

研究报告

聚乳酸材料在不同土壤环境中生物降解的菌群结构分析

范森 段梦洁 刘亚兰 林晓珊 张毅*

(华南理工大学生物科学与工程学院 广东 广州 510006)

摘要:【目的】评价聚乳酸(Polylactic acid, PLA)材料在不同土壤环境中自然降解的效果,通过对3种不同土壤菌群结构的分析,找到能够对聚乳酸材料有降解作用的优势菌群。【方法】通过扫描电镜、断裂拉伸强度和CO₂释放量测定来评价3种土壤对PLA材料的降解效果,并运用高通量测序技术,对3种土壤细菌群落进行基因组测序分析,检测3个样本细菌群落的差异性。【结果】PLA材料在沼泽地、芒果林地和稻田中的生物降解率分别为13.7%、10.6%和4.5%。3种土壤的样品分别获得11 110、11 236和8 848个OTU,共涉及细菌域的9个主要门和16个主要科。其中沼泽地土壤的微生物群落丰富度和多样性最高,稻田土壤最低。【结论】结合土壤的降解效果,土壤中生物群落丰富度和多样性越高,对PLA材料的降解作用越好。同时变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)是降解聚乳酸材料的优势菌群。在科水平上,黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)和噬纤维菌科(Cytophagaceae)的微生物对聚乳酸材料的降解最有潜力。这一研究成果为能有效降解聚乳酸材料的微生物资源的开发提供了理论依据。

关键词: 聚乳酸(PLA), 生物降解, 细菌群落, 高通量测序

Microbial diversity and community structure in biodegradation of poly(lactic) acid (PLA) in different soil environments

FAN Sen DUAN Meng-Jie LIU Ya-Lan LIN Xiao-Shan ZHANG Yi*

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: [Objective] To evaluate microbial biodegradation, three kinds of soil, swamp, orchard and farmland were selected. And to find dominant microbe that can degrade the PLA, we characterize the different of abundance, diversity and community structure of the three microbial strain. [Methods] The residual degraded PLA were analyzed by SEM, the tensile strength, elongation at break and CO₂ generation analysis. And characterize the different of abundance, diversity and community structure of the three kinds of soil by using pyro-sequencing. [Results] The PLA biodegradation in swamp, orchard, and farmland were 13.7%, 10.6%, 4.5%, respectively. The taxonomic analysis of the pyro-sequencing

Foundation item: Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (No. U1301231); Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2013B090600028)

*Corresponding author: Tel: 86-20-39380601; Fax: 86-20-39380602; E-mail: btyzhang@scut.edu.cn

Received: December 14, 2016; Accepted: March 03, 2017; Published online (www.cnki.net): April 05, 2017

基金项目: 国家自然科学基金联合基金项目(No. U1301231); 广东自然科学基金项目(No. 2013B090600028)

*通讯作者: Tel: 86-20-39380601; Fax: 86-20-39380602; E-mail: btyzhang@scut.edu.cn

收稿日期: 2016-12-14; 接受日期: 2017-03-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-04-05

data was grouped into 9 different phyla and 16 different class. **[Conclusion]** By comparing the microbial community of three kinds of soil, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* were the two most dominant phylata degrade the PLA. Flavobacteriaceae, Comamonadaceae and Cytophagaceae were the three most dominant class to degrade the PLA. The result provides scientific basis for the study of microbial diversity and community structure in biodegradation of PLA.

Keywords: Poly(lactic) acid, Biodegradation, Microbial community, Pyro-sequencing analysis

塑料污染是当今世界面临的一个严重的环境问题, 研究者们认为, 使用可生物降解塑料是解决塑料污染的可行方案之一^[1]。聚乳酸(PLA)是目前应用最为广泛的一种可生物降解材料, 可通过玉米、木薯、马铃薯和甘蔗等可再生资源发酵生产^[2], 在微生物环境中可以被完全水解为 CO₂ 和 H₂O^[3]。有研究表明, 在自然环境中, 聚乳酸的降解可大致分为两个过程: 简单水解和酶催化降解。简单水解是水分子攻击聚乳酸分子中的酯键, 使其分解为羧酸和醇的反应, 主要受水解环境的温度、湿度、酸度以及聚合物本身的性质等因素影响; 而聚乳酸的酶催化降解是指聚乳酸分子先水解为低聚物, 然后相关微生物进入其组织物内, 在微生物产生的特定酶的作用下, 被分解为二氧化碳和水^[4], 此过程与天然聚合物的降解不同, 属于间接方式降解。

聚乳酸材料有光降解、氧化降解、土壤降解 3 种降解方式, 在一般情况下, 光降解不能完全降解聚乳酸材料, 氧化降解往往会造成额外污染, 因此土壤降解是最为有效的降解方法^[5]。Weng 等通过控制不同的发酵条件研究聚乳酸的降解作用^[6]; Rudnik 和 Briassoulis 比较了聚乳酸材料在堆肥环境下和自然环境下的降解效果, 结果表明, 聚乳酸材料在堆肥环境和自然环境下都可以被有效降解^[7]。然而聚乳酸材料在自然环境下的降解速率非常缓慢, 如何提高它的降解速率就成为了当前研究的热点之一。

