作者将可生物降解塑料的有机溶液和含菌株的环境样本喷洒在琼脂板上, 通过生产小尺寸和高表面积的塑料颗粒, 可以更快地形成透明区



图1 使用PET纳米颗粒乳液制备的琼脂平板上培养(30 °C, 72 h)的 *Ideonella sakaiensis* 201-F6, 在单个菌落周围可以看到透明圈^[16]

Figure 1 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 grown on an agar plate prepared using PET nanoparticle lotion (30 °C, 72 h), zones of clearance are visible around individual colonies^[16].

域和更高的透明度。作者同时使用PLA、PBS、PBAT和PHA筛选板分离出多个菌株。并且,通过SEM、水接触角分析和窄X射线光电子能谱(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)验证了上述菌株对塑料薄膜的生物降解作用。

Molitor 等^[18]使用短/中链的甘油三酯作为底物进行预筛选,进而采用聚酯底物进行透明圈测定,证明了来自受污染土壤和不同海洋栖息地的穿孔素假单胞菌(*Pseudomonas pertucinogena*)中的聚酯酶活性。Danson 等^[19]通过综合微生物基因组(integrated microbial genome, IMG)数据库检测和透明圈测定发现4种具有PET水解活性的酶。另外,还发现在海洋环境中,拟杆菌门是PET水解酶基因的主要宿主,而在陆地中主要是放线菌门或变形菌门。Oh 等^[20]通过PCL乳液琼脂板的透明圈测定发现了野生型南极念珠菌(*Candida antarctica*)的脂肪酶B变体CalB-658具有解聚PCL的活性。Ahmad 等^[21]通过琼脂板的透明圈测定证实了来自解多聚物奇异球菌(*Roseateles depolymerans* sp.) TB-87的2个编码酯酶 *Est-H* 和 *Est-L* 基因主导PBSA

的降解。

Wang 等^[22]发现栗树甲虫幼虫的肠道中含有一种不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) AnTc-1能够降解PS。他们通过SEM观察到在降解过程中有生物膜的形成,细菌细胞聚集并黏附在PS表面,且PS膜表面出现丰富的孔洞和凹坑,表明菌株AnTc-1能定殖在PS薄膜表面并将降解PS。另外,失重测量、TGA、GPC结果证实菌株AnTc-1对PS的降解能力。

Tarafdar 等^[23]报道了微塑料表面生物膜发育阶段的详细三维形态。他们通过SEM发现暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*) ATKU1在微塑料表面形成生物膜并在LDPE表面观察到明显的孔洞和凹坑,表明这些细菌具有利用LDPE作为碳源的能力。接着通过AFM展示了该菌株在LDPE薄膜表面的生物膜的3D发育模式,并发现在微生物处理后显著增加了LDPE表面的杨氏模量。同时,DSC、GPC、FTIR和FT-ICRMS分析也都验证了菌株ATKU1可降解LDPE。

Akarsu 等^[24]通过SEM图像分析对比了好热黄无氧芽孢杆菌(*Anoxybacillus flavithermus*) Gecek4s和坚硬芽孢杆菌(*Bacillus firmus*) ST5对两种不同尺寸的PE(50和150 μm)的生物降解能力,发现这两种微生物都能有效降解尺寸为50 μm的LDPE颗粒,而Gecek4s对大颗粒LDPE表现出更高的降解效率。Kosiorowska 等^[25]通过SEM发现改良的解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)在细胞外产生源自茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)的角质酶,表现出对PET的降解能力。Sintim 等^[26]通过SEM发现可生物降解塑料PBAT和PLA/PHA在18周的全面堆肥^[27]过程中会形成聚集的微米和纳米颗粒。Yoshida 等^[28]通过显微镜发现细菌 *I. sakaiensis* 201-F6能够使用PET作为其主要碳源。

Chen 等^[29]通过光谱图像融合策略分析了

PE 微塑料在自然环境中的降解程度。其主要过程为, 首先采用衰减全反射(attenuated total reflection, ATR)技术获得样品的光谱和图像数据集; 然后从中获取 ATR 光谱中最具代表性的羰基特征, 并从 ATR 图像中提取了形态学红绿蓝三通道(red, green and blue channels, RGB)颜色特征转换成 LAB 颜色空间坐标(L 为亮度标度、A 为红-绿标度、B 为蓝黄标度); 接着通过将光谱特征和形态特征与权重参数相结合, 构建融合模型; 最后使用融合模型预测外部样本。这是首次通过光谱图像融合模型对自然暴露的微塑料降解程度进行定性测量。

Schnitzler 等^[30]采用无透镜数字全息显微镜 (lens-less digital holographic microscope, LDHM)对 PETG 酶降解过程进行监测(图 2)。在 LDHM 图像中, PETG 样品的表面在 PETase 处理后变得粗糙, 并形成斑点和凹槽。幅度重建图像和相位图像显示出与阴影图像相似的结果,

其中在相位图像中更为明显。此外, 还通过超高效液相色谱(ultra high performance liquid chromatography, UHPLC)和 SEM 证实了此方法的合理性。

Guo 等^[86]利用分子动力学模拟及 SEM、固态核磁等方法证明了构象选择在生物催化塑料水解中的重要性。研究结果表明 *IsPETase* 中的单个氨基酸取代改变了其构象, 并影响了准备与离散底物构象结合的基态结构的相对丰度。通过实验展示了酶与塑料的结合过程, 并提供用于识别硅模拟支持的旁氏构象和反式构象的模型。这项研究强调了在塑料水解中匹配酶和底物构象的重要性, 还表明 PET 中的非标准反式构象是有利于降解的。

2.3 XRD/DSC&TGA&机械性能&表面性能

Gao 等^[31]发现真菌链格孢霉菌(*Alternaria alternata*) FB1 具有在 PE 薄膜上定殖的能力。通过 XRD 分析发现 28 d 菌株 FB1 处理的 PE 薄

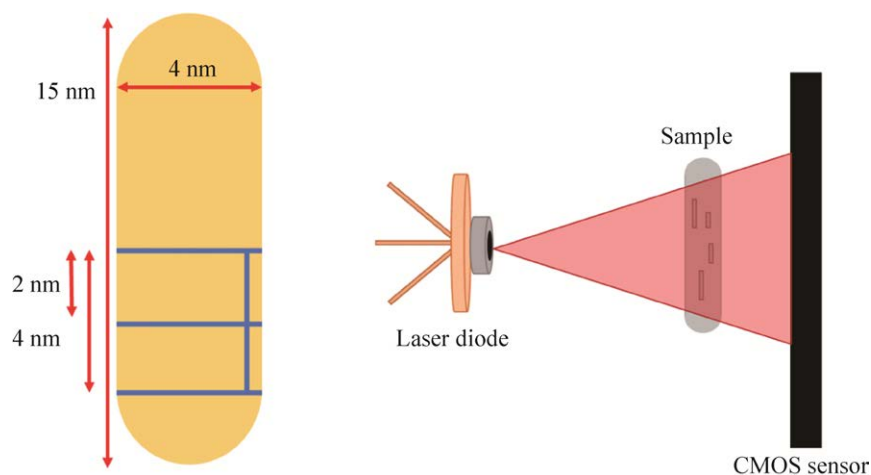


图 2 塑料样品示意图(左)和无透镜数字全息显微镜示意图(右)^[30] 示意图显示了激光标记的单尺寸塑料样品(左); LDHM 装置(右侧)由一个激光二极管组成, 该二极管以低于阈值的 12 mA 电流驱动, 波长为 650 nm, 照亮塑料样品, 衍射图案由 CMOS 传感器记录

Figure 2 Schematic illustration of the plastic sample (left) and of the lens-less digital holographic microscope (right)^[30]. The schematic illustration shows the laser marked plastic sample with single dimensions (left); The LDHM setup (right) consists of a laser diode driven by 12 mA current below threshold with a wavelength of 650 nm. The plastic sample is illuminated and the diffraction pattern is recorded by a CMOS sensor.

