



一株嗜热聚对苯二甲酸乙二醇酯降解菌的分离及其降解特性解析

周剑桥^{1,2,3}, 黄青松^{1,2,3}, 李娟^{1,2,3}, 金昶序^{1,2,3}, 陈晓倩^{1,2,3}, 吴敬^{1,2,3},
颜正飞^{1,2,3*}

- 1 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 2 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 3 江南大学教育部食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122

周剑桥, 黄青松, 李娟, 金昶序, 陈晓倩, 吴敬, 颜正飞. 一株嗜热聚对苯二甲酸乙二醇酯降解菌的分离及其降解特性解析[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2822-2834.

ZHOU Jianqiao, HUANG Qingsong, LI Juan, JIN Changxu, CHEN Xiaoqian, WU Jing, YAN Zhengfei. Isolation and characterization of a thermophilic PET-degrading bacterium[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2822-2834.

摘要: 【目的】大量聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)塑料作为废弃物被丢弃, 严重危害生态健康。针对嗜热 PET 降解菌缺乏这一情况, 本研究旨在获得能够降解 PET 的嗜热菌, 并阐述其降解机制。【方法】采集云南腾冲热泉中的废弃 PET 瓶, 分析其表面生物膜的微生物群落多样性, 从中筛选能够以 PET 为营养源生长的嗜热菌, 并基于 16S rRNA 基因序列加以鉴定; 以菌株的定殖能力与生长曲线为指标, 优选出降解能力较强的降解菌, 并测定其最适 pH、温度和 NaCl 浓度; 降解能力较强的降解菌分别作用于 PET 及 PET 中间体双(羟乙基)对苯二甲酸酯[bis(hydroxyethyl) terephthalate, BHET]和对苯二甲酸单(2-羟乙基)酯[mono(2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET], 测定产物生成量与降解率; 通过观察 PET 膜表面微观结构、活菌数、酯酶活性等探究降解菌与 PET 的互作过程。【结果】废弃 PET 瓶表面生物膜中的微生物群落多样性低; 从生物膜中筛选出 5 株能够以 PET 为营养源生长的嗜热菌; 其中, 菌株 JQ3 以 PET 为唯一碳源生长最佳, 作为降解能力较强的降解菌, 被鉴定为嗜热淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans*), 其最适生长 pH 为 7.0、最适生长温度为 50 °C、最适生长 NaCl 浓度为 0.5%; 菌株 JQ3 以 0.043 mg

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFA0706900); 江苏省政策引导类计划-国际科技合作(BZ2020010); 江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX22_2430)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFA0706900), the Jiangsu Provincial Policy Guidance Program-International Cooperation Projects (BZ2020010), and the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX22_2430).

*Corresponding author. Tel: +86-510-85326653, E-mail: zhengfeiyan@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-10-30; Accepted: 2023-01-01; Published online: 2023-01-05

PET/d 的速率降解 PET, 对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)产量在第 7 天达到峰值 45.2 mmol/L; 菌株 JQ3 对 PET 中间体降解效率显著, 6 h 可降解 85.9% 的 BHET, 60 h 可降解 50.1% 的 MHET。菌株 JQ3 能够定植于 PET 表面并形成生物膜, 侵蚀 PET 并造成开裂和剥落。【结论】*B. thermoamylovorans* JQ3 作为一株嗜热 PET 降解菌, 能够高温(60 °C)降解 PET 及其中间体, 为实现 PET 的有效降解提供了新策略。

关键词: 塑料污染; 聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)生物降解; 嗜热淀粉芽孢杆菌; 热稳定性; 微生物筛选

Isolation and characterization of a thermophilic PET-degrading bacterium

ZHOU Jianqiao^{1,2,3}, HUANG Qingsong^{1,2,3}, LI Juan^{1,2,3}, JIN Changxu^{1,2,3},
CHEN Xiaoqian^{1,2,3}, WU Jing^{1,2,3}, YAN Zhengfei^{1,2,3*}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 International Joint Laboratory on Food Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] Polyethylene terephthalate (PET) plastics are usually discarded as waste, which seriously harms the ecological health. Considering the lack of thermophilic PET-degrading bacteria, this study aims to obtain a thermophilic PET-degrading bacterium and decipher its degradation mechanism. **[Methods]** We collected waste PET bottles from hot springs in Tengchong City, Yunnan Province and then extracted the biofilms from their surfaces to investigate the microbial diversity. We screened the thermophilic bacteria that could grow with PET as a nutrient source and identified them based on 16S rRNA gene sequences. According to the colonization ability and growth curve, we screened out a strain with strong degrading ability and determined the optimal pH, temperature, and NaCl concentration for its growth. Further, we investigated the degrading effects of the strain on PET and its intermediates, (bis(hydroxyethyl) terephthalate (BHET) and mono(2-hydroxyethyl) terephthalate (MHET), by measuring the product yield and degradation rate. In addition, we evaluated the interaction between the degrading bacterium and PET by observing morphology of the PET surface and determining the viable count and esterase activity. **[Results]** The microbial diversity was low in the biofilms of waste PET bottles. We isolated 5 thermophilic bacterial strains that could grow with PET as a nutrient source from the biofilms. Strain JQ3 using PET as the sole carbon source showed the best growth, which was identified as *Bacillus thermoamylovorans*. Its optimal growth conditions were pH 7.0, 50 °C, and 0.5% NaCl. Strain JQ3 degraded PET at a rate of 0.043 mg PET/d, and the yield of terephthalic acid (TPA) peaked at 45.2 mmol/L on the 7th day. Moreover, strain JQ3 exhibited significant degradation effects on PET intermediates,

degrading 85.9% of BHET within 6 h and 50.1% of MHET within 60 h. Strain JQ3 formed biofilm on the PET surface by colonization, which caused cracking and peeling of the PET surface. **[Conclusion]** The thermophilic PET-degrading strain *B. thermoamylovorans* JQ3 can degrade PET and its intermediates at high temperature (60 °C), which provides a new strategy for PET degradation.

