



一株聚乳酸降解菌的筛选、鉴定及其降解特性

张静, 吴涓*, 窦月芹, 徐杰

安徽大学 资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230601

张静, 吴涓, 窦月芹, 徐杰. 一株聚乳酸降解菌的筛选、鉴定及其降解特性[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3945-3957.

ZHANG Jing, WU Juan, DOU Yueqin, XU Jie. Screening, identification, and degradation characterization of a polylactic acid-degrading bacterial strain[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3945-3957.

摘要: 【目的】分离可有效降解聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)的好氧细菌, 并研究其生长特性和降解特性, 为环境中 PLA 废弃物的生物修复提供依据。【方法】通过 16S rRNA 基因序列分析对所筛选菌株进行分子生物学鉴定, 采用扫描电镜和傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)分析降解前后 PLA 膜的形貌和化学结构变化。【结果】从活性污泥中筛选获得一株芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) JA-4, 30 d 后 PLA 失重率可达 10.6%。pH 8.0、30 °C 以及接种量 20% 的条件下, 7 d 后 PLA 的失重率可达到 5.6%。明胶对 PLA 的生物降解具有显著促进作用, 当明胶浓度为 3% 时, 降解 10 d 后 PLA 的失重率达到 23.1%, 降解速率也大大提高。FTIR 分析表明该菌株通过水解酯键来实现 PLA 的降解。【结论】本研究为 PLA 的生物降解提供了新的微生物资源, 为环境中 PLA 废弃物的有效降解提供技术支持。

关键词: 聚乳酸; 筛选; 生物降解; 芽孢杆菌; 失重率

Screening, identification, and degradation characterization of a polylactic acid-degrading bacterial strain

ZHANG Jing, WU Juan*, DOU Yueqin, XU Jie

College of Resources and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

Abstract: [Objective] We isolated the aerobic bacteria capable of effectively degrading

资助项目: 肥东县农业面源污染治理试点工作第三方服务项目(2023ADDFZ00164)

This work was supported by the Third-party Service Project for Pilot Work of Agricultural Non-point Source Pollution Control in Feidong County (2023ADDFZ00164).

*Corresponding author. E-mail: wujuan@ustc.edu

Received: 2024-04-18; Accepted: 2024-07-23; Published online: 2024-07-25

polylactic acid (PLA) and characterized the bacterial growth and degradation, aiming to lay a theoretical foundation for the bioremediation of PLA contaminated environment. **[Methods]** The degrading bacterium was identified by 16S rRNA gene sequencing. Scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were employed to analyze the morphological and chemical changes of PLA films before and after degradation. **[Results]** A strain of *Bacillus* sp. JA-4 was screened from activated sludge, and it caused the PLA weight loss of 10.6% after 30 days. The weight loss of PLA reached 5.6% after incubation with the strain at an inoculation amount of 20%, pH 8.0, and 30 °C for 7 days. Gelatin significantly enhanced the biodegradation of PLA. In the presence of 3% gelatin, the weight loss of PLA reached 23.1% after 10 days of degradation, and the degradation rate was greatly increased. FTIR results indicated that *Bacillus* sp. JA-4 degraded PLA by hydrolyzing the ester bonds. **[Conclusion]** This study enriched the microbial resources for the biodegradation of PLA and provided technical support for the effective degradation of PLA waste in the environment. **Keywords:** polylactic acid; screening; biodegradation; *Bacillus* sp. JA-4; weight loss

随着全球范围内对塑料材料需求的持续增长，塑料产量呈稳步上升趋势^[1-2]。然而，由于传统塑料如聚乙烯和聚丙烯，在自然条件下的分解能力极为有限，因而塑料废弃物所引发的环境污染问题也日趋严重。为了应对“白色污染”问题，积极研发和推广生物可降解塑料变得至关重要。在众多生物可降解塑料中，聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 以其高强度和高弹性模量的优势，被认为是最有潜力替代石油基塑料的候选材料之一^[3]。

PLA 是一种以淀粉作为原料的聚酯类可生物降解材料^[4]，具有易于制造、无毒、生物相容性优异、机械强度高和热塑性良好等优良特性^[5-8]，使得 PLA 在包装材料、农业薄膜以及一次性餐具等产业中得到了广泛应用^[9]。然而，PLA 虽然是生物可降解塑料，但其在自然环境中生物降解速率较为缓慢。Apinya 等^[10]发现，当将 PLA 置于不含特定降解菌的土壤环境中时，经过 60 d 的自然降解，其失重率仅为 4.8%。Richert 等^[11]的研究也显示，当 PLA 暴露于海水或河水中时，其降解效果同样非常有

限。由此可见，PLA 的自然降解速率十分缓慢。

目前生物降解是处置 PLA 废弃物的较有效且环保的处理方法之一。在 PLA 的降解过程中，某些特定的微生物能够分泌胞外解聚酶对 PLA 的分子内酯链进行有效解聚，生成低聚物、二聚物以及单体等中间产物，并进一步被分解为二氧化碳、水或甲烷等^[12]，最终实现废弃物的自然循环。目前的研究表明，土壤或水体中确实存在一些可以降解 PLA 的微生物，但以放线菌为主，细菌和真菌较少。Pranamuda 等^[13]从土壤中筛选出一株可降解 PLA 的放线菌拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis* sp.) HT-32，14 d 后 PLA 降解率约为 60%。Nakamura 等^[14]也从土壤中筛选获得了 2 种放线菌 *Amycolatopsis* sp. K104-1 和 *Amycolatopsis* sp. K104-2，并进一步从 *Amycolatopsis* sp. K104-1 的培养上清液中成功纯化了 PLA 的解聚酶 PldB，在这种酶的催化下 PLA 降解率高达 90%。然而，目前能够降解 PLA 的细菌种类较少，大部分属于嗜热菌^[9]，而且已知的 PLA 降解酶大部分为蛋白酶类^[15-17]。

Bubpachat 等^[18]从土壤和污泥中成功筛选出了帕万氏寡养单胞菌(*Stenotrophomonas pavanii*) CH1 和膝形假单胞菌(*Pseudomonas geniculata*) WS3, 将其接种于含有 PLA 的培养液中发现, 培养液中蛋白酶浓度迅速增加, 并且 PLA 失重率也随之增大, 表明蛋白酶浓度与 PLA 的降解效果之间具有一定的相关性。

生物可降解塑料虽然已成为石油基塑料的潜在替代品, 但生物可降解塑料的废弃物依然会对人类、生物多样性和生态系统造成与传统塑料同样的危害。因此, 如何获得降解性能优良且应用性强的 PLA 降解菌、如何提高其降解效率, 以及存在怎样的降解机理仍是目前需要解决的问题。本研究从活性污泥中筛选可有效降解 PLA 的细菌, 并对其生长特性和降解特性开展研究, 通过考察影响降解的因素来寻找提高 PLA 降解效果的途径。同时, 对 PLA 的微生物降解机理展开初步探讨。因此, 本研究以期通过筛选出的可有效降解 PLA 塑料制品的细菌菌株, 开展细菌对聚乳酸的微生物降解特性研究, 为消除 PLA 废弃物对环境的影响提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

