



研究报告

大蜡螟和黄粉虫肠道菌中聚乙烯地膜降解细菌的筛选及其降解性能

胡亚楠¹ 贺旭¹ 亚森·沙力¹ 罗明^{*1,2} 张宇宏² 张帅¹

1 新疆农业大学农学院 新疆 乌鲁木齐 830052

2 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081

摘要:【背景】在我国农业生产中大量使用的聚乙烯(polyethylene, PE)地膜难以降解,在土壤中长期累积影响农作物生长并破坏生态环境,发掘微生物资源,寻求聚乙烯生物降解途径对治理“白色污染”具有重要意义。【目的】以不同来源的啮食塑料昆虫大蜡螟、黄粉虫为材料,从肠道菌群中分离筛选出对PE具有降解能力的细菌菌株,研究其降解农用地膜的效能。【方法】饲喂PE膜片驯化大蜡螟、黄粉虫幼虫,采集肠道液富集培养、共代谢驯化、选择培养基筛选等方法从肠道细菌中分离出以PE为唯一碳源的细菌菌株。将菌株接种到以PE膜片为唯一碳源的培养基中共培养,通过测定菌体生长量,定期检测膜片失重率,结合高分辨场发射扫描电子显微镜观察、红外扫描分析和膜片力学性能测定,评价菌株对聚乙烯地膜的降解效果。对筛选出的降解性能良好的菌株通过16S rRNA基因扩增和序列分析进行菌株鉴定。【结果】从新疆蜜蜂蜂巢中的土著大蜡螟肠道分离获得的聚乙烯降解菌菌株最多,其聚乙烯的降解效率高于其他来源的分离菌株。从中筛选出具有较高降解能力的3个菌株XJDLM-3、XJDLM-8和XJDLM-12,它们能利用PE膜片生长,扫描电镜观察经过30 d降解的PE膜片表面出现明显的侵蚀孔洞和裂痕,红外扫描图谱发生改变,拉伸强度、断裂伸长率和弹性模量等力学性能显著下降,膜片失重率分别达到了8.06%、5.66%和5.39%。从新疆蜜蜂蜂巢中的土著大蜡螟肠道分离出降解效果较好的细菌菌株,经鉴定XJDLM-8和XJDLM-12为*Bacillus cereus*,XJDLM-3为*Enterobacter bugandensis*。【结论】证明了新疆蜜蜂蜂巢中的土著大蜡螟肠道存在对PE具有较高降解能力的菌株,丰富了PE降解菌的菌种资源,在PE地膜降解中具有开发应用的潜力。

关键词: 聚乙烯, 微生物降解, 啮食塑料昆虫, 肠道细菌

Foundation items: Key Research and Development Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2018B01006-1); Special Funds for Basic Research Services of Central Public Welfare Research Institutes (Y2019XK19)

***Corresponding author:** Tel: 86-991-8763824; E-mail: luomingxjau@sina.com

Received: 08-02-2020; **Accepted:** 08-05-2020; **Published online:** 04-06-2020

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发计划(2018B01006-1); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2019XK19)

***通信作者:** Tel: 0991-8763824; E-mail: luomingxjau@sina.com

收稿日期: 2020-02-08; **接受日期:** 2020-05-08; **网络首发日期:** 2020-06-04

Screening of polyethylene film-degrading bacteria from gut microbiota of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*

HU Ya-Nan¹ HE Xu¹ YASEN-Shali¹ LUO Ming^{*1,2} ZHANG Yu-Hong²
ZHANG Shuai¹

1 College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China

2 Institute of Biotechnology Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: **[Background]** Polyethylene mulch film is widely used for agricultural production in China. Because it is very difficult to be naturally degraded in the fields, it finally accumulates in the soil and negatively affects the growth of crops and the ecological environment. Therefore, it is of great significance to explore the microbial resources for biodegradation of such “white pollution”. **[Objective]** Bacteria were isolated and screened from the intestinal flora of plastic-eating insects such as *Galleria mellonella* and *Tenebrio Molitor* from different sources, and their degradation efficiency of agricultural plastic film was characterized. **[Methods]** The larvae of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* were domesticated by polyethylene membrane, and the bacteria with polyethylene as the sole carbon source were isolated from intestinal bacteria by collecting intestinal fluid, enriching culture, co-metabolic domestication and selecting culture medium. The strain was inoculated into the medium with polyethylene membrane as the only carbon source for co-culture. The degradation effect of the strain on polyethylene mulch film was evaluated by measuring cell growth, regularly detecting the weight loss rate of the film, combined with high-resolution field emission scanning electron microscope observation, infrared scanning analysis and determination of mechanical properties of the film. The strains with good degradability were identified by 16S rRNA gene amplification and sequence analysis. **[Results]** Most polyethylene-degrading bacteria were isolated from the intestines of the indigenous *Galleria mellonella* in the honeybee hive in Xinjiang, and the degradation efficiency of polyethylene was higher than that of the isolates from other sources. Three strains XJDLM-3, XJDLM-8 and XJDLM-12, with high degradation ability were selected to grow using polyethylene membrane. Scanning electron microscope observation showed that obvious erosion holes and cracks appeared on the surface of degraded polyethylene film after 30 days, and the infrared scanning pattern changed. The mechanical properties such as tensile strength, elongation at break and elastic modulus decreased significantly, and the weight loss rate of polyethylene diaphragm reached 8.06%, 5.66% and 5.39%, respectively. A bacterial strain with good degradation effect was isolated from the intestines of the native *Galleria mellonella* in the honeybee hive in Xinjiang. XJDLM-8 and XJDLM-12 were identified as *Bacillus cereus*, XJDLM-3 and *Enterobacter bugandensis*. **[Conclusion]** Strains were isolated with high ability to degrade polyethylene in the intestines of the native *Galleria mellonella* in the honeybee hive in Xinjiang, to provide the potential of development and application in the degradation of polyethylene mulch film.

