

## 研究报告

## 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

徐松 王敬敬 周婷婷 赵维 黄志勇\*

(中国科学院天津工业生物技术研究所 天津市工业生物系统与过程工程重点实验室 天津 300308)

**摘要:**【背景】以聚己二酸/对苯二甲酸丁二酯(PBAT)为主要成分的塑料地膜虽然是生物可降解的地膜,但是关于该塑料地膜降解的微生物菌群研究却较少。【目的】拟从不同环境样品中筛选可降解 PBAT 塑料地膜的微生物菌群。通过对其多次富集的菌群群落结构演替进行分析,明晰可降解 PBAT 塑料地膜的核心微生物。【方法】利用改良的 SM 无机盐培养基从不同环境样品中筛选可降解 PBAT 塑料地膜的微生物菌群;利用失重法测定菌群对 PBAT 塑料地膜降解的效率;利用 16S rRNA 基因高通量测序技术对其第 5 批次(G5)至第 9 批次(G9)富集的降解菌群的群落结构进行深入探讨;通过 Pearson 相关性分析方法对菌群不同菌属相对丰度变化和 PBAT 塑料地膜降解时间进行解析。【结果】从广州金发堆肥厂的堆肥样品中筛选到可完全降解 PBAT 塑料地膜的菌群,编号为 SX。通过连续不断的转接富集,菌群 SX 对 PBAT 塑料地膜的降解速率显著提升。16S rRNA 基因高通量测序结果显示第 5 批次(G5)至第 9 批次(G9)富集的 PBAT 塑料地膜降解菌群,厚壁菌门(Firmicutes)的相对丰度逐渐下降,而放线菌门(Actinobacteria)的相对丰度逐渐上升。硫磺色节杆菌(*Arthrobacter sulfureus*)、红螺菌科(Rhodospirillaceae)和噬几丁质菌科(Chitinophagaceae)在随着转接富集过程中相对丰度逐渐升高而芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)的相对丰度显著降低。通过统计分析发现硫磺色节杆菌(*Arthrobacter sulfureus*)相对丰度升高与 PBAT 塑料地膜降解时间缩短显著相关( $r=-0.927$ ,  $P<0.05$ )。【结论】筛选到 PBAT 塑料地膜高效降解菌群 SX。通过连续不断的转接富集,菌群 SX 对 PBAT 塑料地膜的降解时间由 28 d(第 5 批次, G5)降低到 13 d(第 9 批次, G9)。通过对菌群群落结构的研究,发现随着菌群降解效率的提高,硫磺色节杆菌的所占相对丰度显著增加,说明其可能在 PBAT 塑料降解中发挥着关键作用。本研究为 PBAT 塑料地膜的降解提供了绿色高效环保的新途径和菌株资源,并为 PBAT 塑料地膜降解的机制研究奠定了基础。

**关键词:** PBAT 塑料地膜, 筛选, 生物降解, 群落结构, 演替特征

**Foundation items:** Key Program of the Chinese Academy of Sciences (KFZD-SW-219); National Natural Science Foundation of China (31500424); The Major Ecological and Environmental Governance of Tianjin Municipal Science and Technology Commission (16YFXTSF00560)

\*Corresponding author: Tel: 86-22-84861931; E-mail: huang\_zy@tib.cas.cn

Received: May 24, 2018; Accepted: September 14, 2018; Published online (www.cnki.net): October 11, 2018

基金项目: 中国科学院重点部署项目(KFZD-SW-219); 国家自然科学基金(31500424); 天津市科委重大生态环境治理工作(16YFXTSF00560)

\*通信作者: Tel: 86-22-84861931; E-mail: huang\_zy@tib.cas.cn

收稿日期: 2018-05-24; 接受日期: 2018-09-14; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-10-11

## Screening and community succession of high effective poly(butyleneadipate-co-terephthalate) plastic mulch degrading bacteria

XU Song WANG Jing-Jing ZHOU Ting-Ting ZHAO Wei HUANG Zhi-Yong\*

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Biology System and Process Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

**Abstract:** [Background] Although poly(butyleneadipate-co-terephthalate)/PBAT plastic mulch is biodegradable, little is studied on its microbial degradation. [Objective] This study was to screen bacteria from different environmental samples for degrading PBAT plastic mulch. Through the analysis of community succession structure at multiple enrichment, the core microbe group of degrading PBAT plastic mulch bacteria was studied. [Methods] The modified SM inorganic salt medium was used to screen microorganisms that can degrade PBAT plastic mulch from different environmental samples. The efficiency of microbial degradation community was determined by weight-loss method. By using 16S rRNA gene high-throughput sequencing technology, the community structure from the fifth (G5) to ninth (G9) enrichment was studied. The relative abundance of different bacterial community and the PBAT plastic mulch degradation time were analyzed by Pearson correlation analysis. [Results] The biodegradable bacterial community capable of completely degrading PBAT plastic mulch was selected from the compost samples of Guangzhou Composting Plant and named SX. Through continuous transfer and enrichment, the degradation time of PBAT plastic mulch by bacteria SX decreased from 28 days (fifth, G5) to 13 days (9th, G9), indicating that the degradation rate of PBAT plastic mulch significantly increased. The high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene showed that the relative abundance of Firmicutes gradually decreased in the fifth (G5) to ninth (G9) of PBAT plastic mulch degrading community, and the relative abundance of Actinobacteria gradually increased. The relative abundances of *Arthrobacter sulfureus*, Rhodospirillaceae, and Chitinophagaceae were gradually increased, however the relative abundance of *Bacillus* sp. was significantly decreased. Statistical analysis revealed that the relative abundance of *Arthrobacter sulfureus* was significantly associated with the reduction of PBAT plastic mulch degradation time ( $r=-0.927$ ,  $P<0.05$ ). [Conclusion] This study provided a green, highly efficient and environmental friendly new pathway and strain resource for the degradation of PBAT plastic mulch.

