

# 强化聚乙烯塑料降解的微生物群落构建

学 生：李昕一 清华大学附属中学

指导老师：吴晓磊 北京大学工学院

梁姝颀 清华大学附属中学

## 摘要

塑料污染物在自然环境中逐年增加，且不易被降解，已经严重威胁着我们人类的生存健康，如何治理塑料污染已迫在眉睫，采用微生物安全无害的处理塑料污染物，已是世界性的研究热题。我们选用能降解长链烷烃的微生物 *Dietzia* sp. DQ12-45-1b，对塑料有微弱降解能力的芽孢杆菌属微生物 *Bacillus cereus*，和能在聚对苯二甲酸乙二醇酯塑料表面产生生物膜并进行降解的 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 三株细菌构成降解聚乙烯（PE）的微生物群落；接种到以 PE 为唯一碳源的基础无机盐（MSM）培养基中；进行好氧培养和实验研究。结果发现：1）在实验组，PE 薄膜特性以及培养液物质组成发生了很大的变化。实验组 PE 薄膜表面变得凹凸不平，且其中氧元素含量提高，提示发生了氧化反应。实验组 PE 平均分子量变小，且培养液中检测到大量的新物质，也揭示了微生物对 PE 的降解。2）对实验组，微生物群落也发生了显著变化。实验组混合液中菌浓度明显提高，且 PE 薄膜表面存在着一层厚厚的生物膜、菌与菌之间发现了应该是微生物分泌的大量丝状物质。3）无 PE 降解能力的单菌和微弱 PE 降解能力的功能菌在混合后，PE 降解能力显著提高。进一步分析发现，PE 薄膜表面上，这些菌成簇或重叠分布，协同发挥对 PE 的降解作用。

本研究的主要创新点是发现非 PE 降解的烷烃降解菌、微弱 PE 降解菌和具有产生生物膜功能菌的微生物群落能够显著提高 PE 的降解能力，为利用非功能菌刺激 PE 降解菌、从而强化微生物降解 PE 提供了新技术思路。

## 关键词

微生物群落、*Dietzia* sp.、*Bacillus cereus*、*Ideonella sakaiensis*、聚乙烯（PE），塑料降解

# 目录

1 研究背景.....	1
2 研究目的.....	2
3 研究材料与方法.....	2
3.1 总体流程.....	2
3.2 材料及设备.....	3
3.3 实验方法.....	4
4 研究结果与分析.....	7
4.1 微生物降解 PE 能力比较.....	7
4.2 微生物降解 PE 特性分析.....	8
4.3 讨论.....	14
5 结论.....	15
6 心得体会.....	15
7 致谢.....	16
8 参考文献.....	16

## 1 研究背景

塑料曾被视为“20 世纪人类最为伟大的发明”，以其轻便耐用而为人称道；塑料也在“20 世纪人类最糟糕的发明”中榜上有名，由于难以降解，被人们视为环境的敌人。作为四大支柱材料<sup>[1]</sup>，塑料的产量正因用途广泛而不断扩大，使现如今环境中累积着近 70 亿吨难以降解的相关垃圾，对环境和其他生物带来不可磨灭的影响，严重威胁着人类的生存。

塑料作为一个重要的污染物。它的种类主要有聚乙烯（PE）、聚丙烯、聚氯乙烯、

聚苯乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯及聚氨酯甲酸乙酯<sup>[2]</sup>。全球的塑料产量已达到4亿4000多万吨<sup>[3]</sup>, PE 由于其广泛的用途, 在塑料市场中占有重要的份额, PE 每年的全球产量达到1.4亿吨<sup>[4]</sup>。PE塑料, 是一种线性饱和碳氢化合物, 其基本结构为其基本结构为 $[\text{CH}_2-\text{CH}_2]_n$ , 结构上和长链烷烃相似<sup>[5]</sup>, 属于高分子量烷烃, 是一种稳定性很好的聚合物, 不易降解, 在自然情况下降解需要数百年之久, 处理不当就会造成“白色污染”。PE 塑料垃圾广泛存在于地球的各处, 像是在土壤中的废旧农膜, 使用后回收难度大, 人工成分高, 使土地得不到充分利用。而海洋中的 PE 塑料垃圾可能会伤害海洋动物, 一些更小的塑料碎片在海洋中成为微塑料, 则有可能通过食物链底层的小型鱼类吞食而积累在食物链当中, 破坏整个海洋生态系统。

针对PE塑料垃圾污染问题, 之前有研究表明, 有些微生物可以对PE塑料进行降解。例如在Kaplan *et al.* 研究显示在含有真菌、细菌和无脊椎动物的耕种土壤中, 聚苯乙烯90d 的降解率低于1%<sup>[6]</sup>。而Otake *et al.* 研究显示聚苯乙烯埋在土壤中32年并无明显的降解迹象<sup>[7]</sup>。单独的微生物作用时间长, 降解效果差。在对微生物世界进行深入探索过程中, 人们发现自然界的微生物都是由群落的形式存在的。这些群落境中微生物的相互配合, 可以提高对环境中污染物的降解速率。基于上述认识, 我们提出科学假设: 与单一功能的微生物相比, 微生物群落可以提高塑料的降解效率。

## 2 研究目的

到目前为止, 能够有效降解塑料的微生物极其稀少, 且效率低, 周期长。基于与单一功能的微生物相比, 微生物群落可以提高塑料的降解效率这一科学假设, 构建一个怎样的微生物群落才能实现降解功能的强化, 我们挑选三类不同的微生物, 包括塑料降解菌、烷烃降解菌以及辅助菌构成降解PE的微生物群落, 来强化PE的降解速度, 共同维护地球的生态环境。

## 3 研究材料与方法

### 3.1 总体流程

本研究实验总体流程如图 1, 共分两部分: 将实验室分离的两株菌 *Dietzia* sp. 45-1b 和 *Bacillus cereus* 以及购买的菌株 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 进行单独降解 PE 实验以及三者混合在一起构成一个微生物群落降解 PE 实验, 验证群落和单独微生物对 PE 的降解是否有差异; 然后对构建群落体系中的微生物, 菌液以及 PE 膜分别进行分析。

