



研究报告

黄粉虫及其肠道微生物对聚氯乙烯的生物降解作用

曹沁 林毅博 陈军 肖明*

上海师范大学生命科学学院 上海 200234

摘要:【背景】塑料废物的累积是越来越严重的环境污染问题,其中聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)作为最常用的塑料之一,其生产与消耗量极大。【目的】基于黄粉虫(*Tenebrio molitor*)幼虫自然取食塑料的现象,探究黄粉虫及其肠道微生物对聚氯乙烯类塑料的生物降解作用。【方法】通过观测黄粉虫取食聚氯乙烯过程的重量变化、傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、黄粉虫肠道微生物的筛选和高通量测序等方法研究黄粉虫幼虫及其肠道微生物对聚氯乙烯的降解作用。【结果】研究表明:仅以PVC作为碳源类营养来源,每200条黄粉虫为一组,共3组,喂养32 d后,每组平均取食了 0.499 ± 0.023 g PVC,黄粉虫平均体重增长 0.015 ± 0.002 g。采用傅里叶变换红外光谱检测发现虫粪组分中PVC官能团中的C—C骨架峰明显减弱,表明PVC长链有断裂现象。高通量测序黄粉虫幼虫肠道微生物菌群的结果显示肠道菌群以哈夫尼菌属(*Hafnia*)、摩根氏菌属(*Morganella*)、大肠埃希氏杆菌属(*Escherichia coli*)和未培养肠杆菌属(unclassified *Enterobacteriaceae*)为优势菌群。肠道菌群中哈夫尼菌属(*Hafnia*)和摩根氏菌属(*Morganella*)的丰度分别比常规饲养对照增加了35.20%和16.42%。【结论】证明了黄粉虫及其肠道微生物对PVC塑料具有一定的降解作用,且其肠道菌群中哈夫尼菌属(*Hafnia*)和摩根氏菌属(*Morganella*)菌株对PVC的利用效率最高,研究结果为“白色污染”的生物降解提供了科学证据。

关键词:黄粉虫,生物降解,肠道细菌,聚氯乙烯

Biodegradation of polyvinyl chloride by *Tenebrio molitor* and its intestinal microorganisms

CAO Qin LIN Yi-Bo CHEN Jun XIAO Ming*

College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract: [Background] The accumulation of plastic wastes is an increasingly serious environmental pollution problem, and PVC, as common plastic, has a large number of production and consumption. [Objective] Based on the phenomenon that *Tenebrio molitor* feeds on plastics naturally, in this paper, the biodegradation of polyvinyl chloride (PVC) plastics by *Tenebrio molitor* larvae and its intestinal microbes was researched. [Methods] The weight increase of *Tenebrio molitor* larvae was observed after fed polyvinyl chloride only, and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), screening of

Foundation items: Shanghai 2016 Science and Technology Innovation Action Plan (16391902100); Ministry of Agriculture Urban Agriculture Key Laboratory Open Fund (UA201705)

*Corresponding author: Tel: 86-21-64321022; E-mail: xiaom88@shnu.edu.cn

Received: 24-02-2019; Accepted: 22-10-2019; Published online: 22-11-2019

基金项目:上海市2016年度科技创新行动计划(16391902100);农业部都市农业重点实验室开放基金(UA201705)

*通信作者: Tel: 021-64321022; E-mail: xiaom88@shnu.edu.cn

收稿日期: 2019-02-24; 接受日期: 2019-10-22; 网络首发日期: 2019-11-22

intestinal microbes and high-throughput sequencing methods were used to research biodegradation of PVC. **[Results]** The results showed that when PVC was used as the only carbon source of *Tenebrio molitor* larvae, after 32 d, PVC was consumed at the weight of 0.499 ± 0.023 g per 200 *Tenebrio molitor* larvae, and the average weight of 200 *Tenebrio molitor* larvae was increased by 0.015 ± 0.002 g. FTIR was used to detect the significant increase of carbonyl and hydroxyl content in PVC from excrement components, which indicates PVC degraded obviously. The results of high-throughput sequencing showed that *Hafnia*, *Morganella*, *Escherichia coli* and uncultured *Enterobacteria* were the dominant microflora. Compared with conventional feeding control, the abundance of *Hafnia* and *Morganella* increased by 35.20% and 16.42% respectively. **[Conclusion]** This article proved the biodegradation of PVC by *Tenebrio molitor* larvae and its intestinal microbes, and *Hafnia* and *Morganella* strains had the highest utilization of PVC. The results of the study have enriched scientific evidence for the biodegradation of “white pollution”.

Keywords: *Tenebrio molitor*, Biodegradation, Intestinal bacteria, Polyvinyl chloride

聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)是全球产量最大的通用塑料之一,在建筑材料、工业制品、日用品、人造革、管材、电线电缆和包装膜等方面均有广泛的应用^[1]。随着PVC产品的大量使用,每年都有许多PVC废弃物产生。由于PVC结构稳定,在自然环境中降解速度非常缓慢,其累积对生态环境造成了较为严重的危害,成为“白色污染”的主要来源之一^[2]。长期以来,世界各国都致力于研究塑料污染物质的处理,但目前较为普遍的处理方法都存在着一些问题,如焚烧法与化学法依然污染环境,掩埋法以及回收再利用没能真正地处理掉塑料制品^[3]。所以,开发一种处理塑料废弃物的新方法成为了研究热点。

黄粉虫又叫面包虫,在昆虫分类学上隶属于鞘翅目拟步行虫科粉甲虫属(拟步行虫属)^[4]。陈重光^[5]发现了黄粉虫幼虫啃食塑料的现象;沈叶红^[6]根据这一现象在实验室分离得到了8株菌,但这8株菌并不能单独降解聚苯乙烯(polystyrene, PS)。Yang等^[7]发现黄粉虫幼虫能以泡发式聚苯乙烯为单一食物来源,并能在仅取食泡发式聚苯乙烯的情况下存活1个月以上,并在黄粉虫肠道内分离出一株具有降解聚苯乙烯塑料能力的微小杆菌(*Exiguobacterium* sp. YT2),该菌在60 d内可降解 $7.4\% \pm 0.4\%$ 的聚苯乙烯。这为利用生物降解手段无公害处理塑料垃圾提供了重要信息和探索方

