

研究报告

基于啮食泡沫塑料黄粉虫肠道菌群中聚苯乙烯生物降解的探究

孔芳^{1*} 洪康进¹ 徐航¹ 赵世光¹ 王幼平²

(1. 安徽工程大学生物与化学工程学院 安徽 芜湖 241000)

(2. 扬州大学生物科学与技术学院 江苏 扬州 225009)

摘要:【背景】石油基塑料垃圾污染具有高度的化学惰性而不易分解,严重威胁着生态和海洋环境,筛选其高效降解菌并利用生物法治理塑料污染具有重要意义。【目的】聚苯乙烯是其中一种不能降解且用途广泛的塑料。近期有研究报道黄粉虫幼虫可啮食聚苯乙烯泡沫塑料。本文以啮食聚苯乙烯白色泡沫塑料的黄粉虫幼虫为研究材料,以期从肠道菌群中分离聚苯乙烯降解菌。【方法】分别以聚苯乙烯泡沫塑料与麦麸(对照组)为唯一食物来源饲喂黄粉虫幼虫,经过60 d的驯化,采用多种培养基对幼虫肠道提取液及虫体粪便排泄物进行分离、培养;通过形态学特征观察、扫描电镜与16S rRNA基因、ITS序列分析扩增、测定,根据序列信息构建系统进化树确定菌株的分类地位;将真菌菌种分别接种于加有PS膜片与颗粒的液体培养基中振荡培养,对膜片的力学性能变化进行测定,并对聚苯乙烯颗粒失重率进行计算。【结果】从幼虫粪便中分离的2株好氧菌分别被鉴定为*Bacillus anthracis* Ames PSI-1和*Enterobacter cloacae* PSI-2,从肠道中分离的真菌被鉴定为*Aspergillus niger* KHJ-1;电镜检测PS膜片表面出现大量孔洞,并且膜片疏水性减弱而亲水性增强,膜片的断裂伸长率与拉伸强度等力学性能也显著下降;真菌KHJ-1对PS颗粒的60 d降解测定中,发现PS颗粒由5 g原始重量减少了214.8 mg,失重率为4.29%。【结论】黄粉虫肠道中存在可以降解聚苯乙烯塑料的菌株,具有开发为新型降解聚苯乙烯高分子塑料的潜力。

关键词: 黄粉虫, 聚苯乙烯降解, 分离, 肠道微生物

Foundation items: China Postdoctoral Science Foundation (2013M541735); National & Anhui Provincial Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program of China (201510363074, 2016103630020); Pre-research Project of Anhui Polytechnic University (2016yyzr07)

*Corresponding author: Tel: 86-553-2871034; E-mail: kongf2003@126.com

Received: September 12, 2017; **Accepted:** January 25, 2018; **Published online** (www.cnki.net): February 14, 2018

基金项目: 中国博士后科学基金(2013M541735); 国家级与安徽省大学生创新创业训练计划项目(201510363074, 2016103630020); 安徽工程大学预研项目(2016yyzr07)

*通信作者: Tel: 86-553-2871034; E-mail: kongf2003@126.com

收稿日期: 2017-09-12; 接受日期: 2018-01-25; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-02-14

Evidence of polystyrene biodegradation by gut microbiota of Styrofoam-feeding yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus)

KONG Fang^{1*} HONG Kang-Jin¹ XU Hang¹ ZHAO Shi-Guang¹ WANG You-Ping²

(1. Academy of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu, Anhui 241000, China)

(2. College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: **[Background]** Plastic are synthetic polymers derived from fossil oil and largely resistant to degradation. Plastic litter have adverse effects on the environment and marine biota. Therefore, new solutions for petroleum-based plastic waste degradation are urgently needed. **[Objective]** Polystyrene (PS) is notoriously persistent plastic that is not degradable at appreciable rates for decades. However, an environment was identified in which PS is susceptible to biodegradation: yellow mealworm, the larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus, can damage PS packing by chewing and eating styrofoam. So we try to isolate PS-degrading microorganisms from the mealworms' gut. **[Methods]** The larvae fed with styrofoam as the sole diet could live as well as those fed with bran diet over several months. Based on morphological, physiological and biochemical properties as well as 16S rRNA gene and ITS gene sequences analysis, the phylogenic tree was constructed to identify the taxonomic status of the strains. **[Results]** Two bacterial strains capable of degrading styrofoam were isolated from worm fecula egested from styrofoam-feeding larvae, named as *Bacillus anthracis* PSI-1 and *Enterobacter hormaechei* PSI-2. A PS-degrading fungal strain was isolated from the gut of mealworms and identified as *Aspergillus niger* KHJ-1. Over a 14-day incubation period of the fungal strain KHJ-1 on PS films, a large number of cavities were obviously observed on PS films surfaces, and the changes were measured about the film of mechanical properties. The results showed that hydrophobicity of the film was decreased dramatically, the elongation at break and the tensile strength became smaller. A suspension culture of KHJ-1 strain was able to degrade 214.8 mg/5 g of PS solid particles, the weight loss ratio of PS was 4.29% over a 60-day incubation period. **[Conclusion]** The results demonstrated the presence of PS-degrading bacteria and fungus in the guts of mealworms could degrade PS directly and efficiently and provided promising evidence for the biodegradation of PS in the environment.

Keywords: *Tenebrio molitor* Linnaeus, Polystyrene-degrading, Isolation, Gut microbiota

石油基塑料的环境污染是世界性难题^[1], 据统计, 2015 年全球消耗塑料 3 亿 t, 其中应用最广的热塑性聚苯乙烯塑料占 7.1%。聚苯乙烯(Polystyrene, PS)塑料是由苯乙烯单体聚合而成, 有多个庞大苯基基团在分子链碳原子上, 因此相对分子质量较高、耐腐蚀性好、稳定性强, 普遍认为微生物无法降解聚苯乙烯类塑料^[2]。传统处理废旧塑料的焚烧法、掩埋法均不能从根本上解决污染问题^[3], 而再加工受到加工次数的限制且应用范围较窄, 为减缓塑料累积速度而研发的生物可降解塑料^[4]对清除已形成的塑料垃圾毫无作用。通常高聚物的降解有光氧化、臭氧诱发、催化降解及生物降解