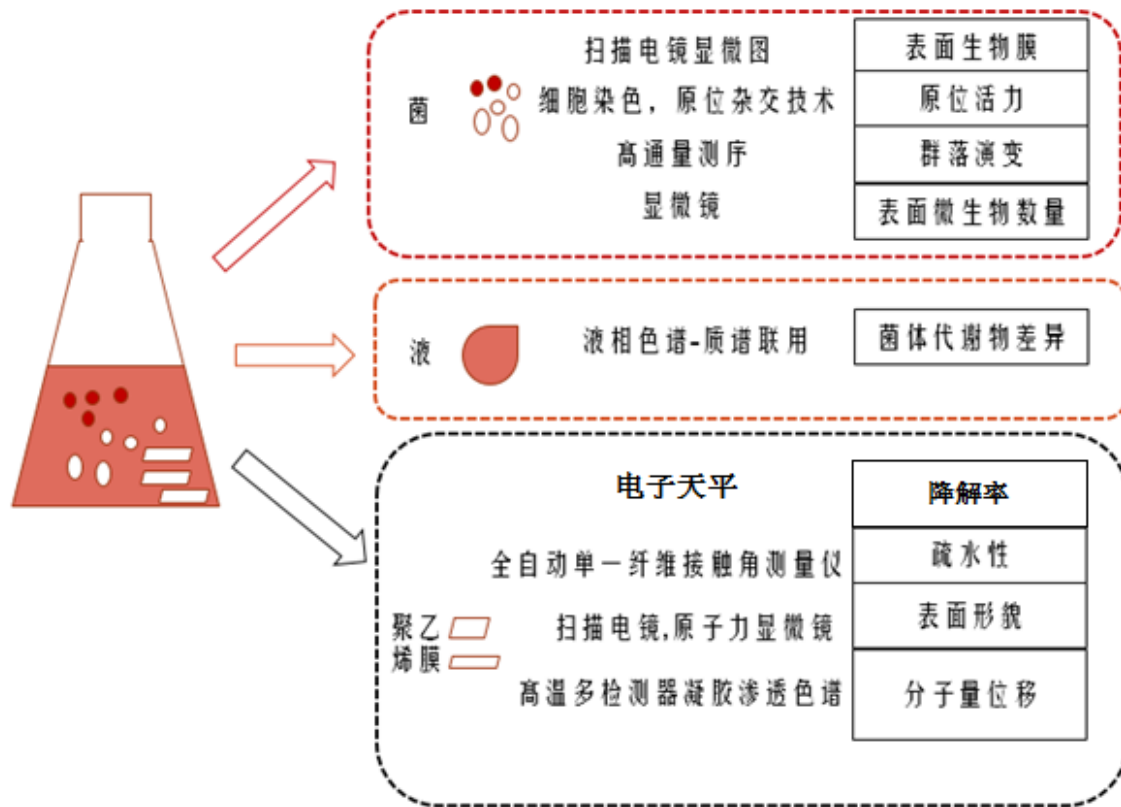


图 1 本研究实验总体流程

### 3.2 材料及设备

#### 3.2.1 实验材料

实验菌株：实验室已分离并验证具有长链烷烃降解功能、但不具备 PE 降解能力的菌株 *Dietzia* sp. 45-1b, 实验室已分离并验证具有 PE 降解能力的功能菌株 *Bacillus cereus*。从 JCM 菌种保藏中心购买的 *Ideonella sakaiensis* 201-F6。

MSM 培养基(1 L):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 4.00 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.00 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5.68 g;  $\text{CaCl}_2$ , 0.78mg;  $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 197.18 mg;  $\text{FeSO}_4$ , 1.112 mg。微量元素溶液 TES 0.10 mL, pH 调节至 7.0。

微量元素溶液 TES (1L) :  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.32 g;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1.78 g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.56 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.78 g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.39 g;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.42g; EDTA, 0.10g;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.004 g; KI, 0.66 g。

LB 培养基 (1 L): 蛋白胨; 10.00 g; 酵母粉, 5.00 g; NaCl, 10.00 g; 琼脂, 20.00 g (配置固体培养基时添加)。

将市面上购买的 PE 膜剪成 1×1cm 大小。在应用时, 将其放在 MSM 培养基中作为微生物的唯一碳源。

### 3.2.2 实验设备与分析仪器

聚合酶链式反应仪 (PCR 仪) (MJ Mini, BIO-RAD, USA)、液相相色谱-质谱联用仪 LC-MS (Agilent, USA)、SEM (SU8010, HITACHI, Japan)、OCA40 全自动单一纤维接触角测量仪、荧光显微镜、原子力显微镜、PL-GPC220 型高温凝胶渗透色谱仪 (示差和光散射双检测系统)、pH 计、电子天平及凝胶成像系统 (BIO-RAD, USA) 等。

## 3.3 实验方法

### 3.3.1 研究 *Dietzia sp. 45-1b*, *Bacillus cereus* 及 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 单菌及构建的微生物群落对 PE 塑料降解的实验设计

选择实验室已分离并验证具有长链烷烃降解功能、但不具有 PE 降解能力的菌株 *Dietzia sp. 45-1b* (以下简称, 45-1b), 实验室已分离并验证具有微弱 PE 降解能力的功能菌株 *Bacillus cereus* (以下简称, BC) 以及能在聚对苯二甲酸乙二醇酯塑料表面产生生物膜并对其进行降解的 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 (以下简称, 201-F6) 三个菌株; 以 PE 为唯一碳源, 分别进行单独 PE 培养、以及混合培养, 分析检测 PE 特性以及培养中物质与微生物的变化情况, 研究三株菌单独以及混合构建的微生物群落对 PE 的降解能力的可行性。PE 该实验设计如表 1 所示。

**表 1 混合 *Dietzia sp. 45-1b*, *Bacillus cereus* 及 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 构建微生物群落进行 PE 降解的研究方案**