向,但研究仅限于现象的描述和减量的统计,少有降解机理上的探究^[8]。

本研究以PVC为单一食物来源喂养黄粉虫3龄幼虫,采用傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)表征虫粪组分中PVC官能团的变化,研究了PVC被降解的情况;通过高通量测序测定了黄粉虫幼虫肠道细菌的组成及其相对丰度,比较不同饲料喂养的黄粉虫肠道细菌种类的差异,探索了其肠道细菌在PVC塑料降解中的作用,精准定位塑料高效降解的微生物菌群的特征,初步揭示了塑料的生物降解机理。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验所用黄粉虫(*Tenebrio molitor*)幼虫购于上海市徐汇区钦青花鸟市场。

1.2 主要试剂和仪器

四氢呋喃、无水乙醇购于国药集团药业股份有限公司;聚氯乙烯购于阿拉丁试剂(上海)有限公司;Taq DNA聚合酶购于天根生化(北京)科技有限公司。

傅里叶红外光谱仪,赛默飞世尔科技有限公司;PCR仪,上海赛默科技发展有限公司;凝胶成像系统,上海天能科技有限公司;凝胶渗透色谱,岛津公司;气相色谱-质谱联用仪,Agilent Technologies公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母膏 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 20.0 (固体), pH 7.0。

无机盐培养基(g/L)^[9]: KH_2PO_4 0.700, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002, K_2HPO_4 0.700, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.700, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001, NH_4NO_3 1.000, NaCl 0.005。

生理盐水: NaCl 0.9 g 溶于 100 mL 水中。

以上培养基均 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.4 实验方法

1.4.1 黄粉虫的喂养

选取形态大小均匀的黄粉虫 1 200 条, 在 25 ± 2 °C 的实验环境下饲养, 平均分为两组(除了饮食来源, 其余条件均保持一致), 一组喂养麦麸(对照组), 另外一组只喂养 PVC。饲养过程中保持空气湿度 55%–70%, 每隔 72 h 喷洒一次水。每组设 3 个平行样。

1.4.2 黄粉虫粪便的收集处理及红外光谱分析^[10]

用无菌勺收集黄粉虫幼虫产生的粪便样品, 在研钵中轻轻研碎后, 分成 50 mg 等分试样并置于具有 2 mL 四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)提取溶剂的干净玻璃小瓶中, 于 37 °C、200 r/min 恒温振荡提取, 一式两份。30 min 后静置沉降 3 h, 吸出溶剂并用 0.22 μm PVDF 过滤器过滤收集。然后再向含有粪便的初始小瓶中加入四氢呋喃 2 mL, 重复提取实验。总提取时间超过 12 h 后, 将收集得到的样品中的溶剂用旋转蒸发仪浓缩, 得到残余 PVC 聚合物, 对处理后的样品进行傅里叶变换红外光谱分析。

1.4.3 黄粉虫肠道微生物菌群 16S rRNA 基因高通量测序^[11]

黄粉虫在以 PVC 喂养 32 d 后, 在麦麸组和 PVC 组随机挑选黄粉虫 10 条, 用 95%酒精浸泡 30 s 后用无菌生理盐水清洗 15 s, 然后在 75%酒精中浸泡 1 min, 用灭菌的镊子夹住黄粉虫尾部与第二对足部以上部分, 拖拉取出完整肠道。将取出的肠道用液氮冻存后送美吉生物公司, 对黄粉虫肠

道微生物 16S rRNA 基因的 V3–V4 区域进行高通量测序^[12], 之后的操作是基于 I-Sanger 平台进行, α 多样性以 Shannon 多样性指数来表征, OTU 的代表序列用 Fast Tree 构建进化树。

1.4.4 黄粉虫肠道可培养微生物的分离与纯化

黄粉虫以 PVC 喂养 32 d 后, 在 PVC 组中随机挑选黄粉虫 10 条, 采用 1.4.3 中方法取出肠道, 将取出的完整肠道装入含有 1 mL 无菌生理盐水的离心管中, 经 Vortex 振荡使肠道内容液全部析出, 接入 LB 液体培养基中, 将上述培养物在 LB 培养基上划线 37 °C 培养, 挑取单菌落进行纯化, 筛选不同菌株, 将筛选得到的菌株甘油冻存, 以备下一步实验使用。

1.4.5 PVC 降解菌株的筛选

纯化后的菌落接入 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 将菌液于冷冻高速离心机 4 000 \times g 离心 10 min 使菌体沉淀。用无菌生理盐水重悬后再次离心, 洗去 LB 培养基。将菌体重悬后, 用紫外分光光度计将 OD_{600} 调至 1.0。再取 1 mL 重悬好的菌液接种于无机盐液体培养基中, 以 PVC 塑料片为唯一碳源进行培养, 用紫外分光光度计检测菌的生长情况, 以此来判断对 PVC 的降解作用。

1.4.6 PVC 降解菌株的鉴定

对具有降解能力的细菌进行分子生物学鉴定。通过 DNA 提取试剂盒提取肠道菌株基因组, 16S rRNA 基因的扩增采用细菌通用引物 27F (5'-CAG AGTTTGATCCTGGCT-3')和 1492R (5'-AGGAGG TGATCCAGCCGCA-3')。PCR 反应体系(25 μL): Taq DNA Master Mix 12.5 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , DNA 模板 0.5 μL , ddH₂O 11 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳测其纯度, 然后送美吉生物测序公司进行测序。

