

• 研究报告 •

董维亮 博士，南京工业大学生物与制药工程学院教授、硕士生导师、新农村发展研究院副院长。主要研究方向为废弃物全细胞催化及高值化转化，在 *ACS Sustain Chem Eng*、*Appl Environ Microb*、*Biotechnol Bioeng*、*Small*、*Biotechnol Adv*、*Trends Biotechnol* 等国际专业期刊发表学术论文 60 余篇，累计他引 469 次；申请中国发明专利 14 件（授权 5 件）；参与撰写学术专著 4 部，英文章节 2 篇；获中国石油和化学工业联合会技术发明奖二等奖 1 项，入选江苏省六大人才高峰。



一株聚氨酯降解菌的分离及其降解特性解析

何洁^{1*}，徐安明^{1*}，刘嘉唯¹，周杰¹，崔中利²，董维亮¹，姜岷¹

1 南京工业大学 生物制药与工程学院，江苏 南京 211816

2 南京农业大学 生命科学学院，江苏 南京 210095

何洁，徐安明，刘嘉唯，等. 一株聚氨酯降解菌的分离及其降解特性解析. 生物工程学报, 2021, 37(10): 3675-3684.

He J, Xu AM, Liu JW, et al. Isolation and characterization of a polyurethane-degrading bacterium. Chin J Biotech, 2021, 37(10): 3675-3684.

摘要：利用微生物对聚氨酯 (Polyurethane, PUR) 类污染物进行生物降解是目前的研究热点之一。寻找能高效降解聚氨酯的微生物是该类研究的重要前提。文中从塑料垃圾填埋场中分离培养了 1 株 PUR 高效降解菌株 P10。基于菌落形态观察和 16S rDNA 系统发育分析，鉴定其为短芽孢杆菌属 *Brevibacillus* 的细菌。通过 PUR 的模式底物水性聚氨酯 (Impranil DLN) 比浊法，确定了该菌株能在 6 d 内降解 71.4% 的 Impranil DLN。此外，菌株 P10 能够利用商业聚氨酯海绵作为唯一碳源进行生长；通过降解条件的优化，在 5% (V/V) LB 作为额外碳源的辅助下实现了 6 d 内对 50 mg PUR 泡沫的降解。以上结果表明 *Brevibacillus* sp. P10 在聚氨酯废弃物的生物降解过程中具有一定的应用潜力。

关键词：聚氨酯，塑料污染，生物降解，短芽孢杆菌

Received: June 1, 2021; **Accepted:** August 12, 2021

Supported by: National Key R&D Program of China (No. 2019YFA0905500), National Natural Science Foundation of China (No. 21978129).

Corresponding author: Weiliang Dong. E-mail: dwl@njtech.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家重点研发计划 (No. 2019YFA0905500)，国家自然科学基金 (No. 21978129) 资助。

Isolation and characterization of a polyurethane-degrading bacterium

Jie He^{1*}, Anming Xu^{1*}, Jiawei Liu¹, Jie Zhou¹, Zhongli Cui², Weiliang Dong¹, and Min Jiang¹

¹ College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

² College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: Biodegradation of polyurethane (PUR) pollutants by microorganisms has received widespread attention currently. Identification of microorganisms capable of efficiently degrading PUR plastics is a key point. In this study, a strain P10 capable of degrading PUR was isolated from the plastic wastes, and identified as a bacterium belonging to the genus of *Brevibacillus* based on colony morphology and 16S rDNA phylogenetic analysis. *Brevibacillus* sp. P10 was capable of degrading 71.4% of waterborne polyurethane (Impranil DLN) after 6 days growth in MSM medium with DLN as a sole carbon source. In addition, strain P10 can use commercial PUR foam as the sole carbon source for growth. *Brevibacillus* sp. P10 can degrade 50 mg PUR foam after 6 days growth in MSM medium supplemented with 5% (V/V) LB after optimization of degradation conditions. This indicates that *Brevibacillus* sp. P10 has potential to be used in biodegradation of PUR waste.

Keywords: polyurethane, plastic pollution, biodegradation, *Brevibacillus*

聚氨酯 (Polyurethane, PUR) 是一类衍生自多异氰酸酯和多元醇缩合的聚合物, 主要分为聚酯型和聚醚型两种。通过改变多元醇和异氰酸酯的类型和比例, 可以生产出各种性质的 PUR, 依据选择原料的多元醇分子的不同, PUR 可被划分为聚酯型 PUR 和聚醚型 PUR。PUR 大多数是柔性或硬质泡沫聚合物, 广泛应用于建筑、汽车工业、绝缘材料、纺织涂料和防腐蚀涂料等领域^[1]。据统计, PUR 的使用量占整个塑料使用量的 7.9%, 我国 2019 年的 PUR 使用量约为 5.3 万 t, 较上年增长了 20% 以上^[2]。