膜的相对结晶度从 62.79% 下降到 52.02%, 这表明真菌处理可以显著改变 PE 聚合物的分子排列结构。SEM、FTIR、GPC、GC-MS 的结果也证明了菌株 FB1 能够降解 PE 薄膜。

Shi 等^[32]比较了来自南极假丝酵母(*Candida antarctica*)的脂肪酶和来自茄病镰刀菌(*F. solani*)的角质酶对 PCL 的降解模式。使用热重(thermogravimetry, TG)和衍生热重(derivative thermogravimetry, DTG)分析发现角质酶降解的 PCL 薄膜的热稳定性几乎没有变化。脂肪酶降解 PCL 的 TG 和 DTG 曲线向较低温度区域移动, 表明 PCL 被降解为较低分子量的聚合物。DSC 和 XRD 分析发现 PCL 经角质酶降解后结晶度没有明显下降, 而经脂肪酶降解后结晶度明显下降。另外, 通过 FTIR 分析结果表明, 角质酶的降解 PCL 薄膜的方式是分层降解, 而脂肪酶是穿透降解。

Beltrán-Sanahuja 等^[33]通过 DSC 评估了常规材料和 PLA 材料在为期一年的模拟不同土壤情景下的降解情况。发现常规材料的融化焓变(ΔH_m)和羰基指数(CI)没有发生明显变化, 而在 PLA 材料中则观察到 CI 增加, 且在潮湿条件下增加更明显。同时, 该结果与失重测量和 FTIR 分析结果一致, 说明土壤等环境的湿度可能会影响材料的降解。Joshi 等^[14]运用 TG-DSC 分析证明了多种细菌配制的细菌联合体降解 LDPE 是先缓慢后快速的过程。Ruggero 等^[34]使用淀粉基聚合物 Mater-Bi[®](MB)、PBAT 和 PLA 进行模拟 20 d 的嗜热阶段和 40 d 的成熟阶段的堆肥测试。TGA 分析发现 MB 中淀粉组分 T_m 大幅下降, 主要是由淀粉降解所引起。同时, PLA 中由于发生了链降解, 所以 T_m 逐渐向较低温度转移。这些结果通过失重测量、SEM、FTIR 和 GPC 测试得到证实。

Xochitl 等^[35]发现模拟垃圾填埋场条件下, 高密度聚乙烯(high density polyethylene, HDPE)由于表面侵蚀, 断裂伸长率下降 13%。可氧化降解

的高密度聚乙烯(HDPE-OXO)由于其中的促氧化添加剂, 断裂伸长率下降 27%。然而, 通过 GPC 和 FTIR 分析发现 HDPE 和 HDPE-OXO 在实验前后发生的变化有限, 说明其只发生了有限的降解。

2.4 GPC、NMR、FTIR、MS&LC/GC

Nikolaivits 等^[37]通过失重测量和 GPC 研究了来自南极莫拉氏菌属(*Moraxella* sp.)的嗜冷酶(MoPE)对 PCL、PLA、PBS、PHB 和 PUR 的降解能力。PCL 在保持高分子量(M_n 仅减少 10.4%)的同时表现出最高的质量损失, 主要是由聚合物链末端的酯键裂解所导致。沿聚合物主链的随机断裂造成了 PLA 的 M_n 减少 10.3%; 而 PHB 主链发生裂解则导致 M_n 减少 46%, 重量损失 8.9%; MoPE 在 PBS 上的内切活性也很明显, M_n 减少达到 25%, 质量损失约为 5.3%; 同时, 测定 PU 的重量损失 3.9%, M_n 减少 4.1%。这些都证实 MoPE 是一种多功能的嗜冷聚酯酶, 具有较强的塑料降解能力。

Prudnikova 等^[38]通过 GPC 分析了西伯利亚北极地区低温土壤微生物群落降解塑料聚 3-羟基丁酸酯[poly-3-hydroxybutyrate, P(3HB)]的能力。研究发现在为期 15 个月的实验过程中, 北坡和南坡样本的 M_w 从 590 kDa 分别下降到 537 kDa 和 550 kDa, M_n 从 210 kDa 分别下降到 129 kDa 和 133 kDa, 多相分散指数(dispersion index, DPI)也从 2.8 增加到 4.14–4.16。这表明聚合物链发生了碎片化。

Roberts 等^[43]探究了从石油污染的土壤中分离的细菌联合体对 PET 的降解能力。通过 ATR-FTIR 分析发现紫外线预处理对 PET 塑料的生物降解有促进作用。在紫外线预处理后, 细菌联合体降解后的 PET 脂肪指数(I_{2958}/I_{1408})上升, 而羰基指数(I_{1713}/I_{1408})和酯键指数(I_{1089}/I_{1408})下降。核磁共振(1H NMR)结果观察到, 接种细菌的 PET 颗粒的波谱中产生了独特的甲基

(1.04 ppm 和 1.88 ppm)、乙二醇亚甲基(3.26 ppm 和 3.43 ppm)和羟基(2.28 ppm),表明细菌促使了 PET 塑料酯键的裂解。羧基吸收峰的出现也表明了这些细菌对 PET 的表面水解。这项研究验证了使用细菌联合体进行生物降解和生物回收 PET 塑料废物的可能性。

Niu 等^[44]通过 FTIR-ATR 分析发现城市河流沉积物中 0 至 50 cm 深度处微塑料的羰基特征峰的平均透射率(波长 1 900–1 600 cm^{-1})从第 1 层的 2.8%增加到第 5 层的 4.9%。这说明垂直河流沉积物中微塑料的浓度和尺寸变化可能与微生物降解微塑料有关。这项研究为城市河流沉积物中微塑料的垂直分布和潜在的微生物降解特性提供了新的见解。

Yan 等^[41]探究了工程化嗜热厌氧细菌热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)分泌表达的角质酶 LCC 在 60 °C 下对 PET 薄膜的降解能力,通过 HPLC 分析发现在培养 2 d 后就可检测到分解产物 TPA 和(2-羟乙基)对苯二甲酸酯(MHET)。上清液中 pH 值从 7.4 快速下降到 6.5,在 14 d 后缓慢连续下降到 6.2。研究结果证明,嗜热微生物是一种有应用前景的合成微生物底盘,可用于研究 PET 废物的生物降解过程。Kim 等^[42]通过 HPLC 分析发现莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) CC-124 异源表达的 PETase 对 PET

具有良好的降解活性。

Cho 等^[39]使用 GC-MS 分析芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) JY35 对 PBAT 薄膜的降解率,发现在培养 2 周内降解率先缓慢上升,然后迅速增加,培养 3 周后达到 50%。另外,芽孢杆菌 JY35 还可以降解 PBS、PCL、PLA、PHB、P(3HB-co-4HB)、P(3HB-co-3HV)等,表明其可用作优质的生物塑料降解剂。

Nasa 等^[40]应用一种基于选择离子流管质谱(selective ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS)的无损方法表征了从托斯卡纳北部沙滩收集的一组塑料碎片释放的挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOC)。通过主成分(principal component analysis, PCA)数据分析,将单个 SIFT-MS 光谱的解释和构成塑料碎片的老化聚合材料与其 VOC 排放曲线、降解水平和采样地点联系起来。这项方法能在 2 min 内获得塑料碎片的定性和定量信息。

2.5 荧光比色检测方法

Ebersbach 等^[50]在 2012 年报道了使用荧光检测法高通量筛选聚酯塑料的水解酶。PET 的主要水解产物对苯二甲酸酯通过与铁自氧化产生的羟基自由基反应可以转化为具有荧光的 2-羟基对苯二甲酸酯(2-hydroxyterephthalate, HOTP),从而进行定量测定(图 3)。通过 96 孔板

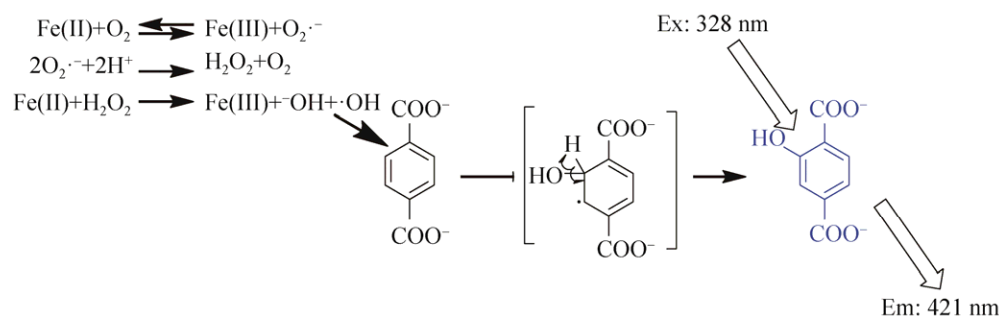


图 3 铁自氧化介导的对苯二甲酸酯羟基化生成荧光 2-羟基对苯二甲酸酯 HOTP 的示意图^[50]

Figure 3 Schematic illustration of the hydroxylation of terephthalate to fluorescent 2-hydroxyterephthalate (HOTP) mediated by iron autoxidation^[50].