将测序得到的序列通过 NCBI 网站进行同源序列搜索(BLAST), 匹配出同源序列。选取代表性

菌株序列作进一步的分析,利用 MEGA 6.0 软件进行系统发育分析。

1.4.7 凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)测定分子量

在以 PVC 为唯一碳源的无机盐培养基中,将筛选得到的具有最佳降解效果的菌株于 37 °C、100 r/min 培养 32 d,对照组中则不加菌液。对经菌株降解后的 PVC 塑料片,用 2.0%十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)水溶液搅拌洗涤 1 h,洗除 PVC 塑料片表面的菌落,清水洗净后,干燥,氯仿加热溶解,用凝胶渗透色谱测定其分子量。对照组也用相同方式处理。

1.4.8 气相色谱质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrum, GC-MS)测定可溶性降解产物

培养结束后,收集 1.4.7 中的液体培养基,经 10 000 r/min 离心 20 min 后,取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤后用 GC-MS 测定其降解产物。

1.4.9 扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)检测 PVC 薄膜表面形态

在以 PVC 为唯一碳源的无机盐培养基中,将筛选得到的具有最佳降解效果的菌株于 37 °C、100 r/min 培养 32 d,对照组中则不加菌液。对经菌株降解后的 PVC 塑料片,用 2.0% SDS 水溶液搅拌洗涤 1 h,洗除 PVC 塑料薄膜表面的菌落,无菌纯

化水洗净后,干燥。用 SEM 观察塑料薄膜表面形态。

2 结果与分析

2.1 黄粉虫啮食 PVC 过程分析

从饲喂过程观察可以发现黄粉虫能主动啮食 PVC 塑料,并在食用后能正常生长,且平均存活 1 个月以上,随着黄粉虫取食 PVC 塑料质量的增加,黄粉虫的平均体重和发育程度均有明显增加。

由图 1A 结果可见,黄粉虫在取食 PVC 的过程中,前 7 天黄粉虫体重呈现一定的下降趋势,可能是黄粉虫改饲 PVC 后虫体内对 PVC 降解的微生物群落需要重新构建,影响了 PVC 消化吸收。喂养 10 d 后,黄粉虫体重逐渐增加;32 d 后,饲喂 PVC 组的黄粉虫平均体重增加 0.015 ± 0.002 g,平均体重相对增加 $17.24\%\pm2.29\%$,而且部分黄粉虫幼虫能完成变态发育全过程。

从图 1B 可以得知,随着喂养时间的增加,黄粉虫对 PVC 的摄取量越来越多。在黄粉虫喂养最开始的 10 d, PVC 的质量减少量较为缓慢。黄粉虫以 PVC 塑料喂养 10 d 以后, PVC 经过黄粉虫的取食,质量减少的速度加快。在 PVC 作为黄粉虫唯一食物来源的情况下,经过 200 条黄粉虫 32 d 的摄取, PVC 质量减少量达到 0.499 ± 0.023 g, PVC 相对减少量为 $9.98\%\pm0.46\%$ 。

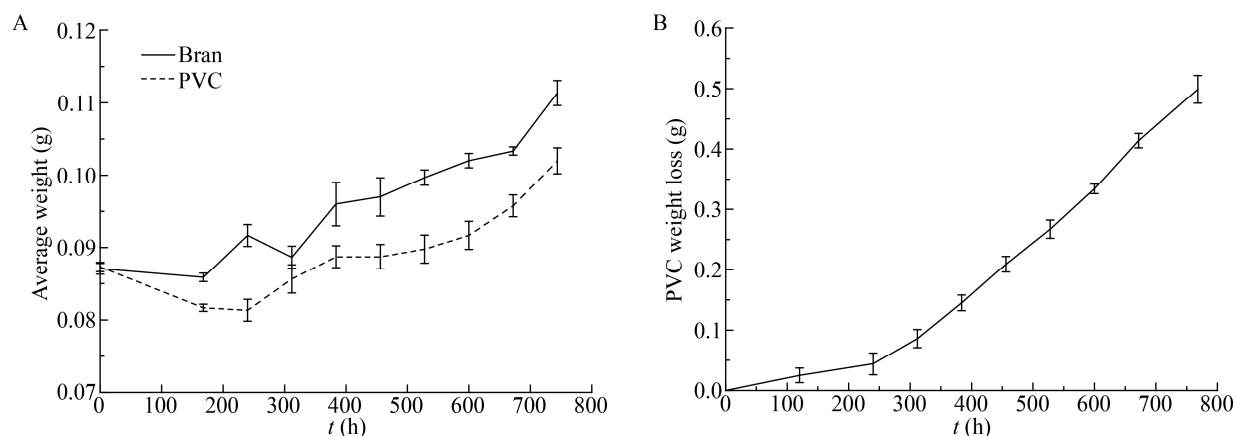


图 1 黄粉虫平均体重(A)和 PVC 质量损失(B)与喂养时间关系

Figure 1 The relationship between average weight of *Tenebrio molitor* (A), PVC average weight loss (B) and feeding time

2.2 傅里叶变换红外光谱分析黄粉虫粪便提取物

采用 1.4.2 中提取的粪便残留 PVC 进行 FTIR 分析,得到红外谱图如图 2 所示。从图 2 可以看出,对照组 PVC 在 $2\,970\text{ cm}^{-1}$ 处出现强的 CH_2 -基团特征吸收振动峰,实验组 PVC 在该处出峰有明显减弱,说明 PVC 结构的主链中 CH_2 -结构减少,即 PVC 高分子主链段被剪切, PVC 结构被降解。同理,对照组在 $1\,099\text{ cm}^{-1}$ 处的 C-C 骨架弯曲振动峰也存在明显的减弱,进一步验证了 PVC 材料被生物降解。实验结果还发现,实验组 PVC 在 $1\,334$ 、 $1\,254\text{ cm}^{-1}$ 处氯原子相连的 CH 基团特征吸收振动峰与 693 cm^{-1} 处的 C-Cl 基团特征峰也有明显减