PLA 薄膜由山东联丰塑料制品有限公司提供, 薄膜厚度为 20 μm 。活性污泥由合肥市某污水处理厂提供。

1.2 培养基

无机盐培养基(g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20, NaCl 0.01, CaCl_2 0.02, KH_2PO_4 1.00, K_2HPO_4 1.00, NH_4NO_3 1.00, FeCl_3 0.05, pH 7.2–7.4, 添加 PLA 薄膜(2.00 g/L)为唯一碳源。诱导培养基: 在无机盐培养基中添加不同种类及不同浓度的诱导物。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取

物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.2–7.4。添加 20.0 g/L 的琼脂即为固体培养基。

1.3 菌种的分离纯化

将活性污泥静置分层后取上清液 10 mL, 接种至 100 mL LB 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 1 d 后, 取 10 mL 菌液加至 100 mL 无机盐培养基中振荡培养。PLA 薄膜需提前用乙醇溶液浸泡 4 h, 并置于紫外线下灭菌。培养 7 d 后吸取 10 mL 菌液转接至 100 mL 新鲜的无机盐培养基中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 进行传代培养。每 7 d 传代一次, 共传代 3 次, 每组设置 3 个重复。将最后一次传代后的培养液依次做 5、10、50、100 倍梯度稀释, 将各稀释液分别涂布于 LB 固体培养基上进行培养。通过常规的平板划线法, 反复纯化直至获得纯菌株, 完成初筛。

分别将初筛所得各菌株接种于 LB 液体培养基中, 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床上振荡培养 1 d。将培养后的菌液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液, 用无菌水洗涤菌体两次, 制备成 OD_{600} 为 1.0 的菌悬液。取上述菌悬液 2 mL 接种于 20 mL 无机盐培养基中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养。30 d 后取出 PLA 薄膜, 经超声波清洗后烘干称重, 比较不同菌株的降解效果, 确定可有效降解 PLA 的优良菌株进行后续实验, 降解效果以 PLA 薄膜的失重率进行评估。

失重率测试: 将 PLA 薄膜于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干 4 h, 准确称取质量为 M_0 的 PLA 薄膜。降解实验结束后收集残留的 PLA 薄膜, 经超声清洗、60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 4 h 后准确称重记为 M_1 , 根据 M_0 和 M_1 之差与 M_0 的比值计算 PLA 膜的失重率。以不接种的无机盐培养基为对照。

1.4 PLA 降解菌的鉴定

将筛选获得的菌株送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 提取细菌基因组 DNA, 利用 PCR 扩增单菌落的 16S rRNA 基因

序列,引物为 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(25 μL): 2 \times Phanta Max Mix (P515) 12.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。经过扩增产物纯化、DNA 测序、序列比对等步骤后得到序列。将测序获得的序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对,选取相似度最高的参考序列并下载,通过 MEGA 7 软件的程序进行序列的裁剪和比对,使用 neighbor-joining 法构建系统发育树,所选模型为 Kimura 2-parameter model, Bootstrap 重复次数设置为 1 000 次。将菌株的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 获得 GenBank 登录号。

1.5 不同条件下的菌株生长曲线的测定

1.5.1 菌悬液的制备

将所筛选菌株接种至 LB 培养基中富集培养 1 d,取菌液离心,弃去上清液,用无菌水洗涤菌体,然后用无菌水将菌悬液 OD_{600} 调至 1.0 作为接种液。

1.5.2 生长曲线的测定

取适量上述菌悬液分别加入到不同 pH 值的无机盐培养基中,接种量为 20% (体积分数),pH 分别设定为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 20 d。在 pH 8.0、接种量 20% 的条件下,培养温度分别设定为 15、20、25、30、35 $^{\circ}\text{C}$,在 180 r/min 培养 20 d。在 pH 8.0 条件下,接种量分别设定为 5%、10%、15%、20%,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 20 d。上述实验均为每隔 5 d 取样测定 OD_{600} ,绘制生长曲线。

1.6 PLA 降解条件的优化

1.6.1 pH、温度、接种量条件的优化

菌悬液的制备方法如前所述。将无机盐培养

基的 pH 分别设定为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0,接种量为 20%,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 7 d,测定 PLA 膜的失重率。在 pH 为 8.0、接种量为 20% 的条件下,培养温度分别为 15、20、25、30、35 $^{\circ}\text{C}$,在 180 r/min 振荡培养 7 d,测定 PLA 薄膜的失重率。在 pH 为 8.0 的条件下,接种量分别为 5%、10%、15%、20% (体积分数),在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 7 d,测定 PLA 薄膜的失重率。综合培养基 pH、接种量、温度等因素,确定 PLA 微生物降解的最适条件。

1.6.2 诱导物的影响

在 100 mL 无机盐培养基中,分别加入质量分数为 2% 的明胶、十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、酵母粉、蛋白胨和干酪素,将预先制备的菌悬液接种至灭菌后的无机盐培养基中振荡培养 10 d,测定 PLA 膜的失重率。以不添加诱导物的降解体系作为对照。

1.7 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察

将降解前和降解后的 PLA 膜均用无菌水洗净并烘干,经表面喷金后使用超高分辨扫描电子显微镜(Regulus 8230)观察 PLA 膜表面的表面形貌变化。

为观察菌株在薄膜上的附着情况,将降解 20 d 后的薄膜进行如下处理:用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)洗涤样品 2 次,然后用 2.5%戊二醛处理 8 h,随后用 50%、70%、80%、90%、95%乙醇各处理 60 min,再用 100%乙醇处理 120 min,最后将样品自然晾干、蒸金,通过 SEM 观察膜表面细菌的附着情况。

1.8 傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)分析

将降解后的 PLA 膜用无菌水清洗烘干后,除去塑料表面的杂质,以降解前的薄膜作为对照,利用傅里叶变换红外光谱仪(BRUKER 公

司), 以 4 cm^{-1} 的分辨率和 $500\text{--}4\,000 \text{ cm}^{-1}$ 的频率范围对 PLA 膜表面官能团进行表征。

2 结果与分析

2.1 PLA 降解菌的筛选结果

将初筛所得的 18 株菌分别进行预培养, 然后分别接种于含 PLA 膜的无机盐培养基中, 30 d 后将 PLA 薄膜清洗烘干后称其质量, 根据 PLA 失重率评估不同菌株的降解效果。结果如图 1 所示, PLA 失重率最大的是菌株 JA-4, 失重率为 10.6%。