**Keywords:** PBAT plastic mulch, Screening, Biodegradation, Community structure, Succession characteristics

塑料地膜覆盖可以良好地保持土壤的温度和湿度,有效促进作物的生长、维持土壤肥力、防治害虫侵害作物,所以其在我国现代农业中得到了广泛的应用且发挥了极其重要的作用。在利用塑料地膜覆盖技术下,我国的粮食产量和农业收入都得到了有效增加,分别增加了20%–35%和20%–60%<sup>[1]</sup>。据相关文献报道,2014年全国塑料地膜用量达到144.1万t,覆盖面积超过2000万hm<sup>2</sup><sup>[2]</sup>,且塑料地膜需求增长率高达10%<sup>[3]</sup>。作为世界上最大的农业大国,我国在农用塑料地膜方面产量居世界第一,塑料地膜的年产量高达60万t左右。

但是,塑料地膜的广泛应用也带来了一系列问题,如传统的塑料地膜在自然环境中极不易被分解,降解所需时间漫长,有些甚至降解周期达到上百年<sup>[4]</sup>。而且现在普遍存在残余塑料地膜回收不利和处理不当等现象。残留在耕地土壤中的塑料地膜,对农作物生长发育存在着严重的影响,主要表现为加大了土壤容重,降低了土壤原有的通透性,影响了耕地土壤中好氧微生物的活性,从而使种子萌发和幼苗生长缓慢,根系发育不良而导致农作物的减产<sup>[4-5]</sup>。因此,塑料地膜残留导致了严重的“白色污染”、耕地土壤结构严重破坏、肥力流失等污染

和农作物欠收等问题, 成为了全球共同面对的亟需解决难题之一。

近年来生物可降解塑料作为一种新型环保的高分子材料受到人们的青睐。生物降解塑料地膜是指一类在自然环境条件下, 通过微生物的生理活性作用而引起降解的塑料地膜。生物降解塑料地膜是最重要的一类降解塑料地膜, 它利用微生物的降解活性来实现其降解效果, 同时微生物来处理降解该类地膜具有降解效率高、反应条件温和、处理过程清洁无污染等优势, 已成为近年来研究的热点。与传统的物理和化学降解方法相比, 微生物能够加速生物降解塑料的水解, 降解高分子材料, 具有低能耗、环境友好、经济性等各种优点, 因此研究生物可降解塑料成为现今研究的焦点和热点。我国作为塑料地膜产量和用量世界第一位的农业大国, 发展生物降解地膜的研发已成为塑料工业和农业发展的重要战略方向之一<sup>[1,6-7]</sup>。

自 2000 年以来, Poly(butyleneadipate-co-terephthalate)/PBAT 塑料地膜作为一种新型的生物可降解地膜, 受到了人们的广泛关注。PBAT 属于热塑性生物降解塑料, 是己二酸丁二醇酯和对苯二甲酸丁二醇酯的共聚物, 兼具 PBA 和 PBT 的特性, 既有较好的延展性和断裂伸长率, 又有较好的耐热性和冲击性能。此外, 还具有优良的生物降解性, 是目前生物降解塑料中研究最活跃、市场应用效果最好的可降解材料之一<sup>[8]</sup>。此外, 国内外大量的科学研究主要针对 PBAT 塑料地膜的力学性能、耐水性能、热学性能和造价方面<sup>[9]</sup>, 目前尚未有关于 PBAT 降解方面的报道。

以 PBAT 为主要成分的塑料地膜虽然是生物可降解的地膜, 但是 PBAT 塑料地膜降解的不可控性或者可控性差的问题仍制约着 PBAT 塑料地膜的发展, 成为其发展瓶颈之一<sup>[10]</sup>。关于此类生物可降解塑料地膜, 尤其是针对 PBAT 塑料地膜的降解微生物群落或者菌株筛选和相关机制研究报道却极为罕见, 而微生物作为自然环境中降解该类塑料地膜的最重要角色, 现对其研究有所缺失。

本研究拟从多类环境样品中, 利用选择性培养基筛选 PBAT 塑料地膜高效降解菌群, 并通过对多次富集和不同降解速率的菌群群落结构演替规律的研究, 探索可降解 PBAT 塑料地膜的核心微生物物种。从而为 PBAT 塑料地膜生物降解机制的研究和 PBAT 塑料地膜生物降解技术的开发利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 PBAT 塑料地膜特性及样品来源

PBAT 塑料地膜是脂肪族和芳香族的共聚物(图 1), 中文名称: 聚己二酸/对苯二甲酸丁二酯, 英文名称: Poly(butyleneadipate-co-terephthalate), 缩写简称: PBAT。PBAT 是一种半结晶型聚合物, 通常结晶温度在 110 °C 附近, 而熔点在 130 °C 左右, 密度在 1.18–1.30 g/mL 之间。PBAT 的结晶度在 30% 左右, 且邵氏硬度在 85 以上<sup>[11]</sup>。PBAT 塑料地膜样品由本研究所总体研究部提供。

### 1.2 主要试剂和仪器

氯化钠等无机化学试剂, 国药集团化学试剂有限公司; PowerSoil DNA 提取试剂盒, MOBIO 公司。电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 凝胶成像仪, 伯乐公司; 高压蒸汽灭菌锅, 三洋公司; 离心机, Eppendorf 公司; 紫外洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 恒温培养箱, 上海新苗医疗器械有限公司。

### 1.3 培养基

Luria-Bertani (LB)培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, 调整 pH 至 7.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

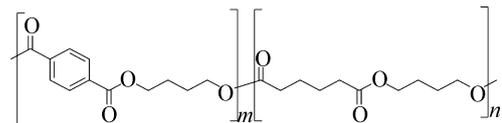


图 1 聚己二酸/对苯二甲酸丁二酯(PBAT)分子结构式  
Figure 1 Poly(butyleneadipate-co-terephthalate) molecular structure

改良的基础 SM 无机盐培养基(g/L):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{KCl}$  0.15,  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{MnSO}_4$  0.001, 调整 pH 至 7.8,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min<sup>[12]</sup>。固体培养基添加琼脂粉 20 g/L。

#### 1.4 环境样品来源

本实验所采用的环境样品分别为来自山东寿光蔬菜基地大棚、福建安溪茶园、新疆 81、84 建设兵团、印度尼西亚棕榈园和中国科学院天津工业生物技术研究所院内的土壤样品以及来自广州金发堆肥厂堆肥样品。山东寿光蔬菜基地大棚、福建安溪茶园、印度尼西亚棕榈园和中国科学院天津工业生物技术研究所院内的土壤样品均由本课题组人员采集。新疆 81、84 建设兵团土壤和广州金发堆肥厂堆肥样品由本研究所总体研究部工作人员提供。所有土壤采样深度为 5 cm–10 cm, 将采集的土壤样品分别贮存于已经完全灭菌的透明封口袋和封口瓶内并编号, 密封好, 4 °C 保存, 备用。

#### 1.5 PBAT 降解菌群的筛选和转接富集

##### 1.5.1 菌群初筛

将土壤/堆肥样品在以 PBAT 塑料地膜为唯一碳源和能源的改良的基础 SM 无机盐液体培养基中进行富集培养。具体操作如下: 将 10.0 g 土壤/堆肥样品加 100 mL 含有改良的基础 SM 无机盐液体培养基中, 加入 3 cm×3 cm 大小的 300 mg PBAT 塑料地膜, 37 °C、180 r/min 振荡培养, 直至 PBAT 塑料地膜发生降解, 以肉眼观察到 PBAT 塑料地膜明显降解成糊状为指标, 每个实验组设置 3 个重复。