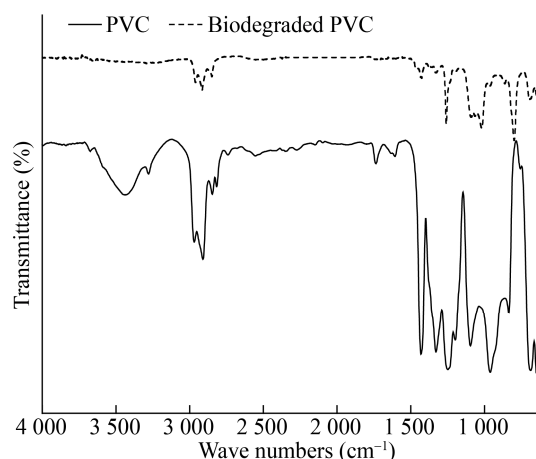
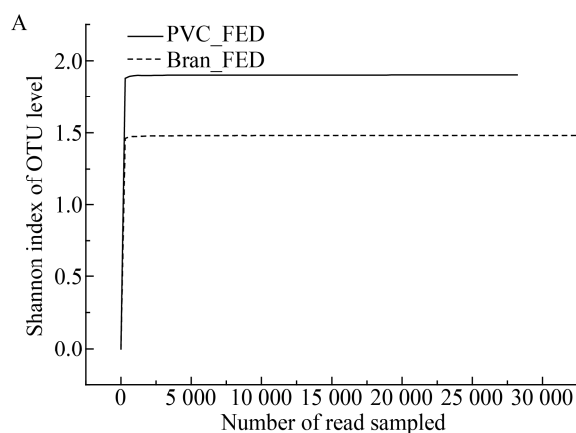


图 2 黄粉虫粪便提取物红外光谱分析图

Figure 2 FTIR spectra of control and frass sample for *Tenebrio molitor* fed PVC



弱,说明与氯原子相连的 C 或氯原子侧基被脱离,同样也证明 PVC 被降解,也说明 PVC 结构在虫体内的降解是多位点降解,可能是肠道微生物菌群协同降解的结果。

2.3 肠道微生物菌群的高通量测序

2.3.1 肠道微生物多样性分析

香农多样性稀释曲线是反映样品中微生物多样性的指数^[13],利用各样品的测序量在不同测序深度时的微生物多样性指数构建曲线,以此反映各样本在不同测序数量时的微生物多样性。对黄粉虫肠道微生物 16S rRNA 基因的 V3-V4 区域进行高通量测序,得到香农多样性稀释曲线如图 3A 所示。

根据图 3A 的香农指数多样性稀释曲线来看,当曲线趋向平坦时,说明测序数据量足够大,可以反映样品中绝大多数的微生物信息。图 3B 表明 PVC 喂养的黄粉虫肠道微生物的多样性明显高于麦麸喂养的黄粉虫肠道微生物,说明 PVC 喂养黄粉虫后肠道微生物菌群出现了新的分布,微生物的多样性增加,也表明了 PVC 的生物降解需要多菌株共同参与协同作用。

2.3.2 黄粉虫肠道菌群群落结构

为了探究喂养不同饲料的黄粉虫肠道微生物群落结构的差异,通过群落组成分析可知,喂养不同饲料对黄粉虫肠道微生物群落结构有明显变化,结果如图 4A、B 所示。

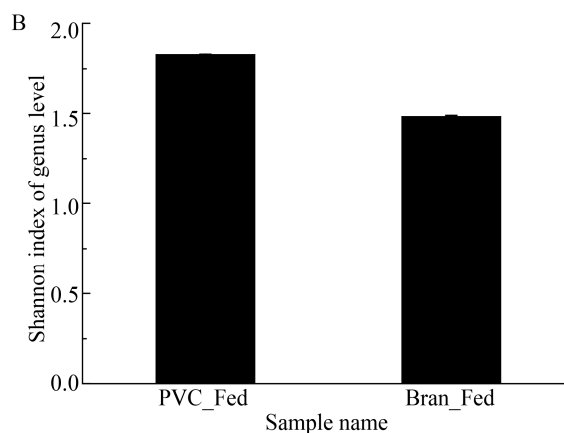


图 3 香农多样性指数的稀释曲线(A)和同一深度下的细菌多样性(B)

Figure 3 Shannon diversity index curves (A) and dilution curve (B) represents the α -diversity within two groups