编号	菌株	培养基	平行培养数量	实验目的
混培组	201-F6+45-1b+BC	MSM+1%PE 膜	3	检验 201-F6+45-1b+BC 混合培养情况。
对照组 1	201-F6	MSM+1%PE 膜	3	检验 201-F6 单独生长情况。
对照组 2	45-1b	MSM+1%PE 膜	3	检验 45-1b 单独生长情况。
对照组 3	BC	MSM+1%PE 膜	3	检验 BC 单独生长情况。
对照组 4		MSM+1%PE 膜	3	检验培养基未被污染。
对照组 5	201-F6+45-1b+BC	MSM	3	检测混合菌无碳源时的生长情况

### 3.3.1.1 种子液准备及接种培养

1) 菌株从甘油管接入平板活化, 挑取单菌落转接到试管进行液体活化, 然后接种到装有 300 mL LB (500 mL 三角瓶) 中作为种子液进行培养。

2) 种子液培养至对数生长期后, 对其进行 5000 rpm, 4 °C 离心 10 min, 收集其中的细胞, 用无机盐 (MSM) 培养基洗涤 3 次, 饥饿处理 30 min 后, 再用无机盐培养基对微生物细胞进行重悬获得最终种子液。并利用紫外分光光度计, 在 600 nm 波长下进行检测, 确定最终种子液的菌体浓度 ( $OD_{600}$ )。

3) 进行混培试验时, 三个菌株的最终种子液按照 1:1:1 的比例接种到含有 150 mL MSM 培养基+1% PE 膜为唯一碳源的 300 mL 三角瓶中, 使微生物的最终浓度为  $OD_{600} \approx 0.10$ 。对照试验组 1、2、3 中, 也按最照微生物各自终浓度  $OD_{600} \approx 0.10$  进行接种, 对照组 4 不进行接种。

### 3.3.1.2 体系培养及检测

活菌数量检测 (紫外分光光度计法  $OD_{600}$ ): 各实验组和对照组培养至 60d 后进行取样, 每个样品取 2 mL 菌液, 根据溶液的 OD 值进行适当稀释, 利用紫外分光光度计测定培养液的  $OD_{600}$  数值及菌液浓度。

## 3.3.2 *Dietzia* sp. 45-1b, *Bacillus cereus* 及 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 构建的微生物群落进行 PE 塑料降解的实验研究

为进一步分析人工群落对 PE 塑料的降解能力, 对培养体系中的微生物、液相物质和 PE 膜进行了系统研究。

### 3.3.2.1 培养基和种子液准备

种子液准备、分析、试验设计等如上 3.3.1.1 所示。

### 3.3.3.2 系统培养及检测

1) PE 表面生物膜检测。对实验组和对照组进行培养 60d, 进行取样、制样, 并利用扫描电子显微镜进行观察。其中扫描电子显微镜样品制作方法如下简述: 样品固定: 用灭菌镊子挑出少量的 PE 薄膜样品, 放入 5ml 的离心管中, 加入 2.5% 戊二醛, 加量为淹没碳粒/碳毡 PE 薄膜样品为宜, 室温固定 1 小时。置于 4°C 冰箱中固定 12 小时。冲洗: 用 0.2 mol pH 7.4 的磷酸缓冲溶液冲洗 3 次, 每次 10 分钟。每次冲洗时用移液

器缓慢吸走上一步骤的冲洗液。脱水: 分别用浓度为 30%, 50%, 75%, 90%, 95%, 100% v/v 的乙醇进行脱水, 每次 10 分钟。干燥: 将样品放在离心管里, 置入干燥器中干燥 12 小时。粘样: 用双面胶将样品观察面向上粘贴在扫描电镜铜板上。预处理好的样品放入干净离心管中待检。

## 2) PE 膜表面微生物组成的显微观察:

微生物细胞数量检测: 培养 60d 后, 取出 PE 膜, 利用显微镜照相及软件对 PE 膜表面微生物细胞的数量进行计数。

活细胞观察: 在培养 60d 后, 取出 PE 膜, 利用 Invitrogen 的 L7007 LIVE/DEAD BacLight. Bacterial Viability Kit 试剂盒对细胞进行染色, 染色后在荧光显微镜下对活死细胞进行检测。

原位杂交 (FISH) 观察: 检测三种微生物在 PE 膜上的分布。探针分别用绿色标记 45-1b, 红色标记 F6, 紫红色标记 BC。探针按照之前实验室设计好的直接采用。FISH 实验方法如下简述:

细胞固定: 细胞置于 2.5% 戊二醛 (PBS 缓冲液), 4 °C 12h 固定。4 °C PBS 缓冲液 冲洗 3 次。溶菌酶消化细胞壁: 加入 25 µg/ml 溶菌酶, 每 45 µl GTE 加入 5µl 溶菌酶, 放入 37 °C, 计时 8 分钟。室温的 PBS 冲洗 1min, 然后酒精梯度脱水, 70%, 85%, 100%, 各 1min, 风干。杂交: 1-2µl 探针 (20 ng/µl in TE 缓冲液) 与 10µl 1.2X hyb 溶液混合, 加水至 12µl, 于 80 度 5min 后置于冰上。将变性探针加入到样品中, 密封。于 37 °C 预热的杂交炉中杂交 10h。冲洗: 去除未杂交的探针和非特异性杂交。用 50ml 37 度 2×SSC 50% 甲酰胺洗 20 min, 置于摇床, 重复 3 次。室温 用 37 度 2×SSC 洗 10min, 重复 3 次。封片观察: 指甲油封片后, 用荧光显微镜进行观察。

3) 微生物群落分析: 对培养 60d 后的每个样品取出合适量的菌液, 进行 DNA 的提取, 送公司测序, 利用测出 DNA 序列, 利用数学分析方法分析微生物群落及其变化。

4) 菌体代谢物差异分析: 在培养 60d 后, 取 5ml 菌液, 于 8000 rpm, 4 °C 离心 10 min 收集细胞; 取上清液, 利用 0.22µm 水系滤膜过滤; 真空冷冻干燥、溶解得到 500 µl 处理液, 取 100 µl 溶液进行上机检测。

5) PE 膜表面疏水性检测: 在培养 60d 后取出 PE 膜, 用 2%SDS 溶液清洗 PE 膜三次, 再用清水冲洗三次, 洗去 PE 膜表面的生物膜及菌体, 风干, 用 OCA40 全自动单一