聚乳酸在土壤中的降解已经有了一些研究^[3,7-8], 对于聚乳酸的水解方面, 研究主要集中在材料的类型、掩埋的方式及温度、湿度、pH 等发酵条件的控制上。在降解聚乳酸的微生物方面, 研究者们最早发现对聚乳酸有降解作用的微生物是放线菌, 它具有高效降解聚酯的作用^[8-9]。Pranamuda

等分离了第一株可降解聚乳酸的放线菌 HT-32, 属于拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)^[10], 其他可降解聚乳酸的放线菌分别属于假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、伦茨氏菌属(*Lentzea*)、拟孢囊菌属(*Kibdelosporangium*)^[11]和马都拉放线菌属(*Actinomadura*)^[11]。随着相关研究的深入, 越来越多的微生物被发现具有降解聚乳酸的作用, 如史氏芽孢杆菌、镰刀酶念珠菌、青霉菌、腐殖菌等。

聚乳酸的降解是个复杂的过程, 需要在多种酶的协同作用下进行, 单一菌株对聚乳酸的降解效果并不理想^[9]。另外, 在自然环境中只有不到 1% 的微生物可以被培养, 一些不可培养的微生物也可能和聚乳酸的降解有关。因此, 从整个环境微生物种群结构方面进行研究, 可以更全面地了解微生物对聚乳酸材料的降解作用, 但目前对于这方面的研究还比较匮乏。

本文选取了 3 种不同的土壤, 在相同的处理条件下比较它们对聚乳酸材料的降解能力, 并利用高通量测序技术对这 3 种土壤中细菌群落组成和结构进行分析, 结合它们对聚乳酸材料的降解能力, 通过比较它们种群结构之间的差异, 找到环境中能够降解聚乳酸材料的优势菌群, 为有效降解聚乳酸材料微生物资源的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 聚乳酸材料

聚乳酸材料来自于华南理工大学材料科学与工程学院。材料中含有 96% 的 L-乳酸异构体和 4% 的 D-乳酸异构体, 材料的密度为 2.3 g/cm³, 熔点为 145–170 °C, 玻璃化转变温度为 55–58 °C。

1.2 土壤采集

3 种土壤于 2015 年 6 月分别采自广东省广州市

番禺区内沼泽地、芒果林地、稻田 15–20 cm 土壤,并用 2 mm 筛子处理土壤,去除与实验无关的杂物,放在 4 °C 保存。

1.3 主要试剂和仪器

Soil total DNA 提取试剂盒,美国 OMEGA 公司; Premix Taq, 上海捷瑞生物工程有限公司; 无机试剂,天津永大化学试剂公司。扫描电镜,德国 ZEISS 公司; 电子强力机,美国 INSTRON 公司; MiSeq, 美国 Illumina 公司。

1.4 聚乳酸材料在土壤中的生物降解

聚乳酸材料剪成 250 mm×50 mm 大小,分别掩埋在装有 3 种土壤的纸箱中,掩埋深度大约 7 cm,并保持在温度 25 °C、湿度 60% 条件下进行降解实验。整个降解过程共 4 个月,每月取一次样,每次 3 个平行样。所取样品用蒸馏水冲洗 4 遍,室温下干燥后 4 °C 保存,以备分析测试^[12]。

1.5 材料降解效果检测

1.5.1 样品表面形态变化观察: 使用扫描电镜对降解前后的聚乳酸材料进行电镜观察。加速电压 20 kV,测试之前样品表面经过真空喷金处理,以消除电荷积累。

1.5.2 机械性能测试实验: 利用电子强力机,执行标准为 GB/T3923.1-1997,控制测试房间温度 20±2 °C、湿度为 65% 的条件下进行拉伸性能测试,测试时样品夹距 150 mm,拉伸速度 20 mm/min,测量不同降解时间段取样样品的断裂强力和伸长率变化^[13],每个取样时间段(每月一次)、每类样品各测 3 个平行样取平均值。

1.5.3 无机碳含量测试: 根据 EN ISO 14852-2004 的方法^[9],搭建装置如图 1 所示,气泵流量控制在

60–100 mL/min,每个三角瓶中装有 200 mL 的液体,反应器中分别装有 5 g 3 种土壤和聚乳酸粉末。前两个三角瓶中的 NaOH (0.05 mol/L) 溶液用于吸收气泵吹出气体中的 CO₂, 第三个三角瓶中的 Ba(OH)₂ (0.012 5 mol/L) 溶液用于确定吹出气体中的 CO₂ 是否除尽,后面 3 个瓶子中的 Ba(OH)₂ (0.012 5 mol/L) 溶液用于吸收反应过程中样品分解后释放的 CO₂。用标准 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液矫正配制的 0.05 mol/L 的 HCl 溶液,再用酸碱滴定的方法测定样品分解后释放的 CO₂ 量。设置灭菌土壤对照组和无聚乳酸材料对照组,分别用来消除 PLA 自然水解和微生物自然生长所释放的 CO₂ 量。