Keywords: Polyethylene, Microbial degradation, Plastic-eating insects, Gut microbiota

在我国农业生产中,以聚乙烯(polyethylene, PE)为主要成分的塑料地膜已经广泛应用 40 多年,其产量和用量均居世界首位。地膜覆盖技术带来了农业生产方式的改变和生产力的飞跃,在西部干旱、半干旱和山区冷凉的气候条件下,地膜的保墒增温作用尤为显著,促进了农业的增产增效,但同时也带来了严重的环境污染问题^[1]。聚乙烯是线性

的饱和碳氢化合物,具有高分子量、表面活化能低、强疏水性以及缺乏被微生物酶系统所利用的功能团等特征,在自然环境中的降解速度非常缓慢,在土壤中可稳定存在 200–400 年^[2]。据调查,随着覆膜年限的增加,每年残存在田间的地膜占使用总量的 20%–40%以上,连续多年覆膜种植区土壤中地膜累积残留量高达 32–38 kg/667 m²;地膜残留物密

布土壤整个耕作层,破坏了农田生态环境和土壤结构,造成农作物烂种、烂芽、缺苗断垅及根系坏死,对作物生长发育造成了“负面效应”,棉花、小麦、玉米等十多种作物减产达 10%–22%,地膜残留量越多对农作物产量的影响就越大^[3]。为了减缓残留地膜对农作物的不良影响,将聚乙烯与促氧化剂或淀粉、脂肪酸、纤维素等掺混后加工的可降解膜是当前新型农用地膜的研发方向。虽然其中的添加剂能有效降解,但含有的大量聚乙烯碎片仍释放到环境中,不能从根本上解决地膜造成的环境污染问题^[4]。因此,探索有效的途径解决地膜残膜的“白色污染”问题已成为我国农业生产和环境保护的当务之急。

近年来,国内外在利用微生物降解塑料的研究领域有了一定的进展。Kathiresan 等从红树林土壤中分离出的聚乙烯塑料降解微生物,其中效率较高的细菌是 *Pseudomonas* sp. 和 *Moraxella* sp.^[5]。美国斯坦福大学和北京航空航天大学的研究人员发现黄粉虫(*Tenebrio molitor*)的肠道微生物能够降解聚苯乙烯(polystyrene, PS)塑料,并从中筛选鉴定了多株与此相关的菌株^[6]。Harshvardhan 等筛选出可高效降解低密度聚乙烯的细菌^[7]。Abrusci 等研究人员分离出的 3 株细菌在以钙铁离子作为氧化助剂的情况下,可有效地降解农用地膜^[8]。随着研究逐步深入,通过微生物降解聚乙烯的潜力越来越受到人们的关注,生物降解策略极有可能成为减少农业“白色污染”的有效途径之一。

本研究以啮食塑料的昆虫大蜡螟、黄粉虫为材料,分离其肠道细菌,通过人工驯化、共代谢富集、选择培养等手段筛选出对聚乙烯地膜具有较强降解能力的功能菌株,验证其降解性能,为研制高效降解菌剂加速农用地膜残膜降解、减少“白色污染”、推进现代绿色农业发展提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 聚乙烯材料

聚乙烯地膜膜片为常规农用聚乙烯地膜,重均

分子量>20 000,厚度为 0.008 mm,购自乌鲁木齐市农资市场;聚乙烯粉末重均分子量>400 000,由中国农业科学院生物技术研究所提供。

1.2 降解菌分离材料

黄粉虫(*Tenebrio molitor*),新疆农业大学农学院昆虫实验室采用餐厨垃圾人工饲养的 3–5 龄幼虫。大蜡螟(*Galleria mellonella*)的来源:购买自四川省成都市某昆虫饲料公司,人工饲养 3–5 龄幼虫,简称饲料大蜡螟;来自国外波兰引进大蜡螟;采集自新疆本地人工养殖蜜蜂的蜂巢,为蜜蜂饲养害虫,简称土著大蜡螟。

1.3 培养基、主要试剂和仪器

富集培养基 A (g/L): 酵母膏 10.0, K₂HPO₄ 0.7, KH₂PO₄ 0.7, MgSO₄·7H₂O 0.7, NH₄NO₃ 1.0, NaCl 0.005, FeSO₄·7H₂O 0.002, ZnSO₄·7H₂O 0.002, MnSO₄·H₂O 0.001, pH 7.2。

富集培养基 B (g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 3.0, 酵母膏 5.0, K₂HPO₄ 0.7, KH₂PO₄ 0.7, MgSO₄·7H₂O 0.7, NH₄NO₃ 1.0, NaCl 0.005, FeSO₄·7H₂O 0.002, ZnSO₄·7H₂O 0.002, MnSO₄·H₂O 0.001, pH 7.2^[9]。

基础无机盐培养基 (g/L): K₂HPO₄ 0.7, CaCl₂·2H₂O 0.7, KCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.7, NH₄NO₃ 1.0, NaCl 0.005, ZnSO₄·7H₂O 0.002, MnSO₄·H₂O 0.001, pH 7.0–7.2。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 10.0, 氯化钠 5.0, pH 7.0^[10]。

实验主要试剂为化学纯,国药集团药业股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。紫外分光光度计,岛津公司;场发射扫描电镜,日立公司;傅里叶红外光谱仪,深圳市鸿永精仪科技有限公司;微机控制电子万能试验机,济南美特斯测试技术有限公司。

1.4 昆虫肠道菌富集培养

1.4.1 聚乙烯材料预处理

聚乙烯粉末灭菌:将聚乙烯粉末放置于无菌干燥的培养皿中,平铺成薄层,在紫外灯下照射 3 h,

每间隔 0.5 h 翻动一次^[11]。

聚乙烯地膜膜的灭菌：将聚乙烯地膜统一剪成 4.0×4.0 cm 大小的膜片。用 0.5% KCl 溶液浸泡 1 h，再用 100% 无水乙醇清洗 3–4 次，最后无菌水润洗，放入干燥无菌的培养皿中烘干后在紫外灯下照射灭菌 4 h^[11]。

1.4.2 昆虫啮食聚乙烯驯化和肠道液菌群富集培养

将不同来源大蜡螟、黄粉虫幼虫放入饲养盒中，饥饿 2 d 后，加入剪碎的聚乙烯膜片饲喂驯化 10 d。将饲喂驯化后的虫体分别放入乙醚溶液中浸泡 10 s，取出放入 0.1% 升汞溶液浸泡 2 min，再放入 100% 无水乙醇浸泡 10 s，最后移入无菌水中洗涤 2–3 次进行表面灭菌处理^[12]。

将经表面灭菌的黄粉虫、大蜡螟放置在解剖镜下，用解剖刀划破虫体，从中挑出肠道放入研钵中，加入 1–3 mL 无菌水充分研磨。吸取 0.5 mL 的肠道液分别加到装有 50 mL 富集培养基 A 和富集培养基 B 的 250 mL 三角瓶中，置于恒温振荡器中 30 °C、160 r/min 富集培养 3 d。在基础无碳源无机盐培养液(装液量 100 mL/300 mL 三角瓶)中加入已经预处理的 PE 粉末，将昆虫肠道菌富集培养液 5 mL 加入其中，在 30 °C、160 r/min 下驯化共培养 10 d，以后每 10 d 按 5% 的接种量取前一次培养液接入以 PE 为唯一碳源的新鲜液体培养基中再进行驯化，共培养 2 次。