##### 1.5.2 菌群转接富集

发现 PBAT 塑料地膜降解后, 将该处理的培养液作为第一批次富集(G1)。待 PBAT 塑料地膜完全降解后, 取 10 mL 的培养液再次按照 10%的接种, 转接到含有 3 cm×3 cm 大小的 300 mg PBAT 塑料地膜的改良的基础 SM 无机盐液体培养基中进行转接富集, 即为第 2 批次富集(G2)。以此类推进行 3 (G3)、4 (G4)……N 批次。

#### 1.6 PBAT 塑料地膜的降解率计算

在 PBAT 塑料地膜的降解试验过程中, 观察 PBAT 塑料地膜的降解剩余塑料量。在规定的时间内从培养液中取出剩余的 PBAT 塑料地膜, 用 70%酒精浸泡 30 min, 然后用超纯水清洗 2 遍, 再放在一次性干净的培养皿, 置于 60 °C 烘箱烘干过夜, 烘干至恒重, 称取重量, 采用失重测定法利用下面公式计算 PBAT 塑料地膜的降解率<sup>[13]</sup>。

计算降解率的公式:

$$V = \frac{V_0 - V_1}{V_0} \times 100\%$$

其中,  $V$  为降解率,  $V_0$  为初始 PBAT 塑料地膜的重量(mg),  $V_1$  为降解过程中剩余 PBAT 塑料地膜的重量(mg)。

#### 1.7 降解菌群基因组的提取

本研究对第 5 批次(G5)、6 批次(G6)、7 批次(G7)、8 批次(G8)、9 批次(G9)这 5 个不同批次的地膜降解菌液进行 DNA 的提取。取 1.5 mL 的培养液, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清收集菌体, 加入 10 mg/mL 的溶菌酶 0.2 mL、10 mmol/L Tris-HCl (pH 为 8.0) 0.2 mL 后混匀, 37 °C 处理 5 min, 后续步骤按土壤基因组提取试剂盒说明书进行。提取的基因组进行电泳鉴定, 并用 NanoDrop 测定基因组的含量和质量。

#### 1.8 16S rRNA 基因高通量测序

以从 G5–G9 提取的菌群基因组 DNA 为模板, 采用 Illumina MiSeq 测序平台检测 16S rRNA 基因的 V3–V4 高变区。细菌通用引物序列为 F515 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'和 R806 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。每个样本产出至少 4 万条读长(Reads), 并通过 QIIME 1.7.0 软件进行基本数据分析, 根据相关流程操作进行<sup>[14]</sup>。高通量测序所得的序列数据采用 FLASH 和 Fastq 进行质量控制, 去除嵌合体及靶向区域外的序列, 然后序列 Reads 按照 97%的序列相似度进行 OTU 聚类分析, 采用 RPD classifier 对随机挑选的 OTU 代表性序列进

行分类学分析<sup>[15]</sup>, 统计各个样品之间的群落组成, Heatmap 采用 HemI 1.0 软件绘制而成<sup>[16]</sup>。

### 1.9 数据统计分析

本研究中数据各个实验处理采用至少 3 次重复, PBAT 塑料地膜降解曲线采用 Excel 作图绘制(均值±标准差), 用 SPSS 20.0 进行统计学分析, 相关性系数采用 Pearson 相关分析,  $P < 0.05$  表示差异性显著(具有统计学意义)。

## 2 结果与分析

### 2.1 PBAT 塑料地膜高效降解菌群的筛选结果

在以 PBAT 塑料地膜为唯一碳源的改良的基础 SM 无机盐培养基中, 接种广州金发堆肥厂的堆肥样品的培养液, 在 37 °C 培养 28 d 后, 发现可使 PBAT 塑料地膜完全崩解, 将此降解 PBAT 塑料地膜的微生物菌群编号为 SX, 从其他地区采集的土样样品并未产生明显的降解效果。

研究发现, PBAT 塑料地膜在菌群 SX 降解的过程中表观变化主要经过下面 5 种形态(图 2): 在未进行任何处理的情况下, PBAT 塑料地膜表面较为平整、有韧性(图 2A); 添加菌群 SX 后, PBAT 塑料地膜韧性逐渐消失, 易于破碎, 可观察到地膜四周发生破损(图 2B); 在菌群的进一步作用下, PBAT 塑料地膜发生完全崩解破碎(图 2C); 随后在菌群 SX 的作用下, PBAT 塑料地膜由破碎的块状形态变成絮状物质形态(图 2D); 最后降解至肉眼不能观察(图 2E)。

### 2.2 PBAT 塑料地膜高效降解菌群 SX 转接富集结果

从广州金发堆肥厂的样品中筛选的降解菌群

SX 将 PBAT 塑料地膜降解成糊状的菌群作为第 1 批次富集(命名为 G1, 后续依次为 G2、G3、G4.....), 共转接富集了 9 批次(G9)。通过对筛选到的 PBAT 塑料地膜降解菌群 SX 进行 9 批次的富集发现, 该菌群的 PBAT 塑料地膜降解能力没有因为转接次数的增多而衰退。随着转接次数的增加, 菌群逐渐适应了以 PBAT 塑料地膜为唯一碳源的生长环境, 表现出越来越强的 PBAT 塑料地膜降解能力。

### 2.3 PBAT 塑料地膜降解菌群 SX 各批次降解时间变化

地膜高效降解菌群在转接富集 9 批次的过程中, 对于 PBAT 塑料地膜的降解失重率都可以达到 100%。但是随着转接富集次数的增加, PBAT 塑料地膜的降解时间逐渐的显著缩短。由图 3 可知, 第 4 (G4)、第 5 批次(G5)菌群 SX 达到 PBAT 塑料地膜 100%降解的时间约为 28 d。第 6 批次(G6)菌群 SX 完全降解 PBAT 塑料地膜的时间仅为 15 d。随着富集过程的不断延长, 第 7 (G7)、8 批次(G8)的 PBAT 塑料地膜完全降解时间为 14 d。第 9 批次(G9)菌群 SX 的地膜 100%降解时间为 13 d。这表明随着转接富集, 各批次菌群对 PBAT 塑料地膜的降解时间显著缩短。

同时, 通过第 4 (G4)、5 (G5)、6 (G6)、7 (G7)、8 (G8)、9 (G9)等各批次 PBAT 塑料地膜降解曲线可以看出, 菌群 SX 对 PBAT 塑料地膜的降解速率在不断地提高。在第 9 批次中, 菌群 SX 在 48 h 对 PBAT 塑料地膜的降解率达到了 59.7% (图 4), 显著高于第 8 (29.2%)和第 7 (22.3%)批次对 PBAT 塑料地膜的降解率( $P < 0.05$ ), 而第 4 和第 5 批次对 PBAT 塑料地膜降解达到 50%的时间需要超过 10 d 以上。

