



研究报告

聚乳酸/聚己二酸-对苯二甲酸丁二酯对土壤细菌群落结构的影响及其降解菌的筛选

张敏^{*1} 贾昊¹ 翁云宣² 李成涛¹¹ 陕西科技大学环境科学与工程学院 陕西 西安 710021² 北京工商大学塑料卫生与安全质量评价技术北京市重点实验室 北京 100048

摘要:【背景】近年来,聚乳酸/聚己二酸-对苯二甲酸丁二酯(poly lactide/polybutylene adipate-co-terephthalate, PLA/PBAT)可降解地膜得到了广泛的使用,然而材料使用对土壤微生物的影响却鲜有报道。【目的】以新疆土壤为例,研究 PLA/PBAT 地膜的使用对土壤中微生物群落结构的影响;并从土壤中筛选可降解 PLA/PBAT 的菌株,为土壤环境的原位修复提供技术支持。【方法】采用高通量测序的方法对比使用 PLA/PBAT 地膜前后土壤中细菌群落的结构变化;采用筛选培养基从土壤中分离、鉴定 PLA/PBAT 的降解菌,通过改变不同培养条件研究菌株降解效果。【结果】使用 PLA/PBAT 地膜后,土壤中酸杆菌门、芽单胞菌门的相对丰度上升,变形菌门、放线菌门的相对丰度下降,这可能是地膜降解过程中其中间产物对土壤 pH 及微生物的抑制作用所致;并从土壤中分离出一株 PLA/PBAT 降解菌 XJ11,初步鉴定为 *Delftia tsuruhatensis*,在外加 1.5%胰蛋白胨的 PLA/PBAT (规格 1×1×0.05 cm)筛选培养基中,接种菌液 1 mL,在 pH 为 7.2、37 °C、130 r/min 的条件下,7 d 内 PLA/PBAT 的降解率可达 6.87%。【结论】PLA/PBAT 地膜的使用可以改变土壤细菌群落结构,从环境中筛选出高效的 PLA/PBAT 降解菌成为解决地膜污染的有效措施。

关键词: 可生物降解, PLA/PBAT, 群落结构影响, *Delftia tsuruhatensis*

Foundation items: Beijing Key Laboratory of Quality Evaluation Technology for Hygiene and Safety of Plastics, Beijing Technology and Business University (TQETJP2018004); Key Research and Development Project of Shaanxi Province (2018SF-375)

***Corresponding author:** E-mail: yanjiushi206@163.com

Received: 24-04-2019; **Accepted:** 02-07-2019; **Published online:** 27-08-2019

基金项目: 北京工商大学塑料卫生与安全质量评价技术北京市重点实验室项目(TQETJP2018004); 陕西省重点研发计划项目(2018SF-375)

***通信作者:** E-mail: yanjiushi206@163.com

收稿日期: 2019-04-24; **接受日期:** 2019-07-02; **网络首发日期:** 2019-08-27

Effects of polylactide/polybutylene adipate-co-terephthalate on bacterial community structure of soil and isolation of degrading bacteria

ZHANG Min^{*1} JIA Hao¹ WENG Yun-Xuan² LI Cheng-Tao¹

¹ School of Environmental Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an, Shaanxi 710021, China

² Beijing Key Laboratory of Quality Evaluation Technology for Hygiene and Safety of Plastics, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

Abstract: [Background] In recent years, the polylactide/polybutylene adipate-co-terephthalate (PLA/PBAT) mulch films has been widely used. However, the effects of PLA/PBAT mulch films on bacterial community structure has rarely been reported. [Objective] The effects of PLA/PBAT mulch films on bacterial community structure was studied. We isolated the PLA/PBAT degrading bacteria to provide technical support for *in situ* remediation. [Methods] The high-throughput sequencing method was used to compare the structural changes of bacterial communities in the Xinjiang soil before and after using the PLA/PBAT mulch films. The PLA/PBAT degrading bacteria were isolated by screening medium, and the degradation effects of the strains were studied by different culture conditions. [Results] After using PLA/PBAT mulch films, the abundance of *Acidophilus* and *Bacillus* were increased, and the abundance of *Proteobacteria* and *Actinomycetes* were decreased. This might be due to the inhibitory effect of intermediate products on pH and microorganisms during the degradation process of the PLA/PBAT mulch films. Moreover, a degrading strain XJ11 was isolated from the soil, which was initially identified as *Delftia tsuruhatensis*. In the screening medium, 1.5% tryptone was added, 1 mL of seed solution was inoculated, the pH of the medium was adjusted to 7.2, and shaker conditions was adjusted to 37 °C and 130 r/min. The degradation rate of PLA/PBAT mulch films (specification: 1×1×0.05 cm) can reach 6.87%. [Conclusion] The PLA/PBAT mulch films could change the bacterial community structure of soil. Screening the PLA/PBAT degrading bacteria from the environment was an effective measure to solve the pollution of mulch films.

Keywords: Biodegradable, PLA/PBAT, Community structure, *Delftia tsuruhatensis*

塑料地膜的铺设可以高效地保湿、保温及促进作物生长^[1-5], 提高农业效益^[6-7], 得到广泛认可。然而由于塑料地膜的主要成分是聚乙烯^[8]等, 使用多年后在土壤中不降解, 带来严重的环境问题^[9]。可生物降解地膜具有传统地膜的优异性^[10], 同时可以被土壤中微生物的生理活动代谢降解^[11], 具备环境友好性, 得到广泛的关注。目前可降解地膜主要是脂肪族聚酯等^[12]的高分子材料, 研究者在通过将聚乳酸(polylactide, PLA)与聚己二酸对苯二甲酸丁二酯(polybutylene adipate-co-terephthalate, PBAT)^[13]共聚或共混, 兼备 PLA 优异的生物降解性能^[14]及 PBAT 良好的力学性能, 并有着广泛的应用^[15]。虽然 PLA/PBAT 地膜可生物降解性较好^[16], 但在试验过程中表现出降解效

果一般等问题^[17], 成为其发展的短板。Touchaleume 等^[18]研究发现, 葡萄地中铺设 PLA/PBAT 地膜(PLA 占 30%), 1 年后质量损失率为 30%左右。这样不采取其他措施处理地膜, 容易造成地膜在土壤中的大量累积, 影响土壤生态环境。