1.5 聚乙烯降解细菌的分离筛选

在基础无机盐培养基中加入灭菌处理的聚乙烯粉末，加入量为 10 g/L，制备以聚乙烯为唯一碳源的培养基平板。分别在平板表面涂布大蜡螟、黄粉虫肠道菌驯化培养液 0.5 mL，每个样品做 5 个平行平板，30 °C 恒温培养箱培养 5–7 d。根据菌落出现的时间、形态、大小和颜色等，挑取能在以聚乙烯粉末为唯一碳源的基础培养基中生长的菌株，在该培养基上反复多次划线分离、纯化，获得单菌落，4 °C 保存备用。

1.6 降解菌株对聚乙烯地膜降解性能的测定

1.6.1 降解菌株的生长量

将聚乙烯地膜膜片编号并精确称取初始重量，灭菌后加入基础无机盐液体培养基中，三角瓶装液量为 50 mL/250 mL。将筛选出的以聚乙烯为唯一碳源生长的降解菌株按 5% 接种量接种到加有聚乙烯膜片的基础无机盐培养液中，30 °C、160 r/min 恒温摇床振荡培养，每个菌株做 5 个平行，重复 3 次。采用紫外分光光度计分别测定 5、10、20、30 d 基础无机盐培养液的 OD_{600} 值，作为接种降解菌的生长量指标。

1.6.2 接种菌株对聚乙烯地膜的失重率

从经过接种菌株处理后 5、10、20、30 d 的共培养液中取出聚乙烯膜片，用 2% SDS 溶液浸泡 4 h，再用无菌水反复清洗多次以去除膜片表面附着的细菌，40 °C 烘干后，利用万分之一天平称取其重量。计算膜片在培养过程中的失重率：

地膜膜片失重率(%)=

$$\frac{\text{接菌处理前膜片质量} - \text{接菌处理后膜片质量}}{\text{接菌处理前膜片质量}} \times 100^{[11]}。$$

1.6.3 接种菌株降解 PE 膜片的表面微观形态和化学官能团的变化

将 1.6.2 中接菌共培养 30 d 的聚乙烯膜片取出，固定喷金后，利用场发射扫描电镜(型号 S-570)观察聚乙烯膜片表面形态的微观变化。以没有接种降解菌株、在基础无机盐液体培养基中摇瓶培养 30 d 的聚乙烯膜片为对照。

采用傅里叶红外光谱仪测定聚乙烯膜片的表面化学官能团变化。扫描波长范围为 1 000–3 500 cm^{-1} ，分辨率为 4.0 cm^{-1} ，扫描次数 100 次。

1.6.4 聚乙烯膜片降解的力学性能

采用型微机控制电子万能试验机测定接菌处理 30 d 后的聚乙烯膜片的拉伸强度、断裂伸长率和弹性模量等力学性能。测定方法按 GB/T1040.3-2006 标准执行，拉伸速度为 50 mm/min。

1.7 聚乙烯降解细菌菌株的鉴定

1.7.1 形态学观察和生理生化特性测定

主要参照《常见细菌系统鉴定手册》^[13]和《微生物学实验》^[10], 对筛选出的 PE 降解菌株进行菌落特征、菌体细胞形态、芽孢的有无和形状及着生位置观察, 革兰氏染色; 测定部分生理生化特性。

1.7.2 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析

聚乙烯降解菌株在 LB 液体培养基中 28 °C、160 r/min 培养至 OD_{600} 值约 0.8–1.0, 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌液总 DNA 进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。引物为细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 1492R (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'), 目标片段大小 1 500 bp。PCR 反应体系(25 μ L): *Taq* DNA Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 7 min, 4 °C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。测序结果用 BLAST 程序与 GenBank 中的序列进行核苷酸同源性比对, 从中选取相似性较高的已知菌株序列, 利用 MEGA 7.0 软件邻接法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 以聚乙烯(PE)为唯一碳源的昆虫肠道细菌的分离

将大蜡螟、黄粉虫的肠道液分别经富集培养基培养后获得的肠道菌富集培养液, 在添加聚乙烯粉末的基础无机盐培养液中反复驯化培养后, 涂布在以聚乙烯为唯一碳源的基础无机盐培养基上培养, 7–10 d 左右在平板上聚乙烯粉末周围出现小的菌落。选取不同形态、大小、颜色、表面光滑的菌落在该基础无机盐固体培养基上反复划线转接, 确定均能生长良好的菌株再进一步纯化, 共获得 24 个细菌菌株(表 1), 作为聚乙烯降解菌的初筛备选菌株。其中分离自新疆蜂巢土著大蜡螟的菌株 12 个,

表 1 以聚乙烯为唯一碳源的昆虫肠道细菌菌株的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of the isolated bacterial strains with polyethylene as sole carbon source from the insects gut microbiota

菌株 Strain	菌落形态 Morphology	边缘 Edge	G 染色 Gram staining
HFC-1	Circle, White	Wavy	G ⁺
HFC-2	Oval, White	Wavy	G ⁺
HFC-3	Circle, White	Serrated	G ⁺
HFC-4	Circle, White	Wavy	G ⁺
DLM-1	Circle, Off-white	Serrated	G ⁺
DLM-2	Circle, Off-white	Serrated	G ⁺
DLM-3	Circle, Off-white	Serrated	G ⁻
DLM-4	Circle, Milky	Serrated	G ⁻
XJDLM-1	Circle, Off-white	Wavy	G ⁺
XJDLM-2	Circle, Milky	Wavy	G ⁻
XJDLM-3	Circle, Light yellow	Regular	G ⁻
XJDLM-4	Circle, Light yellow	Serrated	G ⁻
XJDLM-5	Oval, Off-white	Serrated	G ⁺
XJDLM-6	Circle, Light yellow	Wavy	G ⁺
XJDLM-7	Circle, Off-white	Serrated	G ⁻
XJDLM-8	Oval, Light yellow	Regular	G ⁺
XJDLM-9	Oval, Light yellow	Wavy	G ⁺
XJDLM-10	Oval, Light yellow	Regular	G ⁺
XJDLM-11	Circle, Light yellow	Regular	G ⁺
XJDLM-12	Oval, Light yellow	Regular	G ⁺
BLDLM-1	Circle, Light yellow	Wavy	G ⁺
BLDLM-2	Circle, Light yellow	Serrated	G ⁻
BLDLM-3	Circle, Light yellow	Wavy	G ⁻
BLDLM-4	Circle, Light yellow	Serrated	G ⁻

注: HFC: 人工饲养黄粉虫; DLM: 人工饲养大蜡螟; XJDLM: 新疆蜂巢土著大蜡螟; BLDLM: 波兰引进的大蜡螟。

Note: HFC: *Tenebrio molitor* reared artificially; DLM: *Galleria mellonella* reared artificially; XJDLM: *Galleria mellonella* from beekeeping honeycomb in Xinjiang; BLDLM: *Galleria mellonella* introduced from Poland.