对 PUR 的巨大需求将产生等量的固体废物, 其中很大一部分目前未回收利用, 最终被填埋和焚烧。由于大部分 PUR 是热固性聚合物, 自然条件下的不易分解将导致其在环境中保存数百年以上。受环境风力、河流和洋流等外力迁移作用, PUR 废物可能会不断释放环境污染物, 例如 4,4'-亚甲基二苯胺 (MDA)、2,4'-甲苯二胺 (TDA) 和微塑料 (Microplastic) 等。值得注意的是, 这些二胺物质已经被证明具有潜在的“致癌、致突变和生殖毒性”。此外, 相比于肉眼可见的聚氨酯塑料形成的“白色污染”, 肉眼不可见的微塑料

对整个地球系统具有更大的危害。微塑料污染可以通过大气和洋流进行全球循环。根据已有报道, 海产品中存在着大量的微塑料, 微塑料还可以通过植物根际进入植物体内进行运输, 并通过食物链的富集, 转移到动物或人类体内, 最终影响人类健康^[3]。

目前, 使用微生物或酶进行生物降解已成为塑料回收的一种有前景的替代方法^[4]。首先, 利用微生物对 PUR 废弃物进行生物降解的关键在于获得高催化活性的微生物菌株。目前的研究认为, 只有聚酯型 PUR 才具备生物降解的可能性, 聚醚型 PUR 的生物降解鲜有报道^[5]。针对聚酯型 PUR 的生物降解菌株, 已有多株来自 β -变形菌门的假单胞菌 *Pseudomonas protegens* 被报道具有 PUR 生物降解的功能。Howard 等从绿针假单胞菌 *Pseudomonas chlororaphis* 中鉴定得到了第一个具备 PUR 解聚的脂肪酶 PueB^[6]。此外, *Pseudomonas protegens*、恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*、食酸丛毛单胞菌 *Comamonas acidovorans* 等细菌都被发现可以利用类似脂肪酶或酯酶来参与 PUR 塑料的生物降解^[7-9]。近期的一些研究表明, 相对于细菌而言, PUR 更容易受真菌侵袭。

茄病镰刀菌 *Fusarium solani*、嗜酒假丝酵母 *Candida ethanolica*、皱褶假丝酵母 *Candida rugosa* 以及枝孢菌 *Cladosporium* sp. 都被发现具有 PUR 降解的功能^[10-12], 其中多数真菌也是通过脂肪酶和酯酶来发挥 PUR 的解聚功能^[13]。

值得注意的是, 尽管目前在 PUR 生物降解的研究上已经取得了明显进步, 但是多数研究还仅仅依靠平板水解圈来判断菌株 PUR 水解活性的强弱, 这种实验检测手段很容易造成结果的误判。例如, 一些来源于假单胞菌和芽孢杆菌 *Bacillus* sp. 的酯酶能够在可溶性 PUR 平板上形成巨大水解圈, 然而面对商业的 PUR 塑料却无法发挥降解功能^[14]。因此, 在筛选 PUR 高效降解菌株的同时更应该关注菌株对商业 PUR 塑料的评估。本研究从废弃塑料厂分离鉴定出 1 株聚氨酯高效降解细菌 P10, 通过对该菌株降解动力学的检测, 发现该菌株能以 PUR 为唯一碳源进行生长。我们进一步探究了该菌株的系统发育地位及其最适降解条件, 并使用商业聚酯型聚氨酯海绵考察了该菌株的降解活性。研究发现, 菌株 P10 不仅具有非常强的 PUR 模式底物的降解能力, 对商业 PUR 塑料也具有一定的降解效果, 表明菌株 P10 在 PUR 塑料生物降解领域具备一定的开发价值和应用前景。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和 PUR 塑料样品

本研究中使用的菌株 P10 分离自南通海绵制造厂附近的土壤样品, 现为本实验室保存菌株。所使用的 PUR 塑料模式底物水性聚氨酯 (Impranil DLN) 购买自 (Bayer Materials Science, PA), 商业 PUR 海绵购买自南通大工有限公司。

1.1.2 培养基和主要试剂的配置

(1) LB 液体培养基: NaCl 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 在 121 °C 条件下高压灭菌 20 min。用作细菌的保存活化。

(2) 富集培养基 (LD): 含 0.2% (V/V) Impranil

DLN 的 50% (V/V) LB 培养液。

(3) 固体筛选培养基 (MDA): 无机盐培养基 (MSM)——硫酸铵 1 g/L, 十二水合磷酸二氢钾 1.5 g/L, 磷酸氢二钾 1.5 g/L, 二水合氯化钙 0.01 g/L, 七水合硫酸亚铁 0.001 g/L, 七水合硫酸镁 0.2 g/L, 作为基础培养基, 调节 pH 值至 7.0, 加入琼脂 15–20 g/L、121 °C 灭菌 20 min。灭菌后注入 1% (V/V) 的 Impranil DLN。

(4) 液体降解培养基 (MD): 含 0.4% (V/V) Impranil DLN 的无机盐培养基。

(5) 磷酸缓冲液配置 (50 mmol/L pH 7.0): A 液 (NaH₂PO₄·2H₂O 3.12 g), B 液 (Na₂HPO₄·12H₂O 7.17 g), 分别溶于蒸馏水, 定溶至 100 mL。A 液与 B 液按 39 : 61 比例混合, 并稀释成 400 mL。