2.2 16S rRNA 基因序列测定及系统发育树构建

将测序结果在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 发现与菌株 JA-4 相似性在 99% 以上的均为芽孢杆菌属(*Bacillus*), 其中菌株 JA-4 与高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*)的相似性高达 100%。

从系统发育树(图 2)也可看出, 菌株 JA-4 与芽孢杆菌属具有稳定的亲缘关系。因此, 可确定所筛选的菌株 JA-4 为 *Bacillus* 中的一员, 序列已在 GenBank 中注册(登录号为 PP.594155.1), 在本研究将其命名为 *Bacillus sp. JA-4*。

2.3 *Bacillus sp. JA-4* 的生长特性

在不同的初始 pH 值、温度和接种量条件下, 将 *Bacillus sp. JA-4* 置于以 PLA 为唯一碳源的无机盐培养基中进行生长曲线的测定。如图 3 所示, 在 pH 5.0–9.0 范围内, pH 8.0 是该菌的最适生长 pH (图 3A)。在 15–35 °C 温度范围内, 温度较高显然更利于该菌的生长, 30 °C 和 35 °C 对生长的影响差别较小(图 3B)。*Bacillus sp. JA-4* 的生长量随接种量的增大而增大(图 3C)。因此, 后续的研究均在接种量 20%、pH 8.0、30 °C 条件下进行。

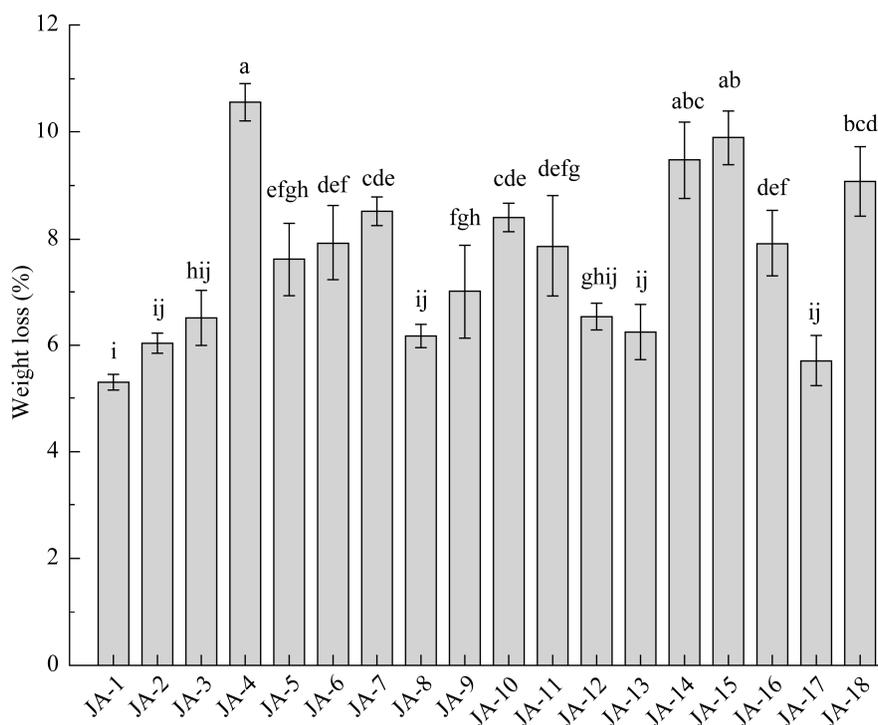


图 1 PLA 在 18 株筛选细菌作用下的失重率

Figure 1 Weight loss of PLA by 18 screened bacteria. Different lowercase letters indicated significant differences between groups ($P < 0.05$).

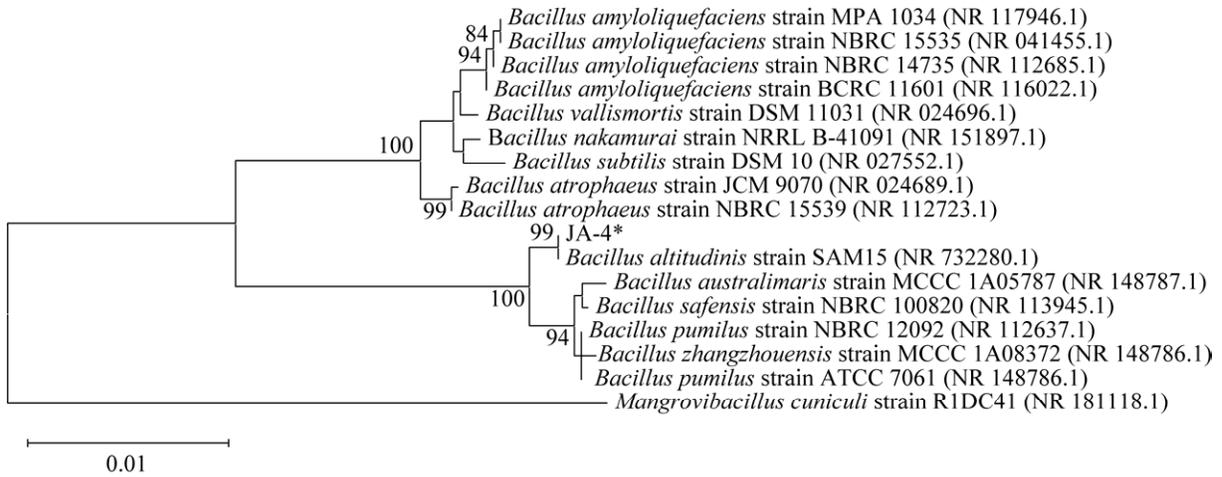


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 JA-4 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain JA-4 based on 16S rRNA gene sequences. *: Labeled the strain screened. The serial number in brackets is the GenBank accession number of the strain, and the value of 0.01 represents the sequence deviation value. The number on the branch point represents the confidence value.

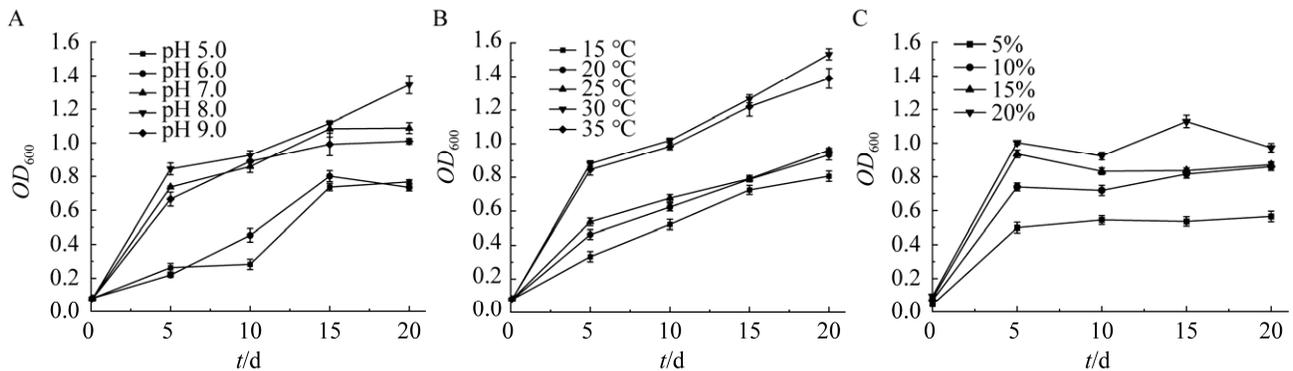


图 3 不同条件下 *Bacillus sp.* JA-4 的生长曲线

Figure 3 Growth curves of *Bacillus sp.* JA-4 under different conditions. A: The growth curves under different pH. B: The growth curves under different temperature. C: The growth curves under different inoculation amounts.