分离自黄粉虫的菌株 4 个, 分离自饲料大蜡螟的菌株 4 个, 分离自波兰大蜡螟的菌株 4 个。

2.2 聚乙烯降解菌的筛选

将分离获得的以聚乙烯为唯一碳源的昆虫肠道细菌菌株分别与加入定量聚乙烯膜片的基础培养液中共培养 5 d, 测定聚乙烯膜片的失重率, 初步比较各菌株的降解能力, 结果见表 2。不同菌株对聚乙烯膜片降解的失重率差异明显, 在 0.35%–1.80% 之间, 其中有 9 个菌株的降解失重率大于 1%, 从中筛选出表现较优的 XJDLM-3、XJDLM-8、XJDLM-12 菌株做进一步测定。

表 2 聚乙烯降解菌株的初筛结果

Table 2 The results of preliminary screening for polyethylene degrading bacterial strains

菌株 Strain	失重率 Weight loss rate (%)
HFC-1	0.68±0.02
HFC-2	1.58±0.11
HFC-3	1.06±0.24
HFC-4	0.35±0.12
DLM-1	1.24±0.16
DLM-2	1.15±0.15
DLM-3	0.75±0.25
DLM-4	0.98±0.11
XJDLM-2	0.35±0.12
XJDLM-3	1.68±0.22
XJDLM-4	0.84±0.25
XJDLM-5	0.52±0.09
XJDLM-6	0.86±0.27
XJDLM-7	0.64±0.12
XJDLM-8	1.77±0.11
XJDLM-9	0.84±0.11
XJDLM-10	0.68±0.18
XJDLM-11	1.10±0.31
XJDLM-12	1.80±0.16
BLDLM-1	1.12±0.20
BLDLM-3	0.41±0.07

2.3 聚乙烯降解菌株对 PE 膜片的降解性能

2.3.1 降解菌株的生长量和对聚乙烯降解的失重率

将初筛选出聚乙烯失重率较高的 XJDLM-3、XJDLM-8、XJDLM-12 接种到以聚乙烯膜片为唯一碳源的培养液中共培养, 分别测定 5、10、20 和 30 d 不同培养时间菌株的生长量, 聚乙烯膜片降解的失重率变化(图 1)及不同处理间的显著性差异(表 3)。结果显示, XJDLM-8、XJDLM-3、XJDLM-12 3 个菌株能利用聚乙烯膜片作为唯一碳源生长, 随着共培养时间的延长, 培养液变浑浊, 30 d 后 OD_{600} 值达 0.56、0.46 和 0.49, 聚乙烯膜片被逐渐降解, 失重率分别为 8.06%、5.66% 和 5.39%, 菌株生长量与聚乙烯的失重率呈正相关。其中 XJDLM-8 菌株的生长和对聚乙烯的降解效果最佳。

2.3.2 降解菌株对聚乙烯膜片表面微观形态和化学官能团的影响

通过场发射扫描电子显微镜观察接菌共培养

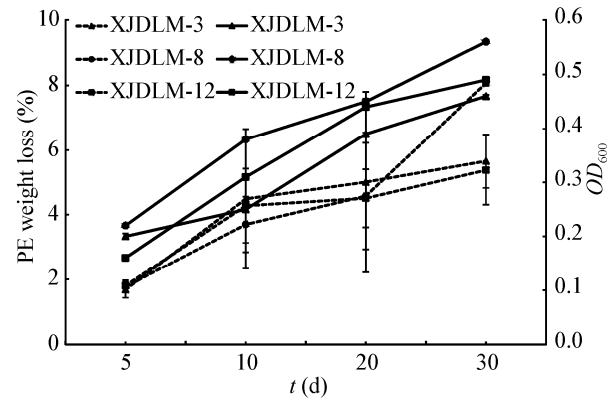


图 1 筛选菌株的生长量和降解 PE 膜片的失重率

Figure 1 The OD_{600} value and weight loss rate of PE film treated with the isolated bacteria strains

表 3 筛选菌株对降解 PE 膜片的失重率

Table 3 Weight loss rate of PE film treated with the isolated bacteria strains

菌株 Strain	5 d (%)	10 d (%)	20 d (%)	30 d (%)
XJDLM-3	1.682±0.25a	4.494±2.16b	5.012±2.79c	5.658±0.83d
XJDLM-8	1.766±0.12a	3.702±0.86b	4.578±1.65c	8.064±0.08e
XJDLM-12	1.802±0.17a	4.276±1.15b	4.508±0.9c	5.386±1.07d

注: 不同小写字母表示处理间存在显著性差异($P<0.05$)。

Note: Different lowercase indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).

30 d 后聚乙烯膜片表面微观形态的变化。由图 2 可见, 接种 XJDLM-3、XJDLM-8、XJDLM-12 菌株共培养 30 d 的聚乙烯膜片表面均变得粗糙不平, 出现明显的侵蚀孔洞和清晰的裂痕, 而未接菌的对照组膜片表面则光滑完整, 无任何变化。

傅里叶红外光谱仪的检测显示(图 3), 接菌处理后的聚乙烯膜片与对照相比, 傅氏转换红外线光谱分析仪(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)出现一些波长峰的消减, 消失的振动峰主要有 1305 cm^{-1} 、 1633 cm^{-1} ; 2900 cm^{-1} 的振动峰有明显削弱和位置偏移, 其中 C-H 伸缩振动峰在 2900 cm^{-1} 处削弱, 1740 cm^{-1} 处酯羰基指数降低。聚乙烯是一种线性饱和碳氢化合物, C-H 伸缩振动峰与酯羰基指数的变化间接说明降解菌株已在攻击利用聚乙烯而导致 C-H 减弱, 表明接种菌株使聚乙烯膜发生了生物降解, 导致其表面的化学功能团发生了变化。

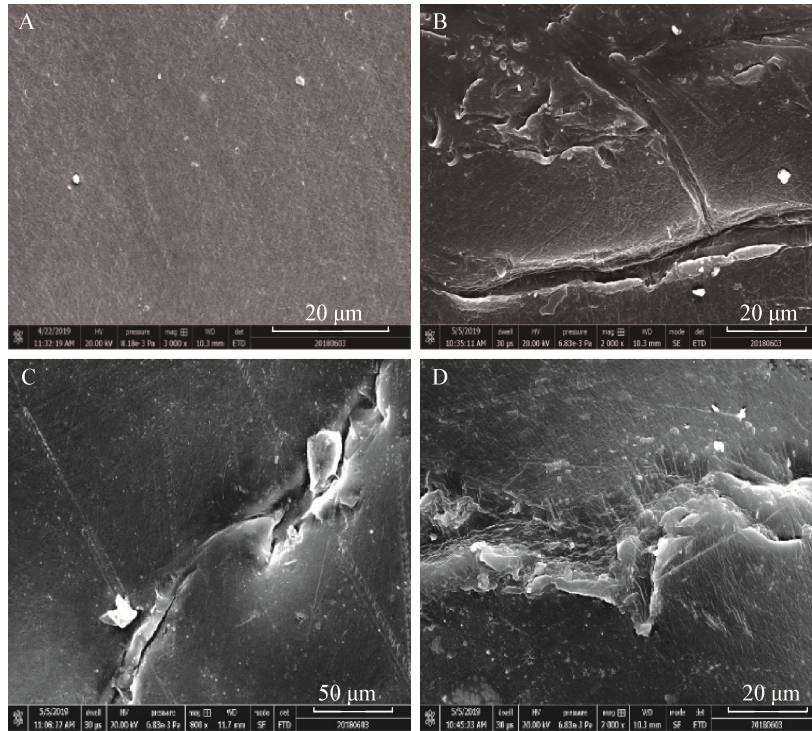


图2 接种降解菌株 30 d 后聚乙烯膜片在扫描电镜下的表面形态特征

Figure 2 Surface morphological characteristics of PE film under scanning electron microscope after degradation for 30 days by strain XJDLM-3, XJDLM-8, and XJDLM-12