目前使用 PLA/PBAT 地膜对土壤微生物群落结构及降解菌的筛选研究却鲜有报道, 徐松等^[19]采用高通量测序方法研究了菌群 SX 对 PBAT 多次转接降解后细菌群落结构的变化, 结果表明厚壁菌门、放线菌门、硫磺色节杆菌、红螺科等相对丰富度发生明显变化, 其中硫磺色节杆菌的相对丰富度与菌群降解 PBAT 的效率呈正相关, 并推测其可能是降解 PBAT 地膜的有效菌种。可见芳香族/脂肪族聚酯类地膜在土壤中的累积会改变土壤微

生物群落结构,虽然土壤中存在多种可降解地膜的微生物,然而其降解菌的研究却很稀少。霍向东等^[20]从南疆疏勒县土样中分离得到一株可有效降解 PBAT 地膜的微生物 *Sphingopyxis ginsengisoli*,在液体培养基中经过 60 d 降解,对 PBAT 颗粒降解率仅有 0.92%,这对于芳香族共聚酯的降解来说只是冰山一角。

本文采用基于 16S rRNA 基因的 V3-V4 区高通量测序方法,研究新疆地区使用 PLA/PBAT 地膜前后土壤中细菌群落结构的变化,分析并解释 PLA/PBAT 的使用对土壤微生物群落结构的影响;同时从土壤中分离 PLA/PBAT 的降解菌,结合生理生化实验、16S rRNA 基因序列分析与构建系统发育树等方法鉴定降解菌,分析不同培养条件对菌株降解 PLA/PBAT 情况的影响。

1 材料与方法

1.1 研究地点及样品处理

在新疆同一棉花地中,选取连续使用 1 年 PLA/PBAT 地膜土壤(记 XJPBAT)及未使用地膜的土壤(记 XJCK),利用无菌采样器取多点地表下层 20 cm 处土壤,混合均匀后放置于真空管,−80 °C 冰箱保存,每份样品设置 3 个重复,用于高通量测序。此外,取部分土壤过 60 目分子筛后置于真空管,4 °C 冰箱保存,以备降解菌的筛选。将购买的 PLA/PBAT 地膜(PLA 占 20%,分子量为 10 万),经过氯仿纯化后,采用流延法制成规格为 1×1×0.05 cm 的 PLA/PBAT 膜,并置于 60 °C 的真空干燥箱干燥 24 h,备用。

1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒,MOBIO 公司;凝胶回收试剂盒,Axygen 公司;PLA/PBAT,山东天野生物降解新材料科技有限公司;KH₂PO₄、Na₂HPO₄、NH₄Cl、CaCl₂·2H₂O、KCl、MgSO₄·7H₂O 和 NaCl 等试剂,天津市天力化学试剂有限公司;胰蛋白胨、酵母提取物、牛肉膏和蛋白胨等试剂,北京奥博星生物技术有限责任公司;中性红,天津市科密欧化学试剂有限公司;16S rRNA 基因 V3-V4

测序扩增引物 338F 与 806R 由北京奥维森基因科技有限公司合成;扩增引物 27F 与 1492R 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

恒温振荡器,上海比朗仪器有限公司;电热恒温培养箱,天津市泰斯特仪器有限公司;环境扫描电子显微镜,FEI 公司;荧光定量仪,Promega 公司;Illumina MiSeq 测序仪,Illumina 公司。

1.3 培养基

筛选培养基(g/L): PLA/PBAT (规格 1×1×0.05 cm) 10.0, KH₂PO₄ 1.0, Na₂HPO₄ 1.5, NH₄Cl 2.0, CaCl₂·2H₂O 0.1, KCl 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.2, pH 7.2–7.4。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.2–7.4。

PLA/PBAT 覆膜培养基: 在无机盐培养基上涂覆一层 1.0 g 的 PLA/PBAT 膜。

油脂培养基(g/L): 牛肉膏 5.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 花生油 10.0 mL, 0.6% 中性红溶液 1.0 mL, pH 7.2–7.4。

1.4 研究方法

1.4.1 基因组 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

根据土壤 DNA 提取试剂盒 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit 的操作方法,分别称取 0.5 g 土壤样本进行总 DNA 的提取,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测各土壤基因组 DNA 的提取结果。本试验针对细菌 16S rRNA 基因的 V3–V4 测序区,采用通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对每个样本进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, 338F/806R 引物 (5.0 μmol/L) 各 1.0 μL, BSA (2 ng/μL) 3.0 μL, 总 DNA 模板 30.0 ng, 加 ddH₂O 至 25.0 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 55 °C 50 s, 72 °C 45 s, 28 个循环; 72 °C 10 min。将同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用回收试剂盒对目的片段进行回收。采用 QuantiFluorTM-ST 蓝色荧光定量系统对回收产物进行定量检测。然后构建插入片段为 350 bp 的 Paired-End 文库,经过

Qubit 定量和文库检测, MiSeq300 上机测序。

1.4.2 测序数据质控与分析

对测序得到的原始数据进行拼接、过滤, 得到有效数据。利用 Mothur 软件去除无效序列, 并对有效数据进行操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 聚类 and 物种分类分析。结合用 RDP Classifier 算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析, 并挑选各个 OTU 中的代表序列, 与细菌和古菌核糖体数据库 (Silva, <http://www.arb-silva.de>) 进行物种注释分析, 并在门、属水平上注释其群落的物种信息并绘制物种组成分析图。

1.4.3 PLA/PBAT 降解菌的分离纯化

将土壤配制成菌悬液, 取上清液接种于筛选培养基中, 于 30 °C、130 r/min 培养。待培养基浑浊后, 取菌液涂布于筛选培养基平板中, 置于培养箱中 30 °C 恒温培养, 在平板上挑取单菌落接种至筛选培养基上, 经过多次分离纯化, 直至获得单一的菌株。