2.4 *Bacillus sp.* JA-4 对 PLA 的降解特性

2.4.1 pH、温度、接种量等因素对降解的影响

PLA 的降解速率不仅与其自身的物理化学性质密切相关,还受到诸如 pH 值、温度、培养时间以及菌体接种量等因素的影响。这些因素通

过影响微生物的生长和产酶能力,进而调控 PLA 的降解过程。在摇床转速设定为 180 r/min 的条件下,通过依次改变培养基 pH 值、温度和接种量,探究这些因素对降解 PLA 的影响。经过 7 d 的培养后,测得的 PLA 失重率如图 4A-4C 所示。

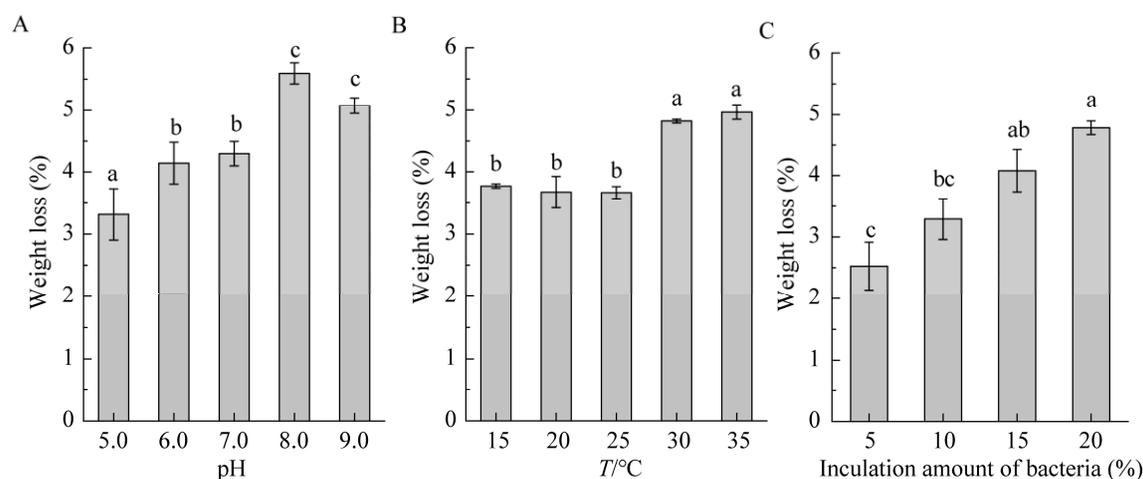


图 4 不同因素对 *Bacillus sp. JA-4* 降解 PLA 的影响

Figure 4 Effects of different factors on PLA degradation by *Bacillus sp. JA-4*. A: The effects of different pH. B: The effects of different temperature. C: The effects of different inoculation amounts. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between groups ($P < 0.05$).

由图 4A 可知,培养基初始 pH 值对 *Bacillus sp. JA-4* 降解 PLA 具有明显的影响。在 pH 5.0–9.0 范围内,PLA 膜的失重率先增大后减小,在 pH 8.0 时失重率最大,为 5.6%。由此可见,pH 过低或过高都会抑制 *Bacillus sp. JA-4* 对 PLA 的生物降解,而且略微碱性的环境更利于 PLA 的降解。图 4B 显示,在 15–25 °C 的温度范围内,温度的变化对 PLA 生物降解的影响并不显著,而在 30 °C 和 35 °C 时 PLA 膜的失重率有明显提高,35 °C 时 PLA 膜的失重率达到了 4.8%。这表明对于 *Bacillus sp. JA-4*,较高的温度有利于 PLA 的生物降解。由图 4C 可见,随着接种量从 5% 增加到 20% (体积分数),PLA 膜的失重率呈现出递增的趋势。当接种量为 20% 时,*Bacillus sp. JA-4* 对 PLA 降解效果最好,降解 7 d 后失重率为 5.0%,高于其他接种量条件下的失重率。

2.4.2 诱导物对 PLA 生物降解的影响

为考察诱导物对 *Bacillus sp. JA-4* 降解 PLA 的影响,选取了明胶、十二烷基磺酸钠(SDS)、酵母粉、蛋白胨和干酪素作为诱导物。降解 10 d

后,各种诱导物对 PLA 生物降解的影响如图 5A、5B 所示。

从图 5A 可看出,与对照 CK (仅含 PLA 膜的无机盐培养基)相比,5 种诱导物在不同程度上均对 PLA 的生物降解有促进作用。其中促进作用最显著的诱导物是明胶,10 d 后 PLA 膜的失重率即达到了 18.5%,远远高于其他诱导物对 PLA 生物降解的影响,与对照相比失重率提高了 12.7%,而其他 4 种诱导物对 PLA 生物降解的促进作用较弱。

由于明胶对 PLA 的生物降解有明显的促进作用,因此为了更好地提高 PLA 的降解效果,考察了明胶的不同添加量即明胶在降解体系中的浓度对 PLA 失重率的影响。明胶浓度分别为 0%、1%、2%、3%,降解时间取为 10 d。

由图 5B 可见,与不含明胶的对照相比,在含有明胶的降解体系中,第 1 天 PLA 的失重率即迅速上升,随后失重率虽仍然保持增大的趋势但逐渐变缓。同时还发现,当降解相同时间时,随着明胶浓度的增加,PLA 的失重率也呈上升趋势。当明胶浓度从 1% 增加至 3% 时,第 10 天