1.6 土壤总 DNA 提取

分别取 0.5 g 3 种土壤,使用 DNA 试剂盒提取土壤总 DNA。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的纯度和浓度,胶回收纯化 DNA,并使用无菌水稀释样品至 1 ng/μL。

1.7 PCR 扩增及上机测序

PCR 扩增采用 16S rRNA 基因的 V3–V4 区域作为目标 DNA 序列,以通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 506R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对 16S rRNA 基因的 V3–V4 进行扩增。PCR 反应体系: 模板 DNA 1 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 10.5 μL, Premix Taq 12.5 μL。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 25 个循环; 72 °C 10 min。扩增后的 PCR 产物经琼脂糖电泳检测呈阳性后,使用荧光计 TBS-380 对 PCR 产物进行均一化混匀,构建 MiSeq 文库,然后用 Illumina MiSeq 上机测序。该测序工作由广州基迪奥生物科技有限公司完成。

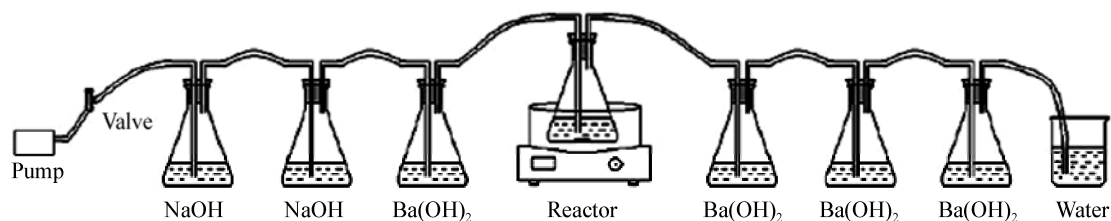


图 1 生物降解试验 CO₂ 释放量测试装置

Figure 1 Devices detecting the amount of CO₂ evolved by PLA in the degradation process

1.8 数据分析处理

1.8.1 OTU (Operating taxonomic unit)分类: 为获得更加精确的生物学信息, 利用 Mothur 软件包对 Tag 序列进行了去冗余处理, 从中挑选出 Unique tag 序列。为了更好地获得样品中物种的多样性信息, 先对 Tags 进行 OTU 聚类, 利用 Mothur 计算 0.03 距离下(97%的相似度)的 OTU 数量, 用 Mothur 软件构建稀释性曲线^[14-15]。

1.8.2 Alpha 多样性分析: 基于 OTU 的结果, 利用 QIIME 软件计算样品 Chao1 指数和 Simpson 指数^[15]。其中群落丰富度用 Chao1 指数描述, 其值越高表明群落物种的丰富度越高; 而样品的多样性用 Simpson 指数描述, 其值越大表明样品群落多样性越低。Chao1 指数和 Simpson 指数的计算公式为:

$$S_{\text{Chao1}} = S + n_1 \times (n_1 - 1) / (n_2 + 1) / 2 ;$$

$$D_{\text{Simpson}} = \sum_{i=1}^S n_i (n_i - 1) / N / (N - 1)。$$

式中, S_{Chao1} 是 Chao1 指数, D_{Simpson} 是 Simpson 指数, S 是得到的 OTU 数量, n_1 是只有一条序列的 OTU 数目, n_2 是只有 2 条序列的 OTU 数目, n_i 是含有 i 条序列的 OTU 数目。 N 是微生物群落中总个体的数量^[16-17]。

1.8.3 Beta 多样性分析: 利用 QIIME 软件计算样品 Beta 多样性距离矩阵, 并根据 Beta 多样性距离矩阵进行层次聚类分析, 根据 OTU 的表达谱计算样品间距离, 并对样品进行聚类分析, 以判断在 OTU 水平上各样品的相似性。距离计算方法为 Kld_jsd^[18], 并用 R 语言绘制物种分布堆叠图。

2 结果与分析

2.1 聚乳酸材料在 3 种土壤中的降解效果

2.1.1 扫描电镜下聚乳酸材料表面形态的变化: 用电子显微镜对降解前后的聚乳酸材料进行观察, 电镜图如图 2 所示。图 2A、B、C、D 分别为未降解前样品及分别经过沼泽地土壤、芒果林地土壤、稻田土壤降解 4 个月后的样品。从图 2 中可以明显看出, 聚乳酸材料在降解前纤维表面很光滑, 无断裂现象, 经过沼泽地土壤降解后样品纤维表面被严重