注: A: 空白对照; B: XJDLM-3; C: XJDLM-8; D: XJDLM-12.

Note: A: Control; B: Treated by XJDLM-3 strain; C: Treated by XJDLM-8 strain; D: Treated by XJDLM-12 strain.

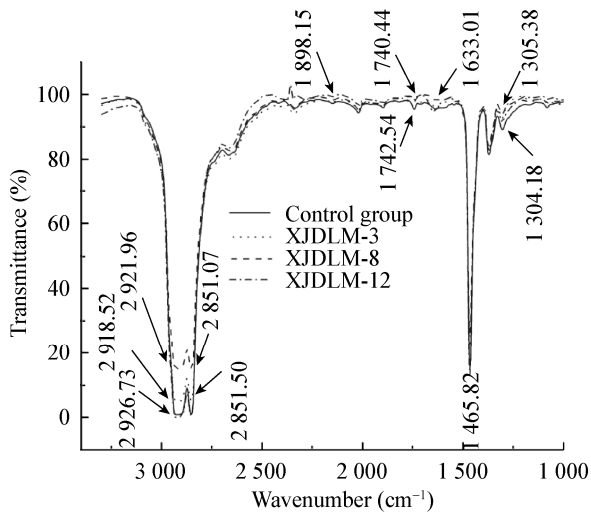


图3 聚乙烯降解菌接种 30 d 后 PE 膜片的红外图谱

Figure 3 FTIR spectrogram of PE film inoculated with strains XJDLM-3, XJDLM-8 and XJDLM-12 for 30 days

2.3.3 降解菌株对 PE 膜片力学性能的影响

接种降解菌株对聚乙烯膜片力学性能的影响测定结果表明(表 4), 经过 30 d 降解, 聚乙烯膜片拉伸强度、断裂伸长率和弹性模量相比对照明显下降, 说明降解菌减小了聚乙烯膜片中的分子间作用力, 使其韧性和抵抗弹性变形能力降低、力学性能下降, 证明其对聚乙烯膜片有明显降解作用。

2.4 聚乙烯降解菌株的鉴定

XJDLM-8、XJDLM-12 在 LB 培养基上菌落均为近椭圆形, 呈淡黄色, 表面干燥有褶皱, 边缘整齐; G^+ , 产芽孢, 芽孢中央位, 孢囊无明显膨大。XJDLM-3 菌株在 LB 培养基上菌落均为近圆形, 呈淡黄色, 表面光滑湿润, 边缘整齐; G^- , 无芽孢。

XJDLM-3、XJDLM-8 和 XJDLM-12 菌株的主要生理生化特征见表 5。XJDLM-3 菌株生理生化特性的测定结果符合 *Enterobacter* 的特征, 与

表 4 聚乙烯降解菌接种 30 d 后 PE 膜片的断裂伸长率、拉伸强度和弹性模量

Table 4 Elongation at break, tensile strength and elastic modulus of PE film between the inoculated with the degrading bacteria for 30 days

菌株	断裂伸长率	拉伸强度	弹性模量
Strain	Elongation at break (%)	Tensile strength (MPa)	Elastic modulus (MPa)
XJDLM-3	84.00±4.00	101.70±2.09	12.19±1.04
XJDLM-8	100.50±2.95	66.70±2.52	11.58±1.25
XJDLM-12	108.00±3.39	89.60±2.42	11.51±2.17
Control	342.50±5.51	228.50±3.97	17.42±1.63

表 5 生理生化测定结果

Table 5 The characteristics of physiology and biochemistry

理化特征	<i>Enterobacter bugandensis</i>	XJDLM-3	<i>Bacillus cereus</i>	XJDLM-8	XJDLM-12
Characteristics					
接触酶 Catalase	-	-	+	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-	+	+	+
尿酶 Urease	-	-	ND	ND	ND
甲基红 Methyl red	-	-	+	+	+
吲哚 Indole test	-	-	+	-	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	-	-	-	-
V-P 测定 V-P test	+	+	+	+	+
酪素分解 Casein decomposition	-	-	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction test	ND	+	+	+	+
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	-	-	+	+	+
D-葡萄糖产酸 D-glucose acid yield	+	+	+	+	+
D-山梨醇 D-Sorbitol	+	-	-	-	-
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	+	+	+	+
明胶液化 Glutin hydrolysis	+	+	+	+	+
H ₂ S 产生 H ₂ S test	-	-	-	-	-
蜜二糖 Honey disaccharide	+	+	-	-	-
乳糖 Lactose	+	+	-	-	-
D-木糖 D-xylose	+	+	-	-	-
L-鼠李糖 L-rhamnose	+	+	-	-	-
L-阿拉伯 L-arabinose	+	+	-	-	-

注: +: 阳性; -: 阴性; ND: 未测定.

Note: +: Positive; -: Negative; ND: Not detected.