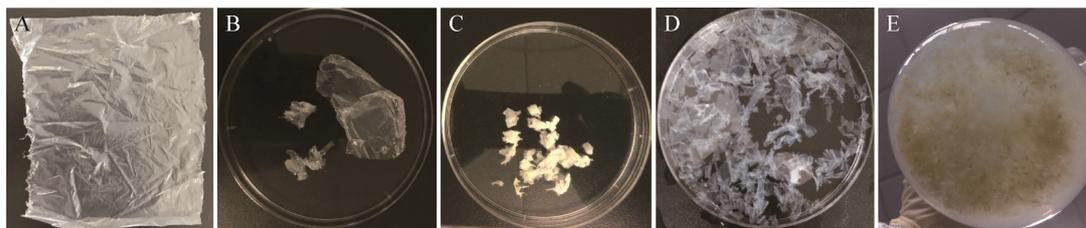


图 2 PBAT 塑料地膜在降解菌群 SX 作用下形态变化情况

Figure 2 Morphological changes of PBAT plastic film under bacteria SX degradation

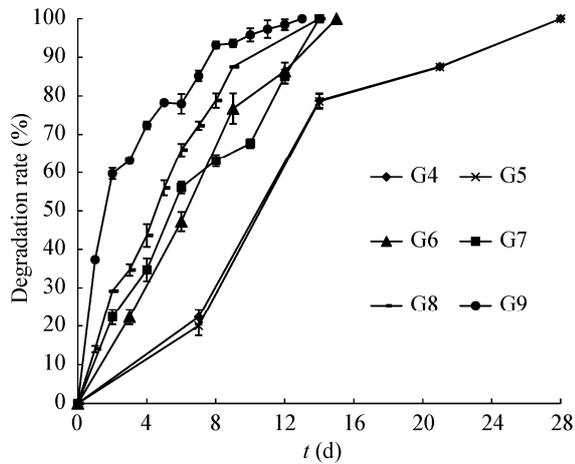


图3 菌群SX转接富集过程各批次对PBAT塑料地膜的降解曲线

Figure 3 Degradation curve of PBAT plastic film mulch during the enrichment of bacteria SX

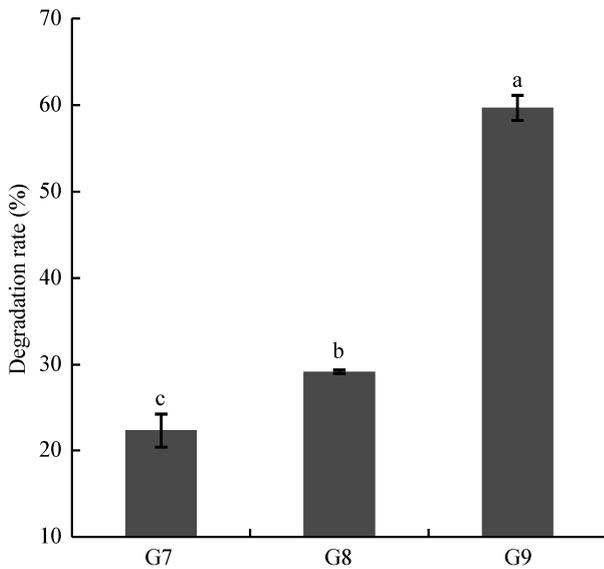


图4 菌群SX第7、8和9批次对PBAT塑料地膜降解率(48 h)

Figure 4 Degradation rate of PBAT plastic film mulch in the seventh, eighth and ninth enrichment of bacteria SX (48 h)

注: 误差线代表标准差; a、b和c代表差异显著( $P < 0.05$ ).

Note: Error bars represent standard deviation; a, b, and c indicate a significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 转接富集中高效降解菌群SX的群落结构变化

通过 16S rRNA 基因高通量测序分析发现, PBAT 塑料地膜降解菌群 SX 的各批次主要是由 12 个不同门的菌株组成(含量高于 0.1%, 包括 Other), 不同富集转接时期的菌群组成和丰度的详细情况如图 5 所示, 在第 5 批次(G5)中, 主要优势菌依次是变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes), 它们的相对丰度分别为 26.7%、25.7%和 21.9%。随着连续转接富集到第 9 批次(G9)中门水平上, 变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门在 PBAT 塑料地膜降解菌群 SX 中是优势菌, 它们的相对丰度分别为 38.6%、29.2%和 19.4%, 所占比例达到 87%以上, 远远高于其他门水平。随着转接富集过程中放线菌门所占有的相对丰度逐渐上升, 厚壁菌门逐渐下降, 变形菌门保持较为平稳的趋势, 相对丰度一直最高。

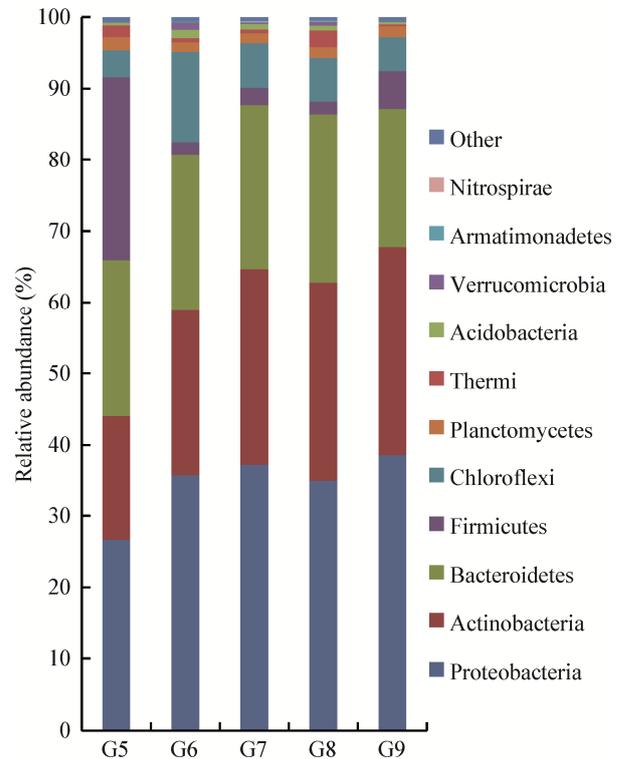


图5 菌群SX转接富集过程中菌群群落结构的变化(门水平)

Figure 5 Overview of community structure during the enrichment of bacteria SX (Phyla level)