(6) 本研究所需主要试剂包括: 2.5% (V/V) 戊二醛溶液; 1 mol/L HCl; 1 mol/L NaOH; 水性聚氨酯 (Impranil DLN)。

1.2 试验方法

1.2.1 Impranil DLN 降解菌的富集与分离

称取 5 g 采自南通海绵制造厂周边的土壤接入 50 mL 0.2% (V/V) Impranil DLN 的富集培养基 (LD) 中, 置于 30 °C、180 r/min 恒温摇床振荡培养 2 d。吸取 5 mL 富集培养液转接至 50 mL 新鲜富集培养液中, 继续富集培养 2 d。将对 Impranil DLN 富集的菌液按 10³–10⁶ 倍梯度稀释后, 分别涂布于筛选平板 (MDA), 37 °C 倒置培养 4–5 d。挑选水解透明圈显著且大的菌落, 另在空白的筛选平板上三区划线, 单菌落即为能够利用 Impranil DLN 的降解菌株, 命名为 P10。

1.2.2 形态特征鉴定

肉眼观察降解菌在 1% (V/V) 的 Impranil DLN 固体平板上 (MDA) 的菌落形状、颜色、透明度、隆起和边缘特征。

离心收集肉眼可见的细胞沉淀芝麻至绿豆大小, 弃培养基后用磷酸盐缓冲液轻轻漂洗后, 加 2.5% (V/V) 戊二醛电镜固定液, 并将细胞吹打开

悬浮于固定液内, 室温固定 2 h, 再转移至 4 °C 保存。将固定好的样品经 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 漂洗 3 次, 每次 15 min。再用 30%、50%、70%、80%、90%、95% (V/V) 的酒精和乙酸异戊酯依次脱水 15 min。将样本放入临界点干燥仪内进行干燥。处理后的样品紧贴于导电碳膜双面胶上放入离子溅射仪样品台上进行喷金 30 s 左右。在扫描电子显微镜下观察采图。

1.2.3 16S rDNA 基因序列测定与系统发育分析

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司) 法提取菌体总 DNA。利用 16S rDNA 通用上、下游引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTACCCTGTTACGACTT-3' 扩增 P10 菌株的 16S rDNA 序列, 将所获得的扩增片段进行测序。测序结果与 NCBI 数据库进行比对, 利用 MEGA-X 软件进行多序列比对分析并构建系统发育树。

1.2.4 菌悬液的制备

将菌株接种至 LB 培养基中活化培养 14 h 后, 于 6 000 r/min、4 °C 的条件下离心 10 min。后续用 pH 7.0 的无菌磷酸缓冲溶液, 重悬底部菌团使其分散, 再次离心去除原始培养基, 重复此步骤 2 次, 最后一次加 PBS 后, 涡旋分散, 不离心, 稀释菌悬液 (无菌 PBS 为对照), 使其在 600 nm 处的 OD 值为 0.7-0.8。

1.2.5 Impranil DLN 标准曲线的建立

采用紫外分光光度法对 MSM 培养基中 Impranil DLN 的浓度进行定量测定。以不加 Impranil DLN 底物的空白 MSM 培养基为对照品, 含 Impranil DLN 的 MSM 混合溶液则为测试样品。配置浓度梯度为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% (V/V) 的 MSM-DLN 混合溶液, 分别稀释 5 倍后, 在特征吸收波长 400 nm^[8] 下测定不同浓度的吸光度值 (OD 值), 并以 Impranil DLN 溶液浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.2.6 Impranil DLN 降解率计算

将制备好的菌悬液先按初始比例 10% (V/V)

接入 50 mL 的降解培养基 (MD) 中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 6 d, 同时设置 3 个实验组及 3 个统一空白组 (无菌接入)。平均每 24 h 取样, 10 000 r/min 离心 1 min 后稀释 5 倍, 在特征吸收波长 400 nm 下用紫外分光光度计测定 Impranil DLN 的吸光度值 (OD 值), 同时以无底物无机盐培养液比色调零。根据标准曲线的拟合方程计算培养基中 Impranil DLN 的浓度。

1.2.7 菌株对 Impranil DLN 的降解研究

通过单因素实验法, 将制备好的菌悬液, 按初始比例 10% (V/V) 分别接入不同 pH (4.0-9.0) 的降解培养基 (MD) 中, 连续振荡培养 36 h, 分别根据在特征波长 600 nm 和 400 nm 下测定的 OD 值, 绘制菌种的生长曲线和降解曲线, 来确定 Impranil DLN 对菌株生长的影响, 以及培养过程中菌株对 Impranil DLN 的降解情况。