1.4.4 菌株鉴定

形态学观察: 在 LB 培养基上观察菌株 XJ11 的菌落形态, 并挑取微生物进行革兰氏染色观察。

生理生化实验: 根据《常见细菌系统鉴定手册》^[21] 进行。

菌株 XJ11 的 16S rRNA 基因序列分析: 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F 及 1492R, 以总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×Taq PCR Master Mix 20.0 μL, 27F/1492R 引物 (10 μmol/L) 各 2.0 μL, 总 DNA 模板 3 μL, 加 ddH₂O 至 50.0 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。将扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序结果提交 GenBank 数据库并进行核苷酸序列同源比对。然后用 MEGA 7.0 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.4.5 不同培养条件对菌株降解 PLA/PBAT 的影响

在筛选培养基中外加不同氮源, 分别在培养基中加入 0.1%、0.5%、1%、1.5%、2% 的胰蛋白

胨、明胶、骨胶原多肽、NaNO₂ 及 CO(NH₂)₂, 调 pH 至 7.2, 加入 PLA/PBAT 膜, 并接种培养 12 h 的 XJ11 种子液, 37 °C、130 r/min 振荡培养 7 d 后, 称重计算 PLA/PBAT 膜质量损失率。

在确定最佳外加氮源条件下, 依次单一改变培养基中菌株接种量为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL; 在最佳氮源及接种量条件下, 改变 pH 为 5.2、6.2、7.2、8.2、9.2; 在最佳氮源、接种量及 pH 条件下, 改变培养温度为 29、33、37、41 和 45 °C; 在最佳氮源、接种量、pH 及培养温度条件下, 改变培养箱转速为 70、100、130、160 和 190 r/min, 测菌株 XJ11 的生长量 OD₆₀₀ 及 PLA/PBAT 膜质量损失率, 初步研究不同培养条件下菌株 XJ11 对 PLA/PBAT 的降解效果。

在上述优化条件下, 研究菌株 XJ11 对 PLA/PBAT 材料的降解速率, 与未优化条件之前进行对比, 分析菌株 XJ11 对材料的降解效果。

1.4.6 电镜观察

降解实验后的 PLA/PBAT 材料经喷金处理后, 利用高分辨场发射扫描电镜观察表面形貌特征变化。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物种类变化差异

从各土壤样本的 Flower 图可见(图 1), 样本共有的 OTU 有 1 146 个, 其中 XJCK 的 3 个平行样特有的 OTU 分别为 980、950 和 912 个, 平均 947 个; XJPBAT 的 3 个平行样特有的 OTU 分别为 848、896 和 892 个, 平均为 879 个, 表明 XJCK 与 XJPBAT 样品中各自样品间的差异很小, 可见样品选取均匀得当; XJCK 中的 OTU 有 2 093 个, XJPBAT 中的 OTU 仅为 2 025 个, 下降了 68 个, 可知 PLA/PBAT 的使用影响土壤中微生物多样性。

2.2 土壤微生物群落结构变化差异

从门水平上(图 2), XJCK 土壤中优势菌为酸杆菌门 (19.4%)、变形菌门 (22.2%)、绿弯菌门 (20.3%)、放线菌门 (19.8%)、芽单胞菌门 (8.1%)、拟杆菌门 (2.9%)、浮霉菌门 (2.1%)、厚壁菌门

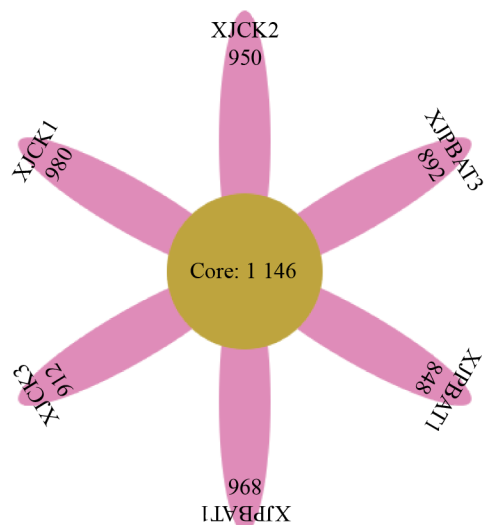


图1 PLA/PBAT 使用前后各土壤样本的 Flower 图

Figure 1 Flower diagram of soil samples before and after using PLA/PBAT mulch

(1.4%); XJPBAT 土壤中优势菌为酸杆菌门 (27.4%)、变形菌门 (18.8%)、绿弯菌门 (19.2%)、放线菌门 (12.0%)、芽单胞菌门 (13.0%)、拟杆菌门 (2.6%)、浮霉菌门 (1.6%)、厚壁菌门 (0.4%)。PLA/PBAT 使用后, 土壤中酸杆菌门丰度上升 8.0%, 芽单胞菌门丰度上升 4.9%, 变形菌门丰度下降 3.4%, 放线菌门丰度下降 7.8%, PLA/PBAT 地膜使用后土壤中优势菌的丰度变化明显。

如图 3 所示, 从属水平上研究 XJCK 中优势菌主要有 RB41 (2.9%)、*Skermanella* (1.7%)、MND1

(0.7%)、鞘氨醇单胞菌 (1.5%)、*Gaiella* (1.2%)、假节杆菌 (0.5%)、*Gemmatimonas* (0.5%)、*Defluviicoccus* (0.2%)。XJPBAT 中优势菌丰度主要有 RB41 (3.0%)、*Skermanella* (1.3%)、MND1 (1.7%)、鞘氨醇单胞菌 (0.8%)、*Gaiella* (1.0%)、假节杆菌 (1.2%)、*Gemmatimonas* (0.9%)、*Defluviicoccus* (1.2%) 等。在 PLA/PBAT 使用后, *Skermanella* 的丰度下降 0.4%, 鞘氨醇单胞菌的丰度下降 0.7%, MND1 的丰度上升 1.0%, 假节杆菌的丰度上升 0.7%, *Gemmatimonas* 的丰度上升 0.4%, *Defluviicoccus* 的丰度上升 1.0%。

2.3 菌株的筛选与鉴定

2.3.1 菌落特征

通过筛选培养基多次分离纯化后, 在平板上获得一株降解菌 XJ11。在 LB 平板上菌落为乳白色的圆形、表面光滑、边缘平整、不透明、呈隆起状, 从其在 PLA/PBAT 覆膜培养基的生长状况来看, 如图 4A 所示, 菌株 XJ11 可在 PLA/PBAT 膜上大量附着生长, 说明此菌株与 PLA/PBAT 之间的相容性良好, 有利于菌株在 PLA/PBAT 上定殖, 加速材料的降解。