Keywords: plastic pollution; polyethylene terephthalate (PET) biodegradation; *Bacillus thermoamylovorans*; thermostability; screening of microorganisms

塑料是由聚合物组成的高性能材料^[1]。由于塑料的优异特性，其被广泛使用，消耗量也与日俱增^[2]。大多塑料制品沦为废弃物广泛散布在河流、海洋和陆地，形成“白色污染”，严重威胁着生态健康^[3]。在废弃塑料垃圾中，聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)已成为“白色污染”的主要来源之一，例如饮料瓶、吸管等^[4]。目前传统的 PET 废弃物处理方法主要包括填埋和焚烧，但此举不仅浪费土地资源，还会产生大量有毒有害气体，对生态环境造成二次污染^[5-6]。因此，生物降解应运而生，包括微生物法与生物酶法，成为处理 PET 废弃物最环保和最有前景的策略^[7]。

生物酶法降解 PET 是目前研究的热点。多种角质酶、脂肪酶和酯酶被证实具有 PET 降解活性^[8]。嗜热单胞菌(*Thermobifida fusca*)来源的角质酶在 60 °C 条件下 20 d 内能够降解 50% 的 PET^[9]。Yoshida 等挖掘并鉴定了 1 株 PET 降解菌大阪伊德氏杆菌(*Ideonella sakaiensis*)，实现了常温下 PET 的降解，其降解率可达 58% (48 d)^[10]，这为微生物降解 PET 提供了潜在底盘生物。进一步研究发现，微生物通过定殖于 PET 表面，分泌能够断裂 PET 表面酯键的胞外酶，进而侵蚀并裂解 PET^[11]。随后，陆续报道了一些能够降解 PET 的微生物，例如蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)^[12]和食砒节杆菌(*Arthrobacter sulfonivorans*)^[13]等。相对于生物酶法而言，微生物对 PET 的降解作用较缓慢，

但其产物能够被微生物摄入并参与体内代谢，从而减少产物的积累对环境的负担^[14]。此外，PET 降解反应温度接近其玻璃化转变温度(60–75 °C)时，PET 分子链因具有足够的流动性而更容易被降解^[15]。然而，目前报道的 PET 降解菌均为常温菌，最适生长温度仅为室温(30–40 °C)，与 PET 最适降解温度相去甚远，不利于 PET 的高效降解。因此，嗜热菌被认为是今后 PET 降解菌挖掘的方向。到目前为止，嗜热 PET 降解菌尚未见报道，这是微生物降解 PET 方向的一大空白。

本研究对云南省腾冲市热泉采集样品进行微生物群落分析，并从中分离和鉴定能够以 PET 作为唯一碳源的嗜热菌；选择降解能力较强的降解菌探究其理化性质，考察其降解 PET 以及 PET 中间体的能力；最后，探究降解能力较强的降解菌与 PET 的相互作用，为微生物降解 PET 提供理论基础与技术支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

PET (结晶度 7.6%) 购于 Goodfellow Cambridge Limited。对苯二甲酸(terephthalic acid, TPA)和对苯二甲酸单(2-羟乙基)酯[mono (2-hydroxyethyl) terephthalate, MHET]由 Sigma-Aldrich 提供。双(羟乙基)对苯二甲酸酯[bis(hydroxyethyl) terephthalate, BHET]由 Aladdin Industrial Co. 提供。其他试剂由中国石油化工集团有限公司提供。

1.2 培养基

1.2.1 驯化培养基(质量体积分数)

BHET 0.5%, 肉膏 0.2%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.07%, KH_2PO_4 0.07%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.07%, NH_4NO_3 0.1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000 2%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000 2%和 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.000 1%。

1.2.2 富集培养基(质量体积分数)

PET 0.5%, NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.07%, KH_2PO_4 0.07%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.07%, NH_4NO_3 0.1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000 2%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000 2%和 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.000 1%; 固体培养基加入 1%琼脂粉。

1.2.3 无机盐培养基(质量体积分数)

NaCl 0.2%, K_2HPO_4 0.07%, KH_2PO_4 0.07%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.07%, NH_4NO_3 0.1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000 2%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000 2%和 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.000 1%; 固体培养基加入 1%琼脂粉。

1.2.4 LB 培养基(质量体积分数)

NaCl 1%, 蛋白胨 1%, 酵母粉 0.5%; 固体培养基加入 1%琼脂粉。

1.3 废弃 PET 瓶表面微生物群落分析

从云南腾冲热泉(24°56'28"N, 98°26'20"E)中收集废弃 PET 瓶。根据 Feng 等所述方法, 从废弃 PET 瓶表面提取生物膜^[16]。使用 Power Soil[®] DNA Isolation Kit 试剂盒提取生物膜中微生物总基因组, 并由苏州金唯智生物科技有限公司进行 16S rRNA 基因测序。

1.4 嗜热 PET 降解菌的分离与鉴定

取废弃 PET 瓶表面的生物膜 1 g 放入 10 mL 驯化培养基中, 置于 60 °C 和 150 r/min 下培养至培养基明显混浊或 OD 值显著增加, 再取 1 mL 培养液加入 9 mL 新的驯化培养基中重复培养 2 轮。取上述培养液 1 mL 加入到 10 mL 富集培养基中, 置于 60 °C 和 150 r/min 下培养至培养基明显混浊或 OD 值显著增加,

再取 1 mL 培养液加入 9 mL 新富集培养基中重复培养 2 轮。用生理盐水适当稀释最后一轮的富集培养液并将其涂布于固体富集培养基上, 置于 60 °C 下培养直至出现单菌落。挑取长势旺盛的单菌落采用三线法纯化获得单一形态菌落。将菌株送往苏州金唯智生物科技有限公司进行 16S rRNA 基因测序。测序结果与 NCBI 数据库比对, 利用 MEGA 7 软件进行多序列比对构建系统发育树。

1.5 嗜热 PET 降解菌的优选

将菌株接种于 10 mL LB 培养基中, 置于 60 °C 和 200 r/min 下培养 12 h, 获得种子液 (0.8×10^8 – 0.9×10^8 CFU/mL), 进行后续实验。

1.5.1 定殖能力分析

取 200 μ L 种子液加入到 96 孔微量滴定板中, 在 60 °C 下孵育 24 h。去除液体后, 用无菌水洗涤孔 2 次, 加入 200 μ L 0.1% (质量体积分数)溶于异丙醇-甲醇-PBS 溶液(1:1:18, 体积比)的结晶紫溶液, 室温静置 20 min。去除液体后, 用无菌水洗涤并自然干燥, 加入 250 μ L 33%乙酸溶液(体积分数)后, 测量其在 570 nm 处的吸光度, 使用无菌处理组作为阴性对照^[17]。

1.5.2 以 PET 为碳源的生长曲线测定

将 1 mL 种子液加入 50 mL 含有 250 mg PET 的无机盐培养基中, 置于 60 °C 和 200 r/min 下培养, 在相同条件下无菌培养作为对照。每 1 h 取样, 使用分光光度计测量 600 nm 处的吸光度并绘制生长曲线。