1.2.8 菌株对聚酯型聚氨酯海绵的降解研究

称取 0.3 g 左右的海绵, 分别倒入 pH 5.0、80 mL 的无机盐培养基和含有 5% (V/V) LB 的无机盐培养基中, 并同时于 121 °C 下灭菌 20 min。将制备好的菌悬液按 10% (V/V) 的比例分别接种到已灭菌的海绵降解培养基中。在 30 °C、180 r/min 培养 6 d, 同时设置 3 个实验组及 3 个统一空白组 (无菌接入)。6 d 后取出海绵, 用 5% (V/V) 的次氯酸钠溶液浸泡 4 h 并超声 2 h 以除去菌体, 无菌水每 10 min 润洗一遍除去残留的次氯酸钠, 之后放入 60 °C 烘箱烘至恒重, 称取并记录降解后的干重。利用扫描电镜观察海绵的表面形态和菌体附着情况, 进一步呈现菌株 P10 对海绵的降解程度。

2 结果与分析

2.1 Impranil DLN 降解菌株的筛选及分离

为了筛选获得具有潜在 PUR 降解功能的菌株, 我们选择了可溶性的 PUR 模式底物 Impranil DLN 作为筛选材料。对取自塑料厂附近的污染土壤经过驯化和富集后, 采用如图 1A 所示的筛选

分离手段,获得1株有效降解 Impranil DLN 的菌株 P10。在温度 30 °C 和 pH 7.0 条件下, P10 能利用 Impranil DLN 作为唯一碳源在 MSM 培养基中生长,并在 24 h 测得菌株的最大生长密度 (OD_{600}) 为 3.501 (图 1B)。该菌株在 MDA 平板上的菌落呈乳白色,不透明,形态呈圆形,表面光滑,微微隆起,边缘整齐,肉眼可见明显的水解圈 (图 1C)。扫描电镜下观察到菌体细胞呈杆状, (0.7–0.9) $\mu\text{m} \times (3–5) \mu\text{m}$, 革兰氏阳性,以周生鞭毛运动 (图 1D)。

2.2 菌株 P10 系统发育地位的鉴定

通过对菌株 P10 的 16S rDNA 序列的比对分析发现,菌株 P10 与美丽短芽孢杆菌 *Brevibacillus formosus*、短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis*、桥石短芽孢杆菌 *Brevibacillus choshinensis* 等多株短芽孢杆菌的同源性大于 98.5%,可以推测菌株 P10

为短芽孢杆菌属细菌。为进一步确定菌株 P10 的系统发育地位,利用 Geneious 和 MEGA 软件对包括菌株 P10 在内的 31 株同源性较高的菌株构建系统发育树。从系统发育树的结果可以看出 (图 2), 菌株 P10 与短芽孢杆菌属的细菌聚在了同一分枝。由于 16S rDNA 的种间分辨率较低,目前还无法通过 16S rDNA 信息对菌株 P10 的种间发育地位进行确定。综合形态学、生理生化特征、16S rDNA 基因序列和系统发育分析,可以确定菌株 P10 为短芽孢杆菌属 *Brevibacillus* sp.。

2.3 短芽孢杆菌 P10 对 PUR 模式底物降解特性的解析

为了探究短芽孢杆菌 P10 对 PUR 模式底物 (DLN) 的降解特性,我们对 DLN 浓度与吸光度值 (400 nm) 间的标准曲线进行了测定。Impranil DLN