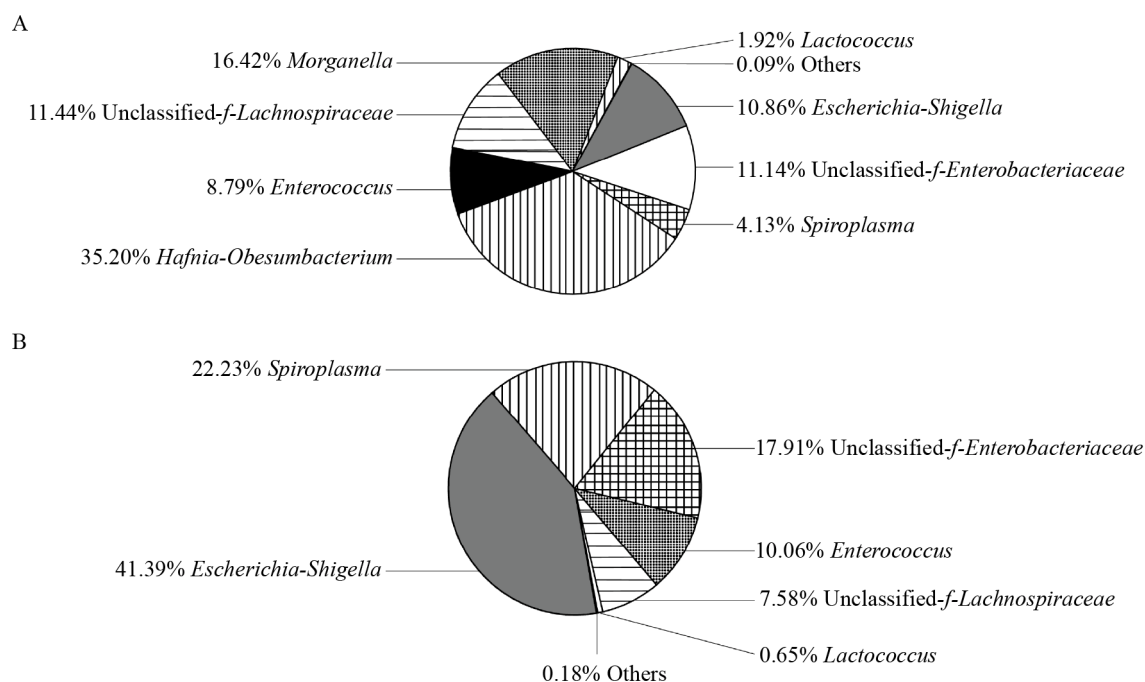


图4 喂养麦麸组(A)和聚氯乙烯(B)组黄粉虫肠道菌群群落结构
Figure 4 The gut microbiota structure of fed with bran (A) and PVC (B)

由图4可知,喂养麦麸的黄粉虫肠道中以螺原体菌属(*Spiroplasma*)、大肠埃希氏杆菌属(*Escherichia coli*)和未培养的肠杆菌属(unclassified *Enterobacteriaceae*)为主,所占比例分别是41.39%、22.23%和17.91%。而以PVC喂养的黄粉虫以哈夫尼菌属(*Hafnia*)、摩根氏菌属(*Morganella*)、大肠埃希氏杆菌属(*Escherichia coli*)和未培养肠杆菌属(unclassified *Enterobacteriaceae*)为主,其所占比例分别是35.20%、16.42%、10.86%和11.14%。可以明显看出,喂养PVC的黄粉虫肠道微生物菌群中发现有大量哈夫尼菌属和摩根氏菌属微生物出现,螺原体菌属和大肠埃希氏杆菌属比例大幅度减少。

文献报道也证明了哈夫尼菌属(*Hafnia*)能有效降解有机氯农药“毒死蜱”的作用^[14]。林云龙等在杂草中分离得到一株哈夫尼菌,经研究发现能够降解包括睾酮、雌二醇和雌酮在内的大量甾类化合物^[15]。摩根氏菌属(*Morganella*)具有能够降解烟碱的能力^[16],还是一种能高效降解有机磷的

菌株^[17]。在潘柯莉等研究中发现,如果敲除大肠杆菌的 *pgi* 基因,大肠杆菌对木质纤维素的降解会大大提升,说明大肠杆菌也具有降解长链碳源的潜力^[18]。王艳丽等的研究表明,大肠杆菌能够对紫甘薯花色苷具有开环反应,能够使花色苷呈色基团发生改变^[19]。王翠薇等的研究表明,大肠杆菌能够降解木聚糖为木糖用于自身的生长^[20]。这些研究结果进一步验证了哈夫尼菌属和摩根氏菌属微生物与PVC降解存在的相关性。

2.4 黄粉虫肠道可培养微生物的分离及鉴定

在实验条件下从喂养PVC的黄粉虫肠道中共筛选出可以形成菌落的肠道细菌6株,其菌落形态如图5所示。由图5可以看出,从喂养PVC的黄粉虫肠道中分离出的6株菌颜色各异,菌落均呈不透明状,菌落形状大多呈圆形,质地紧密,边缘较平整。

对分离出的6株肠道细菌分别从菌落颜色、边缘、质地、表面隆起状况等进行形态学观察的结果见表1。

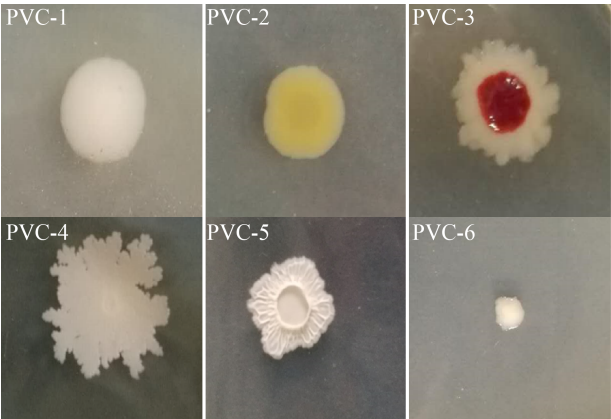


图 5 黄粉虫肠道中分离出的 6 株菌
Figure 5 Six isolated strains from the gut of *Tenebrio molitor*

2.5 黄粉虫肠道微生物对 PVC 的降解作用

2.5.1 黄粉虫肠道微生物的筛选

对分离出的肠道微生物进行 PVC 降解实验，将这 6 株菌分别接种在以 PVC 为唯一碳源的无机盐液体培养基中培养 10 d。然后通过紫外分光光度计测量其 OD_{600} 值，结果如图 6 所示。

从分离菌株对 PVC 的利用情况可以发现，6 株菌中 PVC-4 和 PVC-6 对 PVC 有明显的利用能力，说明该两株菌具有降解 PVC 的酶系，能够将 PVC 分解并提供生长需要，也可以证明肠道中分离到的菌株是可以利用黄粉虫啃食 PVC 后在肠道降解消化，提供虫体生长所需要营养的重要微生物，也揭示了黄粉虫啃食 PVC 能够生长的生物学原理。