Enterobacter bugandensis 的模式种比较, 除对山梨醇的利用不同外, 其余特征相同。XJDLM-8 和 XJDLM-12 菌株生理生化特性的测定结果符合 *Bacillus* 的特征, 与 *Bacillus cereus* 的模式种总体相同, 但在吲哚试验上有区别, 可能与分离自不同环境有关。

以提取的菌株总 DNA 为模板进行 16S rRNA 基

因 PCR 扩增、测序, XJDLM-3、XJDLM-8 和 XJDLM-12 分别获得 1 409、1 419 和 1 420 bp 的 PCR 扩增片段, GenBank 登录号分别为 MN658841、MT039464 和 MT039482。构建的系统发育树见图 4。结果显示, XJDLM-8 与 XJDLM-12 菌株均与 *Bacillus cereus* 聚在一个进化发育分支中, 与模式菌株 *Bacillus cereus* ATCC 14579 (NR074540) 的序列相似性最高达到了

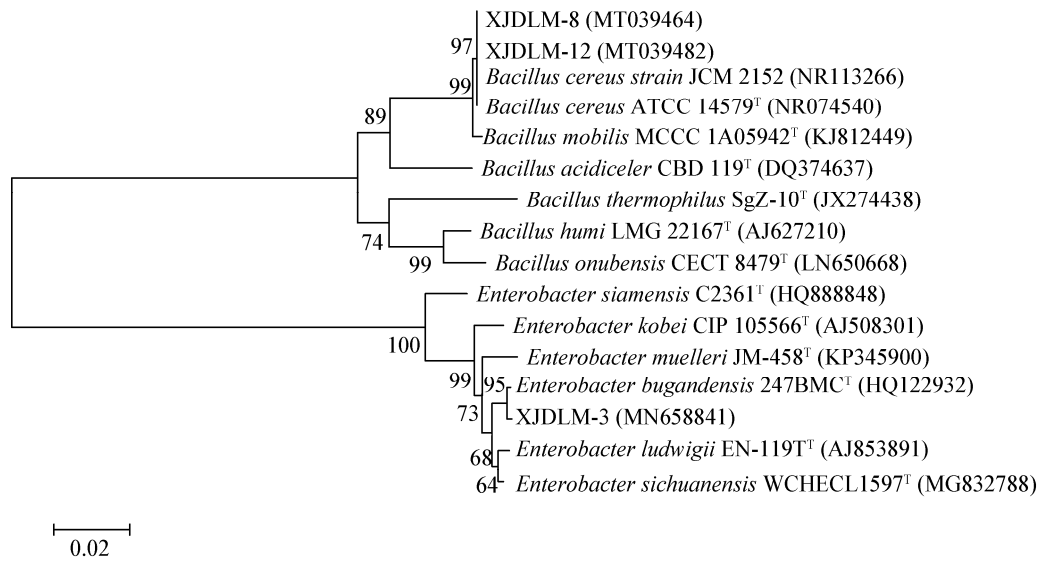


图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建的 3 个聚乙烯降解菌株的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of three polyethylene-degrading strains based on 16S rRNA gene sequence

注: 利用 MEGA 7.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树; 括号中为菌株登录号; 节点上的数值是自展值(%); 刻度 0.02 代表序列差异度。

Note: The tree was reconstructed by the Neighbor-Joining method using the MEGA 7.0 software; Accession numbers of the bacterial isolates are shown in brackets; The numbers at the branch nodes are boot strap values (%); The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide position.

99% 以上。XJDLM-3 菌株与 *Enterobacter bugandensis* 位于同一个系统发育分支中, 与模式菌株 *Enterobacter bugandensis* 247BMC (HQ122932) 菌株的序列相似性达 99%。结合形态学特征、生理生化特性和系统发育分析结果, 将 XJDLM-8 和 XJDLM-12 菌株鉴定为 *Bacillus cereus*, 将 XJDLM-3 菌株鉴定为 *Enterobacter bugandensis*。

3 讨论与结论

发掘微生物资源、寻求安全经济的塑料生物降解途径是人类面临的选择和难题。利用微生物降解聚乙烯塑料的研究始于 20 世纪 70 年代, 但一直报道极少, 研究进展缓慢。直到近年来才有了一些推进, 国内外研究者陆续从农田土壤、废弃地膜、垃圾填埋场、污泥和海洋等环境中分离筛选出对 PE 具有潜在降解能力的菌株, 主要有真菌和细菌, 真菌包括筒青霉(*Penicillium simplicissimum* YK)、腐皮镰孢霉菌(*Fusarium solani*)^[14]和黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[15], 细菌包括阿氏肠杆菌(*Enterobacter*

asburiae)^[16]、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、葡萄球菌属的(*Stenotrophomonas*)^[17]、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)^[18]和紫红红球菌(*Rhodococcus rhodochrous*)^[19]等, 还有链霉菌属(*Streptomyces*)^[20]等少数放线菌。近期, 发现一些昆虫具有啃食并降解 PE 塑料的功能得到了人们广泛的关注, 并取得了积极的研究成果。杨军团团队发现印度谷螟幼虫 (*Plodia interpunctella* Hübner) 可以咀嚼并进食 PE 塑料薄膜, 从其肠道内分离出 2 株具有 PE 降解能力的细菌, 阿氏肠杆菌 YT1 和芽孢杆菌 YP1^[16]。Ren 等从蜡蛾 (*Galleria mellonella*) 的肠道中分离出的 *Enterobacter* sp. D1 菌株, 接种 14 d 后在 PE 膜周围形成菌落, 膜的表面检测到凹陷和裂缝, FTIR 显示发生了氧化反应^[21]。Pererva 对仅饲喂聚乙烯的蜡螟幼虫肠道群落结构的分析结果表明, 取食聚乙烯塑料的蜡螟肠道中的主要细菌是 *Serratia*、*Bacillus* 和 *Pseudomonas* 属等, 推测它们是降解聚乙烯的优势菌^[22]。本研究以不同来源的大蜡螟、黄粉虫为材料, 通过饲喂聚乙烯膜片驯化, 采集肠道液富集培养、

共代谢培养、选择培养基筛选等手段从肠道细菌中分离出了以聚乙烯地膜为唯一碳源的细菌菌株,进一步通过降解试验筛选获得了3株对聚乙烯地膜具有较高降解性能的菌株。研究结果再次证实了啮食塑料昆虫的肠道内存在聚乙烯降解细菌,为聚乙烯的生物降解菌的发掘提供了一条新途径。昆虫作为世界上能适应各种生境、分布最为广泛的动物,其肠道微生物在与昆虫宿主长期共进化的过程中形成了极为复杂多样的种群结构和生物学功能,是蕴含着丰富菌种和基因的资源宝库^[23],从其中发掘和利用具有特定生物学功能的关键微生物,研究其功能机制,具有重要的理论和实践价值。

微生物对聚乙烯降解过程的改变主要通过测定聚乙烯膜的失重率、膜片的表面形态、分子官能团、相对分子量变化、亲/疏水性、结晶度、机械性能等作为评价其降解性能的指标和技术方法^[24]。Yang 等从印度谷螟幼虫中分离获得降解菌株 YT1 和 YP1 的悬浮培养物在 60 d 内对聚乙烯膜的降解率分别达到 6.1%±0.3%和 10.7%±0.2%^[16]。Auta 等从马来西亚半岛的红树林沉积物中分离出蜡状芽孢杆菌和戈特泰利芽孢杆菌 40 d 对 PE 微颗粒的降解率分别为 1.6%和 6.2%^[25]。Harshvardhan 等分离的海洋细菌短小芽孢杆菌 M27 和枯草芽孢杆菌 H1584,与低密度聚乙烯孵育 30 d 后降解率达 1.5%和 1.75%^[7]。本研究从新疆蜜蜂蜂巢中的土著大蜡螟肠道分离筛选出的 *Bacillus cereus* XJDLM-8、*Bacillus cereus* XJDLM-12 和 *Enterobacter bugandensis* XJDLM-3 菌株,在以 PE 膜片为唯一碳源的基础无机盐培养基的寡营养条件下,共培养 30 d 可使 PE 膜片的失重率分别达到 8.06%、5.66%和 5.39%,相比已报道的菌株具有较高的降解效率,丰富了 PE 降解菌的菌种资源。微生物作用于聚乙烯后,可通过以上指标与技术方法评价聚乙烯的降解性能,证明聚乙烯发生降解。从印度马纳尔湾的废弃物垃圾场中分离出的聚乙烯降解细菌持续接触高密度聚乙烯(high density polyethylene, HDPE)膜表面一段时间后,通过 FTIR 分析发现膜片表面化学功

