

• 塑料解聚酶的设计与改造 •

闫新 南京农业大学生命科学学院微生物学系教授，主要研究方向为微生物降解、芽孢杆菌蛋白表达系统以及甲烷氧化菌同化甲烷的分子机理。在 *Applied and Environmental Microbiology*、*Environmental Microbiology*、*Biotechnology and Bioengineering* 等国际专业期刊发表学术论文 70 余篇。



一株聚酯型聚氨酯降解菌高地芽孢杆菌 YX8-1 的分离及鉴定

曾彩婷，纪俊宾，丁方慧，李周坤，曹慧，崔中利，闫新*

南京农业大学生命科学学院，江苏 南京 210095

曾彩婷, 纪俊宾, 丁方慧, 李周坤, 曹慧, 崔中利, 闫新. 一株聚酯型聚氨酯降解菌高地芽孢杆菌 YX8-1 的分离及鉴定[J]. 生物工程学报, 2023, 39(5): 1976-1986.

ZENG Caiting, JI Junbin, DING Fanghui, LI Zhoukun, CAO Hui, CUI Zhongli, YAN Xin. Isolation and identification of a polyester-polyurethane degrading bacterium *Bacillus altitudinis* YX8-1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(5): 1976-1986.

摘 要：聚氨酯(polyurethane, PUR)塑料在日常生活中发挥着重要作用，但同时 PUR 废弃物也带来严重的环境污染问题。生物(酶)降解是一种环境友好、成本低廉的 PUR 废弃物回收方法，其关键在于获得高效的降解菌株或酶。本研究从垃圾填埋场的聚氨酯废弃物表面分离出了一株聚酯型 PUR 降解菌株 YX8-1。基于菌落和显微形态观察、16S rDNA 和 DNA 旋转酶(DNA gyrase)基因 *gyrA* 系统发育分析及基因组序列比对，将该菌鉴定为高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*)。高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)及液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)结果显示菌株 YX8-1 能降解自行合成的聚酯型 PUR 寡聚物(PBA-PU)，并产生单体化合物 4,4'-亚甲基二苯胺。此外，菌株 YX8-1 能在 30 d 内使商品化的聚酯型 PUR 海绵失重 32%。本研究为 PUR 废弃物的生物降解提供了菌株资源，也为挖掘相关降解酶打下了基础。

关键词：聚氨酯塑料；生物降解；塑料废弃物回收；高地芽孢杆菌

资助项目：国家重点研发计划(2021YFC2103600)；南京农业大学大学生创新训练项目计划(202210307004Z)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2103600) and the Student Research Training Project of Nanjing Agricultural University (202210307004Z).

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

Received: 2023-01-05; Accepted: 2023-03-20

Isolation and identification of a polyester-polyurethane degrading bacterium *Bacillus altitudinis* YX8-1

ZENG Caiting, JI Junbin, DING Fanghui, LI Zhoukun, CAO Hui, CUI Zhongli, YAN Xin*

College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: Although polyurethane (PUR) plastics play important roles in daily life, its wastes bring serious environmental pollutions. Biological (enzymatic) degradation is considered as an environmentally friendly and low-cost method for PUR waste recycling, in which the efficient PUR-degrading strains or enzymes are crucial. In this work, a polyester PUR-degrading strain YX8-1 was isolated from the surface of PUR waste collected from a landfill. Based on colony morphology and micromorphology observation, phylogenetic analysis of 16S rDNA and *gyrA* gene, as well as genome sequence comparison, strain YX8-1 was identified as *Bacillus altitudinis*. The results of high performance liquid chromatography (HPLC) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) showed that strain YX8-1 was able to depolymerize self-synthesized polyester PUR oligomer (PBA-PU) to produce a monomeric compound 4,4'-methylene diphenylamine. Furthermore, strain YX8-1 was able to degrade 32% of the commercialized polyester PUR sponges within 30 days. This study thus provides a strain capable of biodegradation of PUR waste, which may facilitate the mining of related degrading enzymes.

Keywords: polyurethane plastics; biodegradation; plastic waste recycling; *Bacillus altitudinis*

聚氨酯(polyurethane, PUR)由多元醇和异氰酸酯聚合而成,改变多元醇、异氰酸酯的种类及其比例将合成不同的 PUR,根据多元醇类型的不同可大致将 PUR 区分为聚酯型和聚醚型两类^[1-2]。PUR 塑料因其耐用性和生产成本低等优点被广泛应用于建筑、生物医药、服饰、家电和交通等领域。此外 PUR 塑料常用于生产海绵,良好的保护和缓冲特性使其成为包装、汽车、建筑、医疗保健和运动等领域的优良选择^[3]。PUR 塑料的生产始于 20 世纪 40 年代,据统计 2020 年我国 PUR 产量达到 1 450 万 t^[4]。伴随着 PUR 的大量使用,产生的 PUR 废弃物堆积在自然环境中使得海洋和土壤受到严重污染,危害动植物及人类健康。由于 PUR 废弃物在自然环境中降解缓慢且难以回收利用,导致绝大部分 PUR 废弃物被送往垃圾场进行填埋及焚

烧,造成了资源的浪费且产生的有毒气体将危害人体健康^[5]。此外, PUR 废弃物经磨损或某些化学过程处理后将产生直径小于 5 mm 的微塑料。据报道,微塑料被某些动物食用后将通过食物链传播至人体内威胁海洋生物及人类的生存^[6],目前已在人类器官及胎盘中检测到微塑料的存在。因此,急需寻找高效的 PUR 废弃物处理方法。