1.6 降解菌最适生长条件优化

将优选获得的菌株接种于 10 mL LB 培养基中, 置于 60 °C 和 200 r/min 下培养 12 h, 获得种子液(0.8×10^8 – 0.9×10^8 CFU/mL), 进行后续实验。

1.6.1 最适 pH 测定

种子液以 1% (体积分数)的接种量接种于

50 mL pH 分别为 3–10 的 LB 培养基中, 于 60 °C 培养, 每隔 2 h 取样, 测定 600 nm 处的吸光值。

1.6.2 最适温度测定

种子液以 1% (体积分数)的接种量接种于 50 mL 最适 pH 的 LB 培养基中, 于 30–70 °C 培养, 每隔 2 h 取样, 测定 600 nm 处的吸光值。

1.6.3 最适 NaCl 浓度测定

种子液以 1% (体积分数)的接种量接种于 50 mL NaCl 浓度分别为 0%–10%的最适 pH 的 LB 培养基中, 于最适温度培养, 每隔 2 h 取样, 测定 600 nm 处的吸光值。

1.7 降解菌对 PET 及 PET 中间体降解特性分析

将优选获得的菌株接种于 10 mL LB 培养基中, 置于 60 °C 和 200 r/min 下培养 12 h, 获得种子液(0.8×10^8 – 0.9×10^8 CFU/mL), 进行后续实验。

1.7.1 降解菌对 PET 降解特性分析

种子液以 1% (体积分数)的接种量接种于含有 120 mg PET 的 50 mL 最适 NaCl 浓度无机盐培养基中, 于 60 °C 和 200 r/min 下培养, 每隔 24 h 取样分析。

1.7.2 降解菌对 PET 中间体降解特性分析

种子液以 1% (体积分数)的接种量分别接种于含有 4 mg PET 中间体(MHET 和 BHET)的 10 mL 最适 NaCl 浓度无机盐培养基中, 于 60 °C 和 200 r/min 下培养, 每隔 24 h 取样分析。

1.7.3 高效液相色谱(HPLC)分析

取 100 μ L 样品, 加入甲醇稀释 10 倍, 12 000 r/min 离心 2 min。上清液经 0.22 μ m 滤膜除杂后, 按 Chen 等所述方法进行高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC)分析并计算降解率^[18](公式 1 和 2)。

$$\text{PET 降解率}(\%) = \left[\left(\frac{A}{166} + \frac{B}{210} + \frac{C}{254} \right) \times \frac{192}{M} \right] \times 100 \quad (1)$$

式中, A 为反应溶液中 TPA 的产率(mg); B 为

反应溶液中 MHET 的产率(mg); C 为反应溶液中 BHET 的产率(mg); 166 为 TPA 的相对分子质量; 210 为 MHET 的相对分子质量; 254 为 BHET 的相对分子质量; 192 是 PET 组成单元的相对分子质量; M 为原 PET 的重量(mg)。

$$\text{PET 中间体降解率}(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_1} \right) \times 100 \quad (2)$$

式中, C1 为反应前原始量(mg); C2 为反应后残留量(mg)。

1.8 降解菌与 PET 的互作分析

为了探究降解能力较强的降解菌与 PET 的相互作用, 将种子液以 1% (体积分数)的接种量接种于含有 120 mg PET 的 50 mL 最适 NaCl 浓度无机盐培养基中, 于 60 °C 和 200 r/min 下培养。PET 在相同条件下置于无菌培养基中处理作为对照。此过程中, 以丁酸硝基苯酯作为底物测定期间酯酶活性的变化^[19]; 采用平板菌落计数法^[20]测定期间活菌数的变化, 以菌落形成单位 (colony forming units/mL, CFU/mL)表示活菌数。反应结束后, PET 经洗涤去除表面杂质后, 利用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)观察 PET 表面特征的变化。

2 结果与分析

2.1 废弃 PET 瓶表面微生物群落分析

在约 100 份含有沉积物的废弃 PET 样品中, 仅 S2 和 S10 样品表面能够清晰观测到生物膜, 表明 2 类微生物群落能够有效地定殖在 PET 表面, 并以 PET 为营养源进行繁殖生长。在门水平上, 这 2 种生物膜中的主要优势菌门是一致的, 包括变形菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门, 其中变形菌门的丰度最高, 其相对丰度大于 40% (图 1A)。在属水平上, 2 种生物膜中的主要优势菌也是相似的, 主要包括不动杆菌属、芽孢杆菌属、迪茨氏菌属和嗜冷杆菌