能团中的羰基键指数和乙烯基指数均有增加,聚乙烯分子的结晶度和平均分子量变化,导致力学性能的改变^[26]。Nowak 等发现经降解菌 225 d 孵育后,聚乙烯延伸率和拉力都有所减小,膜表面产生孔洞和裂痕^[27]。Sudhakar 等接种球形芽孢杆菌处理低密度聚乙烯(low density polyethylene, LDPE)和高密度聚乙烯(HDPE),其拉伸强度、结晶度都发生下降,用原子力显微镜观察显示膜片表面出现缺损,变得凹凸不平^[28]。本研究采用场发射扫描电镜观测了接种 XJDLM-3、XJDLM-8、XJDLM-12 菌株共培养 30 d 的聚乙烯膜片表面的微观形态,发现膜片表面变得粗糙不平,出现明显的侵蚀孔洞和清晰的龟裂。FTIR 检测显示接菌处理后的聚乙烯膜片化学功能团中 C-H 伸缩振动峰削弱,酯羰基指数降低,说明降解菌株利用聚乙烯而导致 C-H 减弱。接种降解菌株对聚乙烯膜片力学性能影响的测定结果显示聚乙烯膜片拉伸强度、断裂伸长率和弹性模量都较对照明显下降,说明降解菌减小了聚乙烯膜片中分子间作用力。这些结果验证了前人的研究结果,为分离菌株降解聚乙烯提供了充分的证据。

本研究发现,以人工饲养的黄粉虫、大蜡螟和新疆蜜蜂蜂巢中的土著大蜡螟及波兰引进的大蜡螟等不同来源的昆虫为分离材料,从其肠道中分离获得的聚乙烯降解菌的数量和降解性能都有较大差异。从新疆蜜蜂蜂巢中的土著大蜡螟肠道分离获得的聚乙烯降解菌菌株最多,其聚乙烯的降解效率高于其他来源的分离菌株。大蜡螟是养蜂业的重要害虫,幼虫取食蜜蜂巢脾,钻蛀隧道、蛀坏蜂具,造成蜜蜂的幼虫和蛹死亡^[29]。蜂巢中的土著大蜡螟长期以蜂蜡为食,而蜂蜡是由高度多样化的脂质化合物混合组成,最常见的键是 $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ^[30],其化学结构与 PE 高度相似,进而形成了对 PE 具有分解利用功能的肠道微生物种群。人工饲养的大蜡螟、黄粉虫由于饲喂食料、培养条件等因素的选择,其肠道微生物的种群结构可能与野生种群之间存在明显差异。

已有的研究已证实了微生物在聚乙烯降解过程中发挥重要作用, 聚乙烯生物降解具备的良好应用前景及环境优势已初现端倪, 但仍然存在不少难题^[31]。关于聚乙烯生物降解的机制, 国内外研究者进行了一些探索, 分析认为: 一方面, 微生物通过分泌多糖、蛋白等多聚物构成黏液层, 有效降低聚乙烯分子的表面疏水性, 微生物产生的胞外酶与聚乙烯材料表面分子链段相互作用进而达到腐蚀作用; 另一方面, 微生物也能分泌特定的酶类, 通过水解、氧化等多重反应将聚乙烯分子分解为低分子量寡聚物、二聚体、单体等分子碎片, 再进入生物体内代谢同化^[32-34]。池明眼检测到 ZJC-1 PE 菌株在 PE 降解过程中分泌漆酶, 该酶可能是 ZJC-1 降解聚乙烯的相关酶之一, 催化氧化 PE 的机理推测可能是单电子氧化机制^[35]。总体而言, 对于聚乙烯微生物降解的机制虽有研究但尚未定论, 欠缺从酶和基因水平上阐述 PE 塑料降解生物机制^[36]。目前已发现的菌株其降解效率低, 具有高效生物降解性能的菌株还很少, 寻找高效的生物降解 PE 微生物和酶系统, 丰富降解菌种资源库方面的工作亟待加强。Khan 等发现宾曲霉在 MSM 额外添加 2% 葡萄糖的培养条件下, 可大大提高对地膜的降解能力^[37]。宋亚珩等发现解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) HK1 对聚乙烯醇的降解酶主要为胞外酶, 通过优化发酵培养条件、外加淀粉碳源使菌株的产酶能力提高了 225%^[38]。因此, 在本研究筛选出 PE 降解菌株的基础上, 还要研究通过添加表面活性剂、调整碳氮源、优化培养条件等措施来提高降解效率, 进一步研究降解的关键酶系, 探究降解机制, 以深入挖掘降解菌株的降解潜能。

在实验室表现出具有一定降解性能的菌株, 对环境的适应性是其发挥降解功效的制约因素, 往往会限制其实际应用。地处内陆干旱荒漠区的新疆是我国最大的地膜应用区域和地膜残留污染区, 干旱、高温、土壤盐碱化普遍、温差变化剧烈是其生态条件的显著特征。立足于当地, 筛选出抗逆性强、适应当地气候环境条件的聚乙烯地膜高效降解菌