中的荧光分析,测定了由嗜热放线菌(*Thermobifida fusca*) KW3 的聚酯水解酶催化 PET 薄膜和 PET 纳米颗粒所产生 TPA 的含量。这与 HPLC 方法获得的结果相同($R^2=0.99$),表明荧光测定法适用于聚酯水解酶的高通量筛选。该测定方法在不同的缓冲液浓度、反应时间、pH 值和蛋白质条件下都表现出较高的稳定性。

Shinozaki 等^[45]开发了一种简单快速的方法用来评估生物可降解塑料(biodegradable plastics, BPs, 包括 PBSA、PCL、PBS)的降解效果。将含有染料的 BPs 膜用作底物,反应 24 h 后酶溶液的颜色变化证实了由 BPs 降解引起的染料释放。主要步骤(图 4)为:(1) 通过浇铸的方法,在防水印刷载玻片上制备 BPs 薄膜(BPs 用尼罗蓝染色试剂溶解在二氯甲烷中,并干燥);(2) 在 BPs 膜上涂抹酶溶液;(3) 酶反应(30 °C, 24 h)(BPs 膜降解释放染料,反应液 OD_{600} 增加);(4) 将反应溶液收集到 96 孔微孔板中并测量 OD_{600} 。这种方法通过吸光度的变化来评估塑料的降解,其优势在于可以在短时间内快速分析大量的样品,有利于高效筛选 BPs 降解酶,且不仅可以分析纯酶,还可以分析粗酶溶液。他们使用测定总有机碳(total organic carbon, TOC)的方法验证了吸光度测试对 BPs 降解评估的可行

性。这项研究成功开发了一种快速且简单评估 BPs 酶促降解的方法。

Zumstein 等^[46]提出了一种筛选聚酯塑料水解酶的方法。其主要步骤是将荧光素二月桂酸酯(fluorescein dilaurate, FDL, 一种荧光酯底物)嵌入到聚酯基质中,并在聚酯酶促水解期间监测 FDL 酶促共水解为荧光素(图 5)。他们使用茄病镰刀菌(*F. solani*)的角质酶(FsC)水解含 FDL 的 PBT 薄膜并使用 pH-滴定、TOC 测定和失重测量验证了该方法的可行性。基于 FDL 的方法,通过酶标仪在不同温度下对 2 种真菌酯酶(FsC 和米根霉脂肪酶)水解 8 种脂肪族聚酯进行灵敏的高通量分析。虽然 2 种酶的水解速率都随着聚酯熔融温度和实验温度之间差异的减小而增加,但脂肪酶的这种趋势比角质酶更明显。温度依赖性聚酯链的柔韧性和酶活性位点的可及性共同决定了水解的速率趋势。这项工作突出了基于 FDL 的方法在酶促聚酯水解的筛选和机理研究中的应用能力。

Qiao 等^[6]开发了一种荧光激活液滴分选(FADS)的方法,用于高通量筛选 PET 降解微生物或酶。该流程包括 4 个步骤(图 6):(1) 通过液滴制造装置将微生物悬浮液以单细胞的方式封装在液滴中;(2) 将荧光探针荧光素二苯甲酸

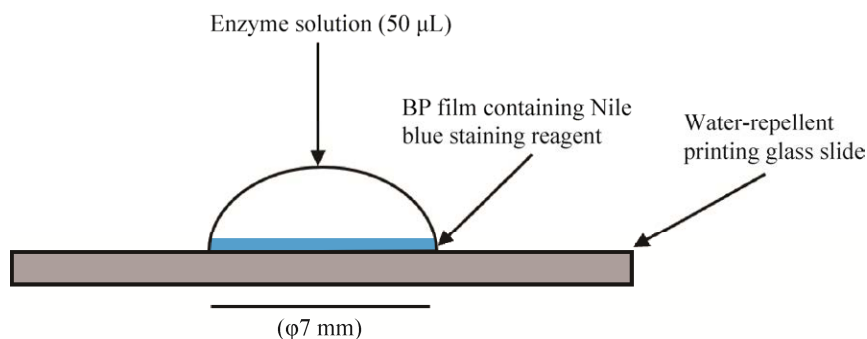


图 4 使用含染料的生物降解塑料薄膜评估相对降解活性示意图^[45]

Figure 4 Evaluation of the relative BPs-degradation activity using dye-containing BP films (dye-BP assay)^[45].

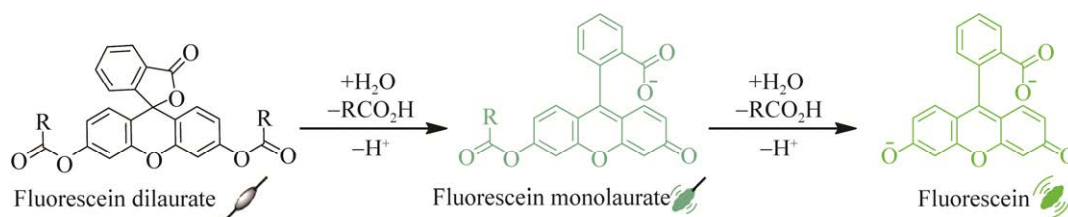


图 5 荧光探针二月桂酸荧光素(FDL)酶水解成荧光素示意图(其中荧光素单月桂酸酯作为中间水解产物)^[46]

Figure 5 Enzymatic hydrolysis of fluorescent probe fluorescein dilaurate (FDL) to fluorescein (with fluorescein monolaurate as the intermediate hydrolysis product)^[46].

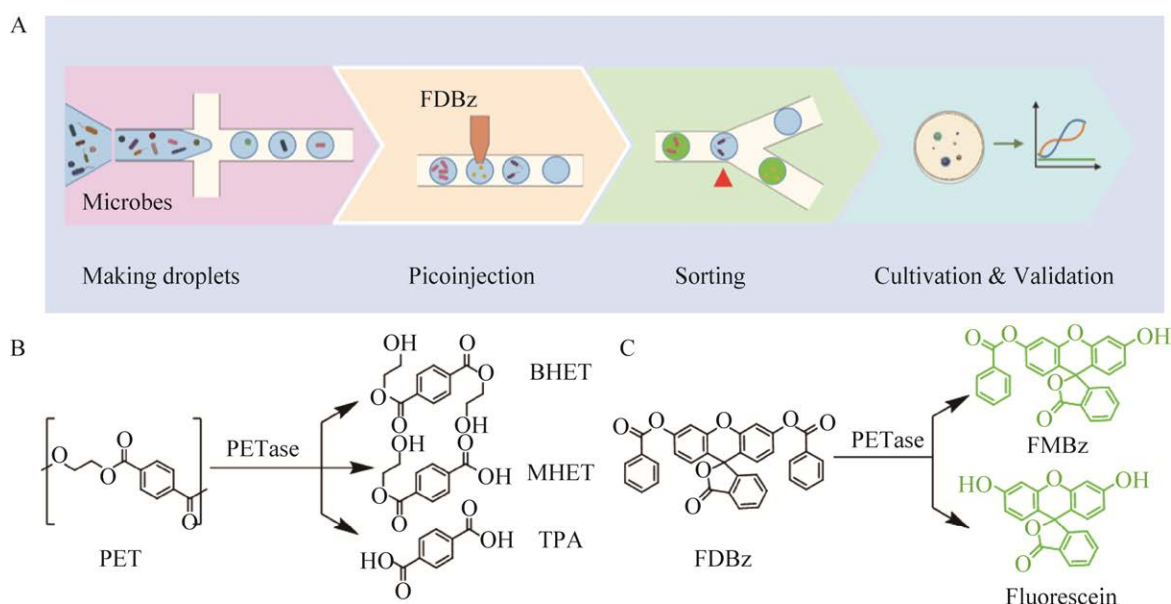


图 6 使用荧光素二苯甲酸酯(FDBz)作为荧光底物,通过液滴微流体对 PET 降解微生物进行分选的工作流程^[6] A: 分选程序,包括 PET 降解微生物的分离、培养和验证. B: PETases 对 PET 的生物降解会释放 MHET、双(2-羟乙基)对苯二甲酸酯(BHET)和 TPA. C: FDBz 水解释放带有绿色荧光的 FMBz 和荧光素

Figure 6 Workflow for sorting PET-degrading microorganisms by droplet microfluidics using fluorescein dibenzoate (FDBz) as a fluorogenic substrate^[6]. A: Sorting procedure including isolation, culture and validation of PET degrading microorganisms. B: Biodegradation of PET by PETases releases MHET, BHET and TPA. C: FDBz hydrolysis releases FMBz and fluorescein with green fluorescence.