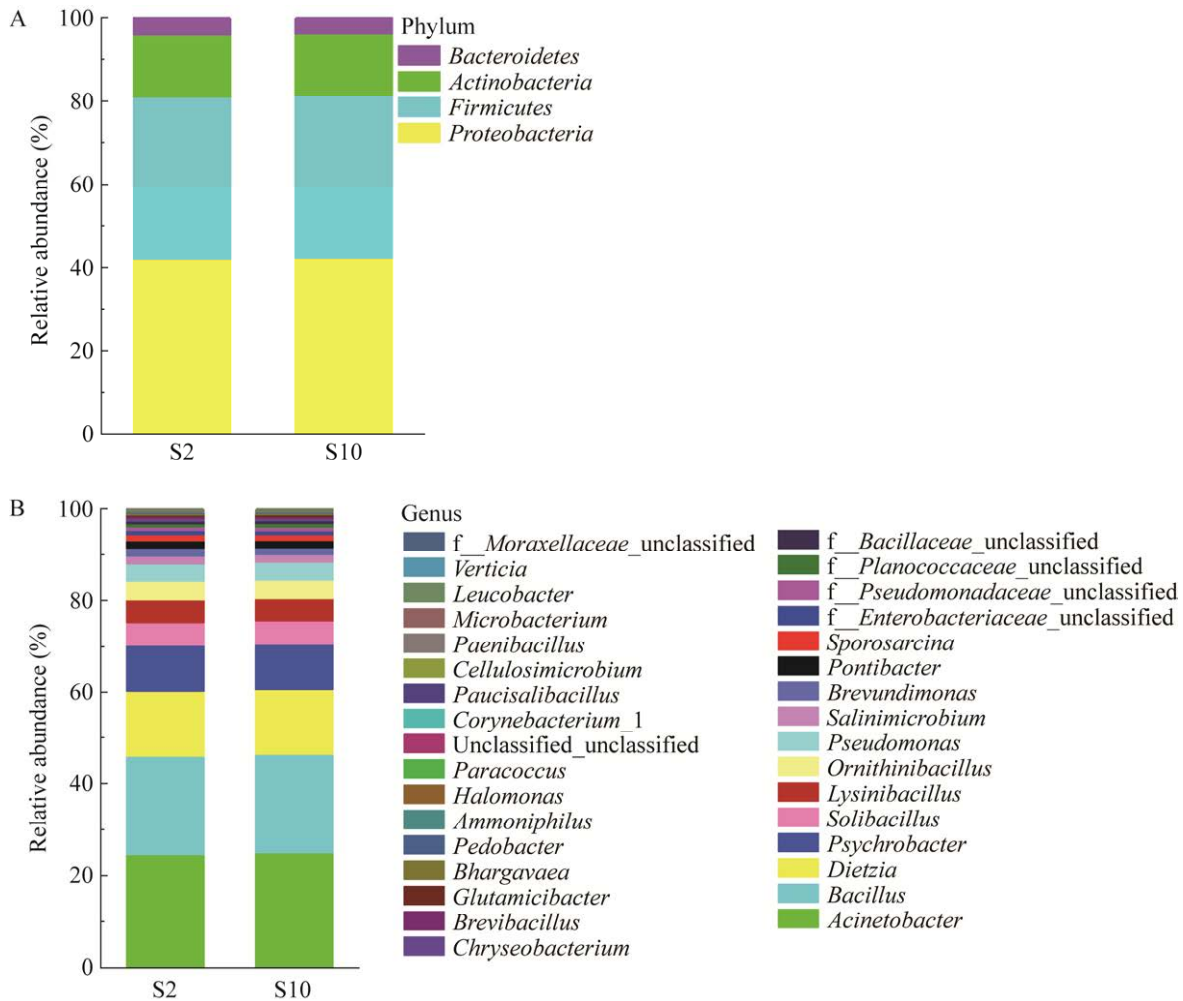


图 1 微生物群落的相对丰度

Figure 1 Relative abundance of the microbial community in biofilm. A: Microbial community composition on the phylum level. B: Microbial community composition on the genus level.

属(图 1B)。经微生物群落 α 多样性分析发现, 包括多样性(Shannon 指数)和丰富度(Chao1 指数)。样品 S2 的 Shannon 和 Chao1 指数分别为 4.424 和 81.5, 样品 S10 的 Shannon 和 Chao1 指数分别为 4.408 和 78.0, 表明 2 种生物膜中的微生物多样性和丰富度均不高。相关研究^[21-22]表明, 塑料填埋场或污染地是筛选潜在塑料降解菌的优势来源地, 但存在大量非塑料降解菌。由于热泉高温环境且营养匮乏的限制, 仅少数种微生物能够在 PET 废弃物表面黏附成膜并利用 PET 进行繁殖生长。因此, 热泉中 PET 废弃

物表面微生物群落多样性维持在较低的水平。

2.2 嗜热 PET 降解菌的分离与鉴定

从样品 S2 和 S10 表面的生物膜中获得以 PET 为唯一碳源生长的嗜热型菌株, 共计 5 株 (JQ1、JQ2、JQ3、JQ4 和 JQ5) (流程详见图 2A)。通过 16S rRNA 基因分析, 菌株 JQ1 和 JQ4 为嗜热类芽孢杆菌(*Paenibacillus thermoaerophilus*); 菌株 JQ3 为嗜热淀粉芽孢杆菌(*Bacillus thermoamylovorans*); 菌株 JQ2 和 JQ5 为努比卤地无氧芽孢杆菌(*Anoxybacillus rupiensis*) (图 2B)。其中, 菌株 JQ3 属于芽孢杆菌, 是微生物群