等, 其中生物降解是由生长在聚合物表面或内部的微生物引起, 能耗低且不会造成二次污染, 是绿色环保的降解方式。

黄粉虫(*Tenebrio molitor* Linnaeus)俗称面包虫, 为全变态类昆虫, 一个生长周期可分为卵、幼虫、蛹与成虫 4 个阶段, 一般一个世代需要 90–100 d^[5-6]。黄粉虫幼虫目前用于动物饲料、食品加工、医药保健品及抗菌蛋白等, 同时还可在环保应用中发挥作用, 研究表明黄粉虫幼虫可富集重金属与微量元素于体内, 并逐渐适应重金属污染的环境^[7]。此外, 黄粉虫幼虫能啮食降解塑料。沈叶红^[8]从黄粉虫肠道中分离出 8 株细菌, 并对黄粉虫降解塑料的机

理进行了初步探究。Yang 等发现以聚苯乙烯泡沫塑料为单一食源喂养黄粉虫幼虫, 100 只幼虫每天可以吃掉 34–39 mg 泡沫塑料, 通过同位素 α - ^{13}C 或 β - ^{13}C 示踪, 标记的 PS 塑料被降解矿化为 ^{13}C 标记的 CO_2 与虫体脂肪, 实验分离出 PS 降解细菌 *Exiguobacterium* sp. YT2, 该菌在 60 d 内可降解 $7.4\% \pm 0.4\%$ 的聚苯乙烯^[9–10]。陈冠舟等^[11]以高通量测序法探究啮食 PS 泡沫塑料黄粉虫肠道菌群结构, 揭示了肠道细菌具有多样性, 并且肠道细菌可能在黄粉虫生物降解塑料的过程中起主导作用。由于昆虫肠道细菌可分泌帮助昆虫肠道消化的酶, 具有非常丰富的物种多样性及代谢途径多样性, 因此从昆虫中分离降解菌是开发高分子材料生物降解的重要途径之一。本研究以啮食 60 d 聚苯乙烯的黄粉虫 3 龄幼虫为实验材料, 通过采用多种培养基富集培养、聚苯乙烯+LB 双层平板等方法, 以期从肠道中分离出聚苯乙烯降解菌, 并进行菌株形态学观察、生理生化实验及分子生物学分析, 考察菌株对聚苯乙烯的降解特性, 为聚苯乙烯塑料降解的研究提供良好的理论参考。

1 材料与方法

1.1 样品来源

实验所用黄粉虫(*Tenebrio molitor* Linnaeus)幼虫于 2016 年 10 月购于山东无棣的绿色饲料养殖厂, 幼虫虫体 20–35 mm, 在室温下饲养。

1.2 黄粉虫的饲养

黄粉虫在室温 25 °C 的实验室环境下饲养, 挑取体态均匀的幼虫各 300 条分为 2 组, 并记录黄粉虫的初始体重, 实验组仅靠聚苯乙烯白色泡沫塑料啮食钻洞, 对照组饲喂麸皮。

1.3 培养基及培养条件

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

以聚苯乙烯为唯一碳源的基础培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, K_2HPO_4 0.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7, KH_2PO_4 0.7, NH_4NO_3 1.0, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.001, NaCl

0.005, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002, 聚苯乙烯膜片, pH 7.0。

查氏培养基(CA, g/L)^[12]: NaNO_3 3.0, K_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.5, FeSO_4 0.01, 蔗糖 30.0, 琼脂 15.0, pH 7.0。

查氏酵母培养基(CYA, g/L): K_2HPO_4 1.0, 查氏浓缩液 10 mL, 酵母提取物 5.0, 蔗糖 30.0, 琼脂 15.0。

麦芽浸汁培养基(MEA, g/L): 生麦芽 20.0, 蔗糖 20.0, 蛋白胨 1.0, 氯霉素 0.1, 琼脂 15.0, pH 调至 6.4。

SAB 缓冲液(pH 5.6, 0.1 mol/L): 将 1.5 mL HAc 稀释至 100 mL, 2.72 g NaAc· H_2O 稀释至 200 mL, 两溶液混合后调 pH 至 5.6, 4 °C 保存。

以上培养基如无特殊情况, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.4 主要试剂和仪器

实验主要试剂为化学纯, 国药集团药业股份有限公司; 快速 DNA 提取检测试剂盒、Taq DNA 聚合酶, 天根生化科技(北京)有限公司。MyCycle PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; 核酸电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统, 英国 Syngene 公司; 振荡培养箱, 常州国华仪器有限公司; 冷冻离心机, 广州绿百草生物科技有限公司; 生物制品冷冻干燥系统, 北京松源华兴科技有限公司。

1.5 黄粉虫肠道微生物的分离与纯化

按照文献[13]的方法, 黄粉虫幼虫经过白色泡沫塑料 60 d 的饲喂处理, 在超净工作台上用 75% 酒精对虫体消毒 1 min, SAB 缓冲液反复漂洗至白色肉体, 无菌水清洗 3 次, 然后在蜡盘中解剖取出肠道, 加入 200 μL 无菌的 0.9% NaCl 溶液, 用灭菌的研磨棒研磨至无可见颗粒, 作为肠道微生物培养母液。

研磨物母液中加入无菌的 0.9% NaCl 溶液进行梯度稀释, 取稀释倍数 10^3 、 10^4 、 10^5 的培养液 200 μL 涂布于 CA 培养基、CYA 培养基与 MEA 培养基, 30 °C 恒温培养, 待菌落长出后, 分别挑

取菌落边缘处新长出的菌丝,及时转接至新鲜平板上培养,等菌落长至直径 3 cm 左右时转接至斜面,4 °C 保存备用。

1.6 黄粉虫幼虫粪便的收集与处理

用无菌勺收集饲喂 60 d 的黄粉虫幼虫产生的粪便,加入 50 mL 聚苯乙烯(1 g)+LB 液体培养基中,30 °C、150 r/min 振荡培养,每次按 2% (质量体积比)接种量转接到新鲜培养基中,转接 4 次后取 1 mL 富集液,进行梯度稀释成 10^{-1} – 10^{-5} 稀释液,取 100 μ L 稀释液涂布平板,将平板上长出的形态不同的菌落编号并多次划线纯化,直至得到纯化单菌落,以确保菌株的纯度和聚苯乙烯降解的稳定性,将纯化的菌株保存斜面试管中于 4 °C,待进一步鉴定。

1.7 部分分离菌株的鉴定

形态观察:挑取培养 48–72 h 的菌落涂片,使用革兰氏染色法将细菌染色并在油镜下观察菌体颜色,用扫描电镜观察细菌形态,其他生理生化试验参照沈萍等^[12]方法。真菌进行菌丝、产孢结构以及孢子的形态特征观察。

分子生物学鉴定:肠道菌株基因组通过试剂盒提取。16S rRNA 基因的扩增采用细菌通用引物 27F (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3')和 1492R (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。肠道真菌菌株 rRNA 的 ITS 区域的扩增采用通用引物 ITS1 (5'-TC CGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTC CGCTTATTGATATGC-3')。