2.3.2 生理生化特征

菌株 XJ11 为革兰氏阴性菌 (图 4B), 可分泌脂肪酶^[22-23] (图 4C), 酶解 PLA/PBAT, 同时其相关生理生化实验结果与叶杰旭等^[24]报道的一致 (表 1)。

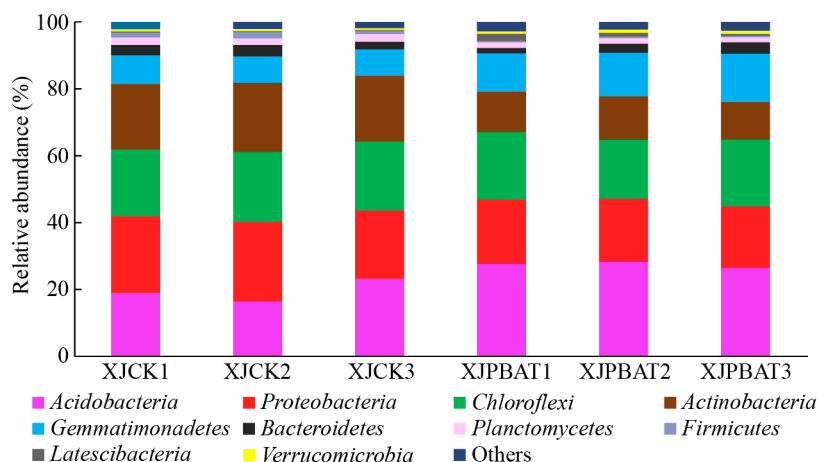


图2 PLA/PBAT 使用前后土壤样本的门水平微生物组成及相对丰度

Figure 2 Microbial composition and relative abundance at phylum level

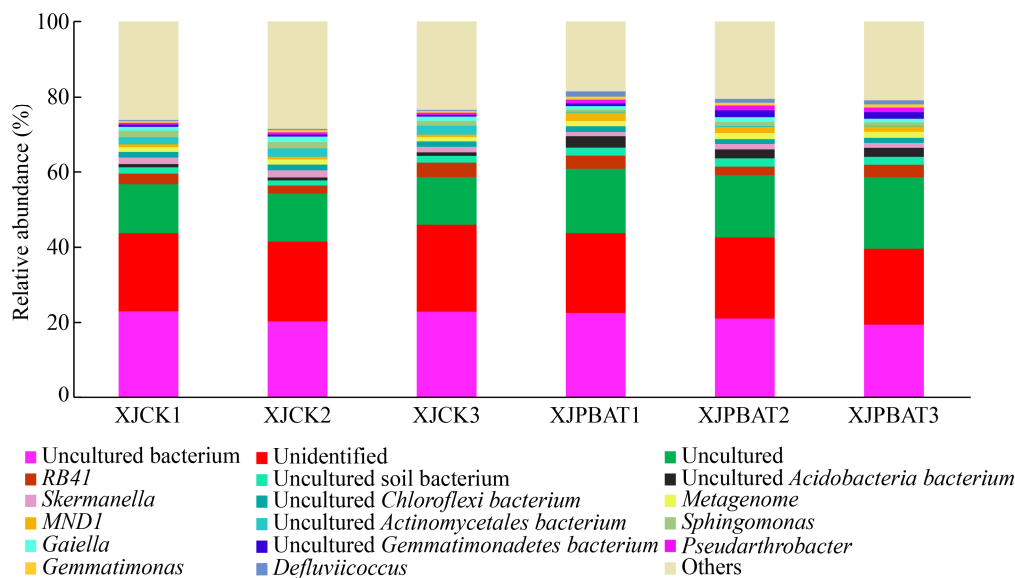


图 3 PLA/PBAT 使用前后土壤样本的属水平微生物组成及相对丰度
Figure 3 Microbial composition and relative abundance at genus level

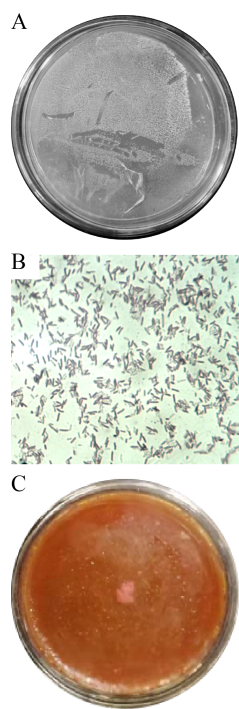


图 4 菌株 XJ11 的革兰氏染色及培养基生长特征图
Figure 4 Gram staining and microbial morphology of strain XJ11
注: A: 革兰氏染色; B: PLA/PBAT 覆膜培养基上的生长形态;
C: 油脂水解试验。
Note: A: Gram staining; B: Growth morphology on PLA/PBAT coated medium; C: Lipid hydrolysis test.

表 1 XJ11 菌株的生理生化特征
Table 1 Physiological and biochemical tests of strain XJ11

测定项目 Items	特征 Characteristic
Gram staining	—
V-P reaction	—
Methyl red test	—
Catalase reaction	+
Starch hydrolysis test	—
Lipid hydrolysis test	+

注: +: 阳性; -: 阴性。
Note: +: Positive; -: Negative.