常用的 PUR 废弃物处理方法主要包括焚烧、填埋、机械回收、化学处理及生物降解^[7]。其中利用微生物或酶进行生物降解是公认的安全环保的方法^[8],目前已报道多株 PUR 降解菌株。例如, Khan 等^[9]分离出一株塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*),将该菌与聚酯型 PUR 薄膜在含 2% (质量体积分数)葡萄糖的无机盐培养基中孵育 2 个月后,聚酯型 PUR 薄膜被降

解成小块,降解率高达 90%。Álvarez-Barragán 等^[10]分离出 8 株 PUR 降解菌株,其中细枝孢霉(*Cladosporium tenuissimum*) A2.PP.5 在 21 d 内降解了 65.3%不含阻燃剂的聚酯型 PUR 海绵。此外,酵母、黄曲霉和青霉等也被报道具有 PUR 降解能力^[11-14]。然而,目前分离到的 PUR 降解菌株中大部分为真菌,有关细菌降解 PUR 的报道相对较少,且降解效果相对较差。Shah 等^[15]分离出枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) MZA-75 及铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) MZA-85,将 2 株菌单独培养时 30 d 内聚酯型 PUR 降解率为 20%,混合培养时聚酯型 PUR 降解率为 40%。Roy 等^[16]从固体废弃物处理厂采集的土样中分离出假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) AKS31,该菌能在 10 d 内降解约 70%的聚酯型 PUR 薄膜,且通过高效液相色谱可检测到产物二甘醇。

在 PUR 降解酶的挖掘方面,Akutsu 等^[17]从菌株食酸丛毛单胞菌(*Comamonas acidovorans*) TB-35 克隆出基因 *pudA*,其编码的酯酶能够水解聚酯型 PUR 的酯键,生成二甘醇和己二酸。Stern 等^[18]和 Howard 等^[19]分别从绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)中成功纯化出能够水解聚酯型 PUR 中酯键的脂肪酶 PueA 和 PueB。此外,Schmidt 等^[20]发现角质酶 LCC 及 TfCut2 不仅能够降解聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET),还具有聚酯型 PUR 降解能力。Magnin 等^[21]研究了南极念珠菌脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB)对 4 种不同聚酯型 PUR 的降解能力,并将 50%降解产物与 50% 6-羟基丙酸混合获得了 74 000 g/mol 无毒聚合物,实现了 PUR 塑料的循环利用。

尽管已有多种 PUR 降解菌株及降解酶被报道,但这些菌株和酶资源仍难以满足 PUR 降解的应用需求,还需要进一步挖掘或改造新的降

解菌株及酶。本研究从广德垃圾处理厂的 PUR 废弃物表面分离出一株 PUR 高效降解菌株 YX8-1,通过系统发育分析、降解产物检测、失重率测定和电子显微镜观察等方法,探究了该菌的系统发育地位并表征了其合成 PUR 塑料 PBA-PU 及商业化 PUR 的降解特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及 PUR 塑料

本研究所用菌株分离自广德垃圾处理厂的 PUR 废弃物表面。筛选聚氨酯降解菌株所用的水性聚氨酯 Impranil DLN 购买自科思创聚合物有限公司,PBA-PU 由南京工业大学周杰老师惠赠^[22],商业化 PUR 塑料购自南通大工有限公司。

1.1.2 培养基

低盐 LB 培养基:10 g/L 蛋白胨,5 g/L 酵母粉,5 g/L NaCl,固体培养基添加 15 g/L 琼脂粉。

无机盐培养基:0.92 g/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$,0.7 g/L KH_2PO_4 ,0.7 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,1.0 g/L NH_4NO_3 ,0.005 g/L NaCl,0.002 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,0.002 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$,0.001 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$,pH 7.0。

富集培养基:含 5% (体积分数) LB 的无机盐培养基中添加 1% (体积分数) Impranil DLN。

筛选培养基:LB 固体培养基中添加 1% (体积分数) Impranil DLN。

固体 PBA-PU 降解培养基:0.1 g PBA-PU 溶于 5 mL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)后,加至 100 mL LB 固体培养基中。

液体 PBA-PU 降解培养基:0.1 g PBA-PU 溶于 5 mL DMSO 后,加至含 5% (体积分数) LB 的无机盐培养基中。

商业化 PUR 降解培养基:称取 0.2 g PUR 海绵置于含 5% (体积分数) LB 的无机盐培养基

中, 121 °C 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 聚氨酯降解菌株的分离

取适量广德垃圾处理厂的 PUR 废弃物用 10 mL 超纯水冲洗表面土样, 随后按 10% (体积分数) 的接种量接种至富集培养基中, 置于 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 1 周后取 10 mL 富集培养液转接至新鲜 100 mL 富集培养基中继续富集 1 周, 重复转接 2 次。富集完成后取富集液稀释至 10^{-4} – 10^{-7} 倍梯度, 涂布于筛选平板, 30 °C 培养约 1 周后取出, 挑取有水解圈的菌株接种至新鲜的筛选平板上观察是否再次出现水解圈。将再次出现水解圈的菌株进行稀释涂布纯化, 最终纯化获得 Impranil DLN 降解菌株, 命名为 YX8-1。