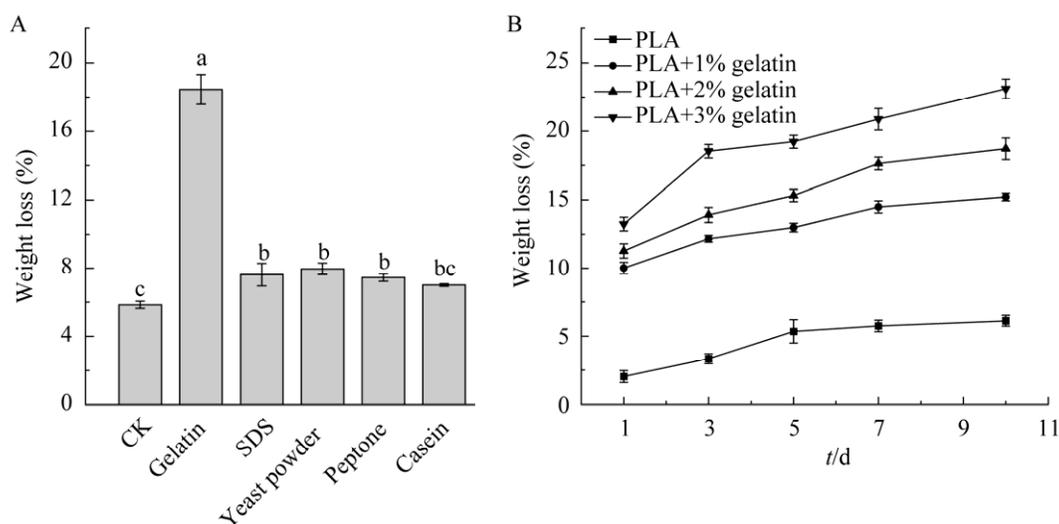


图 5 诱导物对 *Bacillus sp. JA-4* 降解 PLA 的影响

Figure 5 Effects of inducers on PLA degradation by *Bacillus sp. JA-4*. A: Effects of different inducers on PLA degradation by *Bacillus sp. JA-4*. B: Effects of gelatin concentrations on PLA degradation by *Bacillus sp. JA-4*. Different lowercase letters indicate statistically significant differences between groups ($P < 0.05$).

失重率达到了 23.1%，相较于对照组，提高了约 1.5 倍。此实验结果为进一步提高 PLA 膜的降解效果提供了有益启示。

2.5 降解前后 PLA 膜的表面形貌变化

采用 SEM 对 PLA 膜在降解前后表面形貌的变化进行评估，包括表面劣化、孔洞形成和裂纹等变化，以此来验证 PLA 的生物降解效果。如图 6 所示，通过 SEM 的观察，可以清晰地看到 PLA 在降解前后发生了形态学变化。图 6A 中未降解的 PLA 表面光滑，而在 *Bacillus sp. JA-4* 的作用下，PLA 膜表面在降解 10 d 后变得粗糙和不平整(图 6B)，表明 PLA 膜已被部分降解。降解 20 d 后表面出现明显的沟痕(图 6C)，裂缝数量也逐渐增多。降解 30 d 后，表面出现明显的裂纹，并碎裂成块状，甚至出现孔洞(图 6D)。这些表面形貌的变化充分表明了 *Bacillus sp. JA-4* 对 PLA 膜具有明显的降解效果。

通过 SEM 对降解 20 d 后 PLA 薄膜表面的细菌附着情况进行观测与分析，结果如图 7 所

示。图 7A 表明 *Bacillus sp. JA-4* 能够黏附在 PLA 薄膜表面并形成生物膜。从图 7B 中可以看到，在附着于薄膜表面的大量微生物的作用下 PLA 薄膜出现明显的裂纹，与图 6C 所呈现的形态一致。这一结果为 PLA 在 *Bacillus sp. JA-4* 作用下的降解提供了证据。

2.6 降解前后 PLA 的化学结构分析

利用 FTIR 光谱分析 PLA 在生物降解前后其化学结构的变化(图 8)。图中 1 260、1 127 和 1 080 cm^{-1} 为酯基团 O=C=O 的拉伸带^[19]，1 708 cm^{-1} 处是羰基 C=O 的特征吸收峰，2 950 cm^{-1} 处为甲基 CH₃ 的对称伸缩振动峰，873 cm^{-1} 是 O-CH-CH₃ 的伸缩振动峰^[20]，737 cm^{-1} 处对应于 CH₃ 的面内摇摆振动峰^[20-21]。与降解前相比，在经过 *Bacillus sp. JA-4* 降解 30 d 后，这些特征吸收峰的强度均有所减弱。此外，波数 3 398 cm^{-1} 处为-OH 特征吸收峰，经过微生物降解后，吸收峰变宽变强，这是由于降解过程中 PLA 分子中的酯键断裂，使得更多的羟基被释放出来所致^[19,22]。

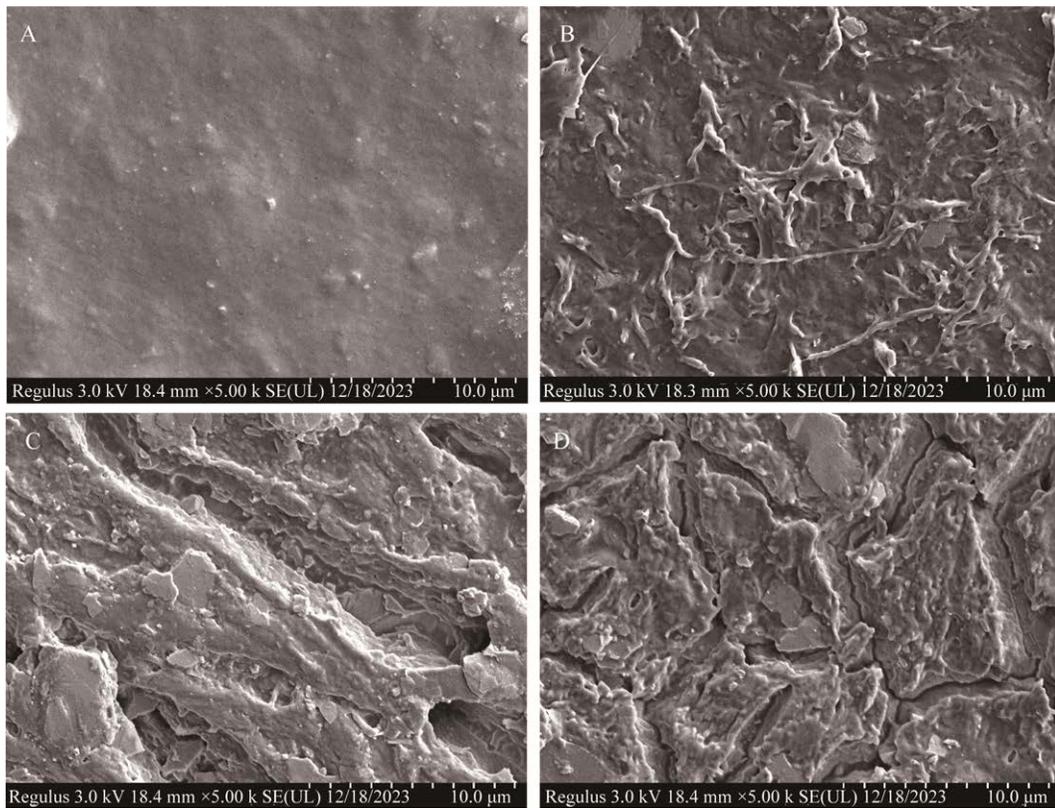


图 6 PLA 膜降解不同时间的扫描电镜图

Figure 6 SEM images of PLA film at different degradation time. A: SEM image of PLA film before degradation. B: SEM image of PLA film after degradation for 10 d. C: SEM image of PLA film after degradation for 20 d. D: SEM image of PLA film after degradation for 30 d.