2.3.3 16S rRNA 基因序列分析

将测序结果利用 DNAMAN 软件进行分析, 在 NCBI 在线 BLAST 工具中进行基因的多重序列比对, 结果表明菌株 XJ11 的 16S rRNA 基因序列与 *Delftia tsuruhatensis* 的一致性最高, 可达 100%。菌株 XJ11 的 16S rRNA 基因序列已经在 GenBank 中注册, 登录号为 MK574811。选取与其相似性高的 10 个菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 如图 5 所示, XJ11 菌株与 *Delftia tsuruhatensis* 在同一分支上, 表明亲缘关系相近。

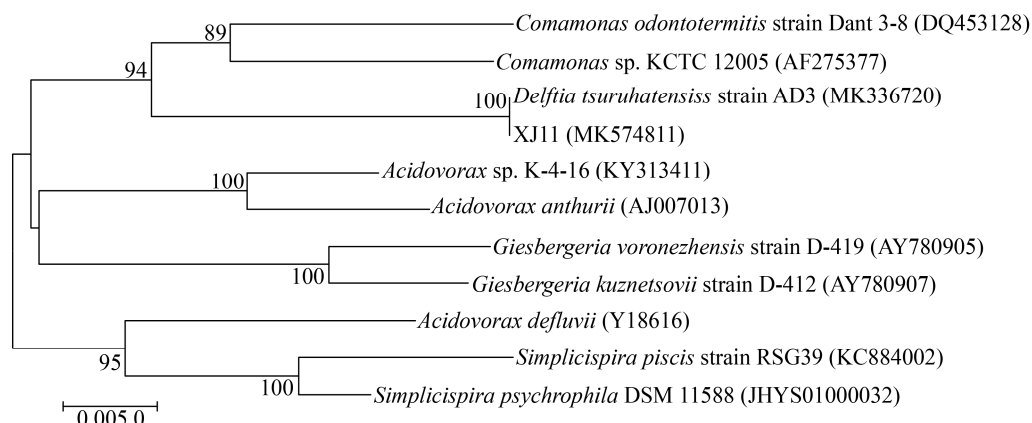


图5 菌株 XJ11 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain XJ11

综合菌株菌落形态、生理生化及 16S rRNA 基因序列鉴定结果，将其初步鉴定为 *Delftia tsuruhatensis*。

2.4 不同培养条件对菌株降解 PLA/PBAT 的影响

如图 6 所示，与不含外加氮源的对照组相比，含有外加氮源的菌株 XJ11 对 PLA/PBAT 的降解率显著升高。随着外加氮源浓度的增加，PLA/PBAT 的降解率呈现先增加后减少的趋势。当外加氮源的浓度为 1.5% 时，菌株对 PLA/PBAT 的降解率最佳，与此同时，不同外加氮源对 PLA/PBAT 的降解率影响依次为：胰蛋白胨 > 骨胶原蛋白 > 明胶 > NaNO_2 > $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 。说明菌株 XJ11 对有机氮源的利用高于无机氮源；其中外加胰蛋白胨的 PLA/PBAT 降解率最高为 6.44% (此时菌液的 OD_{600} 为 1.982)，是对照组降解率(1.98%)的 3.2 倍。

由图 7A 可知，接种量对菌株 XJ11 降解率的影响不大，当接种量为 0.5 mL 时，菌株 XJ11 生长量(OD_{600})为 1.462，降解率为 4.58%；接种量 0.5 mL 增长到 1.0 mL 这一阶段，随接种量的增加降解率也不断增加；当接种量为 1 mL 时，菌株 XJ11 生长量为 1.908，降解率达最高值 6.32%；接种量 1.0 mL 增长到 2.5 mL 这一阶段，随着接

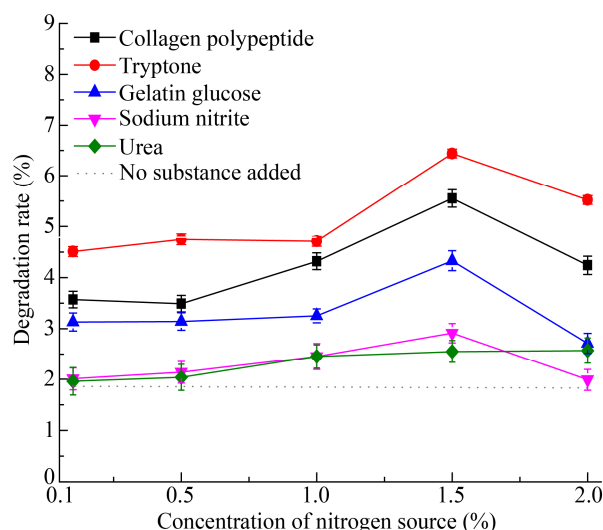


图6 外加不同氮源条件下菌株 XJ11 对 PLA/PBAT 的降解

Figure 6 Degradation of PLA/PBAT by strain XJ11 under different nitrogen sources

种量的增加，降解率不增加反而下降。前期降解率较低的原因是接种量较少，菌株 XJ11 的生物量低，从而降解率不高，然而当接种量超过 1 mL 后降解率会出现微弱的下降。其原因可能是由于菌株 XJ11 的生长量较高，营养物质、氧气等生长因素的限制，从而对 PLA/PBAT 的降解率不断下降。