1.2.2 菌株形态观察

观察菌株 YX8-1 在 Impranil DLN 平板上的颜色、形状、透明度、隆起程度和边缘状况, 并通过革兰氏染色观察菌株形态。

1.2.3 16S rDNA 序列鉴定及系统发育分析

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]提取降解菌株的基因组 DNA, 通过 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增其 16S rDNA 序列, 将获得的 PCR 产物送至公司测序。最终将测序结果提交至 NCBI 数据库进行比对, 并通过软件 MEGA-X 的邻接法(neighbor-joining, NJ) 方法构建系统发育进化树。

通过引物 *gyrA*-F (5'-GCDGCHGCNATGC GTTAYAC-3') 和 *gyrA*-R (5'-ACAAGMTCWGC KATTTTTTC-3') 扩增 *gyrA* 序列, 将获得的 PCR 产物送至公司测序, 最终将得到的 *gyrA* 序列提交至 NCBI 数据库进行比对, 通过软件 MEGA-X 的 NJ 法构建系统发育进化树。

对比分析后下载与分离菌株最相近的模式菌株的基因组序列, 计算 2 个基因组之间的平均核酸统一性(average nucleic acid uniformity, ANI) (<http://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)^[23] 和基因组间的 DNA-DNA 杂交值(dDDH) (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>)^[24]。

1.2.4 PBA-PU 降解特性分析

将菌株 YX8-1 划至固体 PBA-PU 降解平板 30 °C 过夜培养后取出观察是否产生水解圈; 将菌悬液接入 30 mL 液体 PBA-PU 降解培养基中至 $OD_{600}=1$, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养 15 d 后取 5 mL 菌液, 10 000×g 离心 10 min 取上清。用盐酸调节至 pH 2.0 后用 2 倍体积乙酸乙酯进行萃取, 取上层溶液置于通风橱风干, 最后用 400 μ L 甲醇重悬, 有机相滤头过滤后利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)及液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)进行检测。

HPLC 所用仪器为 Thermo Dionex UltiMate 3000, 检测条件如下: C18 反相色谱柱 (4.6 nm×250 nm, 3 μ m), 检测波长为 240 nm, 柱温 40 °C, 流速 0.6 mL/min, 进样量 5 μ L, 流动相为乙腈:水(80:20, 体积分数), 进样时间 8 min。

LC-MS/MS 所用仪器为以上 HPLC 仪配备电喷雾电离探针, 该探针连接 Thermo LTQ Orbitrap XL 混合质谱仪。测定条件与 HPLC 相同, 样品数据分析在正离子模式下进行。

1.2.5 商品化 PUR 海绵降解特性分析

称取大小约为 2 cm×1 cm×0.5 cm (约 0.2 g) 的海绵, 置于含 5% (体积分数) LB 的无机盐培养基中, 121 °C 灭菌 30 min。将菌悬液接入 50 mL 商业化 PUR 降解培养基中至 $OD_{600}=1$, 30 °C、180 r/min 摇床振荡培养, 每组处理设置 3 组重复。15 d 和 30 d 后(中途补加培养基至恒重)取

出海绵,超纯水清洗3遍后用0.4% (体积分数) NaClO 浸泡过夜,取出继续用超纯水清洗3遍,最后超声10 min 除去菌体置于烘箱中烘干至恒重取出称重并计算失重率。

通过扫描电镜观察菌株 YX8-1 处理后 PUR 海绵表面形态变化。

2 结果与分析

2.1 水性聚氨酯 DLN 降解菌株的分离

为分离聚氨酯降解菌株,以水性聚氨酯 Impranil DLN 作为底物进行初步筛选。将样品富集、传代后稀释涂布至 Impranil DLN 平板,获得 Impranil DLN 降解菌株 YX8-1。该菌株在 Impranil DLN 平板上菌落呈白色,不透明,形态呈圆形,边缘整齐,表面光滑湿润、凹陷;菌株 YX8-1 在 30 °C、pH 7.0 条件下 48 h 内可在 Impranil DLN 平板上产生水解圈(图 1A)。革兰氏染色结果显示,菌株 YX8-1 营养体细胞为杆状、革兰氏阳性;此外,该菌株可以形成不着色的芽孢(图 1B)。

2.2 菌株 YX8-1 的系统发育分析

基于菌株的 16S rDNA 相似性比对分析发现,菌株 YX8-1 与高地芽孢杆菌(*Bacillus*

altitudinis)、沙福芽孢杆(*B. safensis*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)等芽孢杆菌同源性大于 99%,与模式菌株 *B. altitudinis* 41KF2b 相似性最高(99.24%)。但由于高地芽孢杆菌、沙福芽孢杆菌和短小芽孢杆菌亲缘关系较近,很难通过 16S rDNA 序列将其区分开(图 2)。

据报道^[25], *gyrA* 序列具有高变异性,使其与 16S rDNA 相比有更好的系统发育分辨率。将菌株 YX8-1 的 *gyrA* 序列提交至数据库比对,发现菌株 YX8-1 与模式菌株 *B. altitudinis* 41KF2b 的 *gyrA* 相似性为 98.12%,且与模式菌株 *B. altitudinis* 41KF2b 在系统发育树上处于同一个分支(图 3)。此外,基因组数据分析发现,菌株 YX8-1 基因组序列与 *B. altitudinis* 41KF2b 基因组序列的平均核酸同一性为 98.5%,高于 95%–96%的物种界限^[23];基因组间的 DNA-DNA 杂交值为 94.29%,显著高于物种划分阈值(70%)^[24];菌株 YX8-1 基因组 G+C 含量为 41.28%,与模式菌株 *B. altitudinis* 41KF2b 基因组 G+C 含量(41.26%)相当。结合菌株 YX8-1 的菌落形态,最终确定菌株 YX8-1 为 *B. altitudinis* 中的一员,命名为 *B. altitudinis* YX8-1。