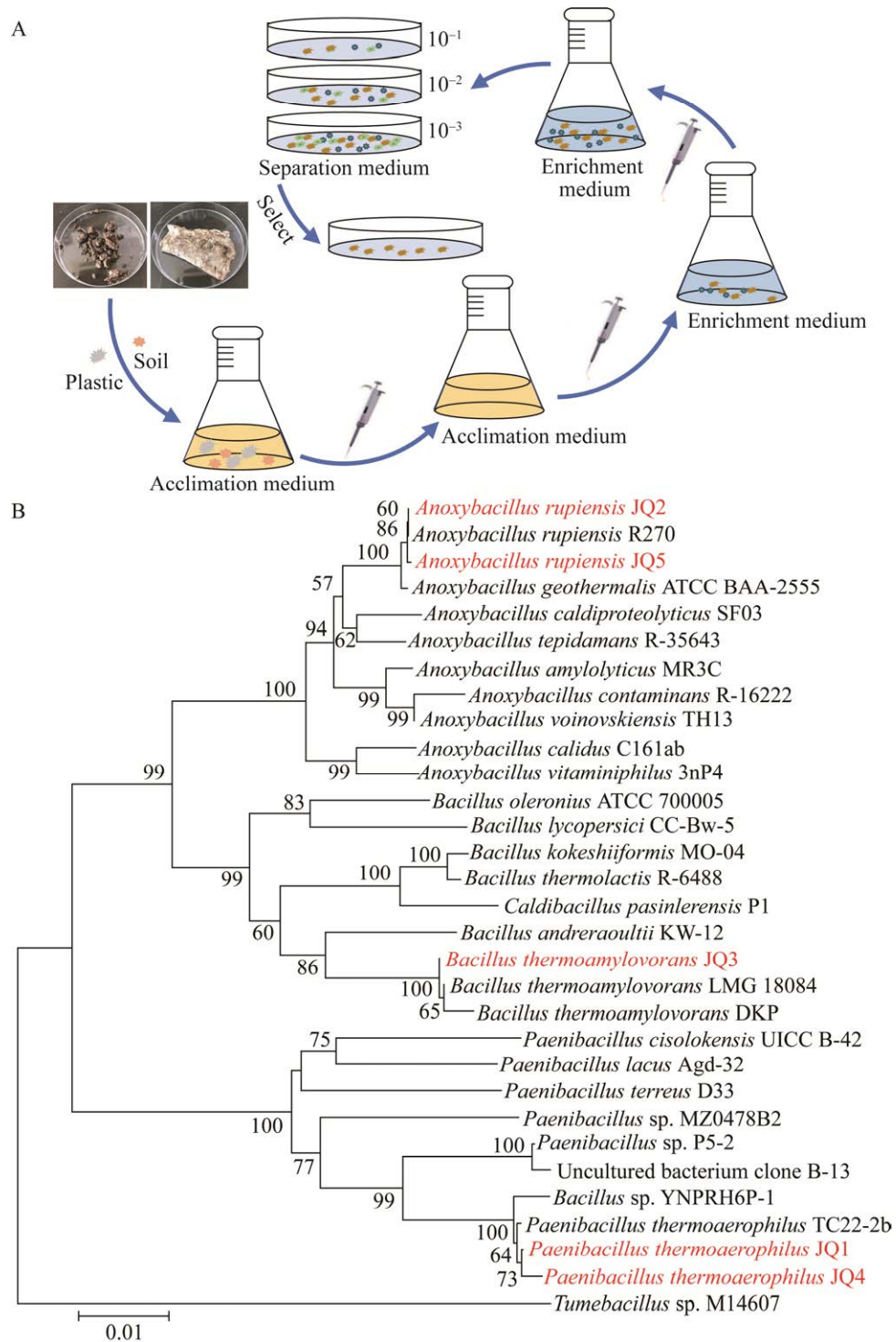


图 2 PET 降解菌的筛选与鉴定

Figure 2 Screening and identification of PET-degrading bacteria. A: Diagram isolation of PET-degrading bacteria. B: The phylogenetic analysis of PET-degrading bacteria based on the 16S rRNA gene sequences. Bootstrap values were expressed as a percentage of 1 000 replications. Only bootstrap values of more than 50% are shown. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

落中四大优势菌属之一。菌株 JQ3 作为 *B. thermoamylovorans* 的成员, 首次被报道具有利用 PET 进行生长代谢的能力。

2.3 嗜热 PET 降解菌的优选

经结晶紫染色实验表明, 获得的 5 株菌均能够在 PET 表面定殖形成生物膜(图 3A)。微生物经定殖行为可以显著降低 PET 表面的疏水性, 提高其生物可及性, 为后续降解酶与 PET 结合奠定基础^[23-24]。生长曲线测定发现 5 株菌均能够以 PET 为唯一碳源进行繁殖生长(图 3B)。其中, 菌株 JQ3 在培养后的长势(OD_{600})最为显著。菌株 JQ3 在 13 h ($OD_{600}=0.029$)时生长速率最高, 生长曲线斜率为 2.7×10^{-2} 。降解菌能够优先将 PET 低结晶区降解为可溶性单体(TPA、MHET 等), 并以此为营养源进行自我繁殖生长, 从而导致菌密度迅速增加。随着菌密度的增加, 可溶性单体生成量不足以支持菌株生长所需的能量。为了缓解这种供不应求的局面, 菌株通过自我调节降低了生长速度, 使菌密度维持平稳并达到了动态平衡。到目前为止, 已报道了多种以 PET 为营养源进行自

我生长的细菌, 如 *I. sakaiensis* 以 PET 为营养源, 其菌密度(OD_{600}) 6 d 内增加了 0.8^[10]。综合考虑, 选择菌株 JQ3 为降解能力较强的嗜热降解菌进行后续深入研究。

2.4 降解菌 JQ3 生长条件优化

2.4.1 最适生长 pH

如图 4A 所示, 不同生长 pH 对菌株 JQ3 生长有所差异。菌株 JQ3 最适生长 pH 为 6.0–8.0; 当 pH 为 9.0 时, 菌株可以缓慢生长; 当 pH 为 3.0–5.0 和 10.0 时, 未能观察到菌株 JQ3 生长。这表明菌株 JQ3 对酸性环境较敏感, 生长 pH 偏向中性或弱碱性环境。

2.4.2 最适生长温度

温度是影响微生物生长的重要因素之一, 在最适 pH 条件下, 探究了不同温度对菌株 JQ3 生长的影响。如图 4B 所示, 菌株 JQ3 能够生长的温度为 40–60 °C, 其最适温度为 50 °C; 当生长温度低于 40 °C 时, 菌株 JQ3 生长缓慢, 甚至停止生长; 当生长温度高于 70 °C 时, 菌株 JQ3 则无法正常生长。

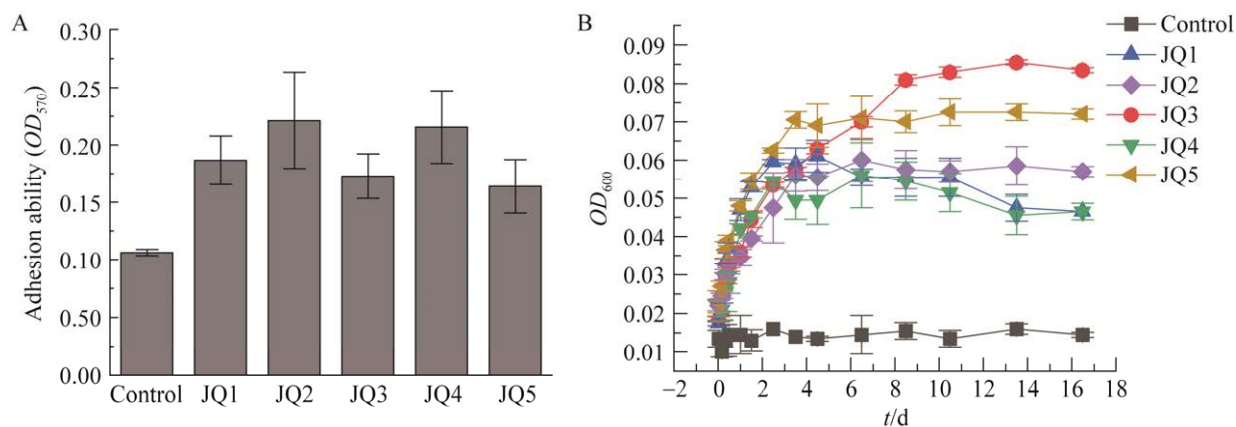


图 3 PET 降解菌的优选

Figure 3 Selection of the dominant PET-degrading bacteria. A: The colonization ability (OD_{570}) of PET-degrading bacteria by crystal violet staining. B: Growth curves of PET-degrading bacteria in a carbon-free medium containing PET powder at 60 °C, 200 r/min. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

2.4.3 最适生长 NaCl 浓度

微生物生长所需的 NaCl 浓度各不相同。在最适 pH 和最适温度下, 将菌株 JQ3 接种于不同 NaCl 浓度的培养基中, 探究其对菌株生长影响。如图 4C 所示, 菌株 JQ3 能够生长的 NaCl