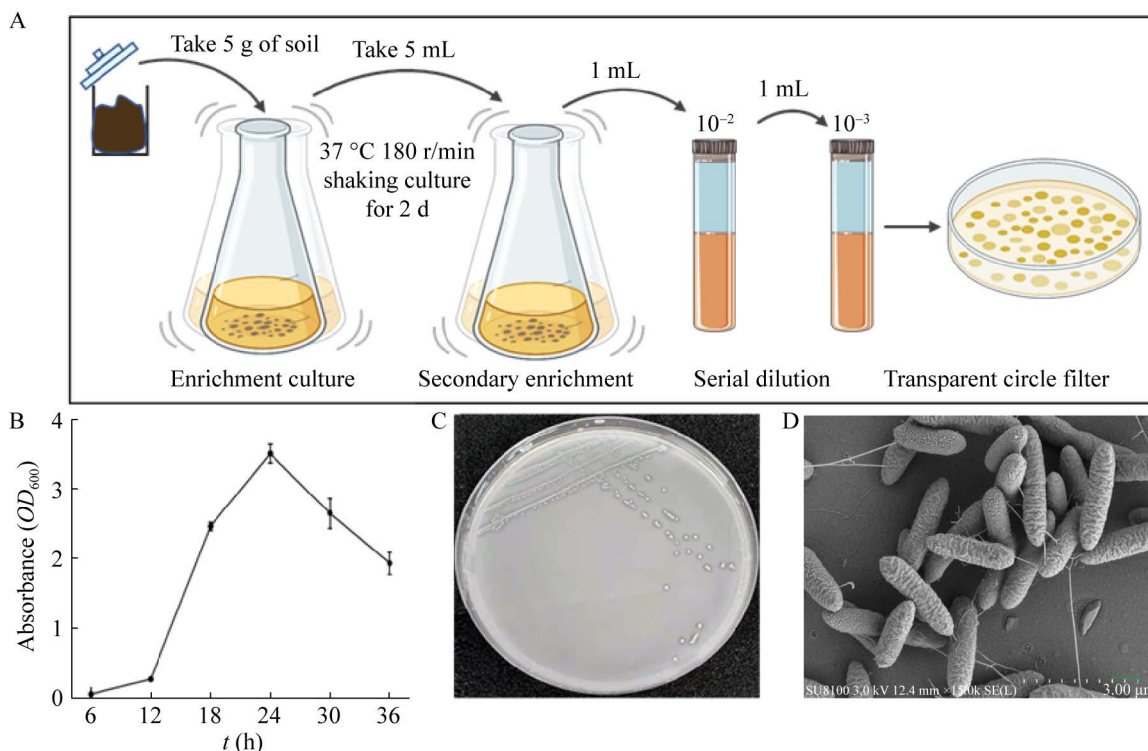


图 1 菌株 P10 的筛选及鉴定

Fig. 1 Screening and identification of *Brevibacillus* sp. P10. (A) Schematic diagram of the process of screening potential PUR-degrading strains using DLN. (B) The growth curve of strain P10. (C) The colony morphology of strain P10 on MSM plate containing 1% (V/V) Impranil DLN. (D) SEM image of strain P10 (12.4 mm×5.00 K).

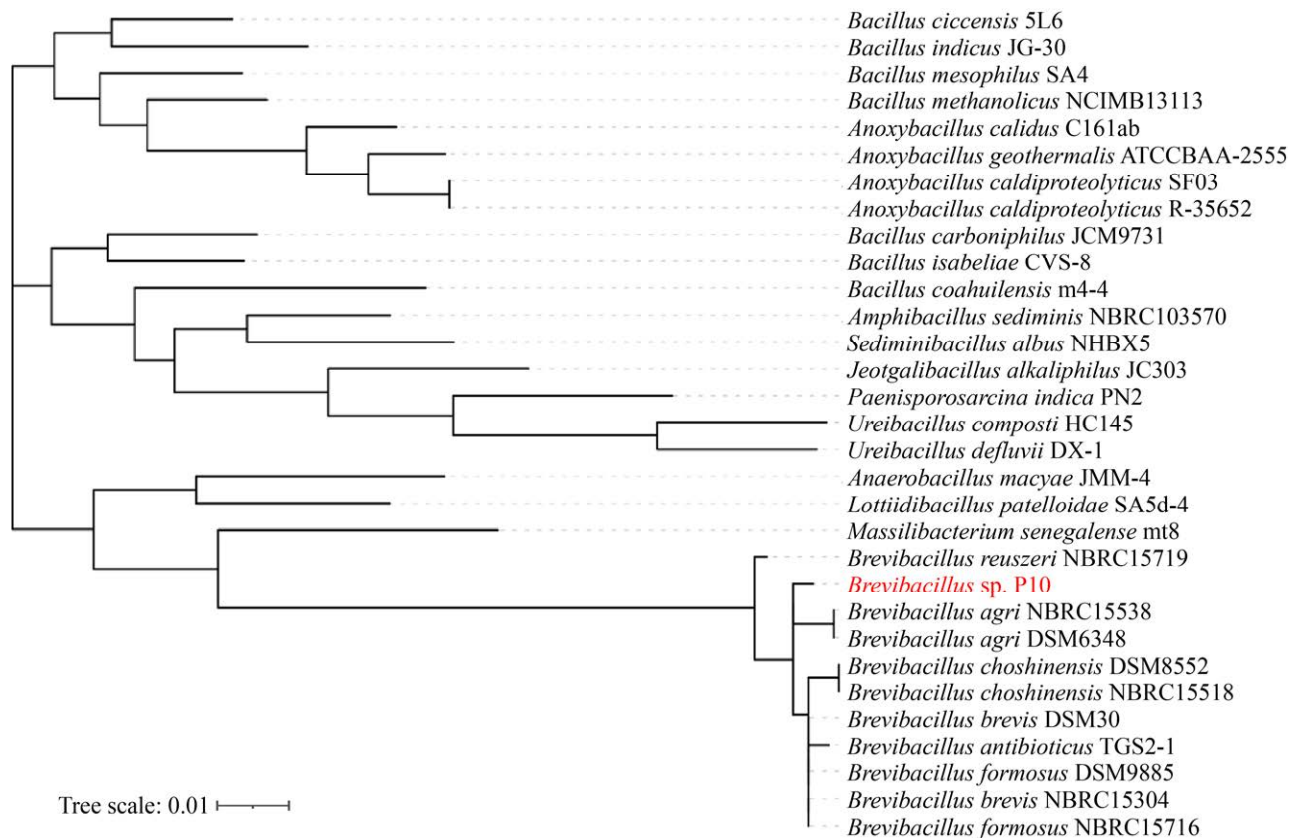


图 2 菌株 P10 的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences.