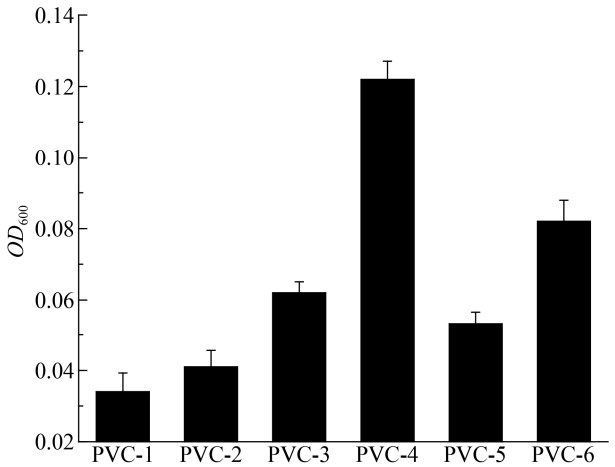


图 6 肠道分离菌株对 PVC 的利用
Figure 6 Utilization of PVC by isolated strains from intestine

2.5.2 虫体肠道分离微生物的鉴定

对两株能够利用 PVC 的菌株进行分子生物学鉴定，16S rRNA 基因序列比对后证明两株菌分别为哈夫尼菌属(*Hafnia*)和摩根氏菌属(*Morganella*)，经 BLAST 比对其同源性最高菌株和相似度的结果如表 2 所示。利用 MEGA 6.0 对两株菌构建进化树，结果如图 7 和图 8 所示。

2.5.3 GPC 测量塑料分子量

为了研究菌株 PVC-4 对 PVC 的降解效果，对降解前后的 PVC 塑料进行了 GPC 测定，测量了 PVC 塑料经菌株降解前后的重均分子量(M_w)和数均分子量(M_n)变化，结果如图 9 所示。

表 1 黄粉虫肠道菌形态学特征
Table 1 Morphological characteristics of *Tenebrio molitor* intestinal bacteria

Name	Color	Sueface	Transparency	Margin	Form	Texture
PVC-1	Cloudy white	Smooth	Opaque	Entire	Irregular	Moist
PVC-2	White	Smooth	Opaque	Entire	Irregular	Moist
PVC-3	Cloudy white and red	Smooth	Opaque	Lobate	Irregular	Butyrous
PVC-4	Cloudy white	Rough	Opaque	Curled	Circle	Dry
PVC-5	Yellow	Wrinkled	Opaque	Undulate	Circle	Dry
PVC-6	White	Smooth	Opaque	Entire	Circle	Mucoid

表 2 筛选菌株 BLAST 比对后同源性最高菌株

Table 2 BLAST screening revealed the highest homology

Bacterial strain	The most homologous identity of bacterial strain	Source	Homologous (%)
PVC-4	<i>Hafnia alvei</i> strain IC3211	Ant intestinal	100
PVC-6	<i>Morganella</i> sp. HK-1	Landfill	98

经 GPC 测定, PVC 在经过菌株降解后 M_w 值为 115 391, 对比降解前的 M_w 值 127 114, 其 M_w 值相对降低了 9.22%; 经降解后 M_n 值由 71 022 降为 64 764, 其 M_n 值相对降低了 8.81%。

PVC 分子量的降低说明菌株能有效利用 PVC 为唯一碳源, 同时也说明菌株对 PVC 塑料存在一

定的降解效果。

2.5.4 GC-MS 测定可溶性降解产物

利用 GC-MS 检测经菌株 PVC-4 降解后无机盐液体培养基中的可溶性降解产物, 结果见图 10 和表 3。在无菌对照组中没有出现明显的峰, 说明无菌对照组中没有可溶性降解产物的出现。经菌株降解后的无机盐液体培养基中有明显的小分子物质的峰出现。在保留时间为 17.262 min 和 20.730 min 的位置出现的小分子物质对应为氧化产物, 说明 PVC 在菌株作用下被氧化。在保留时间为 24.458 min 的位置所对应的物质为塑化剂的常用成分, 说明 PVC 塑料中塑化剂被降解。在

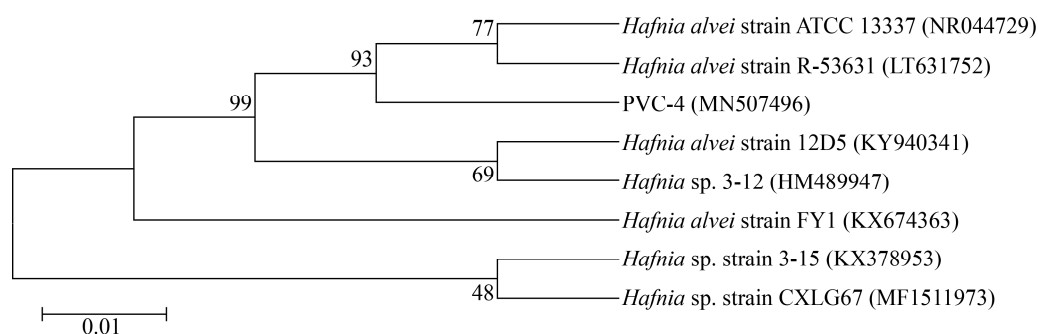


图 7 菌株 PVC-4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree of strain PVC-4 based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号中的序号代表菌株的 GenBank 号; 分支点上的数字代表可信度; 刻度 0.01 代表序列差异度。

Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain; The number at the node means credibility; The scale bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position.