纤维接触角测量仪对 PE 膜的表面接触角进行测量。

6) PE 膜表面形貌检测: 在培养 60d, 后取出 PE 膜, 用 2%SDS 溶液清洗 PE 膜三次, 再用清水冲洗三次, 洗去 PE 膜表面的生物膜及菌体, 风干, 按照上文提到的扫描电子显微镜样品制作方法进行制样, 观察。对于原子显微镜观察, 将 PE 膜剪成 5mm 的小方片, 用光敏胶粘在载玻片上待观察。

7) PE 膜分子量位移的检测: 在培养 60d 后, 取出 PE 膜, 用 2%SDS 溶液清洗 PE 膜三次, 再用清水冲洗三次, 洗去 PE 膜表面的生物膜及菌体, 风干, 称取 10mg 的 PE 试样于试样瓶中, 加入一定体积的邻二氯苯溶剂, 在 140℃ 条件下将试样溶解完全(10h), 流动相以 1.0 mL/min 的流量流过 3 根混合型 B 柱 (7.5 mm×300.0 mm, 10 μm)。将试样注入注射瓶, 在 135 °C 条件下加热并进样测定, 获得浓度色谱图和两个不同角度的光散射色谱图, 然后用 Cirrus TM 多检测器分析软件进行数据处理获得试样的绝对重均分子量及其分布。

8) PE 膜降解率检测: 在培养 60d 后取出 PE 膜, 用 2%SDS 溶液清洗 PE 膜三次, 再用清水冲洗三次, 洗去 PE 膜表面的生物膜及菌体, 风干, 称重, 观察重量变化。

## 4 研究结果与分析

### 4.1 微生物降解 PE 能力比较

在无机盐培养基 MSM 中添加 1%PE 薄膜, 接种不同细菌及混合菌, 培养 60d 后观察分析发现: 空白对照组 MSM+PE, 培养前后无微生物生长; 不加 PE 只加菌的对照组 MSM+45-1b+201-F6+BC, 培养前后, 细菌浓度 OD600 降低, 说明在没有碳源的营养物时, 三株细菌不能生长; 在单菌实验组, 即 MSM+PE+45-1b, MSM+PE+201-F6 和 MSM+PE+BC 组, 培养后发现细菌浓度均降低, 提示单菌不能利用 PE 进行生长; 混合菌 PE 组, 即 MSM+PE+45-1b+201-F6+BC, 培养后细菌浓度明显升高, 提示细菌利用了培养液中的 PE 唯一碳源进行了生长。

PE 降解率检测发现三菌混合组, PE 的降解效率最高, 且与对照组相比,  $P < 0.05$  具有统计学差异, 结果见表 2。

表 2 PE 为唯一碳源的细菌生长分析

实验组	初使接种量 (OD <sub>600</sub> )	培养后浓度 (OD <sub>600</sub> )	降解率	P 值



MSM+PE	0	0	$0 \pm 1.6$	--
MSM+45-1b+201-F6+BC	各 0.1	$0.17 \pm 0.056$	--	--
MSM+PE+45-1b	0.1	$0.08 \pm 0.007$	$0.50 \pm 0.86$	0.84
MSM+PE+F6	0.1	$0.04 \pm 0.005$	$1.00 \pm 0.82$	0.482
MSM+PE+BC	0.1	$0.04 \pm 0.018$	$1.00 \pm 0.82$	0.14
MSM+PE+45-1b+201-F6+BC	各 0.1	$2.24 \pm 0.600$	$8.25 \pm 1.96$	$0.035 < 0.05$

## 4.2 微生物降解 PE 特性分析

### 4.2.1 降解后的 PE 特性分析

#### 4.2.1.1 PE 表面微观形貌观察

用 2% 的 SDS 将 PE 薄膜洗干净后, 原子力显微镜 (AFM) 观察 PE 表面的微观形貌, 观察发现接了三种菌的实验组中 (图 2B), PE 薄膜表面粗糙, 凹凸不平, 而对照组 (图 2A) 表面比较光滑, 说明菌作用于 PE 表面使其发生了形貌变化。

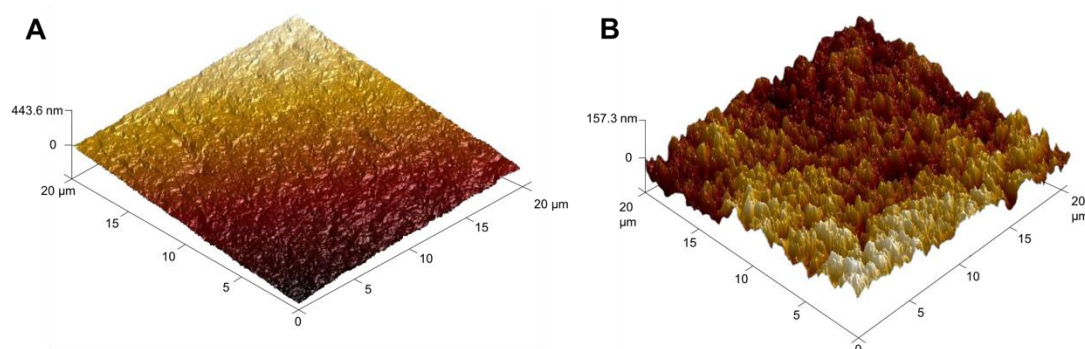


图 2 AFM 观察 PE 薄膜表面微观形貌

#### 4.2.1.2 PE 薄膜表面碳氧元素分析

PE 薄膜表面的碳氧元素用 SEM-EDS 分析发现 (见表 3), 接种了三种混合菌的实验组中氧元素质量百分比为 ( $1.91 \pm 0.12$ ) %, 对照组中 O 元素为 ( $1.56 \pm 0.11$ ) %, 实验组比对照组中的氧元素含量有所提升, 且两组的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 PE 表面有氧化反应发生。