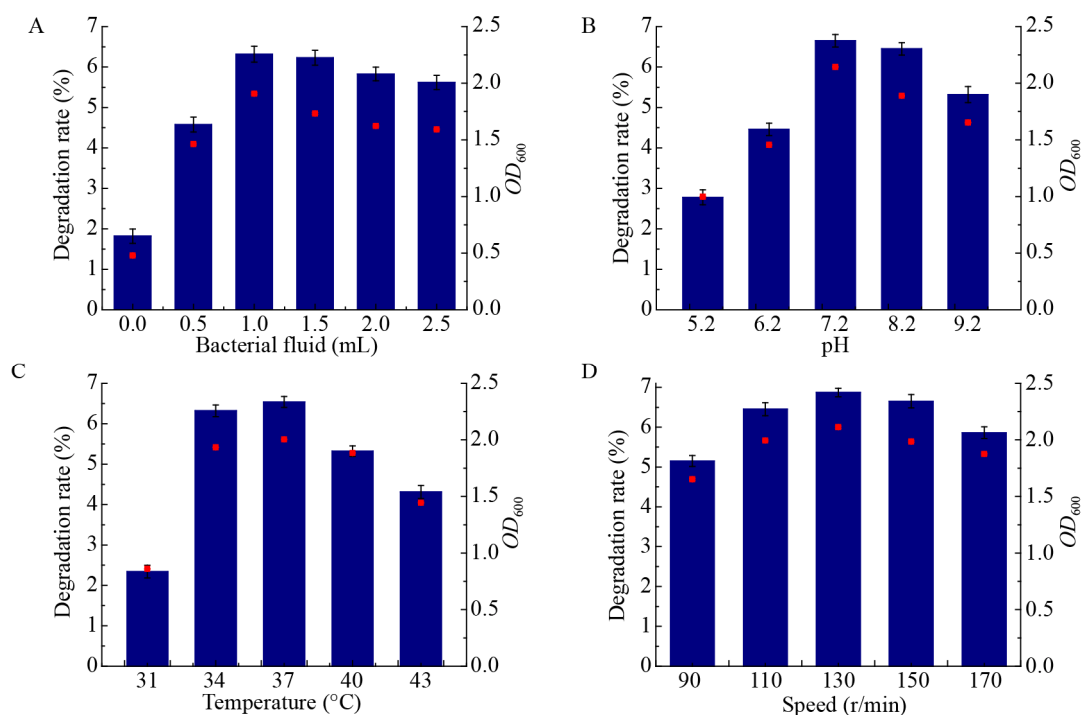


图7 不同因素对菌株 XJ11 生长和 PLA/PBAT 降解的影响

Figure 7 Effects of different conditions on the degradation of PLA/PBAT by strain XJ11

注: A: 培养条件: pH 7.2, 温度 37 °C, 摇床转速 130 r/min; B: 培养条件: 接种量 1 mL, 温度 37 °C, 摇床转速 130 r/min; C: 培养条件: 接种量 1 mL, pH 7.2, 摇床转速 130 r/min; D: 培养条件: 接种量 1 mL, pH 7.2, 温度 37 °C.

Note: A: Conditions: pH 7.2, temperature 37 °C, speed 130 r/min; B: Conditions: Inoculum volume 1 mL, temperature 37 °C, speed 130 r/min; C: Conditions: Inoculum volume 1 mL, pH 7.2, speed 130 r/min; D: Conditions: Inoculum volume 1 mL, pH 7.2, temperature 37 °C.

由图 7B 可知, pH 对菌株 XJ11 的降解率影响较大, 当 pH 为 5.2 时, 菌株 XJ11 的生长量为 0.998, 降解率为 2.78%; 当 pH 5.2 增加到 pH 7.2 时, 随 pH 的增加降解率也不断增加; 当 pH 为 7.2 时, 菌株 XJ11 生长量为 2.144, 降解率达最高值 6.65%; 当 pH 7.2 增加到 pH 9.2 时, 随着 pH 的增加, 降解率不断下降。结果表明菌株在过酸过碱的环境中, 不利于 PLA/PBAT 的降解。

温度对菌株 XJ11 的降解效果影响也较明显, 如图 7C 所示, 随着温度的升高, 菌株的生长量及其降解效果明显增加, 温度增至 37 °C 时, 菌株 XJ11 生长量为 2.004, 达到最佳降解率 6.54%, 随后降解率不断下降。结果表明温度影响菌株 XJ11 的生命活动, 温度还可以通过影响酶促反应速度而影响其对 PLA/PBAT 的降解。

摇床转速对菌株 XJ11 的降解效果影响不明显,

如图 7D 所示, 菌株 XJ11 的生长量及降解率的趋势与温度、pH 等一致, 出现先增加后减少的现象, 摇床转速为 130 r/min 时, 达到最佳降解率 6.87%。可见菌株 XJ11 在外加 1.5% 胰蛋白胨的筛选培养中, 菌液接种量为 1 mL、培养温度为 37 °C、pH 为 7.2 及摇床速度 130 r/min 条件下, 菌株生长量为 2.112, PLA/PBAT 的降解率为 6.87%。

如图 8 所示, 与未优化条件之前相比, 在最适的降解条件下菌株 XJ11 对 PLA/PBAT 的降解速率随着降解天数的增加而稳步提高, 最高可达 147.2 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{d})$, 明显高于未优化条件的降解速率 58.5 $\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{d})$ 。

2.5 PLA/PBAT 材料的扫描电镜图

菌株 XJ11 降解 PLA/PBAT 前(图 9A)材料表面平整, 降解后(图 9B)材料表面变得粗糙, 出现很多小碎片, 并附着大量的微生物, 表明 PLA/PBAT 发生了降解。

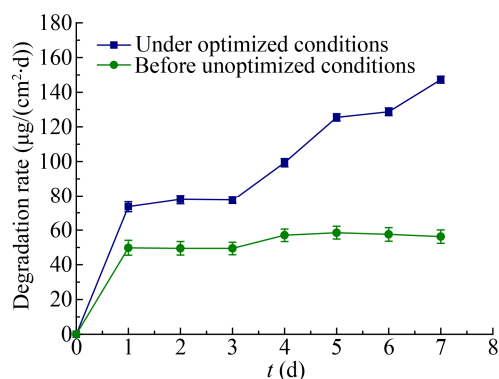


图8 不同降解条件下菌株 XJ11 对 PLA/PBAT 的降解速率图

Figure 8 Degradation rate of PLA/PBAT by strain XJ11 under different degradation conditions

注: A: 优化条件下, 外加 1.5% 的胰蛋白胨的筛选培养中, 接种量 1 mL, 温度 37 °C, pH 7.2, 摇床转速 130 r/min; B: 未优化条件前, 筛选培养基中, 接种量 1 mL, 温度 37 °C, pH 7.2, 摇床转速 130 r/min.

Notes: A: Under optimized conditions: In addition to 1.5% tryptone in screening culture, inoculum volume 1 mL, temperature 37 °C, pH 7.2 and speed 130 r/min; B: Before unoptimized conditions: Screening culture, inoculum volume 1 mL, temperature 37 °C pH 7.2 and speed 130 r/min.

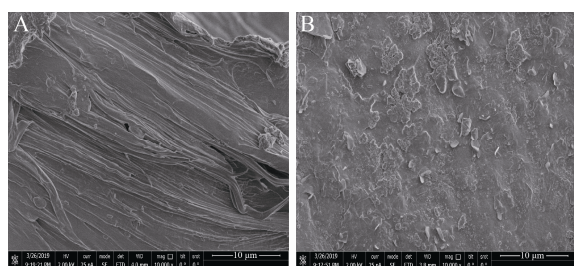


图9 PLA/PBAT 降解前后的电镜图(10 000×)

Figure 9 Electron microscopy before and after degrading PLA/PBAT mulch (10 000×)

注: A: 降解前; B: 降解后.