破坏, 单根纤维裂痕很明显; 经过芒果林地土壤降解后样品纤维表面有轻微腐蚀现象, 但无明显腐蚀断裂; 而经过稻田土壤降解后的样品整体感觉完好, 纤维并没有明显断裂情况。由此可得出结论: 材料在 3 种土壤中的降解效果为沼泽地土壤 > 芒果林地土壤 > 稻田土壤。

2.1.2 聚乳酸材料降解前后机械性能测试结果: 利用电子强力机对降解前后的聚乳酸材料进行断裂拉伸强度的检测, 检测结果如表 1 所示。随着降解的进行, 聚乳酸材料的断裂强度呈下降趋势, 在沼泽地土壤、芒果林地土壤、稻田土壤中经过 4 个月的降解, 材料的断裂强度分别为 43.9、46.6、55.3 MPa。这一结果也反映出材料在沼泽地土壤中的降解效果最好。

2.1.3 二氧化碳释放量测试分析: 为了更直观地评价 3 种土壤对聚乳酸材料的降解效果, 根据 ISO 14852 的方法对降解过程中 CO_2 的释放量进行测定, 实验周期为 4 周, 以灭菌土壤组和无 PLA 材料组作为对照, 降解率 = CO_2 释放量 / 样品理论 CO_2 含量。这里的降解率指完全降解率, 即 PLA 最终降解为 CO_2 和 H_2O 的降解率。

$$Th\text{CO}_2 = M \times X_c \times \frac{44}{12}$$

$$m = \left(\frac{2C_B \times V_{B0}}{C_A} - V_A \times \frac{V_{Bt}}{V_{Bz}} \right) \times C_A \times 22$$

$Th\text{CO}_2$: 样品理论 CO_2 含量; M : 实验所用降解材料的质量; X_c : 实验材料的含碳量, 25.93%; m : CO_2 释放量; C_A : HCl 溶液的准确浓度; C_B : 滴定前 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液的准确浓度; V_B : 试验开始时 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液的体积; V_{Bt} : 滴定前在 t 时间 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液的体积; V_{Bz} : 中和滴定时消耗的 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 溶液体积; V_A : 中和滴定时所用 HCl 体积。

实验结果如图 3 所示。因为灭菌土壤对照组和无 PLA 材料对照组释放的 CO_2 量很少, 可忽略不计。聚乳酸材料在沼泽地土壤、芒果林地土壤和稻田土壤中的降解率分别为 13.7%、10.6%和 4.5%。沼泽地土壤对聚乳酸材料的降解率分别是芒果林地土壤和稻田土壤的 1.29 和 3.10 倍。