的标准曲线拟合方程有较好的线性关系, Impranil DLN 浓度与吸光度的线性方程为 $y=7.114 2x+0.083 5$ 。由于 DLN 具有一定的生理毒性, 我们首先评估了菌株对不同浓度 DLN 的耐受性。通过设置不同的 DLN 浓度梯度, 比较了菌株 P10 在 6 d 内对 DLN 的降解率。图 3A 中我们发现随着 DLN 浓度的升高, 菌株 P10 对 DLN 的降解率呈现逐渐下降趋势。当 DLN 浓度为 0.2% (V/V) 时, P10 可实现对 86% DLN 的降解, 然而对于浓度为 2% (V/V) 的 DLN, 菌株的降解率仅为 20%。当 DLN 的浓度为 0.4% (V/V) 时, P10 在 6 d 内即可完成对 65% DLN 的降解。底物浓度过低时会导致碳源不足, 限制菌株生长; 而浓度过高一方面会对微生物产生毒性, 一方面又会使氮磷等营养元素缺乏导致营养比例失衡, 也会使微生物生长受到抑

制进而导致降解率下降。因此我们选取 0.4% (V/V) 浓度开展了后续的实验。

pH 是影响微生物生长的重要因素之一, 我们探究了不同 pH 对 P10 降解 DLN 水平的影响。由图 3B 可知, 菌株 P10 的最适降解 pH 为 5.0。在 pH 4.0–6.0 条件下, 其对 Impranil DLN 的降解率显著提升, 24 h 就已达到 32.1%。尤其是在 pH 为 5.0 时, Impranil DLN 的降解率达到最高点 71.4%, 远远高于碱性条件下的降解率, 说明菌株 P10 适合在酸性的自然环境中发挥高效的降解水平。后续实验中, 我们考察了菌株 P10 在 DLN 浓度为 0.4% (V/V)、pH 为 5.0 条件下的降解动力学 (图 3C)。由图可知, 随着培养时间的延长, 菌株对 DLN 的降解水平逐渐减缓, 大约在第 6 天时 DLN 的降解趋于最高值。

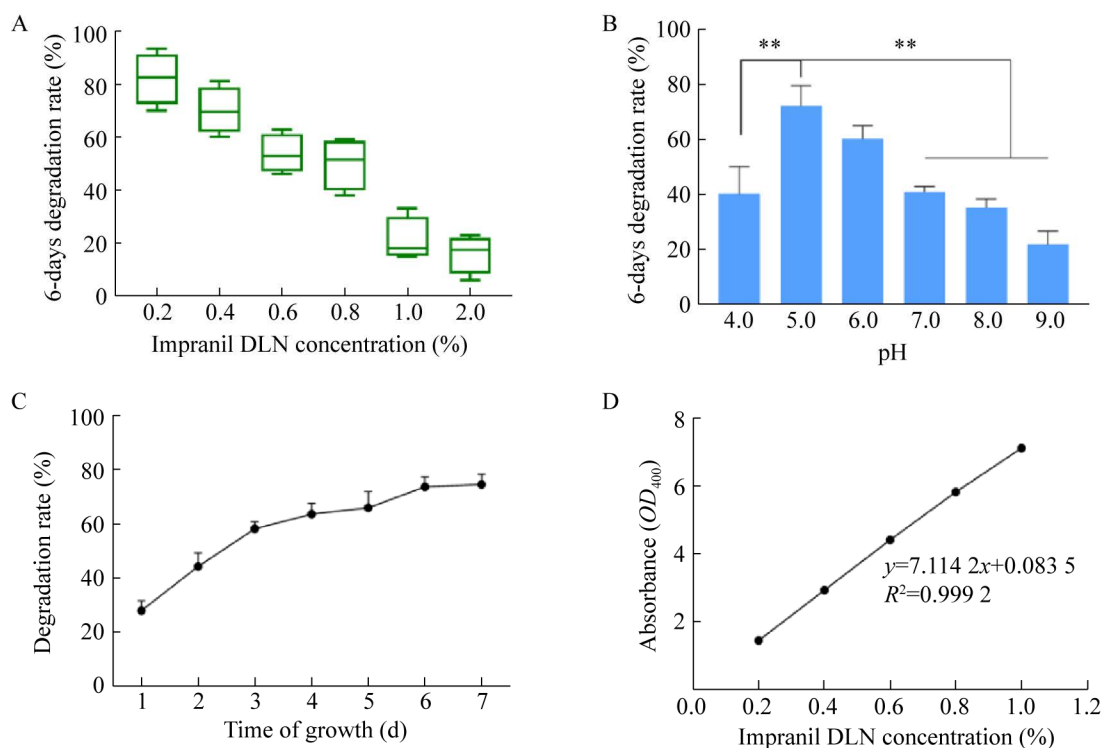


图3 菌株 P10 对 Impranil DLN 的降解特性

Fig. 3 Impranil DLN degradation of *Brevibacillus* sp. P10. (A) Tolerance of P10 to different concentrations of DLN. (B) pH optimization for P10 degradation of DLN. (C) Degradation kinetics of P10 to 0.4% (V/V) DLN. (D) The standard curve between DLN concentration and its absorbance.