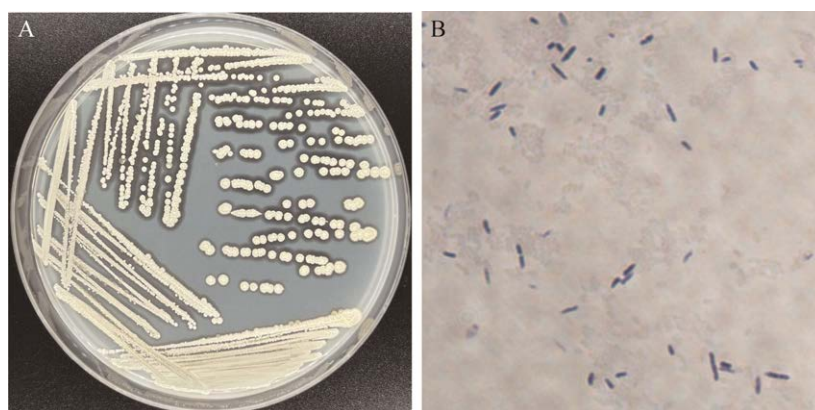


图 1 菌株 YX8-1 菌落和显微形态

Figure 1 Colony and micromorphology of strain YX8-1. A: Colony morphology of strain YX8-1 on Impranil DLN plate. B: Gram staining of strain YX8-1 (1 000× magnification).

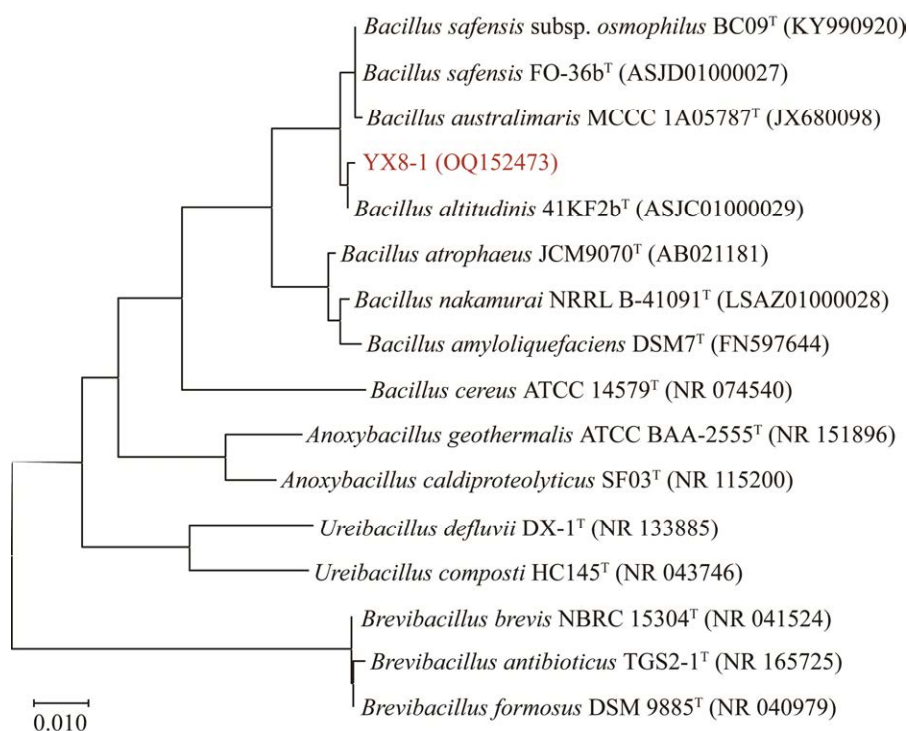


图 2 基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences.

2.3 菌株 YX8-1 对 PBA-PU 的降解特性

PUR 塑料通常由异氰酸酯和多元醇聚合而成, 其中普遍使用的异氰酸酯和多元醇分别为 4,4'-二苯基甲烷二异氰酸酯(4,4'-diphenylmethane diisocyanate, MDI)和聚己二酸丁二醇酯[poly

(1,4-butylene adipate), PBA]。为进一步确认菌株 YX8-1 的聚氨酯降解效果, 以 MDI 与 PBA 聚合形成的 PBA-PU 作为底物(图 4A)。研究发现, 菌株 YX8-1 在 30 °C、pH 7.0 条件下 24 h 内可在 PBA-PU 平板上产生水解圈(图 4B)。此外, 以 PBA-PU 为底物培养 15 d 后, 通过 HPLC 检测到新的产物峰(保留时间 5.133 min), 且该产物峰的保留时间与标准样品 4,4'-亚甲基二苯胺(4,4'-methylenedianiline, MDA) 的保留时间(5.130 min)基本一致(图 4C)。

LC-MS/MS 结果(图 4D)显示某产物在阳离子条件下分子量为 199.122 30, 与 MDA 的理论分子量($M+H^+=199.122\ 98$)之间的误差值为 -3.41。由于该误差值在 5 ppm 范围内, 因此可认为是同样大小^[26]。此外碎片离子分子量为 106.067 30, 与 MDA 质子化衍生物相一致, 结合以上结果, 将该产物鉴定为 MDA。

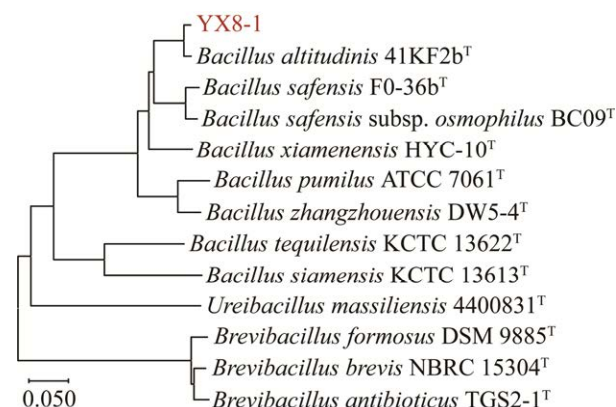


图 3 基于 *gyrA* 序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on *gyrA* sequences.