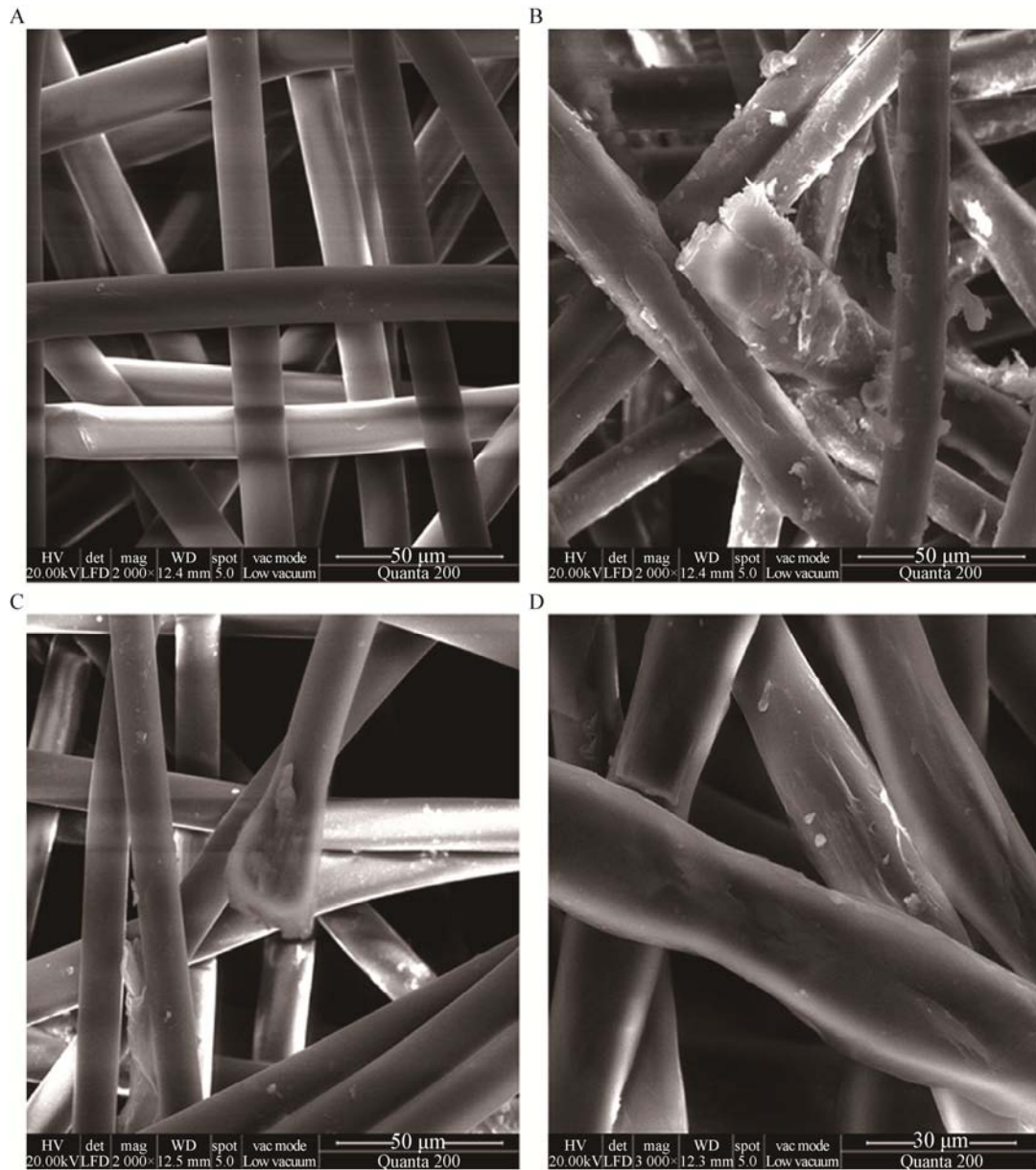


图 2 聚乳酸材料降解前后 SEM 照片

Figure 2 SEM images of PLA before and after degradation

综合扫描电镜、断裂拉伸强度和 CO_2 释放量的测试结果可以得出结论:(1) 聚乳酸材料可以在土壤条件下自然降解;(2) 聚乳酸材料在沼泽地土壤中降解效果最好, 芒果林地土壤次之, 在稻田土壤中降解效果最差;(3) 聚乳酸材料在沼泽地土壤和芒果林地土壤中的降解效果接近, 并远胜于稻田土壤。

2.2 3 种土壤的群落多样性

通过对 V3-V4 区测序, 沼泽、林地、稻田 3 种土壤样品分别得到原始序列 76 553、74 094 和 59 461 条, 经过去冗余处理, 3 种土壤样品分别得到 74 566、71 442 和 57 613 个有效序列, 分别测得 11 110、11 236 和 8 848 个 OTU (表 1)。

表 1 降解前后聚乳酸材料的断裂强度(MPa)和断裂拉伸率
Table 1 Tensile strength (MPa) and elongation at break of PLA (%)

降解土壤 Soil samples	降解时间 Degradation time (months)	断裂强度 Tensile strength (MPa)	断裂拉伸率 Elongation at break (%)
沼泽土壤 Swamp soil	0	76.30±4.77	5.32±0.45
	1	57.70±3.44	5.33±0.32
	2	50.30±3.70	7.94±1.09
	3	46.40±2.54	7.60±1.70
	4	43.90±2.90	4.67±1.14
芒果林地土壤 Orchard soil	0	76.30±4.77	5.32±0.45
	1	60.60±3.89	7.26±0.71
	2	53.30±3.41	5.82±0.71
	3	49.40±2.00	4.80±1.00
	4	46.60±2.54	4.45±0.54
稻田土壤 Farmland soil	0	76.30±4.77	5.32±0.45
	1	67.20±3.23	5.73±0.73
	2	61.50±3.05	5.96±0.68
	3	58.40±3.12	4.65±0.92
	4	55.30±3.16	4.81±0.58

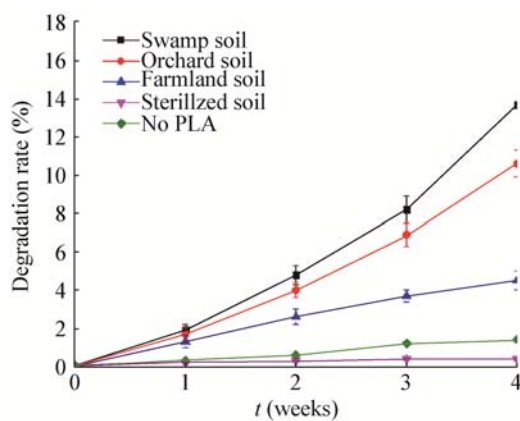


图 3 聚乳酸材料在 3 种土壤中的降解率
Figure 3 Degradation of PLA after incubation in three kinds of soil

对样品间 Alpha 多样性分析, 采用 Alpha 多样性指标中的 Chao1 指数和 Simpsonz 指数来评价样品的丰富度和多样性。结果如表 2 所示, 沼泽地土壤和林地土壤的物种多样性和丰富度高于稻田土壤。

表 2 3 种土壤的微生物群落丰富度和多样性指数
Table 2 Community richness and diversity indices of 3 kinds of soil