PCR 反应体系(25.0 μ L): *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.15 μ L, 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 27F/1492R (10 μ mol/L)各 0.5 μ L,模板 DNA (100 ng/ μ L) 0.5 μ L, 灭菌 ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 50 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳测其纯度,扩增产物经检测后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

将测序得到的序列通过 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行同源序列搜索(BLAST search),匹配出同源序列。选取代表性菌株序列作进一步的分析,首先采用 ClustalX 1.8 将序列对齐,利用 MEGA 6.0 软件进行系统发育分析,并以自展法(Bootstrap)进行检测,共循环 1 000 次,Neighbor-Joining 法构建系统发育树。根据系统发育树中群组关系对菌株进行分类,并结合菌株的形态观察结果确定菌株的分类地位。

1.8 菌株降解特性的研究

1.8.1 聚苯乙烯预处理

将聚苯乙烯置于紫外灯下灭菌 3 h,称取 3 g 聚苯乙烯溶于 12 mL 二氯甲烷配制成均匀溶液,在洁净的工作台上把溶液均匀涂于载玻片上成膜,然后置于真空干燥箱中除去二氯甲烷溶剂,制备成数张 2.5 cm \times 2.0 cm、厚度 0.1 mm 的聚苯乙烯薄膜,将膜片用 50%、75%与 95%乙醇消毒,并用蒸馏水清洗 3 次,烘干称重并用紫外灭菌 30 min 备用。

1.8.2 聚苯乙烯膜片降解的测定

将聚苯乙烯膜片(约 25 mg)置入无碳源的液体培养基,每组 3 个平行,接入菌株于 30 °C、150 r/min 振荡培养,设置空白对照,观察聚苯乙烯膜片的变化,定期取样。取出的膜片用蒸馏水洗涤,干燥后的膜片经喷金后采用扫描电子显微镜观察其表面形态结构;另取洗净干燥的膜片,进行水接触角、断裂伸长率以及拉伸强度的测定,按照 GB/T528-2009 标准测试样品的断裂延伸率和拉伸强度^[14]。

1.8.3 聚苯乙烯颗粒降解的测定

接种 2% (体积比)的菌悬液至有 5 g 聚苯乙烯颗粒的摇瓶中,30 °C、150 r/min 振荡培养,以不接菌株的培养基为空白对照,每组 3 个平行,每 5 d 在灭菌的超净台迅速移取聚苯乙烯于灭菌的离心管中,清洗干净,烘干称重,计算 60 d 培养聚苯乙烯颗粒的失重率。

2 结果与分析

2.1 肠道细菌的分离筛选与鉴定

2.1.1 肠道细菌的形态学观察与鉴定

以聚苯乙烯白色泡沫塑料饲喂黄粉虫幼虫,幼虫在泡沫中打洞,生长良好,经由幼虫肠道消化后白色泡沫变成土黄色条状粪便,将粪便富集,30 °C、150 r/min 振荡 2 d,然后涂布于聚苯乙烯+LB 的固体平板,根据菌落不同形态在有氧条件下进行分离纯化,获得 7 株好氧菌。将 7 株菌分别接种于 LB 和聚苯乙烯膜片组成的液体基础培养基中,对菌株进行初筛。经过 10 d 的培养,结果发现 7 株好氧菌在 LB 液体培养基中长势均良好,而与 LB 培养基相比,含聚苯乙烯的无碳源基础培养基中只有 2 株菌生长状况较好(菌株 5、2),如图 1 所示,这 2 株菌能以聚苯乙烯为唯一碳源生长,菌体浓度最高时 2 株菌的 OD_{600} 分别为 0.550 ± 0.010 和 0.338 ± 0.009 ,而其他菌株利用 PS

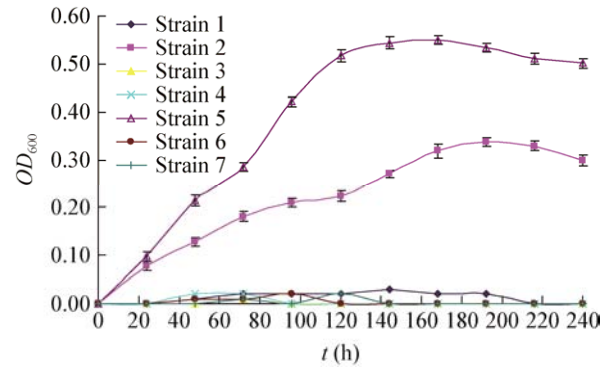


图 1 7 株菌在以 PS 膜片为唯一碳源的液体基础培养基中的生长曲线

Figure 1 Growth curves of strains 1-7 in liquid basic medium with PS films as the sole carbon source

的能力较弱,在培养过程中菌体浓度几乎无变化。

将初步筛选到的菌株 5 和 2 分别命名为 PSI-1 和 PSI-2。将菌株在聚苯乙烯+LB 的固体平板上培养 3 d,菌落形态(图 2A、B)与革兰氏染色后的菌体形态(表 1)及电镜扫描如图 2C、D、E、F 所示。