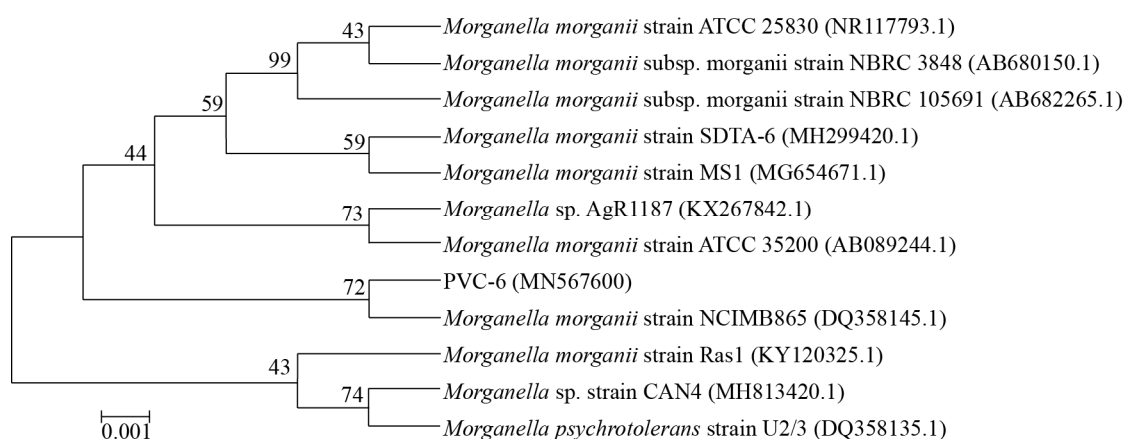


图 8 菌株 PVC-6 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 8 Phylogenetic tree of strain PVC-6 based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号中的序号代表菌株的 GenBank 号; 分支点上的数字代表可信度; 刻度 0.001 代表序列差异度。

Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain; The number at the node means credibility; The scale bar represents 0.001 substitutions per nucleotide position.

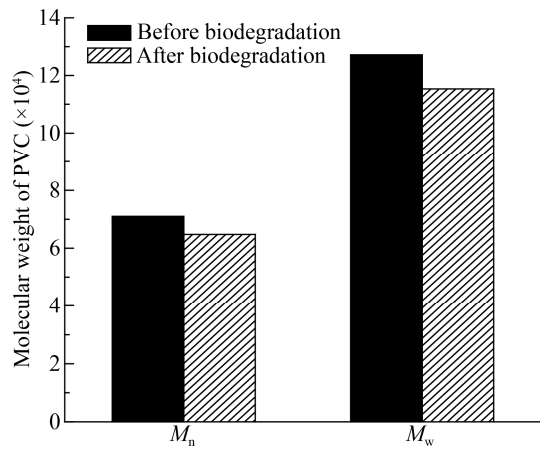


图9 PVC降解前后分子量变化
Figure 9 Molecular weight changes of PVC before and after biodegradation

保留时间为 14.436 min 和 19.149 min 的位置出现的峰所对应的物质为 PVC 的衍生物。这些物质都来自于 PVC 长链分子断裂或氧化水解所产生的小分子物质，进一步证实了菌株具有降解 PVC 的能力。

2.5.5 SEM 观察 PVC 薄膜表面形态

PVC 塑料薄膜在经菌株培养后，通过 SEM 观察塑料膜表面形貌特征，其 SEM 结果如图 11A 和 11B 所示：PVC 薄膜在经菌株利用后，发现 PVC 薄膜表面侵蚀较为严重，形成的孔洞较大，有一定程度的刻蚀，无菌对照组的 PVC 塑料薄膜表面均无明显变化。

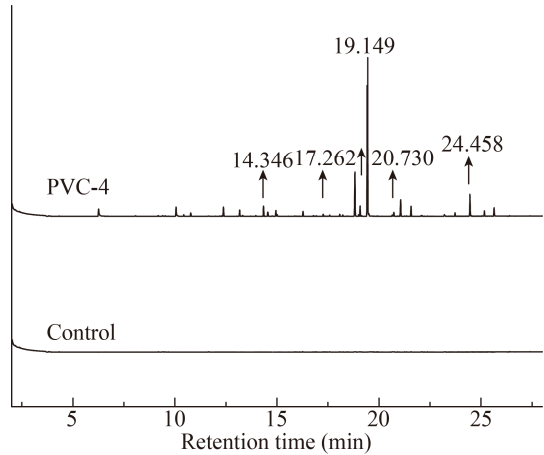


图10 PVC经菌株降解后的水溶性GC-MS色谱图
Figure 10 GC-MS chromatogram of PVC degraded by PVC-4 strain

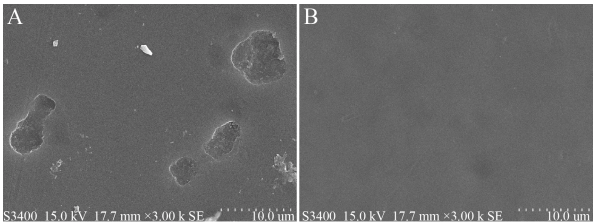


图11 实验组PVC(A)和对照组PVC(B)的SEM图
Figure 11 Experimental group (A) and control group (B) SEM of PVC

3 讨论与结论

黄粉虫能取食塑料并在塑料为唯一食物来源条件下生长的这一现象，为科研人员解决“白色污染”问题提供了一条绿色路线。本文通过对饲喂

表3 GC-MS检测PVC降解产物
Table 3 Degradation products of PVC detected by GC-MS

Retention time (min)	Formula	Speculate product	Similarity (%)	Control	PVC-4
14.346	C ₈ H ₁₈ O ₄	2,5-dimethylhexane-2,5-dihydroperoxide	89	—	+
17.262	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	Propanoic acid,2-methyl-,3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl ester	94	—	+
19.149	C ₈ H ₁₆ O	3-hexanone,2,5-dimethyl	84	—	+
20.730	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	91	—	+
24.458	C ₁₉ H ₂₈ O ₄	Phthalic acid,hept-4-yl isobutyl ester	90	—	+

注：+：有吸收峰；-：没有吸收峰。
Note: +: Existence of peak; -: Inexistence of peak.