通过横向比较可以发现,不同批次的 PBAT 塑料地膜降解菌群的相对丰度不同,表明不同批次富集存在一定的差异,第 5 批次(G5)与后面批次显著不同。其厚壁菌门所占比例在 25.7%,而后续几批次中厚壁菌门所占比例较低,所占比例分别为 1.7%、2.4%、1.8%和 5.3%。由菌群结构热图(Heatmap) (图 6)可知,在第 5-9 各批次转接富集过程中, PBAT 塑料地膜降解菌群 SX 的第 5 批次相对丰度最高的菌属是芽孢杆菌属,第 6-9 批次中相对丰度下降非常明显。而在第 5-9 批次中都存在的菌属为硫磺色节杆菌,且随着转接富集过程相对丰度逐渐升高(图 6)。

通过进一步深入分析,在菌群 SX 降解效率不断提高过程中,硫磺色节杆菌所占菌群 SX 的相对丰度随着转接富集而增加,在第 9 批次中的相对丰度是第 5 批次的 2 倍左右,所占相对比例达到了 20%以上(图 7)。后续各批次菌群对 PBAT 塑料地膜的降解速率明显加快,推测与该菌属所占相对含量增加有关。红螺菌科(Rhodospirillaceae)和噬几丁质菌科(Chitinophagaceae)的相对丰度随菌群的转接富集变化不明显,在菌群 SX 中所占比例含量较高。推测这 2 个菌类群虽然其相对丰度含量变化不显著,但可能对维持菌群的稳定具有重要作用。

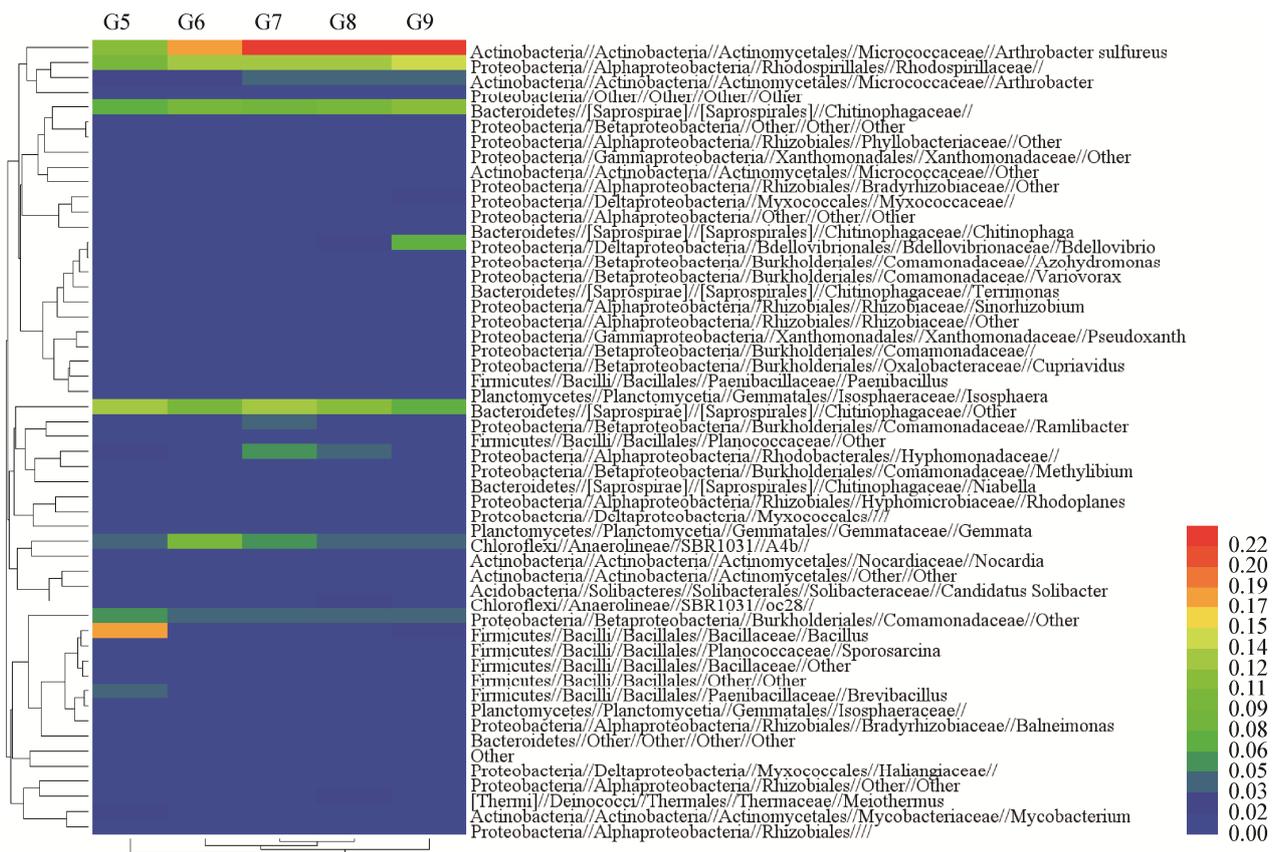


图 6 菌群 SX 转接富集过程中菌群群落结构热图(相对丰度高于 0.1%)

Figure 6 Heatmap of community structure during the enrichment of bacteria SX (relative abundance higher than 0.1%)

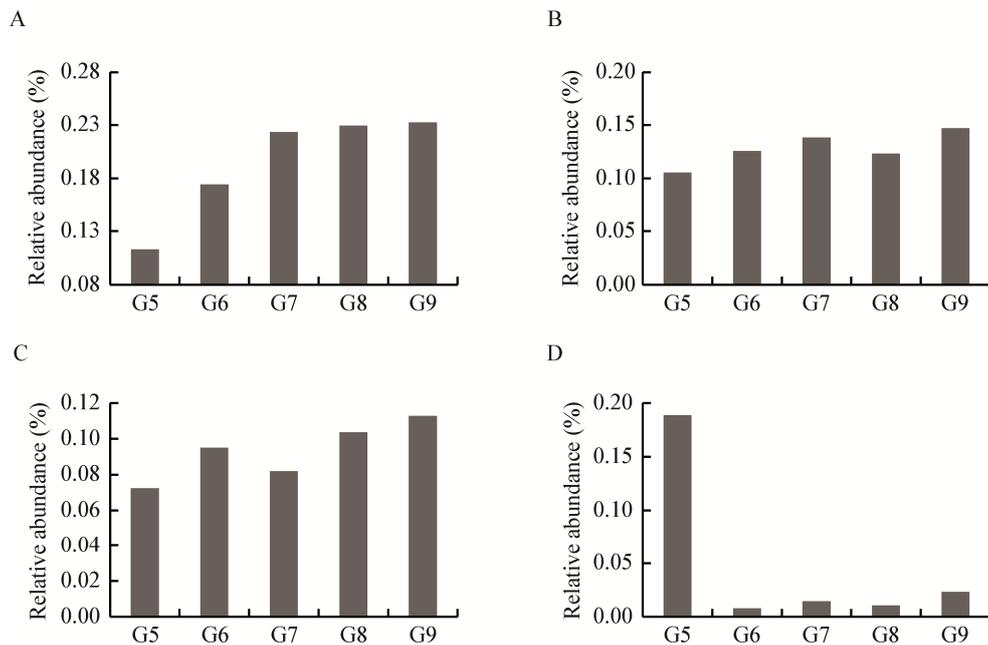


图7 菌群 SX 转接富集过程中特定种类细菌相对丰度的变化

Figure 7 Overview of community structure during the enrichment of bacteria SX

Note: A: *Arthrobacter sulfurosus*; B: Rhodospirillaceae; C: Chitinophagaceae; D: Bacillaceae.