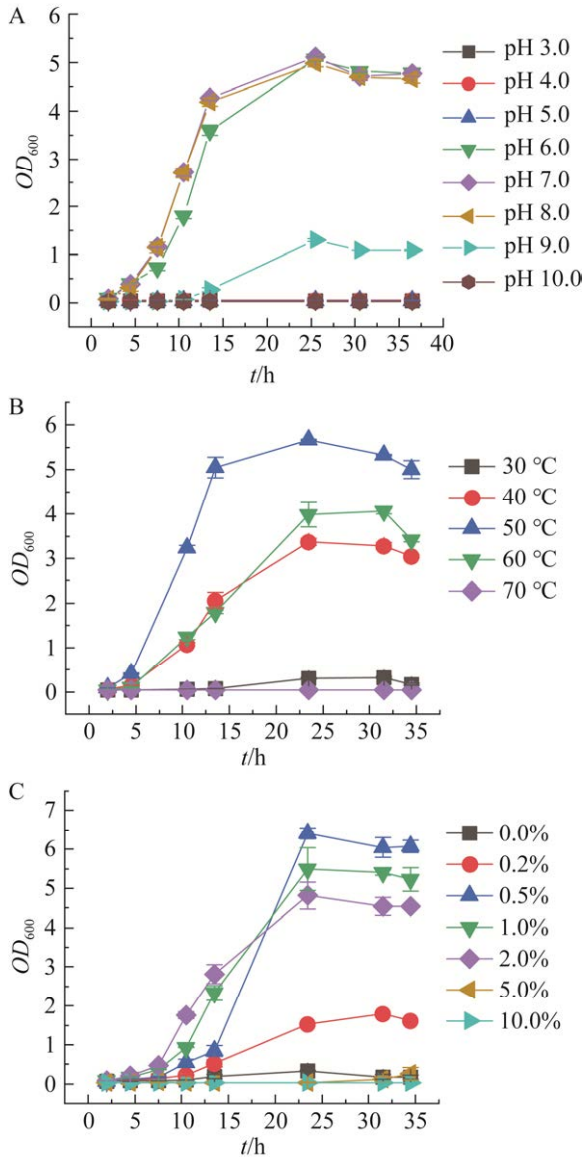


图 4 菌株 JQ3 生长条件优化

Figure 4 Optimal growth conditions of strain JQ3. A: Optimal pH of strain JQ3. B: Optimal temperature of strain JQ3. C: Optimal NaCl concentration of strain JQ3. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

浓度为 0.5%–2.0%, 其最适 NaCl 浓度为 0.5%。过高或过低的 NaCl 浓度将无法维持细菌渗透压, 抑制细菌生长繁殖^[25]。

2.5 降解菌 JQ3 对 PET 及 PET 中间体的降解特性分析

如图 5A 所示, 菌株 JQ3 具有催化 PET 降解活性, 随反应时间的延长, 产物 TPA 逐渐增加, 第 7 天达到峰值 45.2 mmol/L。经计算, 菌株 JQ3 以 0.043 mg PET/d 速率吞噬 PET, 平均降解率为 0.25%, 与王宏阳等报道的鞣丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas* sp.)对 PET 的催化降解效率相近^[26]。菌株 JQ3 对 PET 中间体(BHET 和 MHET)降解实验发现, 菌株 JQ3 对 BHET 的降解效率显著, 6 h 可降解 85.1%的 BHET, 12 h 的降解率超 98% (图 5B)。菌株 JQ3 作用于 MHET, 60 h 降解率可达 50.1%, 84 h 内菌株 JQ3 可降解 81.8%的 MHET (图 5C)。菌株 JQ3 对 PET 中间体的降解效率较 PET 显著, 这可能是 PET 中间体分子链简单、柔性大, 容易被菌株 JQ3 捕获, 本结果与 PET 降解菌嗜油微杆菌(*Microbacterium oleivorans*)降解 PET 中间体特性一致^[27]。目前多个芽孢杆菌被证实具有 PET 降解活性, 如蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[12], 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)^[28]等, 然而 *B. thermoamylovorans* (菌株 JQ3)则是首次被证实具有降解 PET 及其中间体的能力。

2.6 降解菌与 PET 的互作分析

如图 6A 所示, 菌株 JQ3 拥有 PET 降解菌的一个显著特征——鞭毛, 可促使菌株 JQ3 趋向 PET 运动并成功定殖在其表面, 形成清晰的生物膜层, 为菌株 JQ3 生长提供稳定的微环境。在生物膜中, 菌株 JQ3 以丝状结构紧密缠绕 (图 6B、6C)。随后, PET 表面出现不同程度的侵蚀, 表面由光滑到粗糙, 伴随剥落, 这与早期报道中 PET 生物降解时其表面形态变化类似^[29]。

在菌株 JQ3 作用于 PET 过程中, 活菌数 (CFU/mL) 和酯酶活性 (U/L) 随作用时间的变化而显著变化 (图 6D)。菌株 JQ3 的活菌数先升高, 在第 3 天达到峰值 (约 4.9×10^7 CFU/mL), 随后

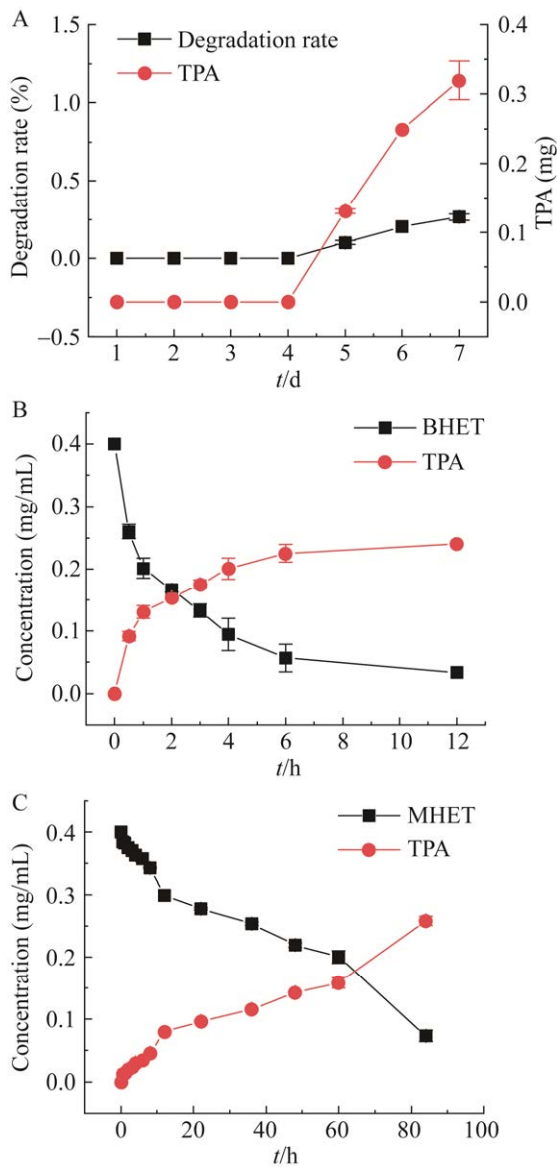


图 5 菌株 JQ3 对 PET 及 PET 中间体的降解特性
Figure 5 Degradation of PET and its intermediates by strain JQ3. A: Degradation of PET by strain JQ3. B: Degradation of BHET by strain JQ3. C: Degradation of MHET by strain JQ3. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