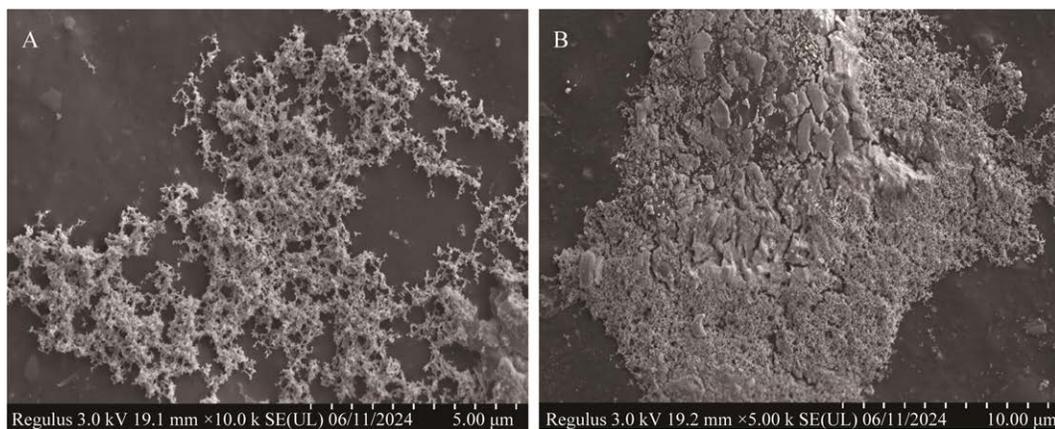


图 7 PLA 膜表面细菌附着情况的 SEM 图

Figure 7 SEM images of bacteria attachment on the surface of PLA membrane. A: SEM image with higher magnification. B: SEM image with lower magnification.

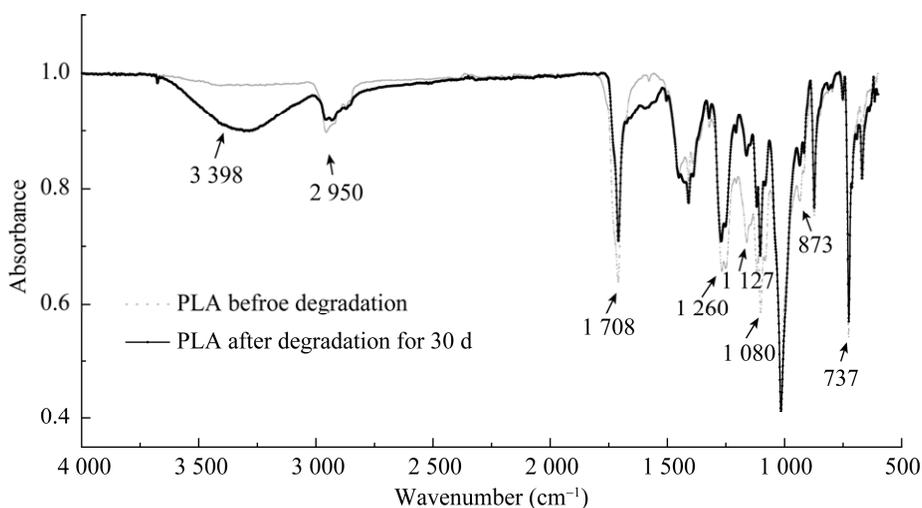


图 8 降解前后 PLA 的 FTIR 图谱

Figure 8 FTIR spectra of PLA film before and after degradation.

3 讨论与结论

尽管聚乳酸(PLA)作为一种生物可降解塑料, 但其在环境中的自然降解过程却十分缓慢。较慢的降解速率和较低的降解效率成为制约 PLA 广泛应用的关键因素之一。因此, PLA 降解菌的有效选育以及深入开展 PLA 微生物降解特性的研究, 对于推动 PLA 的广泛应用具有重要意义。

本研究从活性污泥中筛选出一株具有降解 PLA 能力的菌株 *Bacillus* sp. JA-4, 经过 30 d 的降解, PLA 的失重率为 10.6% (优化前)。关于芽孢杆菌属对 PLA 的降解已有报道, Wang 等^[23]从垃圾填埋场中分离出了一种 PLA 降解菌沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*), 该菌株在与 PLA 薄膜共同孵育 30 d 后, 表现出约 8% 的失重率。Yu 等^[24]研究了解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)对 PLA 的降解特性, 将该菌与 PLA 膜共同置于土壤环境中, 60 d 后 PLA 膜失重率为 7.8% 左右。本研究为进一步提高 *Bacillus* sp. JA-4 对 PLA 的降解能力, 对该菌的生长特性及降解特性展开了研究。

Bacillus sp. JA-4 在 pH 8.0, 温度为 30 °C 以

及接种量为 20% 的条件生长状况较好。*Bacillus* sp. JA-4 的最适生长 pH 为 8.0, 表明该菌倾向于在偏碱性的环境中生长繁殖。实验中采取了相对较高的接种量, 主要是因为 PLA 作为聚合物较难被微生物利用, 而 PLA 又是微生物生长的唯一碳源, 充足的生物量是 PLA 有效降解的必要保障。实验结果也表明, 生物量随着接种量的增大而增长。

影响 *Bacillus* sp. JA-4 降解 PLA 的主要因素包括初始 pH 值、温度以及接种量。*Bacillus* sp. JA-4 在 30–35 °C 时对 PLA 的降解效果最好, 这一现象与该菌在 30–35 °C 范围内良好的生长状况具有正相关性。在所考察的温度范围内, 35 °C 时 PLA 的失重率和降解速率均达到最佳水平。随着接种量从 5% 增加到 20% (体积分数), PLA 的失重率呈现出递增趋势。结合 *Bacillus* sp. JA-4 的生长特性进行分析, 推测这一现象主要是由于菌体生物量增多所致。

外界环境的 pH 值会对细胞膜上的氧化还原电位产生显著影响, 并进一步作用于微生物摄取外界营养物质的能力。研究发现, 在酸性环境下 *Bacillus* sp. JA-4 降解 PLA 的能力相对较差。然而, 在碱性环境中, 特别是在 pH 值为 8.0 的条