酯(fluorescein dibenzoate, FDBz, PET 降解酶荧光探针)注射到液滴中;(3) 高通量分选,获得能够分解 FDBz 的微生物;(4) 分离鉴定阳性菌。他们将该系统用于筛选来自 PET 纺织厂的废水样品并成功地获得了 9 株 PET 降解菌株。其中活性最高的内生动球菌(*Kineococcus*

endophyticus) Un-5 和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) Un-C2-8 经过全基因组序列分析发现了 2 个可能的 PET 降解酶 S9_948 和 PHB, 通过酶活测定和 SEM 图像分析初步验证了它们对 PET 降解的能力。该方法将荧光探针的高特异性与液滴微流控的高通量分析特点结合,

为塑料降解微生物的筛选提供了好的思路。

Li 等^[51]为了实现可降解聚合物的生命周期监测,提出了一种三维荧光监测和量化方法,通过结合 PBAT 的固有共轭和探针标记的羧基,研究了其热降解和光热降解方法。PBAT 断裂酯键的主要产物是羧酸,可以使用 6-氨基荧光素(6-aminofluorescein, AF)分子标记。在 490 nm 的激发波长下,AF 分子在 515 nm 处显示出明亮的绿色发射。据报道,羧基可以被 N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)和 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]活化,与荧光探针的氨基反应形成酰胺^[52](图 7)。其过程为先将降解后的 PBAT 薄膜浸入 AF 溶液中进行超声处理。在薄膜的不同深度可以观察到荧光的均匀分布,说明 AF 已经渗透到薄膜中。用乙醇将未标记的 AF 洗掉,荧光背景消失。在 2D 图像中可以观察到具有 510–550 nm 波长范围内的荧光点,表明存在羧基。在不同的时间测量 AF 对羧基的标记率,发现在 15 min 内可以完成完整的标记过程。总之,利用荧光成像识别和监测可降解塑料的降解演变是一种灵敏且可靠的策略,并且可通过荧光图像定量评估不同降解途径的反应程度。

Gimeno-Pérez 等^[49]报道了一种微孔板荧光

筛选测定 PET 降解程度的策略。此策略基于酮还原酶(KREDs)和心肌黄酶(diaphorase)在 PET 降解产物存在下释放试卤灵的偶联反应。其主要过程首先是 PET 水解产物乙二醇(EG)被酮还原酶识别并氧化,而这个过程伴随着辅因子的还原($\text{NAD}^+/\text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADH}/\text{NADPH}$),接着辅因子会被心肌黄酶氧化以循环,伴随着无荧光的刃天青被还原为强荧光的试卤灵(图 8)。这项研究筛选了能够使用 PET 的结构单元 EG 作为底物的 6 种 KRED,其中最有效的是 KRED61。将 KRED61 与来自科氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)的心肌黄酶组合,监测了来自绿色糖单孢菌(*Saccharomonospora viridis*) AHK190 的热稳定角质酶突变体催化的 PET 降解反应。之后,采用 HPLC 定量分析 PET 降解产物,发现其与荧光法之间具有极好的相关性,证明了此荧光法的可靠性。

Bayer 等^[48]将羧酸还原酶(carboxylate reductase, CAR)和萤光素酶 LuxAB 结合在一起构建了一种互补的生物传感器工具。CAR 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中表达并将 TPA 转化为相应的二醛或单醛,而醛可以被来自发光光杆状菌(*Photobacterium luminescens*)的单加氧酶 LuxAB 生物传感器识别并产生生物发光。该策略被用于检测野生型聚酯水解酶 PES-H1 和 LCC 以及工程变体 LCC^{ICCG}催化 PET 降解产生

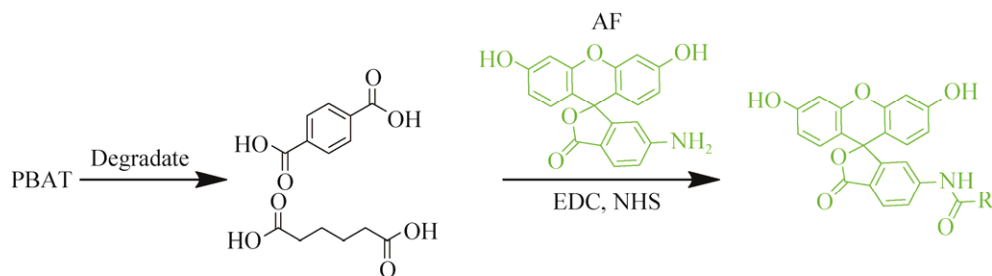


图 7 AF 标记 PBAT 水解产生的羧酸示意图^[51]

Figure 7 The carboxylic acid produced by hydrolysis of the AF-labeled PBAT^[51].

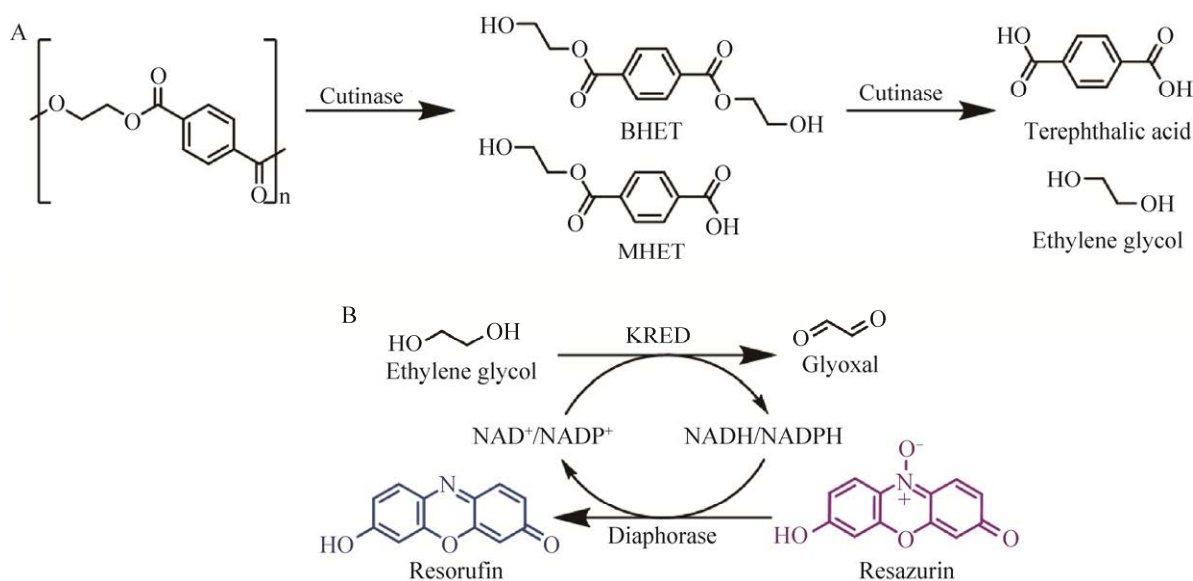


图 8 用于检测降解化合物的 PET 降解和偶联反应^[49] A: 角质酶对 PET 的生物降解释放出 BHET、MHET 及其单体, TPA 和 EG 等产物. B: 偶联反应基于酮还原酶(KRED)对 EG 的识别, 还原了可被心肌酶回收的辅因子, 从而将无荧光的刃天青还原为荧光分子试卤灵

Figure 8 PET degradation and conjugation reactions for detection of degrading compounds^[49]. A: Biodegradation of PET by cutinase releases products such as BHET, MHET and their monomers, TPA and ethylene glycol (EG). B: The coupling reaction is based on ketoreductase (KRED) recognition of EG. The reduced cofactors can be recycled by diaphorase, thereby reducing the non-fluorescent resazurin into the fluorescent molecule resorufin.