通过菌群 SX 在属水平不同菌类群所占相对丰度与 PBAT 塑料地膜降解时间的 Pearson 相关性分析发现, 随着菌群 SX 转接富集, 硫磺色节杆菌的相对丰度变化与 PBAT 塑料地膜降解时间的延长呈负相关性, 且相关性具有统计学意义 ( $r=-0.927$ ,  $P<0.05$ ), 而芽孢杆菌的相对丰度与 PBAT 塑料地膜降解时间的延长呈正相关性且具有统计学意义 ( $r=0.983$ ,  $P<0.05$ )。红螺菌科和噬几丁质菌科的相对丰度与 PBAT 塑料地膜降解时间的延长也是呈负相关性, 但是没有统计学意义 ( $P>0.05$ )。其他菌属的相对丰度与 PBAT 塑料地膜降解时间变化情况的相关性也没有统计学意义。

由 PCoA 图(图 8)可知, PBAT 塑料地膜高效降解菌群 SX 在 5、6、7、8、9 各批次整体群落结构进行聚类分析发现, 第 5 批次和其余(第 6、7、8、9) 4 批次距离间隔较远, 表明第 5 批次与其余 4 个批次的降解菌群群落结构整体差异较大, 与它们对

PBAT 塑料地膜的降解所需时间相呼应。从第 6、7、8、9 各批次分析来看, 第 6、7、8 这 3 个批次聚集在一起, 它们的微生物群落结构非常相似, 与第 9 批次距离也略远。

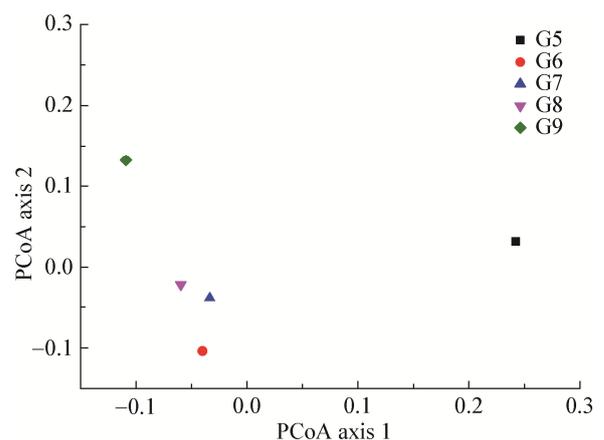


图8 转接富集过程中的菌群 SX 各个批次菌群群落结构 PCoA 分析

Figure 8 Analysis of PCoA in each enrichment of bacteria SX during transit acclimation

### 3 讨论

本研究来自山东寿光蔬菜基地大棚、福建安溪茶园、新疆 81、84 建设兵团、广州金发堆肥厂、印度尼西亚棕榈园和中国科学院天津工业生物技术研究所院内各地的环境样品中筛选 PBAT 塑料地膜降解菌, 从广州金发堆肥厂的堆肥样品中筛选到了对 PBAT 塑料地膜具有良好降解能力的菌群 SX。国内外学者曾对 PE、LDPE、HDPE 和 PVC 等不同类型塑料降解进行过单菌筛选, 或者对它们在自然环境中的降解进行了深入研究<sup>[17-20]</sup>。本研究是国内外首次发现可降解 PBAT 塑料地膜的菌群。同来自日本的科学家发现的一株艾德昂菌 (*Ideonella sakainesis*) 降解聚对苯二甲酸乙酯(PET)塑料材料相比, 本研究筛选的菌群 SX 对于 PBAT 塑料地膜具有更快的降解效率。研究者报道说, 如果温度稳定维持在 50 °C, 该艾德昂菌完全破碎一块较薄的 PET 塑料薄膜需要 6 周时间<sup>[21]</sup>。而本研究筛选的菌群 SX 经过连续 9 次的转接富集之后, 可以实现在 13 d 内完全降解 PBAT 塑料地膜。

初筛时, 菌群 SX 需要 28 d 的降解过程, PBAT 塑料地膜达到了完全崩解消失的效果。本研究对该菌群进行了连续 9 批次的转接富集, 验证了菌群 SX 的稳定降解能力, 而且发现该菌群 SX 对 PBAT 塑料地膜的降解效率随着转接富集批次的增加而增加。在本研究过程中, 我们通过前三批次 PBAT 塑料地膜降解菌群 SX 对 PBAT 塑料地膜降解效果的基础上, 继而通过第 4、第 5 批次乃至后续批次的 PBAT 塑料地膜的具体降解率的计算, 发现了第 9 批次在降解率达到 100% 的时间比第 5 批次的降解时间缩短了接近一半, 只有 13 d。通过后续不断地转接富集, 菌群 SX 对 PBAT 塑料地膜展示了更好的环境适应性和降解性。

随后, 本研究利用 MiSeq 测序技术对菌群 16S rRNA 基因进行了高通量测序分析。对比 G5-G9 不同批次的 PBAT 塑料地膜降解菌群群落结构发现, 不同富集转接时期的菌群群落结构不同, 尤其是第

5 批次和后续各批次的群落结构差异尤为显著, 这与它们对 PBAT 塑料地膜的降解时间快慢相呼应。由菌群结构热图(Heatmap) (图 4)和 PCoA (图 7)分析可知, 第 5 批次(G5)与后面 6 (G6)、7 (G7)、8 (G8)、9 (G9) 4 个批次的微生物群落结构显著不同, 在第 5 批次(G5)中门水平上, 其厚壁菌门所占相对丰度在 25%以上, 而后续几批次中厚壁菌门所占比例较低; 而放线菌门所占的相对丰度在随着转接富集过程中不断的升高。在属水平上, 芽孢杆菌的相对丰度随着转接富集呈现下降趋势, 而硫磺色节杆菌随着菌群 SX 的连续富集, 所占的比例逐渐升高, 相对丰度由 11.3%上升为 23.3%。这与菌群 SX 在第 5 批次对 PBAT 塑料地膜降解需要 28 d 而到第 9 批次只需要 13 d 时间相一致。我们通过 Pearson 相关性分析(图 7)发现, 硫磺色节杆菌相对丰度的增加和芽孢杆菌的相对丰度的降低与菌群 SX 对 PBAT 塑料地膜的降解所需时间显著缩短有关, 具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