表 3 SEM-EDS 分析 PE 表面元素

名称	比重(%)	
	C	O

对照组	98.44±0.11	1.56±0.11
实验组	98.09±0.12	1.91±0.12

### 4.2.1.3 PE 分子量检测

高温凝胶渗透色谱仪 (HT-GPC) 分析 PE 分子量变化如图 3 所示, 横坐标是分子量的对数值  $\log M$ , 越靠近左侧, 分子量越小, 越靠近右侧, 分子量越大; 纵坐标是分子量的微分分布  $W(\log M)=dwt/d(\log M)$ ; 橘色曲线是对照组 (MSM+PE) 中的 PE 分子量分布曲线图, 分子量为 100741; 蓝色曲线是实验组 (MSM+PE+45-1b+BC+201-F6) 中的 PE 分子量分布曲线图, 分子量为 93912; 实验组 PE 分子量分布曲线左移, 平均分子量降低, 且实验组中低分子量 (500-5000) 的 PE 增多 (图中黑色竖线左侧代表低分子量的 PE)。

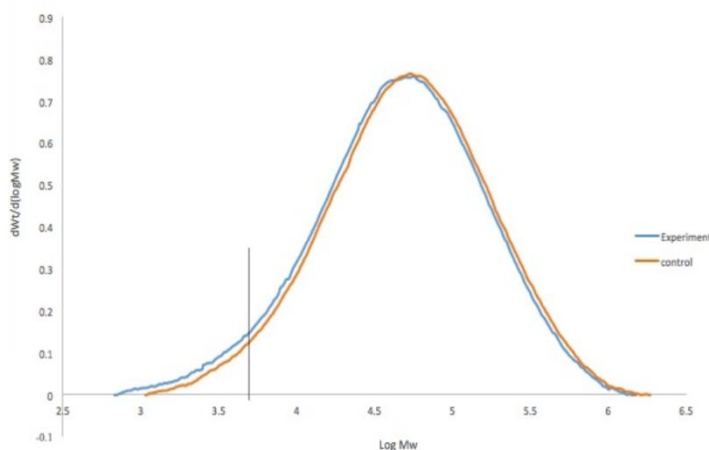


图 3 高温凝胶渗透色谱仪 (HT-GPC) 检测 PE 分子量分布

### 4.2.1.4 PE 表面疏水性

接触角测量仪 (Drop Shape Analyzer- DSA30) 测其表面的水接触角度 (WCA), 对照组 (图 4A) PE 表面的接触角为  $99.1 \pm 1.6^\circ$ ; 实验组 (图 4B) 的接触角为  $84.0 \pm 0.7^\circ$ ; 两者的统计学分析  $P < 0.001$ , 具有显著统计学意义。说明接菌培养后的 PE 表面疏水性降低, 这也可能是 PE 薄膜和培养液中微生物有所差异的原因。

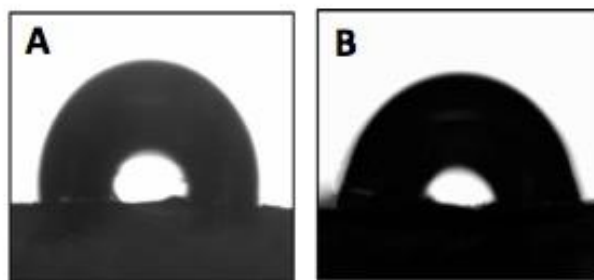


图 4 PE 表面疏水性分析

#### 4.2.2 培养液中 PE 降解子产物及细胞代谢物

对照组 (MSM+PE) 与实验组 (MSM+PE+45-1 b+201-F6+BC) 培养液通过 LC-MS 分析了  $m/z$  比在 100-1500 之间的所有物质, 发现对照组中只有 27 种, 实验组中除了含有相同的 27 种物质外, 还有 54 种不同的明显差异物质 (表 4)。图 5 是  $m/z$  100-200, 600-700, 其中黑色是对照组谱图, 红色是实验组谱图, 蓝色箭头是实验组与对照组之间的差异物质峰, 没标箭头的物质峰是实验组与对照组相同的物质。可见实验组接菌后溶液中的产物明显增多, 提示可能是细菌降解 PE 的代谢物质。

表 4 实验组与对照组代谢产物差异分析

实验组	与 (MSM+PE) 相同物质 (种)	与 (MSM+PE) 组明显差异物质 (种)
MSM+PE	27	—
MSM+PE+45-1b+201-F6+BC	27	54