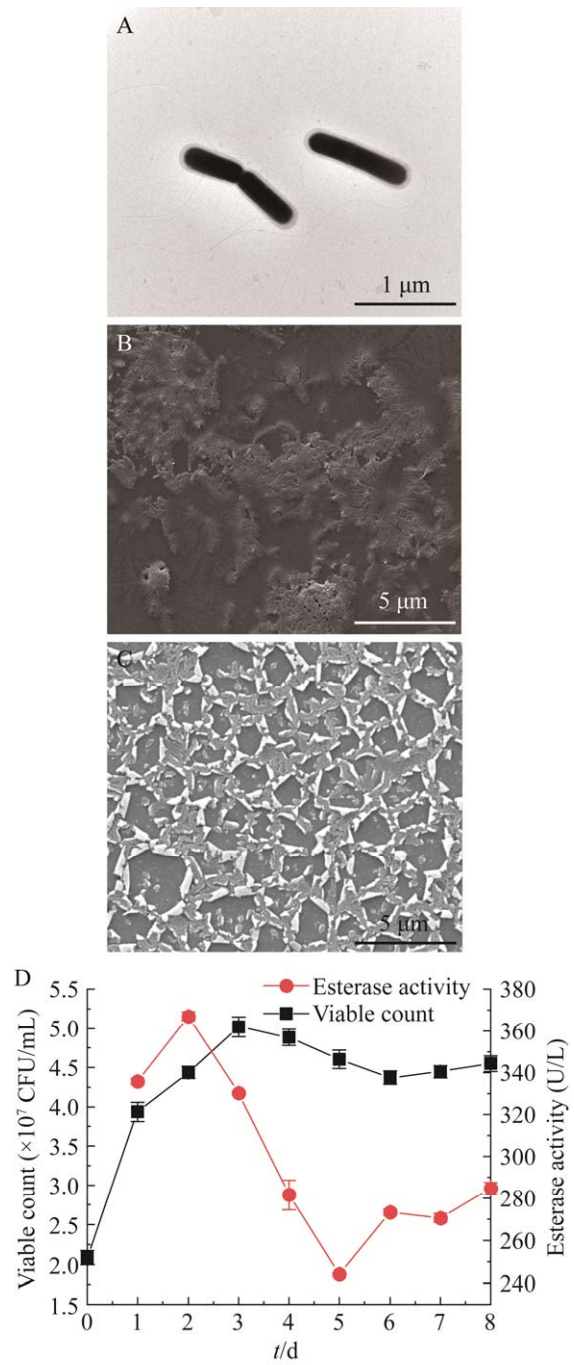


图 6 菌株 JQ3 与 PET 的相互分析
Figure 6 The interaction analysis of strain JQ3 and PET. A: Morphology of strain JQ3. B: Colonization of strain JQ3 on the PET surface. C: Morphologies of the PET surface after strain JQ3 treatment. D: The viable count and esterase activity of strain JQ3. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments.

的 4–6 d, 活菌数略有下降, 6 d 以后活菌数呈小幅上升趋势。在第 2 天时, 菌株 JQ3 酯酶分泌量达到最大值(365 U/L), 随后逐渐降低, 酯酶活性在第 5 天时降到峰谷, 约 272 U/L, 5 d 以后的酯酶活性显著升高。作用初期, 菌株 JQ3 主要利用反应液中残留的易吸收营养成分迅速繁殖, 酯酶的分泌量也相应地增加。随着作用时间的延长, 易吸收营养耗尽, 菌株 JQ3 最显著的变化即是自我增殖减缓或停止, 活菌数略有下降。此期间, 菌株 JQ3 酯酶的分泌停止, 总活性陡降。为应对不利生存环境, 获取更多的营养物质, 菌株 JQ3 减少其他酶合成, 着重合成酯酶或脂肪酶等关键酶, 通过破坏 PET 表面酯键, 将不溶性 PET 转化为可溶性中间体或单体并将其摄入体内, 维持菌株自身生长代谢。

3 讨论与结论

目前, PET 污染已成为一个紧迫的国际问题, 严重威胁生态环境, 而传统方法如焚烧、填埋存在着能耗大、且会带来二次污染等问题。因此迫切需要开发环境友好型的塑料高效生物降解技术。相比于生物酶法降解 PET, 微生物降解 PET 的研究较少, 其中嗜热微生物降解 PET 方向更是一片空白。本研究对云南腾冲热泉来源废弃 PET 瓶表面生物膜进行微生物群落分析, 从中成功获得 5 株嗜热 PET 降解菌。基于菌株定殖能力及以 PET 为营养源的增殖能力分析, *B. thermoamylovorans* JQ3 为降解能力较强的降解菌。菌株 JQ3 平均以 0.043 mg PET/d 速率吞噬 PET, 并对 PET 中间体具有良好降解效率, 首次证实 *B. thermoamylovorans* 具有降解 PET 及其中间体的能力。

相对于目前已报道的中温 PET 降解菌而言, 本研究筛选得到的嗜热型菌株 JQ3, 能够在高温(60 °C)条件下降解 PET, 这与 PET 的最

适降解温度(60–70 °C)相符。相对于常温降解菌, 如绳状青霉菌(*Penicillium funiculosum*)处理 PET 膜近 80 余天, 其降解率仅为 0.21%^[30]; 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)处理 PET 颗粒, 60 d 后降解率仅达到 0.06%^[31], 这表明嗜热或高温降解 PET 菌株更有利于高效降解 PET。本研究进一步研究菌株 JQ3 与 PET 的相互作用, 为实现 PET 的有效降解提供了新策略。