株将是今后研究工作的重点。

REFERENCES

- [1] Yan CR, He WQ, Xue YH, et al. Application of biodegradable plastic film to reduce plastic film residual pollution in Chinese agriculture[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(6): 748-760 (in Chinese)
严昌荣, 何文清, 薛颖昊, 等. 生物降解地膜应用与地膜残留污染防控[J]. 生物工程学报, 2016, 32(6): 748-760
- [2] Zhong Y, Li YZ, Zhang RL, et al. Screening a polyethylene degrading strain and study on the degradation characteristics[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2017, 26(4): 681-686 (in Chinese)
钟越, 李雨竹, 张榕麟, 等. 一株聚乙烯降解菌的筛选及其降解特性研究[J]. 生态环境学报, 2017, 26(4): 681-686
- [3] Yan CR, Liu EK, Shu F, et al. Review of agricultural plastic mulching and its residual pollution and prevention measures in China[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2014, 31(2): 95-102 (in Chinese)
严昌荣, 刘恩科, 舒帆, 等. 我国地膜覆盖和残留污染特点与防控技术[J]. 农业资源与环境学报, 2014, 31(2): 95-102
- [4] Shao Q. Study on the preparation and application of biodegradable additives applied in polyethylene film[D]. Qingdao: Master's Thesis of Shandong University of Science and Technology, 2008 (in Chinese)
邵强. 聚乙烯薄膜用可生物降解添加剂的制备与应用研究[D]. 青岛: 山东科技大学硕士学位论文, 2008
- [5] Kathiresan K. Polythene and plastic-degrading microbes in an Indian mangrove soil[J]. Revista de Biologia Tropical, 2003, 51(3/4): 629-633
- [6] 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
- [7] Harshvardhan K, Jha B. Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India[J]. Marine Pollution Bulletin, 2013, 77(1/2): 100-106
- [8] Abrusci C, Pablos JL, Corrales T, et al. Biodegradation of photo-degraded mulching films based on polyethylenes and stearates of calcium and iron as pro-oxidant additives[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(3): 451-459
- [9] Luo BX. Screening and identification of strains degrading polyethylene (PE) and researches on degradation characteristics of LBX-2 strain[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Normal University, 2013 (in Chinese)
罗贝旭. 聚乙烯降解菌的筛选、鉴定和降解特性的研究

- [D]. 成都: 四川师范大学硕士学位论文, 2013
- [10] 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
- [11] Li X, Gu WJ, Yang SH, et al. Screening of a plastic mulch film degrading fungus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(1): 56-67 (in Chinese)
李夏, 顾文杰, 杨少海, 等. 一株地膜降解真菌的筛选及其降解性能分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(1): 56-67
- [12] Liu YS, Ye BH, Zhang L, et al. Isolation and identification of intestinal bacterial flora of yellow mealworm[J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(10): 894-896 (in Chinese)
刘玉升, 叶保华, 张丽, 等. 黄粉虫不同虫态肠道细菌分离及鉴定[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(10): 894-896
- [13] Cai MY, Dong XZ. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [14] Zahra S, Abbas SS, Mahsa MT, et al. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium[J]. Waste Management, 2010, 30(3): 396-401
- [15] Mathur G, Mathur A, Prasad R. Colonization and degradation of thermally oxidized high-density polyethylene by *Aspergillus niger* (ITCC No. 6052) isolated from plastic waste dumpsite[J]. Bioremediation Journal, 2011, 15(2): 69-76
- [16] 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
- [17] Koutny M, Amato P, Muchova M, et al. Soil bacterial strains able to grow on the surface of oxidized polyethylene film containing prooxidant additives[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009, 63(3): 354-357
- [18] Rajandas H, Parimannan S, Sathasivam K, et al. A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation[J]. Polymer Testing, 2012, 31(8): 1094-1099
- [19] Koutny M, Sancelme M, Dabin C, et al. Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives[J]. Polymer Degradation and Stability, 2006, 91(7): 1495-1503
- [20] Pometto III AL, Lee BT, Johnson KE. Production of an extracellular polyethylene-degrading enzyme(s) by *Streptomyces* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(2): 731-733
- [21] Ren L, Men LN, Zhang ZW, et al. Biodegradation of polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the guts of wax moth *Galleria mellonella*[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, 16(11): 1941
- [22] Pererva E. Biodegradation of polystyrene and polyethylene by the greater wax moth larvae and the effect on their gut microbiome[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2019 (in Chinese)
Pererva E. 大蜡螟降解塑料及其肠道微生物组研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2019
- [23] Wei FW. New angle to study the adaptive evolution: animal gut microbiome[J]. Scientia Sinica Vitae, 2016, 46(11): 1338-1340 (in Chinese)
魏辅文. 动物适应性进化研究的新视角: 动物肠道微生物组[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(11): 1338-1340
- [24] Shah AA, Hasan F, Hameed A, et al. Biological degradation of plastics: a comprehensive review[J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(3): 246-265
- [25] Auta HS, Emenike CU, Fauziah SH. Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation[J]. Environmental Pollution, 2017, 231: 1552-1559
- [26] 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
- [27] Nowak B, Pająk J, Drozd-Bratkowicz M, et al. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(6): 757-767
- [28] Sudhakar M, Doble M, Murthy PS, et al. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 61(3): 203-213
- [29] Nangong ZY, Yang J, Wang QY, et al. Study on histology of the alimentary canal of great wax moth *Galleria mellonella* larvae[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2015, 38(5): 63-67 (in Chinese)
南宫自艳, 杨君, 王勤英, 等. 大蜡螟幼虫消化道的组织学研究[J]. 河北农业大学学报, 2015, 38(5): 63-67
- [30] Yang S, Zhang XW, Song WF, et al. Review of the biological and control methods on *Galleria mellonella* L.[J]. Apiculture of China, 2016, 67(3): 33-37 (in Chinese)
杨爽, 张学文, 宋文菲, 等. 大蜡螟生物学特性及其防治研究概述[J]. 中国蜂业, 2016, 67(3): 33-37
- [31] He H, Liu P, Luo BX, et al. Isolation and complex mutagenesis of an actinomycetes with degraded starch/polyethylene powder[J]. Journal of Sichuan Normal University (Natural Science), 2016, 39(3): 408-413 (in

- Chinese)
何红, 刘沛, 罗贝旭, 等. 一株降解淀粉填充聚乙烯放线菌的筛选以及诱变选育[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2016, 39(3): 408-413
- [32] Kawai F, Watanabe M, Shibata M, et al. Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2004, 86(1): 105-114
- [33] Wilkes RA, Aristilde L. Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 123(3): 582-593
- [34] Lucas N, Bienaime C, Belloy C, et al. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques-A review[J]. *Chemosphere*, 2008, 73(4): 429-442
- [35] Chi MY. Study on the isolation and effect of microorganisms that degrade polyethylene in the intestinal tract of wax borer[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2019 (in Chinese)
池明眼. 蜡螟肠道降解聚乙烯微生物的分离及其效果的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2019
- [36] Xu Y, Yin CF, Yue WL, et al. Microbial degradation of petroleum-based plastics[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(11): 2092-2103 (in Chinese)
许楹, 殷超凡, 岳纹龙, 等. 石油基塑料的微生物降解[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(11): 2092-2103
- [37] Khan S, Nadir S, Shah ZU, et al. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 225: 469-480
- [38] Song YH, Zhou YH, Li SJ, et al. Optimization of poly (Vinyl Alcohol)-degrading enzyme production condition in *Bacillus amyloliquefaciens* HK1[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016, 32(2): 33-39 (in Chinese)
宋亚珩, 周云横, 李素俭, 等. 聚乙烯醇降解菌 HK1 产酶条件优化[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(2): 33-39