件下, 该菌株对 PLA 的降解能力大幅提高。作为一种脂肪族聚酯, PLA 降解酶主要是蛋白酶。尤其是碱性丝氨酸蛋白酶, 在 PLA 降解过程中表现出卓越的降解活性^[25]。根据李荣秋^[26]的研究结果证实, 碱性环境下氢氧根离子可有效催化 PLA 分子中的酯键水解, 从而加速 PLA 的水解进程。本研究的这一结果也可能与降解菌所分泌的碱性蛋白酶在碱性环境中能更好地维持其活性有关^[27]。因此, 碱性条件下 PLA 的生物降解有可能是碱水解和酶水解协同作用的结果, 这一推测与 Mistry 等^[28]的研究基本一致。然而, *Bacillus* sp. JA-4 是否产蛋白酶还有待于进一步证实。

诱导物的加入在不同程度上均对 PLA 的生物降解具有促进作用, 其中明胶的促进作用最为显著。分析其原因可能来自两个方面, 首先, 由于 PLA 的分子结构特点, 在培养初期 PLA 不易被微生物作为生长底物而直接利用, 而诱导物的加入为菌体提供了生长初期所需的碳氮源, 从而促进了微生物的生长。贾文倩等^[27]的研究报道也证实了加入明胶、胰蛋白胨等诱导物后, 巨型芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的培养液中菌体浓度均有所提高。其次, 根据崔婧等^[29]的研究发现, 诱导物能够刺激菌体产生更多的降解酶, 这些降解酶能够加速催化 PLA 降解, 从而提高降解速率。此外, 这种降解作用可能是浓度依赖型, 即需要在较高的酶浓度下才能有效降解 PLA^[30]。在所考察的 5 种诱导物中, 明胶对 PLA 生物降解的促进作用优于其他诱导物。这一发现与其他研究者的报道相一致。有研究者指出^[31-33], 明胶与 PLA 在结构上的相似性可能是其对微生物降解 PLA 具有诱导作用的关键因素之一。实验还发现, 在一定浓度范围内, 明胶的添加量与 PLA 的降解能力、降解速率之间均存在正相关性。据

文献报道, 明胶具有与 L-丙氨酸相似的结构, 这一特点与 PLA 中 L-乳酸单元的手性碳立体化学位置相吻合, 这种相似性可导致破坏这类结构的解聚酶的产生^[34-37]。

通过电镜观察发现, 随着降解时间的延长, PLA 表面由原来的光滑平整逐渐变得粗糙甚至出现孔洞, 直观地呈现了 PLA 的降解效果。此外, 还观察到在降解过程中, *Bacillus* sp. JA-4 会大量黏附在 PLA 薄膜表面形成生物膜并造成表面损伤, 证实了 *Bacillus* sp. JA-4 的降解能力。利用 SEM 观察评价薄膜的宏观改性, 如薄膜表面的劣化、裂纹和孔洞的形成, 并指示微生物的定殖及 PLA 的降解程度, 是一种聚合物生物降解的评价方法。贾文倩等^[27]在研究巨型芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)对 PLA 的降解中也发现, 该菌能够在 PLA 薄膜表面生长, 由于微生物的黏附和代谢作用, PLA 薄膜变脆。对 FTIR 红外光谱进行分析发现, 降解后的一些特征吸收峰均发生了变化, 尤其是羟基的吸收峰变宽且强度增大。这一现象可以解释为, 在降解过程中, PLA 分子中的酯键发生断裂, 从而释放出较多的羟基。FTIR 图谱在降解前后的变化不仅为 *Bacillus* sp. JA-4 降解 PLA 提供了证据, 而且从机理上证明了 PLA 的降解过程应归因于酯键的断裂。

本研究从活性污泥中筛选获得一株 PLA 降解菌 *Bacillus* sp. JA-4, 研究发现 pH、温度和接种量等因素对 PLA 的生物降解具有一定的影响, pH 8.0 和 30 °C 条件下降解效果较好, 随着接种量的增大 PLA 的失重率呈上升趋势。降解体系中加入适量明胶, 不仅大大提高了 PLA 的降解效果, 而且加快了降解速率。SEM 观察和 FTIR 光谱分析表明, *Bacillus* sp. JA-4 能够有效催化 PLA 中的酯键断裂, 从而实现对 PLA 的良好降解。本研究结果为环境中 PLA 废弃物的原

位修复提供了新的菌源和理论依据。

作者贡献声明

张静：实验及论文撰写；吴涓：论文修改和润色；窦月芹：文献调研；徐杰：数据处理。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] GEYER R, JAMBECK JR, LAW KL. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700782.
- [2] LEBRETON L, ANDRADY A. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal[J]. *Palgrave Communications*, 2019, 5(1): 6.
- [3] VOZNYAK Y, MORAWIEC J, GALESKI A. Ductility of polylactide composites reinforced with poly(butylene succinate) nanofibers[J]. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 2016, 90: 218-224.
- [4] BASTIOLI C, BETTARINI F. 6. General characteristics, processability, industrial applications and market evolution of biodegradable polymers[M]//*Handbook of Biodegradable Polymers*. Berlin: De Gruyter, 2020: 147-182.
- [5] FARAH S, ANDERSON DG, LANGER R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications: a comprehensive review[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 107: 367-392.
- [6] LIM LT, AURAS R, RUBINO M. Processing technologies for poly(lactic acid)[J]. *Progress in Polymer Science*, 2008, 33(8): 820-852.
- [7] RASAL RM, JANORKAR AV, HIRT DE. Poly(lactic acid) modifications[J]. *Progress in Polymer Science*, 2010, 35(3): 338-356.
- [8] DOMENEK S, COURGNEAU C, DUCRUET V. 8. Characteristics and applications of poly(lactide)[M]//*Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications*. Massachusetts: Salem, 2011: 183-223.
- [9] KARAMANLIOGLU M, PREZIOSI R, ROBSON GD. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): a review[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2017, 137: 122-130.
- [10] APINYA T, SOMBATSOMPOP N, PRAPAGDEE B. Selection of a *Pseudonocardia* sp. RM423 that accelerates the biodegradation of poly(lactic acid) in submerged cultures and in soil microcosms[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 99: 23-30.
- [11] RICHERT A, DAJBROWSKA GB. Enzymatic degradation and biofilm formation during biodegradation of polylactide and polycaprolactone polymers in various environments[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 176: 226-232.
- [12] MULBRY W, REEVES JB, MILLNER P. Use of mid- and near-infrared spectroscopy to track degradation of bio-based eating utensils during composting[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 109: 93-97.
- [13] PRANAMUDA H, TOKIWA Y, TANAKA H. Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1637-1640.
- [14] NAKAMURA K, TOMITA T, ABE N, KAMIO Y. Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from a soil isolate, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 345-353.
- [15] HANPHAKPHOOM S, MANEEWONG N, SUKKHUM S, TOKUYAMA S, KITPREECHAVANICH V. Characterization of poly(L-lactide)-degrading enzyme produced by thermophilic filamentous bacteria *Laceyella sacchari* LP175[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2014, 60(1): 13-22.
- [16] LEE SH, KIM IY, SONG WS. Biodegradation of polylactic acid (PLA) fibers using different enzymes[J]. *Macromolecular Research*, 2014, 22(6): 657-663.
- [17] LEE SH, YEO SY. Improvement of hydrophilicity of polylactic acid (PLA) fabrics by means of a proteolytic enzyme from *Bacillus licheniformis*[J]. *Fibers and Polymers*, 2016, 17(8): 1154-1161.
- [18] BUBPACHAT T, SOMBATSOMPOP N, PRAPAGDEE B. Isolation and role of polylactic acid-degrading bacteria on degrading enzymes productions and PLA biodegradability at mesophilic conditions[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2018, 152: 75-85.
- [19] BRDLÍK P, BORŮVKA M, BĚHÁLEK L, LENFELD P. Biodegradation of poly(lactic acid) biocomposites under controlled composting conditions and freshwater biotope[J]. *Polymers*, 2021, 13(4): 594.
- [20] WANG X, PENG SX, CHEN H, YU XL, ZHAO XP. Mechanical properties, rheological behaviors, and phase morphologies of high-toughness PLA/PBAT