Soil samples	Tag	Unique tag	OTUs	Chao1	Simpson
Swamp soil	76 553	74 566	11 110	20 844.8	0.001 837
Orchard soil	74 094	71 442	11 236	20 147.7	0.002 408
Farmland soil	59 461	57 613	8 848	15 511.9	0.003 180

2.3 3 种土壤的微生物群落组成

利用 RDP classifier 对各样品中 OTU 依次进行门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)分类分析, 进一步挖掘样品中种群性群落组成。3 种土壤样品共涉及细菌域的酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Firmicutes)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospira)、变形菌门(Proteobacteria)、WS3 (Candidate division 类之一, 这一类微生物为原核微生物, 没有发现可培养的代表菌株, 但已通过 16S rRNA 基因宏基因组分析确定其存在分支)等 9 个主要菌门及多个少量细菌门和未知菌群。

如图 4 所示, 3 种土壤样品中微生物群落结构组成情况相似, 但各种微生物所占比例有着明显差异。变形菌门(Proteobacteria)在 3 种土壤中均占主要优势, 在沼泽地土壤、芒果林地土壤和稻田土壤

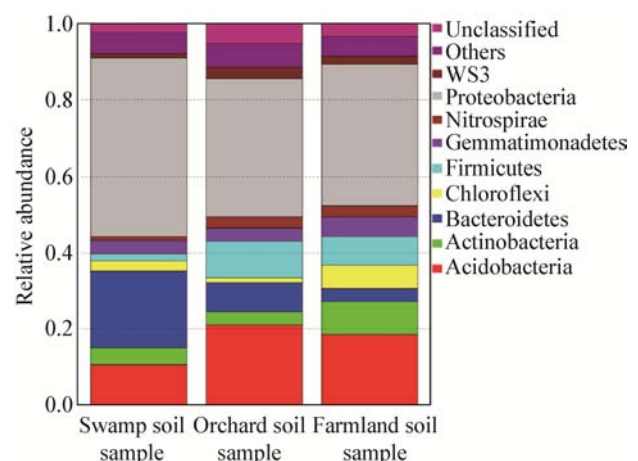


图 4 Phylum 水平各样本菌群分布图
Figure 4 Relative abundance of Phylum in microbial communities from samples

中分别占微生物群落的 45%、38%、36%。拟杆菌门(Bacteroidetes)是沼泽地土壤的第二大优势菌门, 占比接近 20%, 但在芒果林地土壤和稻田土壤中占比很低, 尤其是在稻田土壤中, 仅有 3%。酸杆菌门(Acidobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)是芒果林地土壤的第二和第三大菌门。酸杆菌门(Acidobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)是稻田土壤的第二和第三大菌门。硝化螺旋菌门(Nitrospira)和 WS3 在 3 种土壤中的占比都最少。

在进行分类分析时, 随着注释等级的降低(如从属到种), 能够注释到下一等级 Tag 序列数总是呈下降趋势, 因此需要找到最佳物种分类水平, 即分类等级尽可能低和注释上的 Tag 数量尽可能多的水平。为了确定最佳的物种分类水平, 对各个分类水平上的 Tag 序列数进行统计。如图 5 所示, 3 个样品均有多于 54.49% 的 Tag 序列能够注释到“科”的水平, 而能够注释到“属”水平的 Tag 序列低于 22.67%, 这种情况下选择“科”作为 3 个样品的最佳分类水平。

在科的水平上, 各样品中共涉及 115 个科, 表达丰度占总样本 2% 以上的科共有 16 个。如图 6 所示, 样品间优势科分布存在极大的差异性。黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)和噬纤维菌科(Cytophagaceae)在沼泽地土壤中占比最多, 它们分别属于拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)。前两个门类为沼泽土壤的优势门类, 而在放线菌门

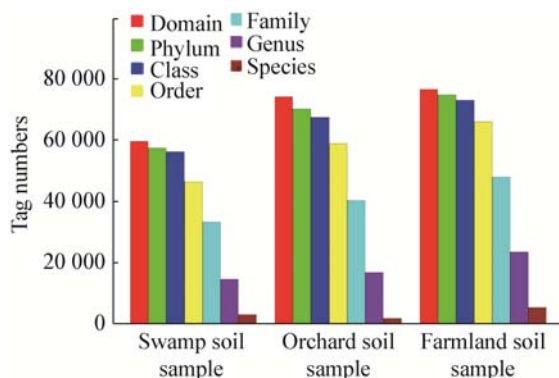


图 5 样品各分类水平中 Tag 数统计
Figure 5 Statistics of tags number at each classification level