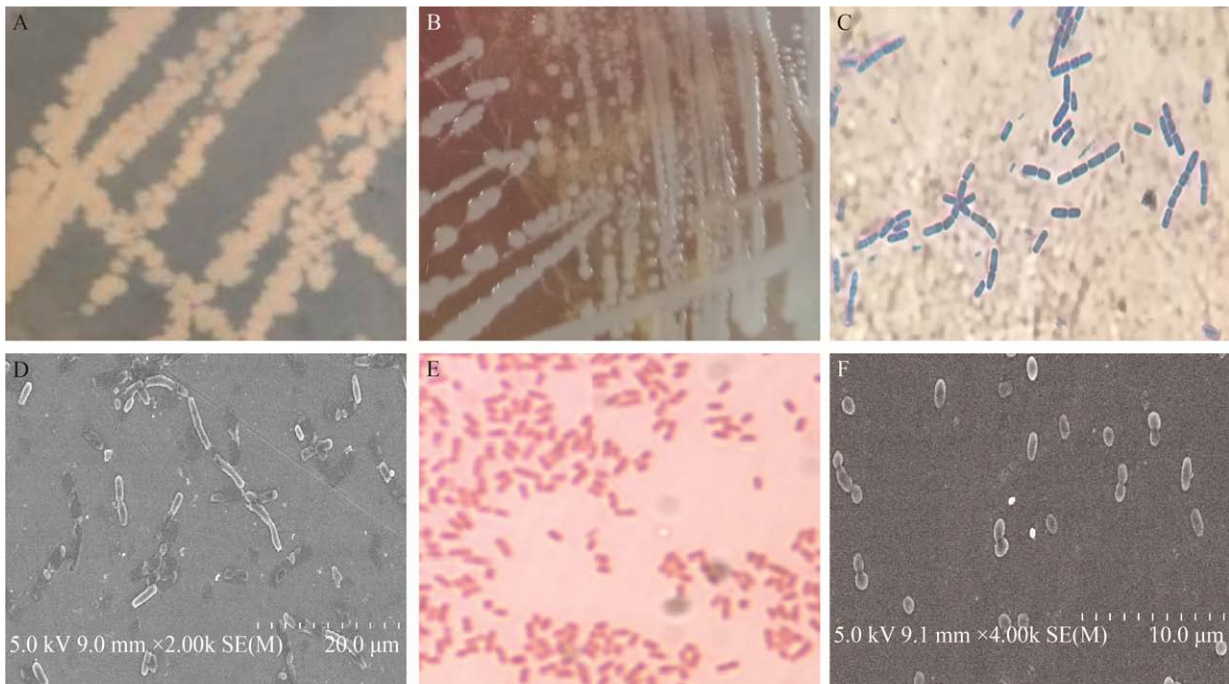


图 2 菌株 PSI-1 与 PSI-2 在 PS+LB 平板中菌落形态、革兰氏染色(100×油镜)与电镜图

Figure 2 Micrographs of PSI-1 and PSI-2 observed under the microscope and SEM

注: A 和 B 分别为菌株 PSI-1 和 PSI-2 在 PS+LB 平板中的菌落形态; C: PSI-1 (G^+); D: PSI-1 的电镜图; E: PSI-2 (G^-); F: PSI-2 的电镜图。

Note: A and B were colony morphology of strains PSI-1 and PSI-2 in PS +LB medium; C: PSI-1 (G^+); D: Micrograph of PSI-1 by SEM; E: PSI-2 (G^-); F: Micrograph of PSI-2 by SEM.

表 1 菌落形态和菌体形态

Table 1 The colony features and thallus morphology of strains

Strains	Colony features	Gram staining	Thallus morphology	Diameter after 3 d incubation period (mm)
PSI-1	White, circle, moist and umbonate with an irregular margin,	Gram-positive and produced endospores	Streptococci, single rod-shaped or arrangement in filamentous chains	4.0–6.0
PSI-2	Transparent, circle, smooth, moist with an entire margin	Gram-negative	Short rod-shaped, single or arrangement in pairs	0.5–1.2

对 2 株菌的多项生理生化指标进行测定,如表 2 所示,参照《伯杰氏细菌鉴定手册》与《常见细菌系统鉴定手册》等,可初步鉴定菌株 PSI-1 为芽孢杆菌属^[15]、菌株 PSI-2 为肠杆菌。

2.1.2 细菌的 16S rRNA 基因序列测定及系统进化分析

对菌株 PSI-1 与 PSI-2 的 16S rRNA 基因序列进行分析,PSI-1 的片段长度为 1 459 bp (GenBank 登录号: MF928090),PSI-2 的片段长度为 1 515 bp (GenBank 登录号:MF928091),将序列进行 BLAST 同源比对分析,挑出相似度 99% 以上的同源序列进行比对,构建系统发育进化树(图 3、4),发现菌株 PSI-1 与炭疽芽孢杆菌聚为同一分支中,菌株 PSI-2 与霍氏肠杆菌聚为同一分支中,二者自展值均是 57,亲缘关系最近。根据上述形态学观察和生理生化鉴定以及进化树的对比结果,菌株 PSI-1 可鉴定为芽孢杆菌属的 *Bacillus anthracis* Ames (AE016879),菌株 PSI-2 可鉴定为霍氏肠杆菌 *Enterobacter hormaechei*。

2.2 肠道真菌的分离与鉴定

2.2.1 肠道的形态学观察与鉴定

从肠道提取液中分离到一株降解聚苯乙烯性能较好的真菌,命名为 KHJ-1。将 KHJ-1 菌株分别点植于 MEA、CYA 与 CA 培养基中培养 10 d,在不同培养基中的生长状况描述如表 3 所示。菌株在 MEA 与 CYA 培养中菌丝生长速率最快(图 5),培养 10 d 后菌落直径可达 80 mm 左右,厚度约 2 mm–3 mm,菌落颜色呈褐黑色,有辐射状沟纹,质地丝绒状,背面浅黄绿色,具霉味,菌丝发达,无渗出液。

KHJ-1 的菌丝和分生孢子形态进行显微观察,

可以看出菌株 KHJ-1 孢子囊球形黑色,在孢囊梗顶端形成,直径 150 μm –250 μm ,具有明显的壁,分生孢子梗发生于基质,孢梗茎(1 000–3 500) μm ×(9–20) μm ,无隔分枝状菌丝,菌丝特化形成假根,分生孢子呈球形(图 6),参照《真菌菌种鉴定手册》,菌株 KHJ-1 与曲霉科(Aspergillaceae)、曲霉属(*Aspergillus*)的性状一致。

2.2.2 真菌的分子生物学鉴定

KHJ-1 菌株 DNA 扩增条带经琼脂糖凝胶电泳测定大小为 570 bp 左右,ITS-rRNA 序列经 NCBI 上 BLAST 比对并申请 GenBank 登录号(MF928710)。菌株 KHJ-1 的 ITS-rRNA 序列与 *Aspergillus niger* ATCC16888 (AY373852)序列相似性达 100%。使用 MEGA 6.0 软件,以 Neighbour-Joining 方法构建进化树(图 7),遗传距离显示该菌株与黑曲霉遗传距离最近,自展值为 96。综合形态学特征与 ITS 序列分析,将菌株 KHJ-1 鉴定为黑曲霉 *Aspergillus niger* KHJ-1,该菌株已保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,其保藏编号为 CGMCC14629。

表 2 菌株的生理生化实验结果

Table 2 Physiological and biochemical properties of strains

Items	PSI-1	PSI-2
Methyl red test	+	–
Indole test	+	–
Voges-Proskauer test	+	+
Glucose fermentation	+	+
Starch hydrolysis	+	–
Catalase test	+	+
Hydrogen sulfide test	–	–
Gelatin liquefaction test	+	–
Citrate test	–	–

Note: +: Positive; -: Negative.