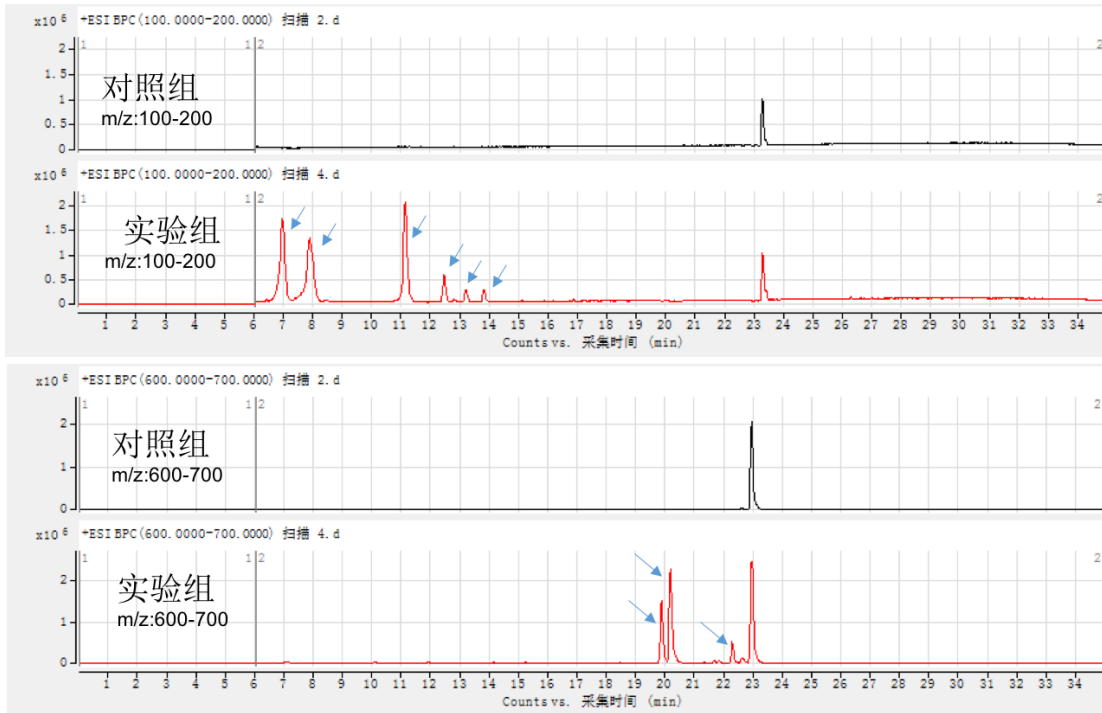


图 5 LC-MS 分析培养液中代谢物典型图谱

## 4.2.3 微生物群落分析

### 4.2.3.1 PE 表面微生物具有生物活性

用 Invitrogen 的 L7007 LIVE/DEAD® BacLight. Bacterial Viability Kit \*for microscopy 检测 PE 薄膜表面细胞的原位活力。活细胞被染成绿色, 死细胞被染成红色。对照组 PE 表面几乎没有绿色荧光的活细胞(图 6A-1), 也没有红色的死细胞(图 6A-2); 实验组 PE 表面有大量绿色荧光细胞(图 6B-1), 未见红色荧光细胞(图 6B-2), 说明这些细菌都具有很强的生物活性。

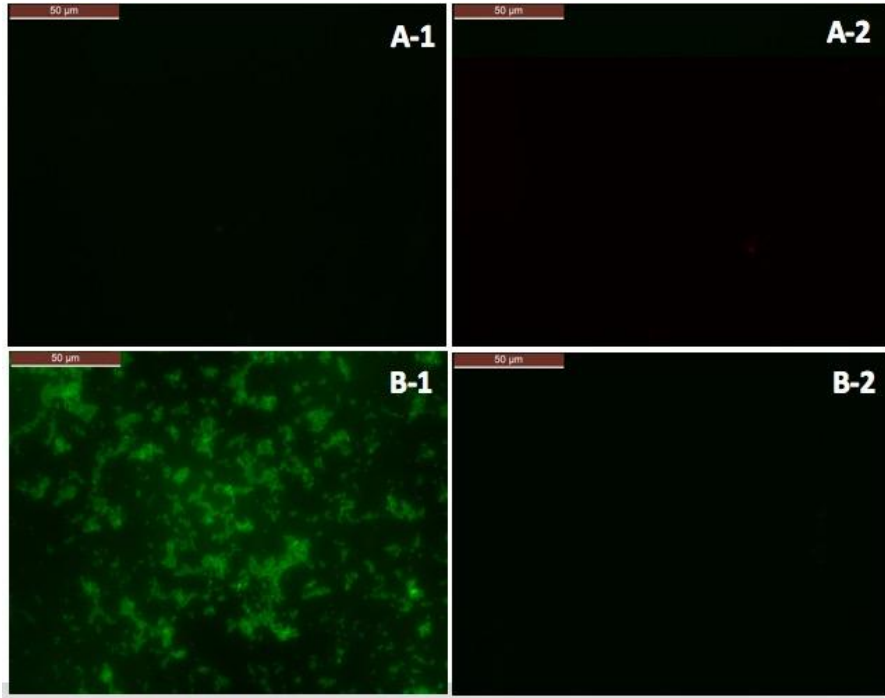


图 6 细胞原位活力检测

#### 4.2.3.2 PE 薄膜表面微生物微观形态

扫描电镜 SEM 观察 PE 薄膜表面菌的形态发现, 对照组 (图 7A) PE 薄膜表面光滑没有细菌附着, 实验组 (图 7B) PE 薄膜表面覆盖了一层生物膜, 细胞与细胞之间, 细胞与膜之间有丰富的丝状物链 (图 7C-D)。