Note: A: Before degrading PLA/PBAT mulch; B: After degrading PLA/PBAT mulch.

3 讨论与结论

相关研究表明, PLA/PBAT 在土壤中降解的过程中可以产生乳酸、对苯二甲酸^[25]等中间物质, 降低土壤的 pH 值, 使得酸杆菌门^[26]、芽单胞菌门^[27]的丰度明显提高; 变形菌门、放线菌门存在多种可降解多环芳烃类^[28]和高分子类^[29-30]化合物的微生物, 但由于土壤 pH 值的下降, 抑制了

其脂肪酶^[25,31]活性, 再者其中间产物的累积对微生物有一定抑制作用, 所以变形菌门与放线菌门的丰度分别下降了 3.4%、7.8%。在属水平上, 变形菌门中的鞘氨醇单胞菌^[32-33]对苯、菲、芘等多环芳烃类化合物具有良好的降解效果, 然而在地膜使用后, 该菌受到降解产物的影响, 丰度下降了 0.7%。再者, 细菌单个基因组内的 16S rRNA 基因的多样性广泛存在, 会使得采用 16S rRNA 基因的不同区域序列研究物种多样性时造成多样性不同程度的高估。Sun 等^[34]的研究结果表明, V6 区的高估程度最高为 12.9%, V4-V5 区的高估程度最低为 3.0%。本文中采用的是 V3-V4 区, 这可能使得所测结果的多样性高估。综合以上, 可见 PLA/PBAT 地膜的使用, 对新疆土壤中的变形菌门及放线菌门有明显的抑制作用, 从而影响变形菌门及放线菌门相关的降解菌对 PLA/PBAT 的降解, 所以极有必要从土壤中分离筛选出可降解 PLA/PBAT 的微生物, 用于土壤原位修复, 改善 PLA/PBAT 等地膜带来的环境问题。

Delftia tsuruhatensis 属于变形菌门, 是一种广泛存在于土壤中的微生物, 目前已发现其具有降解如氯苯^[24]、聚-3-羟基链烷酸酯 (poly-3-hydroxyalkanoates, PHAs)^[35]等多种有机污染物的能力, 对 PLA/PBAT 材料的降解尚未见报道。

目前研究发现少数微生物对 PLA/PBAT 等材料具备降解能力, 如 Muroi 等^[36]从土壤中分离得到一株 *Bacillus pumilus*, 在 30-40 °C、120 r/min 的液体基础培养基中降解 PBAT 膜 (1 cm×1 cm×0.1 mm), 降解率仅为 12.2 μg/(cm²·d), 质量损失率不足 1%; 霍向东等^[20]从土壤中分离得到 PBAT 降解菌 *Sphingopyxis ginsengisoli*, 60 d 内对 PBAT 颗粒降解率仅有 0.92%。本研究从新疆土壤中分离到一株 PLA/PBAT 降解菌 XJ11, 经形态学、生理生化以及 16S rRNA 基因序列分析初步鉴定为 *Delftia tsuruhatensis*, 在一定条件下对 PLA/PBAT 的降解率在 7 d 内可达 6.87%, 优于目前报道的单个微生

物降解同类型材料的效果, 在 PLA/PBAT 等材料的生物降解领域存在着重要的研究价值。

REFERENCES

- [1] Gu YJ, Han CL, Fan JW, et al. Alfalfa forage yield, soil water and P availability in response to plastic film mulch and P fertilization in a semiarid environment[J]. *Field Crops Research*, 2018, 215: 94-103
- [2] Zhang YL, Wang FX, Shock CC, et al. Effects of plastic mulch on the radiative and thermal conditions and potato growth under drip irrigation in arid Northwest China[J]. *Soil & Tillage Research*, 2017, 172: 1-11
- [3] Sullivan TP, Sullivan DS, Granatstein DM. Influence of living mulches on vole populations and feeding damage to apple trees[J]. *Crop Protection*, 2018, 108: 78-86
- [4] Ranaivoson L, Naudin K, Ripoché A, et al. Is mulching an efficient way to control weeds? Effects of type and amount of crop residue in rainfed rice based cropping systems in Madagascar[J]. *Field Crops Research*, 2018, 217: 20-31
- [5] Gao X, Gu FX, Mei XR, et al. Carbon exchange of a rainfed spring maize cropland under plastic film mulching with straw returning on the Loess Plateau, China[J]. *CATENA*, 2017, 158: 298-308
- [6] Canul-Tun CE, Ibarra-Jiménez L, Valdez-Aguilar L, et al. Influence of colored plastic mulch on soil temperature, growth, nutrimental status, and yield of bell pepper under shade house conditions[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2017, 40(8): 1083-1090
- [7] Zhao H, Wang RY, Ma BL, et al. Ridge-furrow with full plastic film mulching improves water use efficiency and tuber yields of potato in a semiarid rainfed ecosystem[J]. *Field Crops Research*, 2014, 161: 137-148
- [8] Zhang L, Sintim HY, Bary AI, et al. Interaction of *Lumbricus terrestris* with macroscopic polyethylene and biodegradable plastic mulch[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 635: 1600-1608
- [9] Yan CR, He WQ, Turner NC, et al. Plastic-film mulch in Chinese agriculture: importance and problems[J]. *World Agriculture*, 2014, 4(2): 32-36
- [10] Gu XB, Li YN, Du YD. Biodegradable film mulching improves soil temperature, moisture and seed yield of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.)[J]. *Soil and Tillage Research*, 2017, 171: 42-50
- [11] Volova TG, Prudnikova SV, Vinogradova ON, et al. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates with different chemical compositions and their biodegradability[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 73(2): 353-367
- [12] Wu NJ, Zhang H. Mechanical properties and phase morphology of super-tough PLA/PBAT/EMA-GMA multicomponent blends[J]. *Materials Letters*, 2017, 192: 17-20
- [13] Qu P, Guo BH, Wang HB, et al. Degradation characteristics of PBAT mulch in maize field[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2017, 33(17): 194-199 (in Chinese)
- 曲萍, 郭宝华, 王海波, 等. PBAT 全生物降解地膜在玉米田中的降解特性[J]. *农业工程学报*, 2017, 33(17): 194-199
- [14] Kwiecien I, Adamus G, Jiang GZ, et al. Biodegradable PBAT/PLA blend with bioactive MCPA-PHBV conjugate suppresses weed growth[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(2): 511-520
- [15] Moustafa H, El Kissi N, Abou-Kandil AI, et al. PLA/PBAT bionanocomposites with antimicrobial natural rosin for green packaging[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(23): 20132-20141
- [16] 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
- [17] Sintim HY, Flury M. Is biodegradable plastic mulch the solution to agriculture's plastic problem?[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(3): 1068-1069
- [18] Touchaleaume F, Martin-Closas L, Angellier-Coussy H, et al. Performance and environmental impact of biodegradable polymers as agricultural mulching films[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 433-439
- [19] Xu S, Wang JJ, Zhou TT, et al. Screening and community succession of high effective poly (butylene adipate-co-terephthalate) plastic mulch degrading bacteria[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(11): 2341-2352 (in Chinese)
- 徐松, 王敬敬, 周婷婷, 等. 聚己二酸/对苯二甲酸丁二酯塑料地膜高效降解菌群筛选及其群落结构演替特征[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(11): 2341-2352
- [20] Huo XD, Gao Y, Lin Q, et al. Isolation and identification of poly (butylene adipate-co-terephthalate)-degrading bacteria[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2017, 54(11): 132-137 (in Chinese)
- 霍向东, 高雁, 林青, 等. 聚对苯二甲酸-己二酸丁二酯 (PBAT)降解菌的分离鉴定和降解能力测定[J]. *新疆农业科学*, 2017, 54(11): 132-137
- [21] Dong XZ, Cai MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 1-198 (in Chinese)
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1-198
- [22] Zhang M, Li CT, Xu XL, et al. The catalytic degradation of PC lipases and molecular simulation on PBS based copolymer in different solvent system[J]. *Polymer Bulletin*, 2014(12): 141-148 (in Chinese)
- 张敏, 李成涛, 许小玲, 等. 在不同溶剂体系中 PC 脂肪酶对 PBS 基共聚物的催化降解和分子模拟[J]. *高分子通*