2.4 最优条件下海绵的降解效果

在前面的实验中,我们探究了 P10 对 PUR 模式底物 Impranil DLN 的降解特性,菌株 P10 能够以 DLN 为唯一碳源进行生长,并表现出良好的降解特性。我们进一步探究了 P10 对商业聚酯型 PUR 泡沫的降解。在本研究中,根据图 4A 显示,在培养的一周内实验组和对对照组均有质量损失。虽然在以海绵为唯一碳源时, P10 对海绵的降解率达到 20 mg,但在加入 5% (V/V) LB 后 P10 对海绵的降解率得到提升,达到 50 mg,表明 P10 能够利用海绵作为碳源进行生长,且更需要易于获得的碳源来维持其生长和触发 PUR 的生物降解能力。此外,经细菌处理后,在聚酯型聚氨酯海绵的微观结构中也观察到降解的证据。对照组表面平整(图 4B),与对照组相比,实验组不仅看起来被菌丝体生长的物理作用所破坏,而且网状结

构更稀疏粗糙,更多孔(图 4C)。在第 6 天,聚酯型 PUR 海绵表面已经布满了菌体细胞及其导致的大小不一的侵蚀坑(图 4D),推测此为 P10 菌株利用该聚酯型 PUR 作为碳源进行生长。

3 讨论

由微生物介导的塑料降解技术是解决塑料环境污染的有效途径。文献已经报道了很多能降解或转化 PUR 的微生物^[15]。Shah 等的研究发现,枯草芽孢杆菌 MZA-75 和铜绿假单胞菌 MZA-85 都能以聚酯型 PUR 薄膜为唯一碳源生存,并在 30 d 内将其质量减少 50 mg^[16-17]。此外,很多真菌也被发现可以降解聚酯型 PUR, Mathur 等的研究中黄曲霉 *Aspergillus flavus* 菌株能以聚酯型 PU 薄膜为唯一碳源,并在 30 d 内,使其质量损失达到 60.6%^[18]。在聚酯型 PUR 的微生物降解方面,普遍

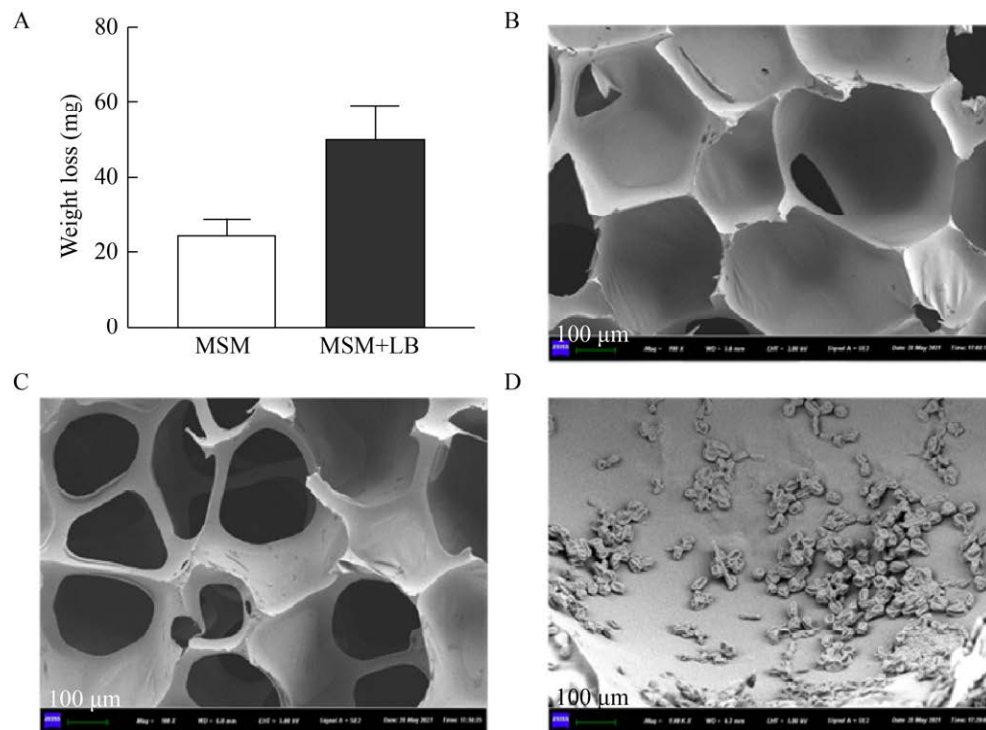


图 4 菌株 P10 对海绵降解效果检测

Fig. 4 PUR foam degradation by *Brevibacillus* sp. P10. (A) The weight loss of PUR foam after 6-days degradation by strain P10. SEM images of the ultrastructure of PUR foam before (B) and after (C) degradation by strain P10. (D) SEM image of *Brevibacillus* sp. P10 grown on PUR foam.