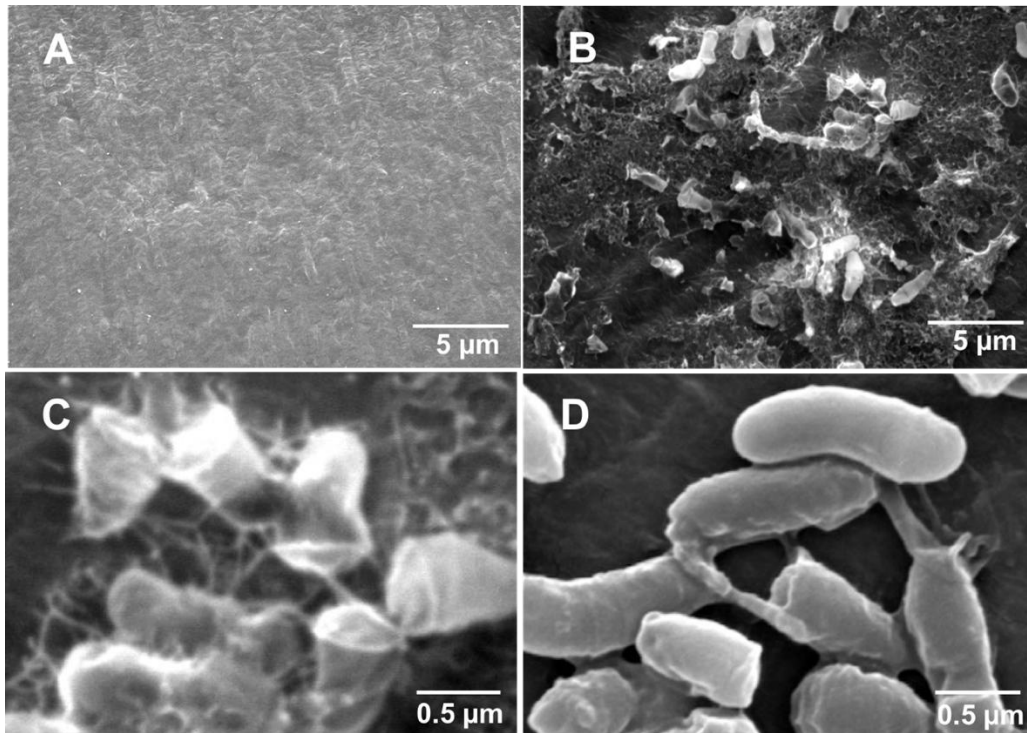


图 7 SEM 观察 PE 薄膜表面微生物

#### 4.2.3.3 PE 表面微生物群落原位分析

FISH 原位观察 PE 表面细菌, 用绿色探针标记 *Dietzia* sp. 45-1b (图 8A), 紫色探针标记 *Bacillus cereus* (图 8B), 红色探针标记 *Indonella sakaiensis* 201-F6 (图 8C), 三种菌交错分布 (图 8D), 红色荧光和绿色荧光重合后是黄色, 表示有不同菌之间有重叠分布。所有细菌在 PE 表面的分布所占的相对面积比例约为 40%。因有的细菌成团分别于薄膜表面, 无法对单个细胞计数, 所以选用了每种细胞所占面积百分比来评价三种细胞在薄膜上的分布比例 (表 5), *Dietzia* sp. 45-1b 所占的面积比例为  $(16.25 \pm 1.28) \%$ , *Indonella sakaiensis* 201-F6 所占的面积比例为  $(15.87 \pm 1.64) \%$ , *Bacillus cereus* 所占的面积比例为  $7.57 \pm 1.03$ 。培养后发现附着于 PE 表面的菌发生了改变, 45-1b / 201-F6 / BC 数量比例大约为 2:2:1。

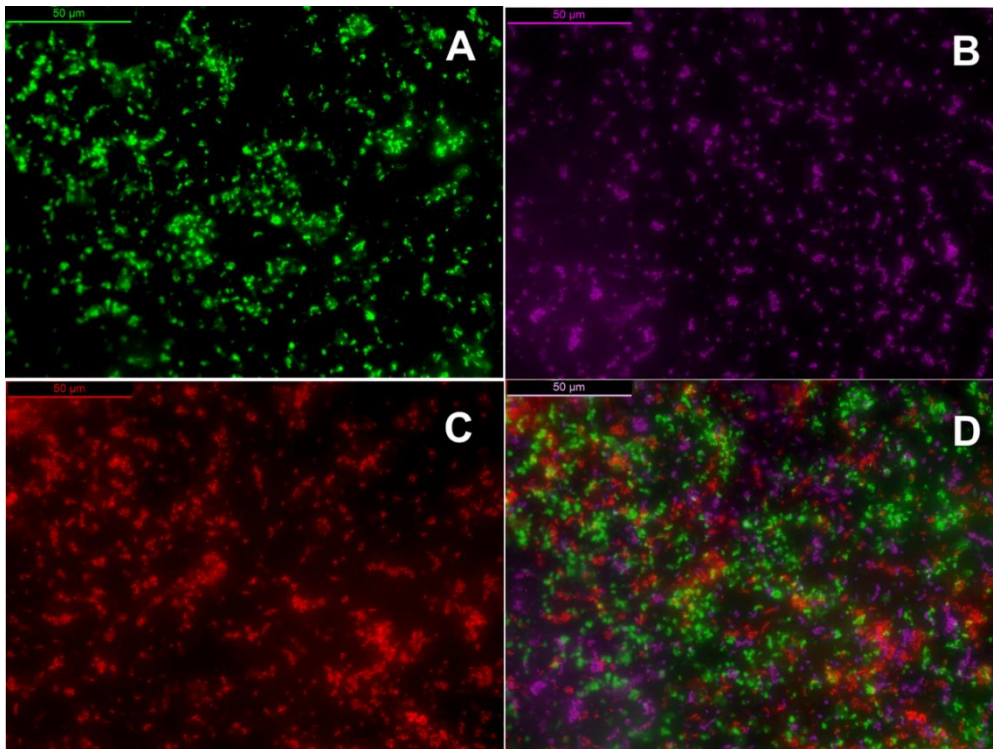


图 8 FISH 原位观察 PE 薄膜表面混合菌

表 5 PE 薄膜表面不同菌所占的相对面积

名称	面积 (%)
<i>Dietzia</i> sp. 45-1b	16.25±1.28
<i>Indonella sakaiensis</i> 201-F6	15.87±1.64
<i>Bacillus cereus</i>	7.57±1.03

#### 4.2.3.4 16S 测序分析培养液中微生物群落变化

收集培养液中的细菌，提取 DNA，通过不同菌 16S 的相对丰度来分析不同菌在溶液中所占的相对比例。三种细菌最初的接种比例为 1:1:1，培养后溶液中的微生物构成发生了很大的变化，*Dietzia* sp. 45-1b 和 *Indonella sakaiensis* 201-F6 所占比例升高，分别为 47.41% 和 43.97%，*Bacillus cereus* 所占的比例显著降低，只有 8.25%，见图 9。并且培养液中的菌与薄膜上（45-1b:201-F6:BC 约为 2:2:1）的菌比例有所差异。可能与不同菌在 PE 薄膜表面粘附能力有关。

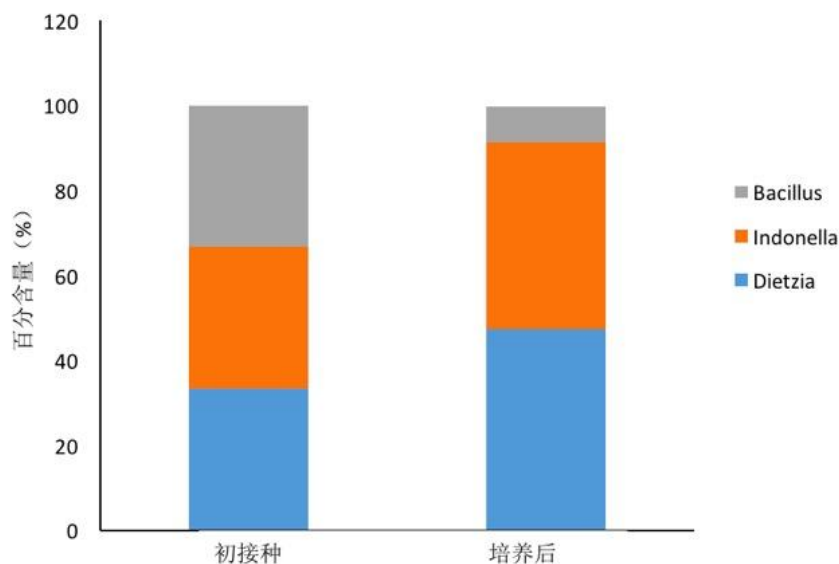


图 9 培养液中群落演替

### 4.3 讨论

本实验采用能降解长链烷烃的微生物 *Dietzia* sp. DQ12-45-1b，对 PE 有降解能力的微生物 *Bacillus cereus*，和能在聚对苯二甲酸乙二醇酯塑料表面产生生物膜并能够降解其自身的 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 构成人工降解 PE 的微生物群落。*Dietzia* sp. 45-1b