的 TPA, 且与 HPLC 分析结果一致, 这可以作为高通量筛选方法来评估 PET 水解酶活性。此外, CAR 催化的对苯二甲醛(p-benzaldehyde, TAL)合成与还原胺化级联反应实现了一锅法产生相应的二胺, 这为 PET 生物降解产生的 TPA 转化为产品提供了一种新策略(图 9)。

Xu 等^[47]提出了一种结合新型合成荧光聚氨酯类似物探针(fluorescent polyurethane analog probe, FPAP)以及基于液滴的微流体通过 FADS 来筛选 PUR 降解微生物的方法。其反应机理(图 10A)是 PFAP 通过将萘酰亚胺衍生物分子修饰到 PUR 单体的两侧。当 PFAP 被聚酯酶降解时, 2 个萘酰亚胺衍生物分子从 FPAP 中释放出来, 导致荧光强度显著增强。同时, PFAP 在区分聚酯酶和其他非活性酶方面具有很强的特异

性。FPAP 在微流控液滴系统中的应用表明, 该探针在选择含有 LCC 的阳性液滴时表现出高灵敏度和高效率(图 10B)。这种新型荧光探针 FPAP 与液滴微流体系统相结合, 可用于开发生物技术和环境应用的新型 PUR 生物降解催化剂。

3 总结与展望

当前国内外高度重视塑料生物降解的相关研究, 然而由于合成塑料在设计之初就具备结构致密、疏水性强、分子结晶度高、键能稳定等特点, 导致了其生物降解过程缓慢、降解效率低。迄今为止, 尽管已经证实了 PET、PA、PE、PS、PUR 等塑料可被微生物降解, 并发现了降解塑料的微生物或生物酶, 但是不同类型塑料研究进展差距较大, 且筛选到的降解菌株

降解效率有限。另一方面,塑料种类繁多、降解时间周期长以及降解效率低导致在研究的过程中现有的材料学表征手段无法满足塑料生物降解资源的高效筛选。因此,开发准确、快速的塑料降解过程分析方法对于生物降解资源筛选和降解效能评价具有重要意义。

塑料生物降解过程的检测,实质上是材料变化的表征,因而通过表征材料的方法可检测塑料降解的程度。目前研究塑料生物降解的表征技术手段存在较大的差异,难以横向比较,需要建立统一、系统化的塑料生物降解评价技术体系。同样或同类型的塑料在降解过程中的

变化都是类似的。例如:聚烯烃在降解过程中往往会产生羟基、羰基等亲水基团,这将导致亲水性的增加,可以通过测量水接触角进行检测。聚酯、聚酰胺塑料的降解则会伴随着酯键、酰胺键的断裂,基团的变化可以通过 FTIR、NMR 等验证。几乎所有的塑料降解都会导致高分子向小分子寡聚物的转变,这一特点又可以通过质谱、GPC 和 LC/GC 等捕捉到。塑料表面形貌的变化则可以通过显微镜观察到。另外,针对不同种类、不同形貌的塑料需要运用个性化的鉴定方法,例如对于 PVC,可基于其降解释放的氯来建立分析方法。

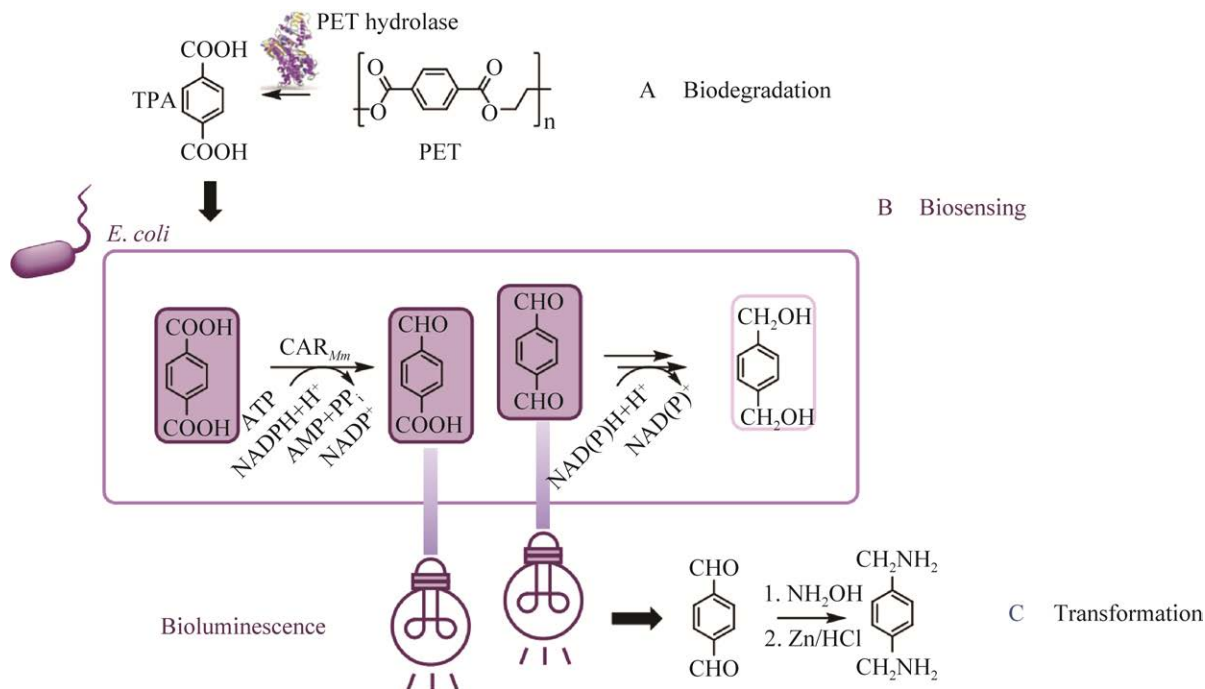


图9 用于检测大肠杆菌中 TPA 的酶联生物传感器^[48] A: 水解酶对 PET 的生物催化降解释放出单体分子,包括 TPA 和乙二醇。B: TPA 通过 CAR_{Mm} 还原为相应的二醛和单醛,被 LuxAB 识别,从而发出生物发光,内源酶进一步将醛还原为相应的伯醇。C: 反应性 TAL 通过还原胺化和基本后处理转化为二胺,作为进一步优化后的未来升级再循环的选择

Figure 9 Enzyme-linked biosensor for detection of TPA in *Escherichia coli*^[48]. A: The biocatalytic degradation of PET by hydrolase releases monomer molecules, including TPA and EG. B: TPA is reduced to the corresponding dialdehydes and monoaldehydes by CAR_{Mm} , which are recognized by LuxAB to emit bioluminescence, and the endogenous enzymes further reduce the aldehydes to the corresponding primary alcohols. C: Reactive TALs are converted to diamines by reductive amination and basic workup as an option for future upcycling after further optimization.