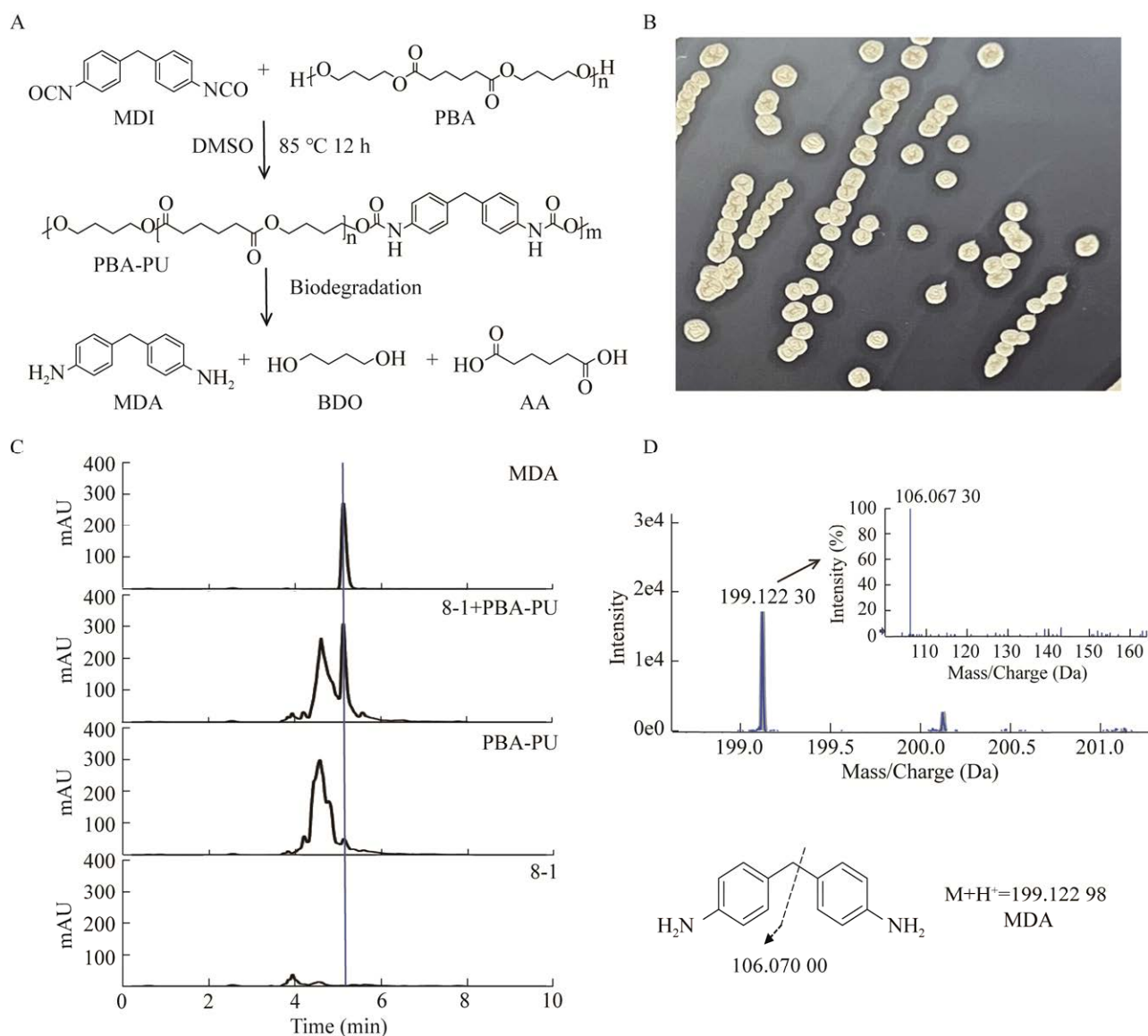


图4 菌株 YX8-1 的 PBA-PU 降解特性 A: PBA-PU 合成线路图. B: PBA-PU 平板上菌株 YX8-1 的菌落形态. C: 菌株 YX8-1 降解 PBA-PU 的 HPLC 图谱. D: 菌株 YX8-1 降解 PBA-PU 的 LC-MS/MS 图谱

Figure 4 PBA-PU degradation properties of strain YX8-1. A: Synthesis and degradation route of PBA-PU. B: Colony morphology of strain YX8-1 on PBA-PU plate. Liquid chromatogram (C) and LC-MS/MS chromatogram (D) of PBA-PU treated by strain YX8-1.