具有降解石油组分的功能, 对中长链烷烃的降解能力尤为出色<sup>[8-9]</sup>。将三株菌进行单独或混合培养, 结果显示单菌在 PE 微唯一碳源的培养基中无生长, 混菌组有明显的生长, 这些现象说明三个菌株相互协作, 利用 PE 促进群落菌的生长。

微生物作用后 PE 薄膜后, PE 本身特性发生了很大的变化, 本研究用原子力显微镜观察发现实验组 PE 薄膜表面变得粗糙不平, 而对照组的比较光滑。实验组 PE 薄膜表面的氧含量提高, 提示发生了氧化反应, 有氧元素的加入, 平均分子量变小, 培养液中有大量新物质出现, 这些说明 PE 大分子本身与微生物发生反应后产生了一系列的自身变化。

本研究发现, 微生物在 PE 薄膜的表面生成了一层厚厚的生物膜, 使细菌可以成功的定植在原本疏水性较高的光滑的 PE 表面, 这些具有很强的生物活性的细胞在 PE 表面分泌了大量的物质, 且菌与菌, 菌与生物膜活薄膜之间有千丝万缕的丝状物质连接, 不同菌成簇或者是重叠式分布在 PE 薄膜表面, 协同发挥作用。微生物之间是如何协同分工合作降解 PE 的, 这些将是后续研究关注的重点。

## 5 结论

本研究选用 *Dietzia* sp. DQ12-45-1b, *Bacillus cereus* 和 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 构成人工降解 PE 的微生物群落, 接种到含有 PE 为唯一碳源的 MSM 培养基中, 与接种了单菌的实验组或无接菌的对照组相比, 混合菌的生物量 ( $OD_{600}$ ) 明显升高。分析发现混合菌中 PE 薄膜的表面形貌凹凸不平, PE 薄膜表面的氧含量提高, PE 薄膜平均分子量变小, 培养液中有大量新物质出现, 这些说明 PE 大分子本身与微生物发生反应后产生了一系列的自身变化。SEM 观察微生物在 PE 薄膜的表面生成了一层厚厚的生物膜, 且具有生物活性, 菌分泌了大量的丝状物质, 稳固的粘附在 PE 表面, 并构成相互之间的沟通桥梁, 不同菌成簇或者是重叠式分布, 协同分工降解 PE 并分解利用其供群落生长。

## 6 心得体会

- (1) 通过选题过程了解了环境污染问题, 让自己建立了保护环境意识。
- (2) 我们身边使用的很多化学产品在给人带来便利的同时, 也给环境带来了污染。
- (3) 自然界中的微生物有很强的降解能力, 效法自然, 用微生物的方法降解污染是一种不错的选择。
- (4) 虽然我对降机理还不清楚, 无法独立操作大型仪器以及无法独立解读图像、



谱图等, 但是已经掌握微生物实验基本方法和如何设计实验。

(5) 一个高水平的导师和设备齐全的实验室让你比较容易了解掌握科学的方法, 并且能够在一个高起点上开展工作。

(6) 虽然我在 18 个月里利用周末、假期及晚间开展大量实验, 但微生物实验的长周期性让具体的微生物选择具有局限性, 还可以进行更多的优化选择工作。

(7) 微生物之间是如何协同分工合作降解 PE 的机理还不清楚, 这将是后续研究关注的重点, 我希望它能成为我未来的方向。

## 7 致谢

感谢北京大学工学院吴晓磊老师和卢社莲博士的亲切关怀和悉心指导, 感谢吴教授实验室提供的资助和实验室的师兄师姐的帮助, 感谢清华大学附属中学梁姝颀、谢元凯老师的鼓励和指导。

## 8 参考文献

- [1]黄涛, 赵建青. 微生物可降解塑料的研究进展[J]. 塑料工业, 1991(4):23-27.
- [2]毛海龙, 白俊岩, 姜虎生,等. 可降解塑料的微生物降解研究进展[J]. 微生物学杂志, 2014(4):80-84.
- [3]Quecholac-Piña X, García-Rivera M A, Espinosa-Valdemar R M, et al. Biodegradation of compostable and oxodegradable plastic films by backyard composting and bioaugmentation[J]. Environmental Science & Pollution Research, 2016, 24(33):1-6.
- [4]Yang J, Yang Y, Wu W M, 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.
- [5]高霞, 苏允兰, 关瑜,等. 有机高分子材料的受限结晶:从长链烷烃到高分子[C]// 全国高分子材料科学与工程研讨会学术. 2014.
- [6]Gautam R, Bassi A S, Yanful E K. A review of biodegradation of synthetic plastic and foams.[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2007, 141(1):85-108.
- [7]Otake, Y., Kobayashi, T., Asabe, H., Murakami, N. and Ono, K. (1995) Biodegradation of Low-Density Polyethylene, Polystyrene, Polyvinyl Chloride, and Urea Formalde-Hyde Resin Buried under Soil for over 32 Years. Journal of Applied Polymer Science, 56, 1789-1796.

[8]Wang XB, Chi CQ, Nie Y, et al. 2011. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6-C40) and crude oil by a novel Dietzia strain. *Bioresource Technology*. 102(17): 7755-61.

[9]Wang XB, Nie Y, Tang YQ et al. 2013. n-Alkane chain length alters Dietzia sp strain DQ12-45-1b biosurfactant production and cell surface activity. *Applied and environmental microbiology*. 79, 400-402