相关研究表明, 变形菌门、放线菌门、拟杆菌门和厚壁菌门的微生物是参与一些有机质和高分子材料降解的主要物种<sup>[22-23]</sup>。在第 6、第 7、第 8 和第 9 (G9)批次水平上, 变形菌门、放线菌门、拟杆菌门和厚壁菌门在 PBAT 塑料地膜降解菌群 SX 中都是优势菌门, 在连续转接富集过程中始终保持较高的相对丰度, 占总菌群 80%以上。在种属水平上, 这些优势活性微生物中: 硫磺色节杆菌对含有苯环类化合物具有降解效果, 在芳烃降解、耐盐、产表面活性物质等方面均有报道, 在有机废弃物降解菌群中, 具有降解酚、苯酚、喹啉和咪唑等有机物的功能<sup>[24-27]</sup>。红螺菌科可产生如抗生素、拮抗蛋白、酶、絮凝剂等多种生物活性物质, 对于废水、石油和大分子烃类具有降解和修复作用<sup>[28-30]</sup>。噬几丁质菌科主要用来发酵腐熟各类有机肥, 促使土壤中的有机质分解成腐殖质, 降解纤维素和用于含有环丙沙星的废水处理<sup>[31-33]</sup>。蛭弧菌(*Bdellovibrio* sp.)能稳定分解蛋白质, 一般不直接利用碳水化合物

物, 而以肽、氨基酸作碳源和能源, 能液化明胶, 严格好氧<sup>[34-35]</sup>。短小芽孢杆菌(*Brevibacillus* sp.)可产甘露聚糖酶、淀粉酶等, 对淀粉基类材料和低密度聚乙烯具有明显的降解效果<sup>[13]</sup>, 此外还对土壤修复具有一定的作用<sup>[36-37]</sup>。芽孢杆菌类对于有机质的降解具有明显的作用<sup>[38-39]</sup>, 同时对于一些大分子材料也具有一定的降解效果<sup>[40-41]</sup>。此外, 还有其他的一些本 PBAT 塑料地膜降解菌群 SX 存在, 但是还未发现其明显功能的菌属, 它们依然对这类 PBAT 塑料地膜的降解存在积极的影响, 虽然相对丰度较低, 可能会对维持菌群的稳定具有一定作用。

在本研究中, 通过高通量测序和生物统计分析的方法, 得到的最关键研究结果是硫磺色节杆菌、红螺菌科和噬几丁质菌科在随着菌群 SX 富集过程中对 PBAT 塑料地膜降解速率提高的同时, 它们在菌群中所占相对丰度也在逐渐地升高。PBAT 塑料地膜作为一类新型的生物可降解地膜, 它是己二酸丁二醇酯和对苯二甲酸丁二醇酯的共聚物, 此共聚物最难降解部分是含苯环的大分子化合物, 而相关研究证实硫磺色节杆菌、红螺菌科和噬几丁质菌科对于该类大分子物质具有降解效果。我们推测, 硫磺色节杆菌、红螺菌科和噬几丁质菌科是菌群 SX 降解 PBAT 塑料地膜的关键核心菌株, 尤其是硫磺色节杆菌。

此外, 本实验结果还显示菌群 SX 不需要高温便可以降解 PBAT 塑料地膜。PBAT 塑料地膜如果未来被广泛地应用于农作物的覆盖过程, 其长期的积累可能会对环境构成威胁。菌群 SX 的发现可以从微生物降解的角度对环境中 PBAT 塑料地膜的降解可控性提供了一个新颖的途径和思路。该菌群 SX 被认为在常温环境中的 PBAT 塑料地膜降解或相似的废弃物处理中具有潜在的应用价值。同时, 本研究也对 PBAT 塑料地膜降解单菌、酶的分离纯化及 PBAT 塑料地膜微生物降解机制的阐明奠定了基础。然而, 该 PBAT 塑料地膜经高效菌群 SX 降解的产物、具体机制和分子基因方面仍需要后续进行更加深入细致的研究和探讨。这将是本课题组下一

步的研究重点, 以期能更好地提高和控制该菌群对 PBAT 塑料地膜的降解过程和条件, 并实现其规模化应用, 为将来 PBAT 塑料地膜的市场化应用奠定研究基础和条件。

#### 4 结论

本研究首次筛选得到 PBAT 塑料地膜高效降解微生物菌群 SX。同时, 以该菌群 SX 为研究对象, 通过连续 9 批次的转接富集, 分析和比较了该菌群 SX 各批次对 PBAT 塑料地膜降解能力、菌群群落结构在地膜降解过程中的动态演替变化特征, 揭示了菌群 SX 在降解过程中的关键微生物及群落结构演替规律, 从而为将来 PBAT 塑料地膜降解的微生物降解机制及其关键菌、酶的研究提供了资源基础。

#### REFERENCES

- [1] Liu EK, He WQ, Yan CR. 'White revolution' to 'white pollution'—agricultural plastic film mulch in China[J]. *Environmental Research Letters*, 2014, 9(9): 091001
- [2] Yan CR, Liu Q. Develop biodegradable plastic film to solve white pollution problems[J]. *Chinese Food*, 2016(17): 84-85 (in Chinese)  
严昌荣, 刘勤. 发展生物降解地膜解决白色污染问题[J]. *中国食品*, 2016(17): 84-85
- [3] Anonymous. Chinese plastic film demand growth rate of 10%[J]. *The Age of Rubber and Plastic Machinery*, 2016(4): 22-23 (in Chinese)  
佚名. 中国塑料薄膜需求增长率达 10%[J]. *橡塑机械时代*, 2016(4): 22-23
- [4] Hu QE, Li T, Ma PM, et al. Progress in the research of biodegradable mulching film[J]. *Plastics Packaging*, 2017, 27(3): 34-41 (in Chinese)  
胡琼恩, 李婷, 马丕明, 等. 生物可降解地膜的研究进展[J]. *塑料包装*, 2017, 27(3): 34-41
- [5] Yan CR, He WQ, Turner N. Plastic-film mulch in Chinese agriculture: importance and problems[J]. *World Agriculture*, 2014, 4(2): 32-36
- [6] Yu LJ, Xu L, Tang YB, et al. Synthesis and application prospect of three kinds of degradable plastic films[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2013, 41(10): 10-11 (in Chinese)  
虞利俊, 徐磊, 唐玉邦, 等. 3 种可降解地膜的合成及应用展望[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(10): 10-11
- [7] Islam NZM, Othman N, Ahmad Z, et al. Effect of pro-degradant additive on photo-oxidative aging of polypropylene film[J]. *Sains Malaysiana*, 2011, 40(7): 803-808