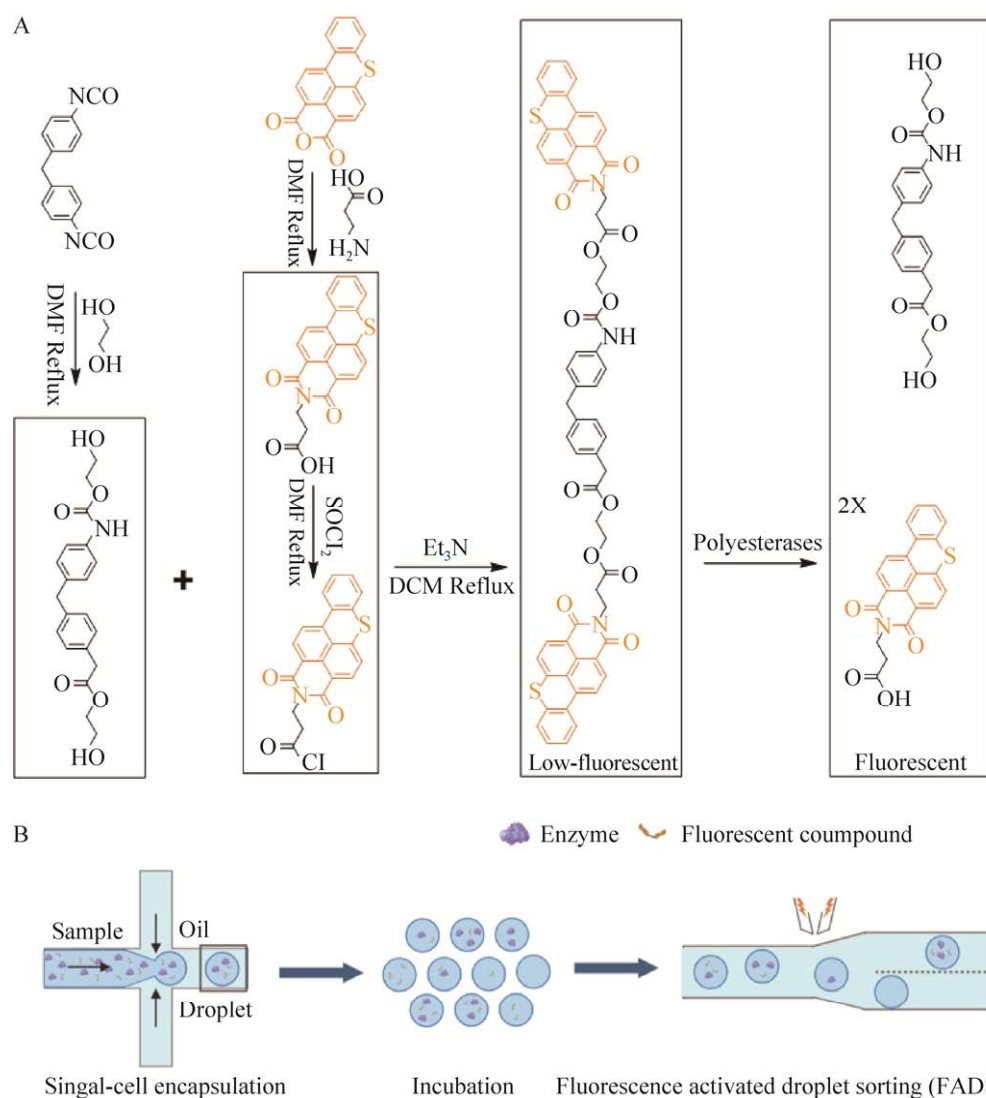


图 10 荧光聚氨酯类似物探针(FPAP)的合成及其识别与应用^[47] A: FPAP 识别聚酯酶过程. B: FPAP 在微流控液滴系统中的应用

Figure 10 Synthesis of fluorescent polyurethane analog probe (FPAP) and its identification and application^[47]. A: Synthesis of FPAP and its polyesterase hydrolysis process. B: Application of FPAP in microfluidic droplet system.

由于荧光传感法具有独特的检测方式,可用于原位实时监测塑料降解的过程,这为探究酶与塑料的反应机理提供可能,此外,还可以建立基于荧光传感的高通量筛选方法,例如结合微流控平台的 FADS 技术,为实现塑料降解微生物和酶的高效筛选提出新策略。但现有探针分子还存在设计困难等方面的问题,未来可从识

别策略方面进行改进,例如:基于类似于聚酯降解产物羟基醇的硫醇识别策略设计的荧光探针,或者基于氨基甲酸酯键断裂引起荧光释放的 PUR 解聚酶识别荧光探针。相信在不远的将来,荧光传感在塑料降解领域会有越来越多的应用研究。最后,随着各种检测方法的联合使用和不断完善,为进一步规范塑料生物降解过程的表征

与分析研究,以及开发更加高效的塑料生物降解资源筛选方法提供强有力的支撑。

REFERENCES

- [1] SHAH AA, HASAN F, HAMEED A, AHMED S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review[J]. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(3): 246-265.
- [2] HOU P, XU YF, TAIEBAT M, LASTOSKIE C, MILLER SA, XU M. Life cycle assessment of end-of-life treatments for plastic film waste[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 201: 1052-1060.
- [3] 杜灿, 于岸弘, 张颖, 高月, 刘倍汐, 叶慧敏, 孔亮. PET 塑料降解微生物的研究进展[J]. *广东化工*, 2022, 49(5): 82-83, 114.
- DU C, YU AH, ZHANG Y, GAO Y, LIU BX, YE HM, KONG L. Research progress of PET plastic degrading microorganisms[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2022, 49(5): 82-83, 114 (in Chinese).
- [4] 刘彤瑶, 辛艺, 刘杏忠, 吴冰, 向梅春. 微生物降解塑料的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(8): 2688-2702.
- LIU TY, XIN Y, LIU XZ, WU B, XIANG MC. Advances in microbial degradation of plastics[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(8): 2688-2702 (in Chinese).
- [5] EDWARDS S, LEÓN-ZAYAS R, DITTER R, LASTER H, SHEEHAN G, ANDERSON O, BEATTIE T, MELLIES JL. Microbial consortia and mixed plastic waste: pangenomic analysis reveals potential for degradation of multiple plastic types via previously identified PET degrading bacteria[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10): 5612.
- [6] QIAO YX, HU R, CHEN DW, WANG L, WANG ZY, YU HY, FU Y, LI CL, DONG ZY, WENG YX, DU WB. Fluorescence-activated droplet sorting of PET degrading microorganisms[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424: 127417.
- [7] LYU YT, CHEN XY, WANG Q, LI Q, WANG Q, LI XY, ZHU ZR, YAN CX, ZHAO XL, ZHU WH. Monitoring autophagy with Atg4B protease-activated aggregation-induced emission probe[J]. *Advanced Functional Materials*, 2022, 32(6): 2108571.
- [8] PENG BY, SUN Y, XIAO SZ, CHEN JB, ZHOU XF, WU WM, ZHANG YL. Influence of polymer size on polystyrene biodegradation in mealworms (*Tenebrio molitor*): responses of depolymerization pattern, gut microbiome, and metabolome to polymers with low to ultrahigh molecular weight[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(23): 17310-17320.
- [9] WU YH, LI TL, YANG LZ. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 107: 10-18.
- [10] TOSIN M, WEBER M, SIOTTO M, LOTT C, DEGLI INNOCENTI F. Laboratory test methods to determine the degradation of plastics in marine environmental conditions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 225.
- [11] KHANDARE SD, CHAUDHARY DR, JHA B. Marine bacterial biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) plastic[J]. *Biodegradation*, 2021, 32(2): 127-143.
- [12] KUMARI A, BANO N, BAG SK, CHAUDHARY DR, JHA B. Transcriptome-guided insights into plastic degradation by the marine bacterium[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 751571.
- [13] KHRUENGSAI S, SRIPAHCO T, PRIPDEEVECH P. Low-density polyethylene film biodegradation potential by fungal species from Thailand[J]. *Journal of Fungi(Basel, Switzerland)*, 2021, 7(8): 594.
- [14] JOSHI G, GOSWAMI P, VERMA P, PRAKASH G, SIMON P, VINITHKUMAR NV, DHARANI G. Unraveling the plastic degradation potentials of the plastsphere-associated marine bacterial consortium as a key player for the low-density polyethylene degradation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 425: 128005.
- [15] BELTRÁN-SANAHUJA A, CASADO-COY N, SIMÓ-CABRERA L, SANZ-LÁZARO C. Monitoring polymer degradation under different conditions in the marine environment[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 259: 113836.
- [16] CHARNOCK C. A simple and novel method for the production of polyethylene terephthalate containing agar plates for the growth and detection of bacteria able to hydrolyze this plastic[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2021, 185: 106222.
- [17] SHIN G, PARK SA, KOO JM, KIM M, LEE M, JEGAL J, HWANG SY, PARK J, OH DX. A micro-spray-based high-throughput screening system for bioplastic-degrading microorganisms[J]. *Green Chemistry*, 2021, 23(15): 5429-5436.
- [18] MOLITOR R, BOLLINGER A, KUBICKI S, LOESCHCKE A, JAEGER KE, THIES S. Agar

- plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by *Pseudomonas* species[J]. Microbial Biotechnology, 2020, 13(1): 274-284.
- [19] DANSO D, SCHMEISSER C, CHOW J, ZIMMERMANN W, WEI R, LEGGEWIE C, LI XZ, HAZEN T, STREIT WR. New insights into the function and global distribution of polyethylene terephthalate (PET)-degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(8): e02773-17.
- [20] OH JY, OH YR, KIM DM, EOM GT, SONG JK. Screening and efficient production of engineered lipase B from *Candida Antarctica* for eco-friendly recycling of waste polycaprolactone[J]. Polymer Degradation and Stability, 2022, 195: 109807.
- [21] AHMAD A, TSUTSUI A, IJIMA S, SUZUKI T, ALI SHAH A, NAKAJIMA-KAMBE T. Gene structure and comparative study of two different plastic-degrading esterases from *Roseateles depolymerans* strain TB-87[J]. Polymer Degradation and Stability, 2019, 164: 109-117.
- [22] WANG Z, XIN X, SHI XF, ZHANG YL. A polystyrene-degrading *Acinetobacter* bacterium isolated from the larvae of *Tribolium castaneum*[J]. Science of the Total Environment, 2020, 726: 138564.
- [23] TARAFDAR A, LEE JU, JEONG JE, LEE H, JUNG Y, OH HB, WOO HY, KWON JH. Biofilm development of *Bacillus siamensis* ATKU1 on pristine short chain low-density polyethylene: a case study on microbe-microplastics interaction[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 409: 124516.
- [24] AKARSU C, ÖZDEMİR S, OZAY Y, ACER Ö, DIZGE N. Investigation of two different size microplastic degradation ability of thermophilic bacteria using polyethylene polymers[J]. Environmental Technology, 2022: 1-11.
- [25] KOSIOROWSKA KE, BINIARZ P, DOBROWOLSKI A, LELUK K, MIROŃCZUK AM. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for poly(ethylene terephthalate) degradation[J]. Science of the Total Environment, 2022, 831: 154841.
- [26] SINTIM HY, BARY AI, HAYES DG, ENGLISH ME, SCHAEFFER SM, MILES CA, ZELENYUK A, SUSKI K, FLURY M. Release of micro- and nanoparticles from biodegradable plastic during *in situ* composting[J]. Science of the Total Environment, 2019, 675: 686-693.
- [27] 宋力, 赵晶晶, 王战勇, 苏婷婷. 生物降解塑料降解技术及其前景展望[J]. 塑料, 2020, 49(5): 88-91, 120. SONG L, ZHAO JJ, WANG ZY, SU TT. Biodegradable plastic degradation technology and the prospects[J]. Plastics, 2020, 49(5): 88-91, 120 (in Chinese).
- [28] YOSHIDA S, HIRAGA K, TAKEHANA T, TANIGUCHI I, YAMAJI H, MAEDA Y, TOYOHARA K, MIYAMOTO K, KIMURA Y, ODA K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)[J]. Science, 2016, 351(6278): 1196-1199.
- [29] CHEN X, XU M, YUAN LM, HUANG GZ, CHEN XJ, SHI W. Degradation degree analysis of environmental microplastics by micro FT-IR imaging technology[J]. Chemosphere, 2021, 274: 129779.
- [30] SCHNITZLER L, ZARZYCKI J, GERHARD M, KONDE S, REXER KH, ERB TJ, MAIER UG, KOCH M, HOFMANN MR, MOOG D. Lensless digital holographic microscopy as an efficient method to monitor enzymatic plastic degradation[J]. Marine Pollution Bulletin, 2021, 163: 111950.
- [31] GAO RR, LIU R, SUN CM. A marine fungus *Alternaria alternata* FB1 efficiently degrades polyethylene[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 431: 128617.
- [32] SHI K, JING J, SONG L, SU TT, WANG ZY. Enzymatic hydrolysis of polyester: degradation of poly(ϵ -caprolactone) by *Candida antarctica* lipase and *Fusarium solani* cutinase[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 144: 183-189.
- [33] BELTRÁN-SANAHUJA A, BENITO-KAESBACH A, SÁNCHEZ-GARCÍA N, SANZ-LÁZARO C. Degradation of conventional and biobased plastics in soil under contrasting environmental conditions[J]. Science of the Total Environment, 2021, 787: 147678.
- [34] RUGGERO F, ONDERWATER RCA, CARRETTI E, ROOSA S, BENALI S, RAQUEZ JM, GORI R, LUBELLO C, WATTIEZ R. Degradation of film and rigid bioplastics during the thermophilic phase and the maturation phase of simulated composting[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2021, 29(9): 3015-3028.
- [35] XOCHITL QP, MARÍA del CONSUELO HB, MARÍA del CONSUELO MS, ROSA MARÍA EV, ALETHIA VM. Degradation of plastics in simulated landfill conditions[J]. Polymers, 2021, 13(7): 1014.
- [36] FOTOPOULOU KN, KARAPANAGIOTI HK. Surface

- properties of beached plastic pellets[J]. Marine Environmental Research, 2012, 81: 70-77.
- [37] NIKOLAIVITS E, TAXEIDIS G, GKOUNTELA C, VOUYIOUKA S, MASLAK V, NIKODINOVIC-RUNIC J, TOPAKAS E. A polyesterase from the Antarctic bacterium *Moraxella* sp. degrades highly crystalline synthetic polymers[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 434: 128900.
- [38] PRUDNIKOVA SV, EVGRAFOVA SY, VOLOVA TG. Metabolic activity of cryogenic soils in the subarctic zone of *Siberia* towards “green” bioplastics[J]. Chemosphere, 2021, 263: 128180.
- [39] CHO JY, LEE PARK S, KIM SH, JUNG HJ, CHO DH, KIM BC, BHATIA SK, GURAV R, PARK SH, PARK K, YANG YH. Novel Poly(butylene adipate-co-terephthalate)-degrading *Bacillus* sp. JY35 from wastewater sludge and its broad degradation of various bioplastics[J]. Waste Management, 2022, 144: 1-10.
- [40] NASA JL, LOMONACO T, MANCO E, CECCARINI A, FUOCO R, CORTI A, MODUGNO F, CASTELVETRO V, DEGANI I. Plastic breeze: volatile organic compounds (VOCs) emitted by degrading macro- and microplastics analyzed by selected ion flow-tube mass spectrometry[J]. Chemosphere, 2021, 270: 128612.
- [41] YAN F, WEI R, CUI Q, BORNSCHEUER UT, LIU YJ. Thermophilic whole-cell degradation of polyethylene terephthalate using engineered *Clostridium thermocellum*[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(2): 374-385.
- [42] KIM JW, PARK SB, TRAN QG, CHO DH, CHOI DY, LEE YJ, KIM HS. Functional expression of polyethylene terephthalate-degrading enzyme (PETase) in green microalgae[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 97.
- [43] ROBERTS C, EDWARDS S, VAGUE M, LEÓN-ZAYAS R, SCHEFFER H, CHAN G, SWARTZ NA, MELLIES JL. Environmental consortium containing *Pseudomonas* and *Bacillus* species synergistically degrades polyethylene terephthalate plastic[J]. mSphere, 2020, 5(6): e01151-20.
- [44] NIU LH, LI YY, LI Y, HU Q, WANG C, HU JX, ZHANG WL, WANG LF, ZHANG C, ZHANG HJ. New insights into the vertical distribution and microbial degradation of microplastics in urban river sediments[J]. Water Research, 2021, 188: 116449.
- [45] SHINOZAKI Y, WATANABE T, NAKAJIMA-KAMBE T, KITAMOTO HK. Rapid and simple colorimetric assay for detecting the enzymatic degradation of biodegradable plastic films[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(1): 111-114.
- [46] ZUMSTEIN MT, KOHLER HP E, McNEILL K, SANDER M. High-throughput analysis of enzymatic hydrolysis of biodegradable polyesters by monitoring cohydrolysis of a polyester-embedded fluorogenic probe[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(8): 4358-4367.
- [47] XU AM, LIU JW, CAO SX, XU B, GUO CZ, YU ZY, CHEN XQ, ZHOU J, DONG WL, JIANG M. Application of a novel fluorogenic polyurethane analogue probe in polyester-degrading microorganisms screening by microfluidic droplet[J]. Microbial Biotechnology, 2023, 16(2): 474-480.
- [48] BAYER T, PFAFF L, BRANSON Y, BECKER A, WU SK, BORNSCHEUER UT, WEI R. Biosensor and chemo-enzymatic one-pot cascade applications to detect and transform PET-derived terephthalic acid in living cells[J]. iScience, 2022, 25(5): 104326.
- [49] GIMENO-PÉREZ M, FINNIGAN JD, ECHEVERRIA C, CHARNOCK SJ, HIDALGO A, MATE DM. A coupled ketoreductase-diaphorase assay for the detection of polyethylene terephthalate-hydrolyzing activity[J]. ChemSusChem, 2022, 15(9): e202102750.
- [50] EBERSBACH H, GEISSE S. Antigen generation and display in therapeutic antibody drug discovery: a neglected but critical player[J]. Biotechnology Journal, 2012, 7(12): 1433-1443.
- [51] LI YJ, TIAN R, WANG PL, LI KT, LU C. Fluorescence monitoring of the degradation evolution of aliphatic polyesters[J]. Chemical Communications (Cambridge, England), 2022, 58(63): 8818-8821.
- [52] ZHANG ZK, TIAN R, LIN DL, WU DZ, LU C, DUAN X. Three-dimensional fluorescent imaging to identify multi-paths in polymer aging[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(29): 10301-10309.
- [53] ZHANG K, HAMIDIAN AH, TUBIĆ A, ZHANG Y, FANG JKH, WU CX, LAM PKS. Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: a review[J]. Environmental Pollution, 2021, 274: 116554.
- [54] WAN JJ, LIU XM, WU CX, WU YH. Nutrient capture and recycling by periphyton attached to modified agrowaste carriers[J]. Environmental Science and