- 报, 2014(12): 141-148
- [23] Zhang M, Ding ML, Zhang T, et al. Effect of solvent on the enzyme catalysis biodegradation of PBS with high molecular weight and its modified copolymer[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2010, 31(3): 612-615 (in Chinese)
张敏, 丁明亮, 张婷, 等. 溶剂对脂肪酶降解高分子量 PBS 及改性共聚物的影响[J]. 高等学校化学学报, 2010, 31(3): 612-615
- [24] Ye JX, Lin TH, Luo YH, et al. Isolation and identification of a chlorobenzene-degrading bacterium and its degradation characteristics[J]. Environmental Science, 2017, 38(2): 802-808 (in Chinese)
叶杰旭, 林彤晖, 骆煜昊, 等. 1 株氯苯高效降解菌的分离鉴定及降解特性[J]. 环境科学, 2017, 38(2): 802-808
- [25] Li JX, Gu JD. Degradation of dimethyl terephthalate ester and its isomer by mangrove microorganisms[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2004, 10(6): 782-785 (in Chinese)
李佳喜, 顾继东. 对苯二甲酸二甲酯及其异构体的好氧微生物降解[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(6): 782-785
- [26] Wang GH, Liu JJ, Yu ZH, et al. Research progress of *Acidobacteria* ecology in soils[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(2): 14-20 (in Chinese)
王光华, 刘俊杰, 于镇华, 等. 土壤酸杆菌门细菌生态学研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(2): 14-20
- [27] Cao YQ, Yan XJ, Luo HY, et al. Nitrification activity and microbial community structure in purple soils with different pH[J]. Acta Pedologica Sinica, 2018, 55(1): 194-202 (in Chinese)
曹彦强, 闫小娟, 罗红燕, 等. 不同酸碱性紫色土的硝化活性及微生物群落组成[J]. 土壤学报, 2018, 55(1): 194-202
- [28] Zhang Y, Wu XF, Dong SJ, et al. Effect of DEHP on soil microbial populations and enzyme activities[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2015, 46(1): 47-54 (in Chinese)
张颖, 吴雪峰, 董士嘉, 等. DEHP 对黑土微生物数量及酶活性的影响[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(1): 47-54
- [29] Kanokratana P, Mhuanong W, Laothanachareon T, et al. Phylogenetic analysis and metabolic potential of microbial communities in an industrial bagasse collection site[J]. Microbial Ecology, 2013, 66(2): 322-334
- [30] Berlemont R, Martiny AC. Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(5): 1545-1554
- [31] Wang PJ. The time-space distribution characteristics of phthalate esters in the facilities agriculture soil of northeast black soil zone[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2015 (in Chinese)
王鹏杰. 东北黑土区设施农业土壤中酞酸酯时空分布特征[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2015
- [32] Zhang J, Liu YS, Meng L, et al. Isolation and characteristics of PAHs-degrading strains[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2003, 14(10): 1783-1786 (in Chinese)
张杰, 刘永生, 孟玲, 等. 多环芳烃降解菌筛选及其降解特性[J]. 应用生态学报, 2003, 14(10): 1783-1786
- [33] Ji TT, Gao L, Hou B, et al. Bioinformatics analysis of *ahdA1c* gene in *Sphingomonas*[J]. Science Technology and Engineering, 2017, 17(31): 163-169 (in Chinese)
纪婷婷, 高莉, 侯彬, 等. 降解多环芳烃的鞘氨醇单胞菌 *ahdA1c* 基因的生物信息学分析[J]. 科学技术与工程, 2017, 17(31): 163-169
- [34] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969
- [35] Razaif-Mazinah MR, Anis SNS, Harun HI, et al. Unusual poly (3-hydroxyalkanoates) (PHAs) biosynthesis behavior of *Pseudomonas putida* Bet001 and *Delftia tsuruhatensis* Bet002 isolated from palm oil mill Effluent[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2017, 64(2): 259-269
- [36] Muroi F, Tachibana Y, Soulethone P, et al. Characterization of a poly (butylene adipate-co-terephthalate) hydrolase from the aerobic mesophilic bacterium *Bacillus pumilus*[J]. Polymer Degradation and Stability, 2017, 137: 11-22