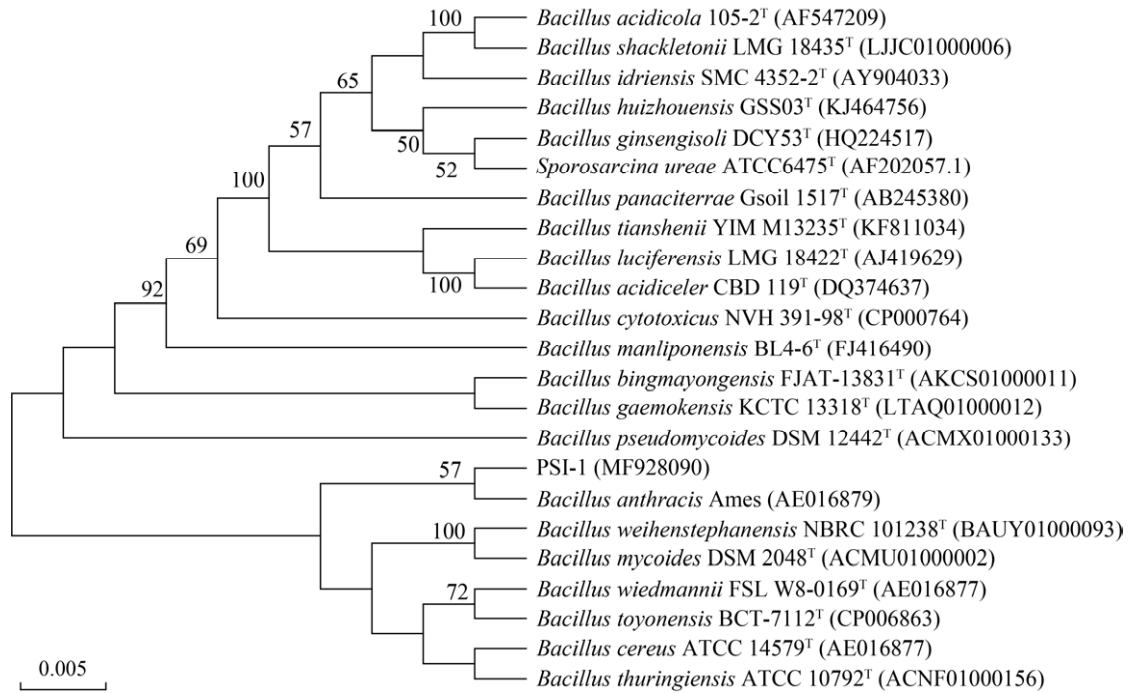


图 3 菌株 PSI-1 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain PSI-1 based on 16S rRNA gene sequence

注：利用 MEGA 6.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树，括号中为菌株的登录号，节点上的数值是自展值(%)。

Note: The tree was reconstructed by the Neighbor-Joining method using the MEGA 6.0 software. Accession numbers of the bacterial isolates are shown in brackets. The numbers at the branch nodes are boot strap values (%).

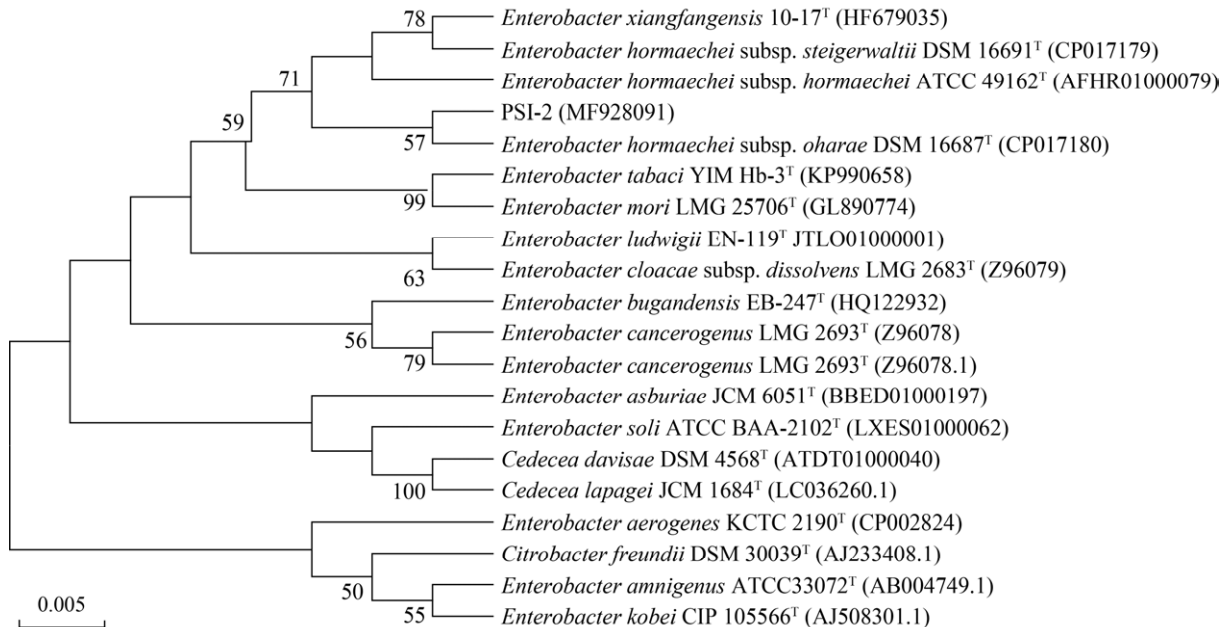


图 4 菌株 PSI-2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain PSI-2 based on 16S rRNA gene sequence

表 3 菌株 KHJ-1 在 3 种不同培养基中培养 10 d 的生长状况

Table 3 Growth condition of KHJ-1 strain for 10 days

Index	MEA medium	CYA medium	CA medium
Surface color	Black	Black center with a white indusium in the edge	Brown-black
Color in the rear of the medium	Yellow-orange	Greenish-yellow	Colorless
Colony characteristics	Dry and wrinkled	Wrinkled	Wrinkle free
Speed of growth	Fast growing	Fastest growing	Slow-growing,
Colony diameter (mm)	85 mm in diameter	90 mm in diameter	80 mm in diameter
Whole colony	Round	Round	Round
Margin	Irregular	Irregular	Irregular
Consistency	Adhere to the medium more tenaciously	Tenacious	Tenacious
Odor	Mouldy	Mouldy	Mouldy