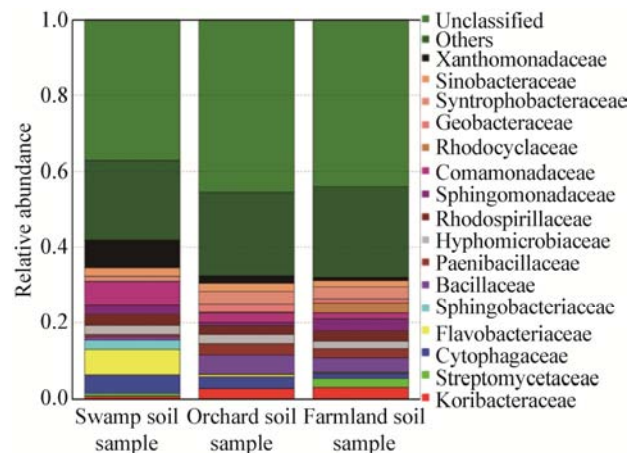


图 6 Family 水平各样本菌群分布图
Figure 6 Relative abundance of Family in microbial communities from samples

中, 大量不同种属的放线菌已被证明具有降解聚乳酸的作用。林地土壤和稻田土壤中各科微生物占比比较平均, 没有特别优势的科类。在 3 种样品中, 未分类的科均为最主要菌群, 分别占 36%、46% 和 42%, 表明还有大量的未知微生物资源有待开发。

结合土壤对材料的降解作用, 沼泽地土壤>芒果林地土壤>>稻田土壤的结果, 可以得出结论: (1) 土壤菌群多样性和丰富度越高, 对聚乳酸材料的降解作用越好。(2) 变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)在对聚乳酸材料的降解中起到了更主要的作用, 这两个门类中可能存在着数量更多、降解能力更好的微生物, 尤其是黄杆菌科(Flavobacteriaceae)和丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)。这一结果不仅找到了环境中能降解聚乳酸材料的优势菌群, 而且为降解聚乳酸材料微生物资源的发掘提供了理论依据。

3 结论与讨论

随着聚乳酸可生物降解材料的广泛应用, 建立可快速降解聚乳酸材料的体系对扩大聚乳酸材料的工业应用具有重要意义。只有尽可能多地获取与聚乳酸生物降解和循环利用有关的信息, 才能使聚乳酸的降解更加快速、安全、无污染, 从而真正实现环境友好化^[19]。近年来有很多研究者从特定的环境中分离出降解聚乳酸材料的菌株进行研究, 如南

开大学的宋存江课题组对分离出的 200 多株细菌进行聚乳酸材料降解实验,发现聚乳酸的降解是个复杂的过程,需要在多种酶的协同作用下进行,单一菌株对材料的降解效果并不理想^[9]。因为在自然环境中,只有不到 1%的微生物可以被培养,一些不可培养的微生物也可能和聚乳酸的降解有关。因此,本文从环境微生物的整体水平进行研究,通过对聚乳酸材料在 3 种土壤中自然降解后的表面形态变化、机械性能变化、二氧化碳释放量的比较,证明聚乳酸材料可以在土壤条件下自然降解,而且在沼泽地土壤中降解效果最好,芒果林地土壤次之,在稻田土壤中降解效果最差。利用高通量测序技术对沼泽地、芒果林地、稻田 3 种土壤的微生物群落结构及多样性进行分析。结果表明土壤菌群多样性和丰富度越高,对聚乳酸材料的降解作用越好。

此前,研究者们通过克隆文库和 DNA 测序的方法鉴定了一些对聚乳酸材料有降解作用的细菌,克隆出的基因序列属于多个门类,主要集中在放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)^[20-21]。本文对 3 种土壤进行高通量测序,沼泽地、芒果林地、稻田 3 种土壤的样品分别测得 11 110、11 236 和 8 848 个 OTU,共涉及细菌域的 9 个主要门和 16 个主要科。结合土壤的降解效果,变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)是降解聚乳酸材料的优势菌群。在科水平上,黄杆菌科(Flavobacteriaceae)、丛毛单胞菌科(Comamonadaceae)和噬纤维菌科(Cytophagaceae)的微生物对聚乳酸材料的降解最有潜力。在一些研究者的报道中,*Brevundimonas* 和 *Acidisphaera* 作为聚乳酸材料的降解菌株属于变形菌门(Proteobacteria)^[22],*Cytophaga* 属于拟杆菌门(Bacteroidetes),可以降解纤维素^[23]。这些报道与我们的研究结果一致,也证实在这两个门中存在着大量有待开发的可降解聚乳酸材料的微生物。

Sun 等指出,16S rRNA 基因在原核生物内往往同时存在多个拷贝,而且拷贝之间的基因序列并不

完全一致,因此基于 16S rRNA 基因的菌群多样性分析会引起一定程度的高估^[24]。为了降低这一高估的影响,本文选取了高估程度较低的 V3-V4 区(约 5%)作为高通量测序的目的片段。尽管这一高估不可避免,使 3 种土壤测得的菌群多样性比真实情况略高,但对本研究的结论影响不大。