- [8] Nofar M, Maani A, Sojoudi H, et al. Interfacial and rheological properties of PLA/PBAT and PLA/PBSA blends and their morphological stability under shear flow[J]. *Journal of Rheology*, 2015, 59(2): 317-333
- [9] Arruda LC, Magaton M, Bretas RES, et al. Influence of chain extender on mechanical, thermal and morphological properties of blown films of PLA/PBAT blends[J]. *Polymer Testing*, 2015, 43: 27-37
- [10] Li ZJ. Present condition of application and prosperity of degradative plastic film[J]. *Environmental Science and Management*, 2006, 31(2): 56-57 (in Chinese)  
李忠杰. 可控降解地膜应用现状及发展前景[J]. *环境科学与管理*, 2006, 31(2): 56-57
- [11] Zhou CW, Zhang Y, Wu ZH. Study on degradation properties of filled PBAT composite[J]. *Plastics Science and Technology*, 2013, 41(9): 63-66 (in Chinese)  
周承伟, 张玉, 吴智华. 填充复合材料 PBAT 的降解性能研究[J]. *塑料科技*, 2013, 41(9): 63-66
- [12] Balasubramanian V, Natarajan K, Hemambika B, et al. High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51(2): 205-211
- [13] Hadad D, Geresh S, Sivan A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(5): 1093-1100
- [14] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [15] Cole JR, Wang Q, Cardenas E, et al. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S1): D141-D145
- [16] Deng WK, Wang YB, Liu ZX, et al. HemI: a toolkit for illustrating heatmaps[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111988
- [17] Nauendorf A, Krause S, Bigalke NK, et al. Microbial colonization and degradation of polyethylene and biodegradable plastic bags in temperate fine-grained organic-rich marine sediments[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 103(1/2): 168-178
- [18] de Tender C, Devriese LI, Haegeman A, et al. Temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North Sea[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(13): 7350-7360
- [19] Ali MI. Studies on biodegradation of cellulose blended polyvinyl chloride films[J]. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2009, 11(5): 577-580
- [20] Shah AA, Hasan F, Hameed A, et al. Isolation of *Fusarium* sp. AF4 from sewage sludge, with the ability to adhere the surface of polyethylene[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, 3(10): 658-663
- [21] Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)[J]. *Science*, 2016, 351(6278): 1196-1199
- [22] Kanokratana P, Mhuantong 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
- [23] Berlemont R, Martiny AC. Phylogenetic distribution of potential cellulases in Bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(5): 1545-1554
- [24] Labana S, Pandey G, Jain RK. Desulphurization of dibenzothiophene and diesel oils by bacteria[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 40(3): 159-163
- [25] Abraham WR, Wenderoth DF, Gläßer W. Diversity of biphenyl degraders in a chlorobenzene polluted aquifer[J]. *Chemosphere*, 2005, 58(4): 529-533
- [26] Aresta M, Acquaviva MI, Baruzzi F, et al. Isolation and characterization of polyphenols-degrading bacteria from olive-mill wastewaters polluted soil[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(4): 639-647
- [27] Margesin R, Moertelmaier C, Mair J. Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 84: 185-191
- [28] Mao XH. Study on the immobilization of photosynthetic bacteria (*Rhodospirillaceae*) for wastewater treatment[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Jinan University, 2009 (in Chinese)  
毛雪慧. 光合红螺菌(*Rhodospirillaceae*)固定化及其对废水处理的研究[D]. 广州: 暨南大学硕士学位论文, 2009
- [29] You XJ. Bacterial community and environmental influencing factors in rehabilitative sediment environment of Xiangshan Bay[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 (in Chinese)  
有小娟. 象山港养殖区生境修复的沉积环境细菌群落与环境影响因子的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2013
- [30] Yuan XY, Wang ML, Yang L, et al. Study on the structure of petroleum degrading bacteria in natural seawater using PCR-RFLP technology[J]. *Journal of Qingdao Technological University*, 2016, 37(4): 91-96 (in Chinese)  
原晓艳, 王明丽, 杨乐, 等. 利用 PCR-RFLP 技术研究天然海水中石油降解菌的结构[J]. *青岛理工大学学报*, 2016, 37(4): 91-96
- [31] Mena-Violante HG, Olalde-Portugal V. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs[J]. *Scientia Horticulturae*, 2007, 113(1): 103-106
- [32] Kumar A, Prakash A, Johri BN. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem[A]/Maheshwari DK. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011: 37-59
- [33] Dai Q, Liu R, Liang YT, et al. Influence of ciprofloxacin on the microbial community and antibiotics resistance genes in a

- membrane bioreactor[J]. Environmental Science, 2018, 39(3): 1333-1341 (in Chinese)
- 戴琦, 刘锐, 梁玉婷, 等. 环丙沙星对膜生物反应器中微生物群落及抗性基因的影响[J]. 环境科学, 2018, 39(3): 1333-1341
- [34] Rendulic S, Jagtap P, Rosinus A, et al. A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective[J]. Science, 2004, 303(5658): 689-692
- [35] Schwudke D, Linscheid M, Strauch E, et al. The obligate predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* possesses a neutral lipid A containing  $\alpha$ -D-Mannoses that replace phosphate residues: similarities and differences between the lipid As and the lipopolysaccharides of the wild type strain *B. bacteriovorus* HD100 and its host-independent derivative HI100[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(30): 27502-27512
- [36] Schmid A. Screening, isolation and characterization of *Brevibacillus borstelensis* for the bioremediation of carbendazim[J]. Molecular and Cellular Biology, 2014, 25(13): 5763
- [37] Arya R, Sharma AK. Bioremediation of Carbendazim, a benzimidazole fungicide using *Brevibacillus borstelensis* and *Streptomyces albogriseolus* together[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2016, 17(2): 185-189
- [38] Che XX, Li XK. The research on development of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Beijing Agriculture, 2013(3): 7-10 (in Chinese)
- 车晓曦, 李校堃. 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)的研究进展[J]. 北京农业, 2013(3): 7-10
- [39] Chu XQ, Pang GH, Fang H, et al. Isolation, identification and characteristics of a butachlor-degrading bacterium[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(1): 145-150 (in Chinese)
- 楚小强, 庞国辉, 方华, 等. 丁草胺降解菌的分离鉴定及降解特性的研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(1): 145-150
- [40] Wang WD, Yan L, Cui ZJ, et al. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(19): 9321-9324
- [41] Sakai M, Deguchi D, Hosoda A, et al. *Ammonibacillus agariperforans* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, agar-degrading bacterium isolated from compost[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(2): 570-577