- blends by *in situ* reactive compatibilization[J]. Composites Part B: Engineering, 2019, 173: 107028.
- [21] BOONPAVANITCHAKUL K, JARUSSOPHON S, PIMPHA N, KANGWANSUPAMONKON W, MAGARAPHAN R. Silk sericin as a bio-initiator for grafting from synthesis of polylactide *via* ring-opening polymerization[J]. European Polymer Journal, 2019, 121: 109265.
- [22] 贾昊, 张敏, 翁云宣, 李成涛. 聚乳酸降解菌的分离鉴定及其产酶和降解特性[J]. 精细化工, 2020, 37(3): 507-514.
JIA H, ZHANG M, WENG YX, LI CT. Isolation and characterization of polylactic acid-degrading bacteria and their enzyme production and degradation characteristics[J]. Fine Chemicals, 2020, 37(3): 507-514 (in Chinese).
- [23] WANG YJ, HU T, ZHANG WT, LIN JW, WANG ZY, LYU SX, TONG HB. Biodegradation of polylactic acid by a mesophilic bacteria *Bacillus safensis*[J]. Chemosphere, 2023, 318: 137991.
- [24] YU J, KIM PD, JANG Y, KIM SK, HAN J, MIN J. Comparison of polylactic acid biodegradation ability of *Brevibacillus brevis* and *Bacillus amyloliquefaciens* and promotion of PLA biodegradation by soytone[J]. Biodegradation, 2022, 33(5): 477-487.
- [25] 王战勇, 王玉俊, 张婉婷, 林景卫, 高嵩. 聚乳酸的生物降解[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(2): 1-9.
WANG ZY, WANG YJ, ZHANG WT, LIN JW, GAO S. Biodegradation of polylactic acid[J]. Journal of Microbiology, 2023, 43(2): 1-9 (in Chinese).
- [26] 李荣秋. 聚乳酸薄膜的降解行为及其降解性能快速检测方法研究[D]. 绵阳: 西南科技大学硕士学位论文, 2016.
LI RQ. Study on degradation behavior of polylactic acid film and rapid detection method of its degradation performance[D]. Mianyang: Master's Thesis of Southwest University of Science and Technology, 2016 (in Chinese).
- [27] 贾文倩, 高飞, 周虹池, 钱方, 吕艳娜. 芽孢杆菌应用于聚乳酸的降解及其降解条件的研究[J]. 塑料科技, 2022, 50(2): 68-72.
JIA WQ, GAO F, ZHOU HC, QIAN F, LÜ YN. Application of *Bacillus* species to degradation of polylactic acid and its degradation conditions[J]. Plastics Science and Technology, 2022, 50(2): 68-72 (in Chinese).
- [28] MISTRY AN, KACHENCHART B, WONGTHANAROJ A, SOMWANGTHANAROJ A, LUEPROMCHAI E. Rapid biodegradation of high molecular weight semi-crystalline polylactic acid at ambient temperature *via* enzymatic and alkaline hydrolysis by a defined bacterial consortium[J]. Polymer Degradation and Stability, 2022, 202: 110051.
- [29] 崔婧, 翟丽华, 时东方, 陈珊. 巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)产聚乳酸降解酶条件的研究[J]. 长春师范大学学报, 2015, 34(12): 50-53.
CUI J, ZHAI LH, SHI DF, CHEN S. Study on the conditions of producing polylactic acid degrading enzyme by *Bacillus megaterium*[J]. Journal of Changchun Normal University, 2015, 34(12): 50-53 (in Chinese).
- [30] 李凡, 王莎, 刘巍峰, 陈冠军. 聚乳酸(PLA)生物降解的研究进展[J]. 微生物学报, 2008, 48(2): 262-268.
LI F, WANG S, LIU WF, CHEN GJ. Progress on biodegradation of polylactic acid: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(2): 262-268 (in Chinese).
- [31] SUKKHUM S, TOKUYAMA S, KITPREECHAVANICH V. Development of fermentation process for PLA-degrading enzyme production by a new thermophilic *Actinomyces* sp. T16-1[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2009, 14(3): 302-306.
- [32] BOGDANOVA A, PAVLOVA E, POLYANSKAYA A, VOLKOVA M, BIRYUKOVA E, FILKOV G, TROFIMENKO A, DURYMANOV M, KLINOV D, BAGROV D. Acceleration of electrospun PLA degradation by addition of gelatin[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(4): 3535.
- [33] 林娟, 周景文, 康振, 堵国成, 陈坚. 聚乳酸降解菌株筛选鉴定及降解过程优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1560-1569.
LIN J, ZHOU JW, KANG Z, DU GC, CHEN J. Isolation, identification of poly lactic acid degrading microorganisms and optimization of the degradation process[J]. Microbiology China, 2013, 40(9): 1560-1569 (in Chinese).
- [34] LIANG P, LIU SY, XU F, JIANG SQ, YAN J, HE QG, LIU WB, LIN CH, ZHENG FC, WANG XF, MIAO WG. Powdery mildews are characterized by contracted carbohydrate metabolism and diverse effectors to adapt to obligate biotrophic lifestyle[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3160.
- [35] MAYEKAR PC, AURAS R. Speeding it up: dual effects of biostimulants and iron on the biodegradation of poly(lactic acid) at mesophilic conditions[J]. Environmental Science Processes & Impacts, 2024, 26(3): 530-539.
- [36] TSUJI H, IKARASHI K. *In vitro* hydrolysis of poly(L-lactide) crystalline residues as extended-chain crystallites: II. effects of hydrolysis temperature[J]. Biomacromolecules, 2004, 5(3): 1021-1028.
- [37] MASAKI K, KAMINI NR, IKEDA H, IEFUJI H. Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7548-7550.