变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)作为能够降解聚乳酸材料的优势菌群,如果把分离出的几种或几十种此门类的细菌进行不同比例的混合,也许可以大大提高材料的降解速率。此外,研究变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)微生物的生长习性,在自然土壤中处理聚乳酸材料时,控制有利于这两个门类细菌生长的条件,也可以大大提高材料的降解速率。总之,本研究为有效降解聚乳酸材料微生物资源的开发提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Jarerat A, Pranamuda H, Tokiwa Y. Poly(L-lactide)-degrading activity in various actinomycetes[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2002, 2(9): 420-428
- [2] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(3): 524-534
- [3] Tokiwa Y, Jarerat A. Biodegradation of poly(l-lactide)[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(10): 771-777
- [4] Copinet A, Legin-Copinet E, Erre D. Compostability of co-extruded starch/poly(lactic acid) polymeric material degradation in an activated inert solid medium[J]. *Materials*, 2009, 2(3): 749-764
- [5] Kim J, Seo SM, Lee SG, et al. Nematicidal activity of plant essential oils and components from coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(16): 7316-7320
- [6] Weng YX, Jin YJ, Meng QY, et al. Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT), poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions[J]. *Polymer Testing*, 2013, 32(5): 918-926
- [7] Rudnik E, Briassoulis D. Comparative biodegradation in soil behaviour of two biodegradable polymers based on renewable resources[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2011, 19(1): 18-39
- [8] Apinya T, Sombatsompop N, Prapagdee B. Selection of a *Pseudonocardia* sp. RM423 that accelerates the biodegradation of poly(lactic) acid in submerged cultures and in soil

- microcosms[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 99: 23-30
- [9] Guo WB, Tao J, Yang C, et al. The rapid evaluation of material biodegradability using an improved ISO 14852 method with a microbial community[J]. *Polymer Testing*, 2010, 29(7): 832-839
- [10] Pranamuda H, Tokiwa Y, Tanaka H. Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1637-1640
- [11] Sukhumaporn S, Shinji T, Vichien K. Development of fermentation process for PLA-degrading enzyme production by a new thermophilic *Actinomadura* sp. T16-1[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009, 14(3): 302-306
- [12] Karamanlioglu M, Houlden A, Robson GD, et al. Isolation and characterisation of fungal communities associated with degradation and growth on the surface of poly(lactic acid) (PLA) in soil and compost[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 95: 301-310
- [13] Luan C, You CF. A novel experimental investigation into sintered neck tensile strength of ash at high temperatures[J]. *Powder Technology*, 2015, 269: 379-384
- [14] Jin L, Gao XM, Du JH, et al. Peat bacterial diversity and community structure in Gahai Lake wetland in Gan'nan[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(11): 2396-2404 (in Chinese)
靳亮, 高学梅, 杜建华, 等. 尕斯湖湿地泥炭细菌多样性分析[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(11): 2396-2404
- [15] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120
- [16] Huang ZT, Song XF, Li X, et al. Analysis of microbial diversity of submerged biofilters in recirculating aquaculture system (RAS) for grouper (*Epinephelus moara*) based on high-throughput DNA sequencing[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2016, 32(S1): 242-247 (in Chinese)
黄志涛, 宋协法, 李勋, 等. 基于高通量测序的石斑鱼循环水养殖生物滤池微生物群落分析[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(S1): 242-247
- [17] Zhang ZD, Gu MY, Wang W, et al. Analysis of bacterial community in radiation polluted soils by high-throughput sequencing[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(6): 1218-1226 (in Chinese)
张志东, 顾美英, 王玮, 等. 基于高通量测序的辐射污染区细菌群落特征分析[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(6): 1218-1226
- [18] Sun H, Terhonen E, Koskinen K, et al. Bacterial diversity and community structure along different peat soils in boreal forest[J]. *Applied Soil Ecology*, 2014, 74: 37-45
- [19] Lin J, Zhou JW, Kang Z, et al. Isolation, identification of poly lactic acid degrading microorganisms and optimization of the degradation process[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(9): 1560-1569 (in Chinese)
林娟, 周景文, 康振, 等. 聚乳酸降解菌株筛选鉴定及降解过程优化[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(9): 1560-1569
- [20] Sangwan P, Wu DY. New insights into polylactide biodegradation from molecular ecological techniques[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2008, 8(4): 304-315
- [21] Sangwan P, Way C, Wu DY. New insight into biodegradation of polylactide (PLA)/Clay nanocomposites using molecular ecological techniques[J]. *Macromolecular Bioscience*, 2009, 9(7): 677-686
- [22] Marsh TL. Culture-independent microbial community analysis with terminal restriction fragment length polymorphism[J]. *Methods in Enzymology*, 2005, 397: 308-329
- [23] Longieras A, Tanchette JB, Erre D, et al. Compostability of Poly(lactide): Degradation in an inert solid medium[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2007, 15(3): 200-206
- [24] Sun DL, Jiang X, Wu QLL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(19): 5962-5969