参考文献

- [1] QUECHOLAC-PIÑA X, GARCÍA-RIVERA MA, ESPINOSA-VALDEMAR RM, VÁZQUEZ-MORILLAS A, BELTRÁN-VILLAVICENCIO M, CISNEROS-RAMOS AL. Biodegradation of compostable and oxodegradable plastic films by backyard composting and bioaugmentation[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2017, 24(33): 25725-25730.
- [2] WONG SL, NGADI N, ABDULLAH TAT, INUWA IM. Current state and future prospects of plastic waste as source of fuel: a review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 50: 1167-1180.
- [3] ROCHMAN CM, BROWNE MA, HALPERN BS, HENTSCHEL BT, HOH E, KARAPANAGIOTI HK, RIOS-MENDOZA LM, TAKADA H, TEH S, THOMPSON RC. Policy: classify plastic waste as hazardous[J]. *Nature*, 2013, 494(7436): 169-171.
- [4] GEYER R, JAMBECK JR, LAW KL. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700782-e1700782.
- [5] MOHARIR RV, KUMAR S. Challenges associated with plastic waste disposal and allied microbial routes for its effective degradation: a comprehensive review[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 208: 65-76.
- [6] WEBB H, ARNOTT J, CRAWFORD R, IVANOVA E. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate)[J]. *Polymers*, 2012, 5(1): 1-18.
- [7] WIERCKX N, PRIETO MA, 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.

- [8] DANSO D, CHOW J, STREIT WR. Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(19): e01095-e01019.
- [9] MÜLLER RJ, SCHRADER H, PROFE J, DRESLER K, DECKWER WD. Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*[J]. *Macromolecular Rapid Communications*, 2005, 26(17): 1400-1405.
- [10] 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.
- [11] JOO S, CHO IJ, SEO H, SON HF, SAGONG HY, SHIN TJ, CHOI SY, LEE SY, KIM KJ. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation[J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 382.
- [12] AUTA HS, EMENIKE CU, FAUZIAH SH. Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation[J]. *Environmental Pollution: Barking, Essex*, 2017, 231(pt 2): 1552-1559.
- [13] JANCZAK K, HRYNKIEWICZ K, ZNAJEWSKA Z, DĄBROWSKA G. Use of rhizosphere microorganisms in the biodegradation of PLA and PET polymers in compost soil[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2018, 130: 65-75.
- [14] JAISWAL S, SHARMA B, SHUKLA P. Integrated approaches in microbial degradation of plastics[J]. *Environmental Technology and Innovation*, 2020, 17(C): 100567.
- [15] RONKVIST ÅM, XIE WC, LU WH, GROSS RA. Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate)[J]. *Macromolecules*, 2009, 42(14): 5128-5138.
- [16] FENG L, HE L, JIANG S, CHEN J, ZHOU C, QIAN ZJ, HONG P, SUN S, LI C. Investigating the composition and distribution of microplastics surface biofilms in coral areas[J]. *Chemosphere*, 2020, 252: 126565.
- [17] HUANG QS, YAN ZF, CHEN XQ, DU YY, LI J, LIU ZZ, XIA W, CHEN S, WU J. Accelerated biodegradation of polyethylene terephthalate by *Thermobifida fusca* cutinase mediated by *Stenotrophomonas pavanii*[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 808: 152107.
- [18] CHEN XQ, GUO ZY, WANG L, YAN ZF, JIN CX, HUANG QS, KONG DM, RAO DM, WU J. Directional-path modification strategy enhances PET hydrolase catalysis of plastic degradation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 433: 128816.
- [19] ALISCH M, FEUERHACK A, MÜLLER H, MENSAK B, ANDREAUS J, Zimmermann W. Biocatalytic modification of polyethylene terephthalate fibres by esterases from actinomycete isolates[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2004, 22(5/6): 347-351.
- [20] MESSER JW, RICE EW, JOHNSON CH. Total viable counts spread plate technique[J]. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1999, 3: 2159-2160.
- [21] GAO R, SUN C. A marine bacterial community capable of degrading poly(ethylene terephthalate) and polyethylene[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 416: 125928.
- [22] OBERBECKMANN S, OSBORN AM, DUHAIME MB. Microbes on a bottle: substrate, season and geography influence community composition of microbes colonizing marine plastic debris[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0159289.
- [23] HIROTA Y, NAYA M, TADA M, SHIKYO Y, KAWANISHI T, TAKIGUCHI N. Analysis of soil fungal community structure on the surface of buried polyethylene terephthalate[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2021, 29: 1-13.
- [24] ZHANG J, WANG X, GONG J, GU Z. A study on the biodegradability of polyethylene terephthalate fiber and diethylene glycol terephthalate[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 93(3): 1089-1096.
- [25] PETERS AC, THOMAS L, WIMPENNY JWT. Effects of salt concentration on bacterial growth on plates with gradients of pH and temperature[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 77(2/3): 309-314.
- [26] 王宏阳, 巩继贤, 李辉芹, 李政, 李秋瑾, 张健飞. 微生物降解 PET 过程研究[J]. *针织工业*, 2016, (1): 43-46.
WANG HY, GONG JX, LI HQ, LI Z, LI QJ, ZHANG JF. Research process of microbial degradation of polyester[J]. *Knitting Industries*, 2016, (1): 43-46 (in Chinese).
- [27] 顾冷涛, 颜正飞, 吴敬, 宿玲恰. 一株 PET 降解菌株的筛选鉴定及降解特性研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(3): 1179-1186.
GU LT, YAN ZF, WU J, SU LQ. Screening,

- identification and degradation characteristics of a PET-degrading strain[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(3): 1179-1186 (in Chinese).
- [28] NOWAK B, PAJAŁ J, DROZD-BRATKOWICZ M, RYMARZ G. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2011, 65(6): 757-767.
- [29] XU X, WANG S, GAO F, LI J, ZHENG L, SUN C, HE C, WANG Z, QU L. Marine microplastic-associated bacterial community succession in response to geography, exposure time, and plastic type in China's coastal seawaters[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 145: 278-286.
- [30] NOWAK B, PAJAŁ J, ŁABU ZEK S, RYMARZ G, TALIK E. Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester "BionolleÒ" by *Penicillium funiculosum*[J]. *Polimery*, 2011, 56: 35-44.
- [31] JARA MAT, ANTUNES AA, BARRETO NSE, RUFINO RD, DURAN NE, ALBUQUERQUE CDC, NASCIMENTO AE, CAMPOS-TAKAKI GM. Formation of biofilms and production of enzymes by *Bacillus subtilis* on surfaces of polyethylene terephthalate simulating degradation[C]//Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. University of Seville Spain World Scientific, 2009: 254-258.