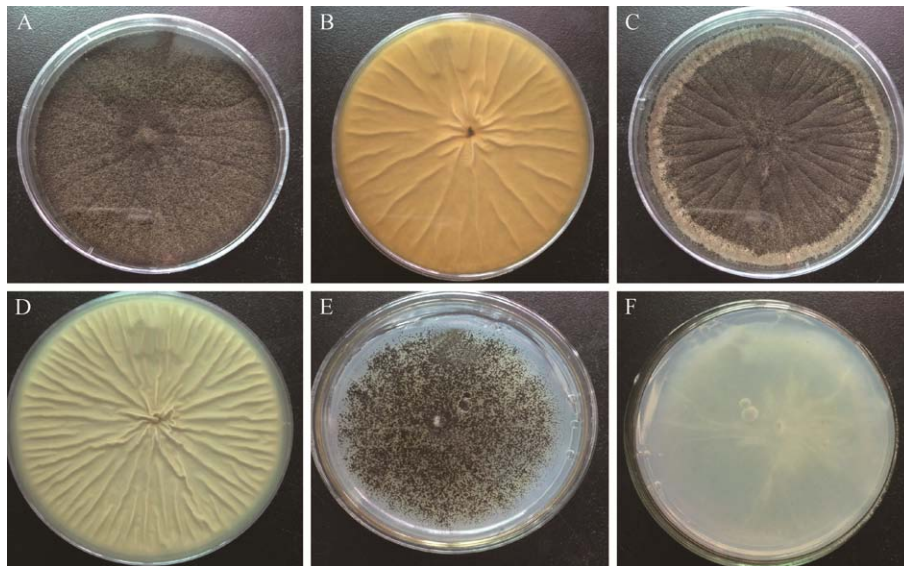


图 5 菌株 KHJ-1 在 MEA、CYA 与 CA 培养基上的生长状况

Figure 5 Developing conditions of KHJ-1 strain in different medium

注: A、B: 在 MEA 培养基正面与反面; C、D: 在 CYA 培养基正面与反面; E、F: 在 CA 培养基正面与反面。

Note: A, B: MEA medium; C, D: CYA medium; E, F: CA medium.

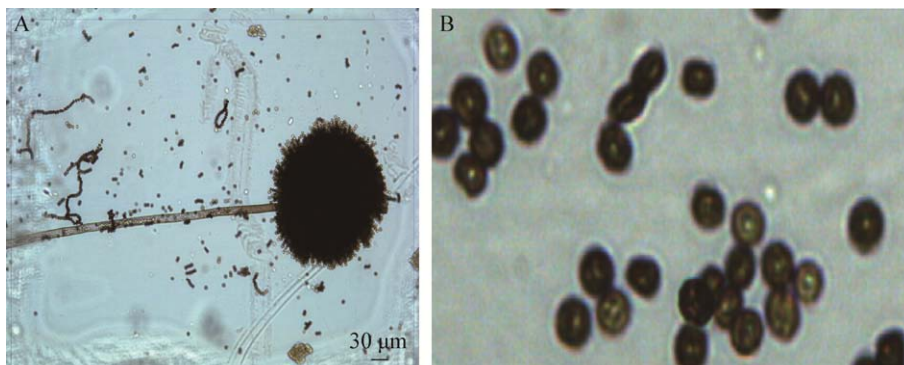


图 6 KHJ-1 菌株的菌丝体及孢子形态图

Figure 6 The morphologic hyphal and acervulus of endophyte KHJ-1 strain

注: A: 菌株的菌丝形态; B: 菌株的孢子形态。

Note: A: Mycelial morphology of KHJ-1; B: Spore morphology of KHJ-1.

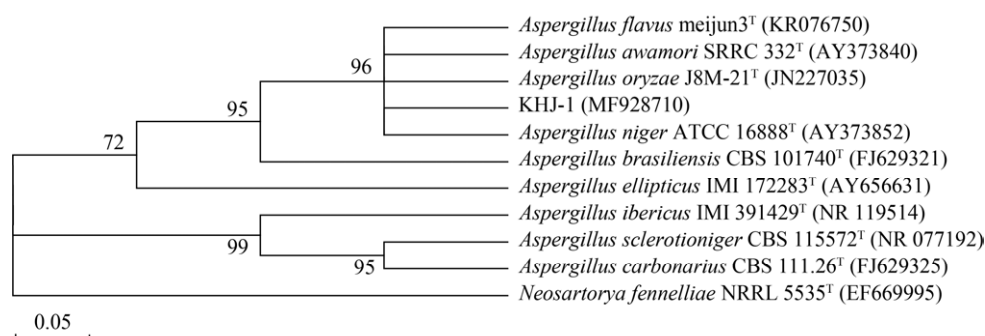


图 7 基于真菌 KJH-1 的 5.8S rRNA 基因片段序列构建的系统发育树

Figure 7 Phylogenetic tree based on the 5.8S rRNA gene sequence of KJH-1

注：括号中的序列号代表菌株的 GenBank 登录号；发育树节点的数值表示自展值(%)。

Note: Number in parenthesis represent the sequence's accession number in GenBank; Numbers at nodes present bootstrap percentage.

2.3 菌株的降解特性

2.3.1 真菌 KJH-1 降解聚苯乙烯膜片的性能测定

测定真菌 KJH-1 对聚苯乙烯膜片的降解实验中，按 2% 接种量接入聚苯乙烯膜片+查氏液体培养基(实验组)，设空白对照组。经 14 d 的培养，实验组培养基变浑浊，微生物菌体生长良好，对照组液体透明，实验组聚苯乙烯膜片上有大量腐蚀孔洞，孔洞大至肉眼可见(图 8)，图 8B 中最大椭圆孔洞为 1.02 mm×0.669 mm。

接触角是目前获得聚合物表面结构及其变化最有效、最灵敏的方法，聚苯乙烯膜片的疏水性可用接触角大小来反映，接触角越大，表面能越低，其疏水性越强^[14]。测定空白对照组 0 d 膜片水接触角为 85.02°±0.12°，疏水性很强；14 d 后测定膜片

水接触角缩至 61.25°±0.16°，膜片接触角减小，亲水性增强。膜片的断裂伸长率由原来 0 d 的 480.87%±4.15% 降至 95.25%±4.38%，拉伸强度由原来的 240.5±3.30 MPa 降至 90.0±2.81 MPa，膜片力学性能大幅下降。膜片质地由初始的粗糙变得光滑，膜片边缘出现卷边、褶皱、脆易破损等现象，而对照组的膜片几乎无变化。表明真菌微生物在膜片上生长并可有效降解聚苯乙烯。

2.3.2 KJH-1 降解聚苯乙烯颗粒的测定

将菌种 KJH-1 接种若干瓶加有 5 g 聚苯乙烯颗粒的查氏液体培养基中，30 °C、150 r/min 振荡培养 60 d，每 5 d 取样一次，洗涤聚苯乙烯颗粒并烘干至恒重，称量后计算颗粒的失重率，空白组与实验组各 3 个平行(图 9)，在培养过程中菌株生长