- Pollution Research, 2016, 23(8): 8035-8043.
- [55] ROSE RS, RICHARDSON KH, LATVANEN EJ, HANSON CA, RESMINI M, SANDERS IA. Microbial degradation of plastic in aqueous solutions demonstrated by CO₂ evolution and quantification[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(4): 1176.
- [56] HOFFMANN J, ŘEZNÍČEKOVÁ I, VAŇŮKOVÁ S, KUPEC J. Manometric determination of biological degradability of substances poorly soluble in aqueous environments[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 1997, 39(4): 327-332.
- [57] CUCINA M, SOGGIA G, de NISI P, GIORDANO A, ADANI F. Assessing the anaerobic degradability and the potential recovery of biomethane from different biodegradable bioplastics in a full-scale approach[J]. Bioresource Technology, 2022, 354: 127224.
- [58] NISHIDA H, SUZUKI S, TOKIWA Y. Distribution of poly(β -propiolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments[J]. Journal of Environmental Polymer Degradation, 1998, 6(1): 43-58.
- [59] NABEOKA R, SUZUKI H, AKASAKA Y, ANDO N, YOSHIDA T. Evaluating the ready biodegradability of biodegradable plastics[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2021, 40(9): 2443-2449.
- [60] SPENCER M. Modern light microscopy[J]. Nature, 1981, 292(5818): 9-10.
- [61] CREWE AV. Scanning electron microscopes: is high resolution possible?[J]. Science, 1966, 154(3750): 729-738.
- [62] PRATER CB, BUTT HJ, HANSMA PK. Atomic force microscopy[J]. Nature, 1990, 345(6278): 839-840.
- [63] TSIPER S, DICKER O, KAIZERMAN I, ZOHAR Z, SEGEV M, ELDAR YC. Sparsity-based super resolution for SEM images[J]. Nano Letters, 2017, 17(9): 5437-5445.
- [64] LIU YY, ZHANG TZ, ZHOU YB, LI JP, LIANG XY, ZHOU NN, LV JD, XIE J, CHENG FR, FANG YL, GAO YF, WANG N, HUANG B. Visualization of perforin/gasdermin/complement-formed pores in real cell membranes using atomic force microscopy[J]. Cellular & Molecular Immunology, 2019, 16(6): 611-620.
- [65] JABARIN SA, LOFGREN EA. Photooxidative effects on properties and structure of high-density polyethylene[J]. Journal of Applied Polymer Science, 1994, 53(4): 411-423.
- [66] BARGHEER M, ZHAVORONKOV N, GRITSAI Y, WOO JC, KIM DS, WOERNER M, ELSAESSER T. Coherent atomic motions in a nanostructure studied by femtosecond X-ray diffraction[J]. Science, 2004, 306(5702): 1771-1773.
- [67] ZHENG QJ, ZHANG YF, MONTAZERIAN M, GULBITEN O, MAURO JC, ZANOTTO ED, YUE YZ. Understanding glass through differential scanning calorimetry[J]. Chemical Reviews, 2019, 119(13): 7848-7939.
- [68] ANDRADY AL. The plastic in microplastics: a review[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 119(1): 12-22.
- [69] ERDEY L, PAULIK F, PAULIK J. Differential thermogravimetry[J]. Nature, 1954, 174(4436): 885-886.
- [70] PEÑALVER R, ARROYO-MANZANARES N, LÓPEZ-GARCÍA I, HERNÁNDEZ-CÓRDOBA M. An overview of microplastics characterization by thermal analysis[J]. Chemosphere, 2020, 242: 125170.
- [71] SELKE S, AURAS R, ANH NGUYEN T, CASTRO AGUIRRE E, CHERUVATHUR R, LIU Y. Evaluation of biodegradation-promoting additives for plastics[J]. Environmental Science & Technology. 2015, 49(6): 3769-3777.
- [72] ARHANT M, LE GALL M, LE GAC PY, DAVIES P. Impact of hydrolytic degradation on mechanical properties of PET-towards an understanding of microplastics formation[J]. Polymer Degradation and Stability, 2019, 161: 175-182.
- [73] WILKES RA, ARISTILDE L. Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(3): 582-593.
- [74] BLY DD. Gel permeation chromatography[J]. Science, 1970, 168(3931): 527-533.
- [75] YANG J, YANG Y, WU WM, ZHAO J, JIANG L. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(23): 13776-13784.
- [76] FENN JB, MANN M, MENG CK, WONG SF, WHITEHOUSE CM. Electrospray ionization-principles and practice[J]. Mass Spectrometry Reviews, 1990, 9(1): 37-70.
- [77] MOKRUSHIN SG. Definition of chromatography[J].

- Nature, 1956, 178(4544): 1244-1245.
- [78] GRIFFITHS PR. Fourier transform infrared spectrometry[J]. Science, 1983, 222(4621): 297-302.
- [79] LEVY GC, CRAIK DJ. Recent developments in nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Science, 1981, 214(4518): 291-299.
- [80] KÄPPLER A, FISCHER D, OBERBECKMANN S, SCHERNEWSKI G, LABRENZ M, EICHHORN KJ, VOIT B. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy: FTIR, Raman or both?[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(29): 8377-8391.
- [81] TER HALLE A, LADIRAT L, MARTIGNAC M, MINGOTAUD AF, BOYRON O, PEREZ E. To what extent are microplastics from the open ocean weathered?[J]. Environmental Pollution, 2017, 227: 167-174.
- [82] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2006.
- XU JG, WANG ZB. Fluorimetry[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2006 (in Chinese).
- [83] XIAO Y, QIAN XH. Substitution of oxygen with silicon: a big step forward for fluorescent dyes in life science[J]. Coordination Chemistry Reviews, 2020, 423: 213513.
- [84] SANTANDER MV, MITTS BA, PENDERGRAFT MA, DINASQUET J, LEE C, MOORE AN, CANCELADA LB, KIMBLE KA, MALFATTI F, PRATHER KA. Tandem fluorescence measurements of organic matter and bacteria released in sea spray aerosols[J]. Environmental Science & Technology, 2021, 55(8): 5171-5179.
- [85] TAN FC, ZHA L, ZHOU Q. Assembly of AIEgen-based fluorescent metal-organic framework nanosheets and seaweed cellulose nanofibrils for humidity sensing and UV-shielding[J]. Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla), 2022, 34(28): e2201470.
- [86] GUO BY, VANGA SR, LOPEZ-LORENZO X, SAENZ-MENDEZ P, ERICSSON SR, FANG Y, YE XC, SCHRIEVER K, BÄCKSTRÖM E, BIUNDO A, ZUBAREV RA, FURÓ I, HAKKARAINEN M, SYRÉN PO. Conformational selection in biocatalytic plastic degradation by PETase[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(6): 3397-3409.

(本文责编 陈宏宇)