2.4 菌株 YX8-1 对商品化 PUR 的降解特性分析

商业化 PUR 种类多样, 成分复杂, 为研究菌株 YX8-1 对商品化 PUR 的降解效果, 将 YX8-1 与聚酯型 PUR 海绵进行孵育; 孵育 15 d 后 PUR 海绵失重率为 21.1%, 30 d 后 PUR 海绵

失重率达到 32.42% (图 5A)。经 YX8-1 处理后的 PUR 海绵与对照组相比形态发生明显变化, 体积缩小表面塌陷且失去弹性(图 5B)。SEM 结果显示(图 5C), 对照组 PUR 海绵呈网状、连接紧密, 边缘及表面较光滑; 而经菌株 YX8-1 孵育后部分网状结构断裂, 结构变得稀疏, 表面

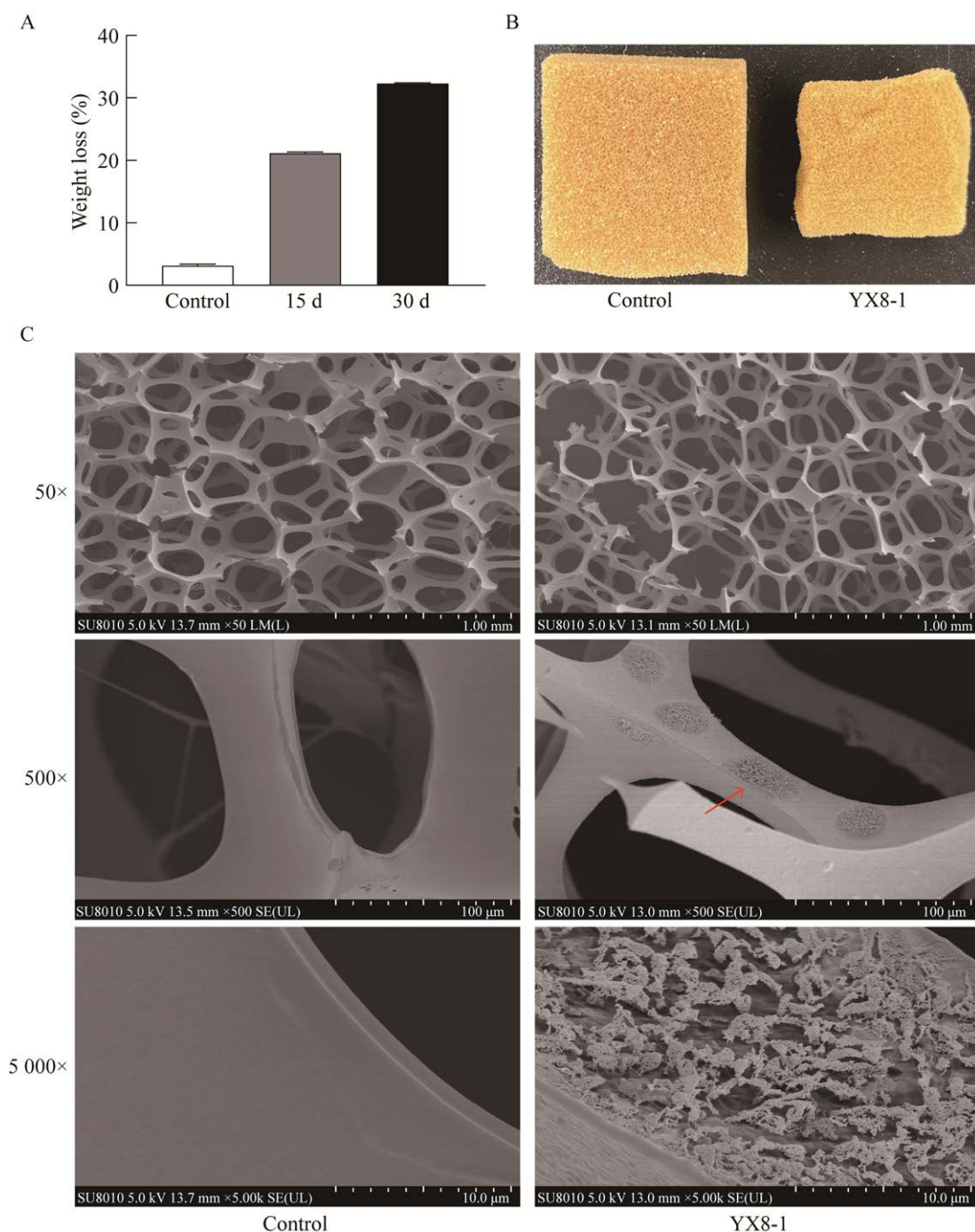


图5 YX8-1对商品化PUR的降解特性 A: 商业化PUR海绵的失重率. B: 与菌株YX8-1孵育30 d前(左)后(右)PUR海绵实物图. C: 菌株YX8-1孵育前(左)后(右)PUR海绵电镜图

Figure 5 Degradation properties of commercial PUR by strain YX8-1. A: Weight loss of commercial PUR after incubation with strain YX8-1. B: Morphology of commercial PUR before (left) and after (right) incubation with strain YX8-1 for 30 d. C: Electron micrograph of commercial PUR before (left) and after (right) incubation with strain YX8-1.