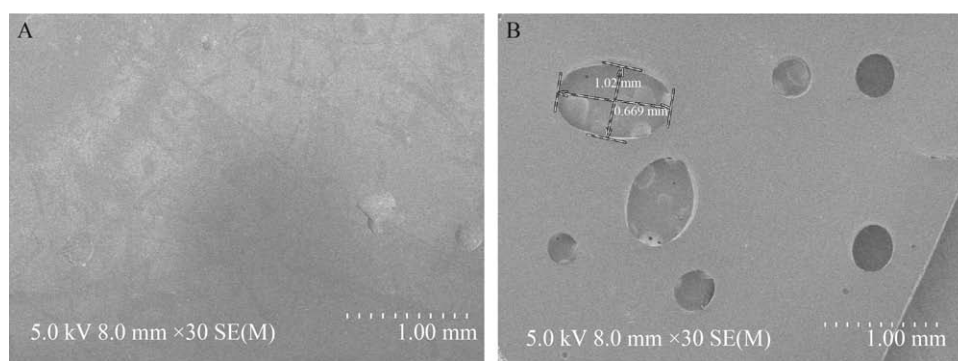


图 8 SEM 观察聚苯乙烯膜片表面

Figure 8 SEM observation of the surface of polystyrene film

注：A：空白对照；B：接种 KJH-1 菌株 14 d 后的破损膜片。

Note: A: Control; B: Film damaged after 14-day inoculation of strain KJH-1.

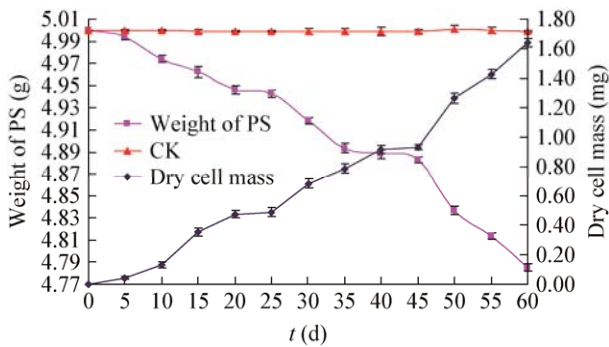


图9 菌株生长对聚苯乙烯颗粒重量的影响

Figure 9 Effect of weight of polystyrene on growth of KHJ-1

趋势增加,60 d 细胞干重最大值为 1.641 ± 0.032 mg, 从 5、10、15、20 d 时聚苯乙烯颗粒失重分别为 5.8、25.8、37.6、54 mg, 20 d 后将菌种第一次重新转接新鲜培养基, 导致 25 d 时 PS 颗粒重量变化出现了平缓, 失重只有 57 mg, 与上次测量相差仅 3 mg 左右, 菌株在 20–25 d 间也表现为生长停滞(图 9 菱形标注), 导致代谢缓慢; 30 d 时菌株迅速适应新环境, 达到了对数生长期, PS 失重达 81.6 mg, 与上次测量差值高达 24.6 mg; 培养 40 d 后第二次重新转接, 降解又出现平缓, 45 d 测量与上次失重相差 5.3 mg; 50 d 时菌株又重新适应新环境, 60 d 时 PS 失重高达 214.8 ± 0.004 mg, 失重率为 4.29%。结果表明菌株在迟滞期时颗粒失重也较慢, 达到对数生长期时, PS 失重也大幅增加, 而空白组中颗粒实验前后几乎无变化, 说明聚苯乙烯颗粒的降解是菌株作用的结果而非水解作用。

3 讨论与结论

塑料废物污染是世界性环境难题, 严重威胁着生态环境, 而聚苯乙烯又是其中最难降解的塑料之一。与处理塑料的传统方法相比, 利用微生物降解途径对于生态环境的可持续发展更具现实意义。早期有研究报道不同国家和地区工作的研究人员发现在仓库与厨房中的具颚昆虫可以咀嚼和咬破装粮食的塑料袋^[16-17]。根据对不同种昆虫(218 个种)肠道菌群多样性研究, 昆虫肠道中优势菌群属于

Proteobacteria 和 Firmicutes 两大门^[18]。而陈冠舟等利用高通量测序探究黄粉虫肠道厌氧菌群结构发现, 啮食 PS 组相对于纸片对照组中丰度最高的是 *Alcaligenes* (相对丰度 35.9%), 因此可见啮食 PS 塑料对虫体正常肠道菌群结构造成影响^[11]。Atiq 等从埋放 PS 膜的土壤中分离出 6 种细菌, 它们以 PS 作为唯一碳源在膜上粘附生长, 通过检测胞外环境代谢物, 发现只有 *Paenibacillus urinalis* NA26、*Bacillus* sp. NB6 和 *Pseudomonas aeruginosa* NB26 3 种菌能从 PS 中提取一些碳, 但塑料并未发生显著的化学变化^[19]。沈叶红从黄粉虫肠道菌群中分离出 8 株好氧菌, 分别是 *Stenotrophomonas*、*Serratia*、*Bacillus subtilis*、*Enterobacter* sp.、*Bacterium*、*Staphylococcus*、*Stenotrophomonas maltophilia* 和 *Citrobacter*, 8 株菌在 PS 膜上均有腐蚀斑^[8], 分离出的微生物菌种类别与文献报道的菌种存在较大的差别。Gilan 等在好氧条件下分离的降解 PS 的菌种是 *Rhodococcus ruber* C208, 该菌降解率可达 8%^[20]。2014 年 Yang 等首次以全面证据揭示了蜡虫(*Plodia interpunctella*, 印度谷斑螟)肠道内存在有效降解聚乙烯(Polythene, PE)塑料的细菌, 分离出 2 株细菌 *Bacillus* spp. YP1 和 *Enterobacter asburiae* YT1, 60 d 液体培养 PE 膜失重率达 10%, 并在液体培养基中检测出大量水溶性的低分子量中间产物^[21]。2015 年 Yang 研究团队又发现, 黄粉虫幼虫相对于蜡虫而言吃塑料更为厉害, 并根据虫体粪便的化学组成证实聚苯乙烯长链已发生解聚。Bombelli 等在除去蜂巢内的寄生虫时偶然发现了蜡蛾幼虫, 研究将 100 只蜡虫与英国超市的塑料袋接触, 仅 40 min 袋子上就开始出现孔洞, 12 h 后塑料袋重量比初始减少了 92 mg, 而以前报道细菌生物降解某些塑料的速度为 0.13 mg/d; 为证实塑料降解并非仅由蜡虫咀嚼机造成, 将其中一些蜡虫捣碎后涂在 PE 塑料袋上, 光谱分析表明 PE 化学键发生了断裂, 蜡虫将 PE 转化成了乙二醇单体分子, 证实蜡虫降解了 PE 高分子链^[22]。