PVC 的黄粉虫粪便提取物进行傅里叶变换红外光谱图分析,发现 PVC 经过黄粉虫肠道作用后其高分子长链被切断,氯原子相连的 C 或氯原子侧基脱离。对肠道微生物群落结构进行分析,发现了喂养 PVC 塑料的黄粉虫肠道中哈夫尼菌属(*Hafnia*)和摩根氏菌属(*Morganella*)菌群含量显著增加。通过 GPC 检测,发现经菌株降解后 PVC 分子量降低,且 GC-MS 检测分析得到无机盐液体培养基中有小分子物质的产生,进一步证实了菌株具有降解 PVC 物质的能力。研究结果准确定位了可降解 PVC 的主要菌株类群,揭示了黄粉虫食用塑料生长的机理,为塑料等“白色污染”的生物降解提供了理论依据,为解决塑料污染问题提供了一个新的尝试。

本研究只对黄粉虫肠道微生物的好氧菌进行了研究,肠道微生物中厌氧菌的分离筛选也是应该着重研究讨论的一部分。另外,对于所研究筛选出来的具有 PVC 降解效果的菌株,应该进一步研究他们的酶学特征,探究有效降解菌所产生的胞外酶对 PVC 是否具有降解效果。

REFERENCES

- [1] Cheng T. Development status and modification of PVC[J]. China Chemical Trade, 2015(28): 178 (in Chinese)
成涛. 聚氯乙烯的发展状况以及改性[J]. 中国化工贸易, 2015(28): 178
- [2] Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate)[J]. Science, 2016, 351(6278): 1196-1199
- [3] Restrepo-Flórez JM, Bassi A, Thompson MR. Microbial degradation and deterioration of polyethylene — a review[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 88: 83-90
- [4] Yi LY, van Boekel MAJS, Boeren S, et al. Protein identification and *in vitro* digestion of fractions from *Tenebrio molitor*[J]. European Food Research and Technology, 2016, 242(8): 1285-1297
- [5] Chen CG. Discovery of digestive organic plastics[J]. Science in 24 Hours, 2005(2): 25 (in Chinese)
陈重光. 黄粉虫可消化有机塑料的发现[J]. 科学24小时, 2005(2): 25
- [6] Shen YH. Isolation of intestinal bacteria from *T. molitor* L. and study on the phenomenon of plastic degradation[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2011 (in Chinese)
沈叶红. 黄粉虫肠道菌的分离和取食塑料现象的研究[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2011
- [7] Yang J, Yang Y, Wu WM, et al. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(23): 13776-13784
- [8] Brandon AM, Gao SH, Tian RM, et al. Biodegradation of polyethylene and plastic mixtures in mealworms (larvae of *Tenebrio molitor*) and effects on the gut microbiome[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(11): 6526-6533
- [9] Yang Y, Yang J, Wu WM, et al. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 2. Role of gut microorganisms[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(20): 12087-12093
- [10] Yang Y, Yang J, Wu WM, et al. Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 1. Chemical and physical characterization and isotopic tests[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(20): 12080-12086
- [11] Zhang QP, Wu YQ, Wang J, et al. Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27572
- [12] Ong SY, Kho HP, Riedel SL, et al. An integrative study on biologically recovered polyhydroxyalkanoates (PHAs) and simultaneous assessment of gut microbiome in yellow mealworm[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 265: 31-39
- [13] Austin HP, Allen MD, Donohoe BS, et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(19): E4350-E4357
- [14] Zhang L, Liu HY, Zeng GM, et al. Isolation, identification and characterization of chlorpyrifos degrading bacterium CH3[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2008, 2(10): 1421-1424 (in Chinese)
张利, 刘红玉, 曾光明, 等. 一株毒死蜱降解菌的分离鉴定及降解性能研究[J]. 环境工程学报, 2008, 2(10): 1421-1424
- [15] Lin LY, Yu SG, Ke LL, et al. Isolation and degradation characteristics of steroid-degrading bacterial strain D61[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2016, 45(3): 320-324 (in Chinese)
林龙云, 于曙光, 柯兰兰, 等. 甾类化合物降解菌D61的分离鉴定及其降解特性[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2016, 45(3): 320-324
- [16] Zhang J, Zhang LL, Hu L, et al. Screening and preliminary identification of nicotine degrading microbes[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2010, 16(6): 89-93 (in Chinese)
张娟, 张丽丽, 扈麟, 等. 烟碱降解菌的筛选与初步鉴定[J]. 中国烟草学报, 2010, 16(6): 89-93

- [17] Kang JT, Wu X, Gan BC, et al. Isolation and identification of high efficiency methlparathion degrading bacterium BR13 and BR57[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2011, 24(2): 566-569 (in Chinese)
康纪婷, 吴翔, 甘炳成, 等. 高效有机磷降解菌BR13和BR57的分离和鉴定[J]. 西南农业学报, 2011, 24(2): 566-569
- [18] Pan KL, Mao YC, Yue SJ, et al. Effects of *pgi* knockout on mixed carbon source utilization of *Escherichia coli*[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2018, 32(1): 138-146 (in Chinese)
潘柯莉, 茅以诚, 岳圣杰, 等. *pgi*基因敲除对大肠杆菌利用混合碳源的影响[J]. 高校化学工程学报, 2018, 32(1): 138-146
- [19] Wang YL, Li J, Gao P, et al. Interaction between purple sweet potato anthocyanin and *Escherichia coli in vitro*[J]. Food Research and Development, 2018, 39(23): 37-43 (in Chinese)
王艳丽, 李静, 高品, 等. 紫甘薯花色苷与大肠杆菌在体外的相互作用[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(23): 37-43
- [20] Wang CW, Li Z, Qu HN, et al. Construction of *Escherichia coli* by xylan for growth[J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2014, 32(1): 103-107 (in Chinese)
王翠薇, 李哲, 屈虹男, 等. 利用木聚糖生长的大肠杆菌的构建[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2014, 32(1): 103-107

编辑部公告

邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wsxwtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