有多处明显侵蚀痕迹,放大 5 000 倍时发现海绵表面变得十分粗糙,且布满较大侵蚀坑。这些结果表明菌株 YX8-1 具有降解商品化 PUR 海绵的能力。

3 讨论

近年来利用生物法处理 PUR 废弃物成为了研究热点,但目前分离的大部分 PUR 高效降解菌为真菌,为丰富 PUR 塑料生物降解资源库,本研究以水性聚氨酯 Impranil DLN 为底物成功分离出一株 PUR 降解菌株 YX8-1,该菌株在 30 °C 时 48 h 内可在 Impranil DLN 平板上产生水解圈。根据生理生化特性、系统发育树分析及基因组数据分析,确定菌株 YX8-1 为芽孢杆菌属的高地芽孢杆菌(*B. altitudinis*)。目前已发现芽孢杆菌属中枯草芽孢杆菌、沙福芽孢杆菌、短小芽孢杆菌及短芽孢杆菌等具有 PUR 降解能力^[27-34],但还未有过高地芽孢杆菌降解 PUR 的报道。Nair 等^[30]从被聚氨酯污染过的水中分离出 *B. pumilus* NMSN-1d,该菌能以 Impranil DLN 为唯一碳源生长,并在 Impranil DLN 平板上产生水解圈。Nakkabi 等^[33]分离到一株 *B. safensis*,该菌可在 10 d 内使 Impranil DLN 完全降解。何洁等^[34]分离出短芽孢杆菌(*Brevibacillus* sp.) P10,该菌在添加 5% (体积分数) LB 作为碳源时,6 d 内降解 50 mg 聚酯型 PUR。然而,目前分离的芽孢杆菌属的菌株中大部分仅以能否降解 Impranil DLN 为指标来评估其 PUR 降解能力,未探究其对商品化 PUR 的降解性能。

为进一步评估菌株 YX8-1 的 PUR 降解能力,本研究以合成的成分明确的 PBA-PU 为底物,并通过 HPLC 及 LC-MS/MS 检测到了产物 MDA 的产生。合成 PUR 塑料结构上与商业化 PUR 塑料相似且成分明确,已被广泛应用于评估菌株 PUR 降解能力。Shah 等^[22]分离的菌株 *P. aeruginosa*

MZA-85 可降解 PBA 和 MDI 为底物合成的聚酯型 PUR,通过气相色谱-质谱检测到产物己二酸和 1,4-丁二醇的产生。Magnin 等^[35]以 MDI 和 4 种不同的多元醇聚合形成 TPU 用于检测不同酶的 PUR 降解能力,通过 LC-MS/MS 检测到 6-羟基己酸、MDA 及 MDA 衍生物的产生。此外,将菌株 YX8-1 与商品化聚酯型 PUR 进行孵育,30 d 内 PUR 海绵失重率达到 32.42%。其降解能力与芽孢杆菌属的其他 PUR 降解菌不相上下。Shah 等^[36]分离出菌株 *B. subtilis* MZA-75,以聚酯型 PUR 为唯一碳源时 30 d 内失重率为 20%。彭瑞婷等^[37]从载人航天器冷凝水中分离出 *Bacillus* sp. S10-2,该菌株以线性聚酯型 PUR 作为唯一碳源时 30 d 内失重率为 19%。但由于培养基成分及 PUR 种类的不同可比性较差。

因商品化 PUR 成分的复杂性,以商品化 PUR 为底物时利用 HPLC 未能检测到其降解产物。且商品化 PUR 与菌株 YX8-1 孵育 80 d 时失重率为 36.8%,与孵育 30 d 的失重率相比仅增加 4.38%。这可能是因为随着孵育时间的延长培养基中营养成分的减少导致菌体转变为休眠状态的芽孢从而使得降解效果减弱,也可能是因为商品化 PUR 中包含的硅油、催化剂等不明物质随着 PUR 降解被释放到培养基中,从而对 PUR 降解酶产生了一定抑制作用。因此持续补充碳源,探究功能酶的最适反应条件或许有助于提高其商品化 PUR 降解能力。后续实验将进一步探究菌株 YX8-1 在不同培养条件下的商品化 PUR 降解特性,并挖掘菌株 YX8-1 中参与 PUR 降解的功能酶,解析其降解 PUR 塑料的分子机制。

REFERENCES

- [1] 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.
- [2] RUSSELL JR, HUANG J, ANAND P, KUCERA K, SANDOVAL AG, DANTZLER KW, HICKMAN D, JEE J, KIMOVEC V FM, KOPPSTEIN D, et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(17): 6076-6084.
 - [3] 江志通, 陈雪, 闫新, 李周坤, 曹慧, 崔中利. 聚氨酯塑料生物降解的研究现状[J]. *生物加工过程*, 2022, 20(4): 439-449.
JIANG ZT, CHEN X, YAN X, LI ZK, CAO H, CUI ZL. Research status of polyurethane biodegradation[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2022, 20(4): 439-449 (in Chinese).
 - [4] GROUP T. *Plastics-the Facts 2019*[J]. RFP: Rubber Fibres Plastics International, 2020(3): 12.
 - [5] 彭瑞婷, 夏孟丽, 茹家康, 霍毅欣, 杨宇. 聚氨酯塑料的微生物降解[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(9): 1398-1409.
PENG RT, XIA ML, RU JK, HUO YX, YANG Y. Microbial degradation of polyurethane plastics[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(9): 1398-1409 (in Chinese).
 - [6] JIANG Y, YANG F, HASSAN KAZMI SSU, ZHAO YN, CHEN M, WANG J. A review of microplastic pollution in seawater, sediments and organisms of the Chinese coastal and marginal seas[J]. *Chemosphere*, 2022, 286: 131677.
 - [7] 李昕玥, 刘卓苗, 薛润泽, 代燕辉, 岳同涛, 赵建. 典型塑料的生物降解及其降解机理[J]. *科学通报*, 2021, 66(20): 2573-2589.
LI XY, LIU ZM, XUE RZ, DAI YH, YUE TT, ZHAO J. Biodegradation of typical plastics and its mechanisms[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2021, 66(20): 2573-2589 (in Chinese).
 - [8] WIERCKX N, POMPOSIELLO P, de LORENZO V, O'CONNOR K, BLANK LM. Plastic waste as a novel substrate for industrial biotechnology[J]. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8(6): 900-903.
 - [9] 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.
 - [10] 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.
 - [11] WU YH, LI JY, WANG CC, CHEN CY. Effect of oxalate unit on polycarbonate-based polyurethane and biodegradation by fungi[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2020, 252: 123463.
 - [12] RODRIGO OA, del CASTILLO DAYNET S, JAIME NM, NORA F, JOSÁ© ÁB, ALEJANDRO A, JHONNY SV, MILTON BA. Analysis of the degradation of polyethylene, polystyrene and polyurethane mediated by three filamentous fungi isolated from the *Antarctica*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2021, 20(2): 66-76.
 - [13] SCHAEFER DA, KHAN S, NADIR S, DONG Y, XU J. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus flavus* G10[J]. *BioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.06.25.170654.
 - [14] 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.
 - [15] SHAH Z, GULZAR M, HASAN F, SHAH AA. 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.
 - [16] 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.
 - [17] AKUTSU Y, NAKAJIMA-KAMBE T, NOMURA N, NAKAHARA T. Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(1): 62-67.
 - [18] STERN RV, HOWARD GT. The polyester polyurethanase gene (*pueA*) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 185(2): 163-168.
 - [19] HOWARD GT, CROTHER B, VICKNAIR J. Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas*