本研究发现通过 60 d 连续饲喂聚苯乙烯泡沫塑料, 黄粉虫幼虫肠道与粪便中富集了与 PS 降解相关的菌种, 在有氧条件下通过分离筛选到 2 株细菌 PSI-1、PSI-2 与一株真菌 KHJ-1, 通过形态观察、生理生化及 rRNA 基因序列分析鉴定分别是 *Bacillus anthracis*、*Enterobacter hormaechei* 和 *Aspergillus niger*, 3 株菌均能以聚苯乙烯为唯一碳源进行生长并参与塑料降解。在聚苯乙烯塑料降解特性研究中, 我们选择了降解性较好的 *Aspergillus niger* KHJ-1, 14 d 的培养发现 PS 膜片多处形成孔洞破损, 水接触角与力学性能测定结果表明, 当膜片上出现孔洞后, 导致膜片受力不均, 抗拉性能下降, 疏水性减弱, 亲水性增强, 有利于菌体的粘附降解。推测降解过程中, 菌株将 PS 高分子链氧化生成了-CHO、-COOH 等亲水性基团^[23]。在测定 KHJ-1 菌株对 PS 颗粒定量降解中, 60 d 测得 PS 颗粒失重 214.8 mg/5 g, 失重率为 4.29%。作者认为失重率理论应更高些, 由于菌体在 PS 降解过程中可能会附着在颗粒表面, 导致颗粒外围附着有菌膜, 从而使 PS 颗粒的称量结果之间的差值实际偏低, 结果造成降解率计算偏低。

目前有关细菌降解 PS 等塑料已有较多报道, 但降解能力大多不够理想, 利用黑曲霉真菌降解 PS 的研究却很少。本研究分离出的 *Aspergillus niger* KHJ-1 相较于文献中报道的菌株而言, 降解聚苯乙烯泡沫塑料的周期测定持续了 60 d, 周期虽漫长但重复性较好, 尽管降解效率与文献报道存在一定的差距, 未来的工作中可以通过诱变及降解优化等手段提高其降解效率。该菌株在聚苯乙烯生物降解方面极具应用潜能, 丰富了聚苯乙烯降解菌株资源库, 为深入研究聚苯乙烯的生物降解具有一定辅助作用。

REFERENCES

- [1] Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate)[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1196-1199
- [2] Yang J, Song YL, Qin XY. Biodegradation of polyethylene[J]. *Environmental Science*, 2007, 28(5): 1165-1168 (in Chinese)
杨军, 宋怡玲, 秦小燕. 聚乙烯塑料的生物降解研究[J]. *环境科学*, 2007, 28(5): 1165-1168
- [3] Ioakeimidis C, Fotopoulou KN, Karapanagioti HK, et al. The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23501
- [4] Lu CX, Liu L, Li JH, et al. Isolation and characterization of a microorganism degrading starch/polyethylene blends[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2013, 19(4): 683-687 (in Chinese)
陆辰霞, 刘龙, 李江华, 等. 淀粉填充聚乙烯类塑料降解微生物的筛选和降解特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2013, 19(4): 683-687
- [5] Bai YY, Cheng JA. Nutritive value and rearing methods of *Tenebrio molitor* in China[J]. *Entomological Knowledge*, 2003, 40(4): 317-322 (in Chinese)
白耀宇, 程家安. 我国黄粉虫的营养价值和饲养方法[J]. *昆虫知识*, 2003, 40(4): 317-322
- [6] Ye XQ, Liu DH, Hu C. Some factors' effects on the solubility of protein from yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L) larvae[J]. *Journal of Zhejiang University (Science A)*, 2001, 2(4): 436-438
- [7] van Ooik T, Rantala MJ, Saloniemi I. Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata*[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 145(1): 348-354
- [8] 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
- [9] 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
- [10] 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
- [11] Chen GZ, Zhang BL, Ji MM, et al. Gut microbiota of polystyrene-eating mealworms analyzed by high-throughput sequencing[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(9): 2011-2018 (in Chinese)
陈冠舟, 张白鹭, 纪梦梦, 等. 高通量测序探究嗜食聚苯乙烯泡沫塑料黄粉虫的肠道菌群结构[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(9): 2011-2018
- [12] Shen P, Chen XD. *Microbiology Experiment*[M]. 4th ed. Beijing: China Higher Education Press, 2007: 241 (in Chinese)
沈萍, 陈向东. *微生物学实验*[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 241
- [13] Zhang Y, Shao MW, Zhang YL, et al. Inhibition of *Amaranthus retroflexus* by wasp gut fungal isolate *Fusarium oxysporum* MF06[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(3): 292-298

- (in Chinese)
张蕴, 邵明伟, 张应烙, 等. 马蜂肠道菌抑制反枝苋的活性筛选及菌株 MF06 的活性代谢产物[J]. 微生物学报, 2015, 55(3): 292-298
- [14] Wang XP, Chen ZF, Ni HG, et al. Surface properties of Hydroxy-terminated polystyrenes[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2005, 26(9): 1752-1756 (in Chinese)
王新平, 陈志方, 倪华钢, 等. 端羟基化聚苯乙烯的表面性质[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26(9): 1752-1756
- [15] Buchanan RE, Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 274-280 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984: 274-280
- [16] Gerhardt PD, Lindgren DL. Penetration of packaging films: film materials used for food packaging tested for resistance to some common stored-product insects[J]. California Agriculture, 1954, 8(6): 3-4
- [17] Riudavets J, Salas I, Pons MJ. Damage characteristics produced by insect pests in packaging film[J]. Journal of Stored Products Research, 2007, 43(4): 564-570
- [18] Yun JH, Roh SW, Whon TW, et al. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(17): 5254-5264
- [19] Atiq N, Ahmed S, Ali MI, et al. Isolation and identification of polystyrene biodegrading bacteria from soil[J]. African Journal of Microbiology Research, 2010, 4(14): 1537-1541
- [20] Gilan I, Hadar Y, Sivan A. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(1): 97-104
- [21] 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
- [22] Bombelli P, Howe CJ, Bertocchini F. Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*[J]. Current Biology, 2017, 27(8): R292-R293
- [23] Lu JJ. The analysis of *Paenibacillus mucilaginosus* KNP414 stress resistance comparative genome and transcriptome under nitrogen starvation condition[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Sci-Tech University, 2014 (in Chinese)
卢景江. 胶质类芽孢杆菌 KNP414 抗逆比较基因组及氮饥饿的转录组分析[D]. 杭州: 浙江理工大学硕士学位论文, 2014