- chlororaphis*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2001, 47(3): 141-149.
- [20] SCHMIDT J, WEI R, OESER T, DEDAVID E SILVA L, BREITE D, SCHULZE A, ZIMMERMANN W. Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases[J]. Polymers, 2017, 9(12): 65.
- [21] MAGNIN A, ENTZMANN L, BAZIN A, POLLET E, AVÉROUS L. Green recycling process for polyurethane foams by a chem-biotech approach[J]. ChemSusChem, 2021, 14(19): 4234-4241.
- [22] SHAH Z, HASAN F, KRUMHOLZ L, AKTAS DF, ALI SHAH A. Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GC-MS[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 77: 114-122.
- [23] YOON SH, HA SM, LIM J, KWON S, CHUN J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(10): 1281-1286.
- [24] MEIER-KOLTHOFF JP, AUCH AF, KLENK HP, GÖKER M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14(1): 1-14.
- [25] LIU Y, ŠTEFANIČ P, MIAO YZ, XUE YS, XUN WB, ZHANG N, SHEN QR, ZHANG RF, XU ZH, MANDIC-MULEC I. Housekeeping gene *gyrA*, a potential molecular marker for *Bacillus* ecology study[J]. AMB Express, 2022, 12(1): 1-12.
- [26] BLAKE SL, WALKER SH, MUDDIMAN DC, HINKS D, BECK KR. Spectral accuracy and sulfur counting capabilities of the LTQ-FT-ICR and the LTQ-orbitrap XL for small molecule analysis[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2011, 22(12): 2269-2275.
- [27] ALDILA F, SUSILOWATI A, SETYANINGSIH R. Polyurethane degrading bacteria isolated from decayed teak wood (*Tectona grandis* Linn. f.)[J]. Journal Biodjati, 2019, 4(2): 225-235.
- [28] BLAKE RC, NORTON WN, HOWARD GT. Adherence and growth of a *Bacillus* species on an insoluble polyester polyurethane[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 1998, 42(1): 63-73.
- [29] ROWE L, HOWARD GT. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2002, 50(1): 33-40.
- [30] NAIR S, KUMAR P. Molecular characterization of a lipase-producing *Bacillus pumilus* strain (NMSN-1d) utilizing colloidal water-dispersible polyurethane[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(10): 1441-1449.
- [31] SHAH AA, HASAN F, AKHTER JI, HAMEED A, AHMED S. Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil[J]. Annals of Microbiology, 2008, 58(3): 381-386.
- [32] NAKKABI A, SADIKI M, FAHIM M, ITTOBANE N, IBNSOUDA KS, BARKAI H, ELABED S. Biodegradation of poly(ester urethane)s by *Bacillus subtilis*[J]. International Journal Environmental Research, 2015, 9(1): 315-318.
- [33] NAKKABI A, SADIKI M, IBNSSOUNDA KS, FAHIM M. Biological degradation of polyurethane by a newly isolated wood bacterium[J]. International Journal Recent Advanced Multidis Research, 2015, 2: 222-225.
- [34] 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).
- [35] MAGNIN A, POLLET E, PERRIN R, ULLMANN C, PERSILLON C, PHALIP V, AVÉROUS L. Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks[J]. Waste Management, 2019, 85: 141-150.
- [36] SHAH Z, KRUMHOLZ L, AKTAS DF, HASAN F, KHATTAK M, ALI SHAH A. Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75[J]. Biodegradation, 2013, 24(6): 865-877.
- [37] 彭瑞婷, 秦利锋, 杨宇. 载人航天器下行细菌对聚氨酯塑料的分解作用[C]//中国生物工程学会第二届青年科技论坛暨首届青年工作委员会学术年会论文集. 广州, 2017: 103-104.
- PENG RT, QIN LF, YANG Y. Decomposition of polyurethane plastics by bacteria descending from manned spacecraft[C]//China Society of Biotechnology Young Scientists Forum II. Guangzhou, 2017: 103-104 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)