来看真菌的降解效率高于细菌的降解效率^[19]。在这项工作中,我们报告了 1 株能够以 PUR 模拟底物 Impranil DLN 作为生长的唯一碳源并将其高效降解的短芽孢杆菌 P10。通过对 DLN 降解特性的研究,发现低浓度的 Impranil DLN 有利于该菌株生长代谢,当浓度超过 0.6% (V/V) 后会显著降低 P10 的降解能力。目前,短芽孢杆菌作为一种新型嗜热短杆菌在微生物降解塑料废物的应用研究中逐渐被熟知。例如, Sinosh 等筛选出的短芽孢杆菌系列能够在 140 d 内使聚乙烯和聚丙烯衍生物质量损失 50%^[20]; Hwang 等通过使用新型生物过滤器获得了短芽孢杆菌一天内对苯乙烯 3 kg/m³ 的高消除能力^[21]。但是,关于该菌株降解聚氨酯塑料的研究甚少,特别是对商业聚氨酯塑料来说。

因此,本研究又考察了菌株 P10 对聚酯型聚氨

酯海绵的降解水平,发现该菌株也能够利用 PUR 海绵作为唯一碳源进行生长,并在一周内使海绵的质量损失达到 20 mg。为了提高降解率,额外添加的共代谢碳源 LB,使 PUR 海绵的质量损失高达 50 mg。从单位时间内的降解效果来看,P10 菌株对聚氨酯的降解能力稍强于其他研究中的降解菌株。在 Gunawan 等的研究中显示了在堆肥和土壤中培养的聚酯型聚氨酯泡沫每周能被藻类微生物降解 5.8% 左右^[22]。同样地,在 Álvarez-Barragán 的工作中,聚醚型聚氨酯泡沫在 50% (V/V) 的马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB) 中与 6 种不同的枝孢菌一起培养 3 周后的重量损失范围为 35%–65%^[10]。由于聚氨酯成分复杂,加之每项研究中所使用的降解底物均不同,培养条件也不同,因此降解效率也有差别,导致不同研究间的可比性较差。

微生物对 PUR 塑料的降解在很大程度上受其分泌或表面结合的水解酶作用介导,例如酯酶、脲酶、蛋白酶和酰胺酶^[5]。尽管 Impranil DLN 和 PUR 泡沫的组成成分不同,但氨基甲酸酯和酯基团是所有聚氨酯中最常见的成分。因此,在利用 DLN 为唯一碳源生长的过程中,检测上清中酯酶、脲酶和蛋白酶等相关水解酶的表达情况将进一步验证该菌株是否可以分泌水解酶对 DLN 进行水解。在后续的研究中,我们将进一步对菌株 P10 参与 PUR 塑料降解的关键酶和关键解聚产物的代谢途径进行解析,阐明菌株 P10 降解 PUR 塑料的分子机制。

REFERENCES

- [1] Seymour RB, Kauffman GB. Polyurethanes: a class of modern versatile materials. *J Chem Educ*, 1992, 69(11): 909.
- [2] 2020–2025 年中国 PUR 热熔胶行业应用市场需求及开拓机会研究报告 [EB/OL]. [2020-07-15]. <https://zhuanlan.zhihu.com/p/347578922>.
- [3] Černá T, Pražanová K, Beneš H, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in aged and unaged polyurethane microplastics in contaminated soil. *Sci Total Environ*, 2021, 770: 145254.
- [4] Wierckx N, Prieto MA, Pomposiello P, et al. Plastic waste as a novel substrate for industrial biotechnology. *Microb Biotechnol*, 2015, 8(6): 900-903.
- [5] Mahajan N, Gupta P. New insights into the microbial degradation of polyurethanes. *RSC Adv*, 2015, 5(52): 41839-41854.
- [6] Howard GT, Crother B, Vicknair J. Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (pueB) from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2001, 47(3): 141-149.
- [7] Hung CS, Zingarelli S, Nadeau LJ, et al. Carbon catabolite repression and impranil polyurethane degradation in *Pseudomonas protegens* strain Pf-5. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(20): 6080-6090.
- [8] Peng YH, Shih YH, Lai YC, et al. Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. *Environ Sci Pollut Res*, 2014, 21(16): 9529-9537.
- [9] Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martinez S, et al. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr*, 2002, 41(4): 153-160.
- [10] Álvarez-Barragán J, Domínguez-Malfavón L, Vargas-Suárez M, et al. Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. *Appl Environ Microbiol*, 2016, 82(17): 5225-5235.
- [11] Zafar U, Houlden A, Robson GD. Fungal communities associated with the biodegradation of polyester polyurethane buried under compost at different temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(23): 7313-7324.
- [12] Russell JR, Huang J, Anand P, et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(17): 6076-6084.
- [13] Mathur G, Prasad R. Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) isolated from soil. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 167(6): 1595-1602.
- [14] Biffinger JC, Barlow DE, Cockrell AL, et al. The applicability of Impranil® DLN for gauging the biodegradation of polyurethanes. *Polymer Degradation Stability*, 2015, 120: 178-185.
- [15] Liu J, He J, Xue R, et al. Biodegradation and up-cycling of polyurethanes: progress, challenges, and prospects. *Biotechnol Adv*, 2021, 48: 107730.
- [16] Shah Z, Hasan F, Krumholz L, et al. Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GC-MS. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2013, 77: 114-122.
- [17] Shah Z, Krumholz L, Aktas DF, et al. Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil

- bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75. Biodegradation, 2013, 24(6): 865-877.
- [18] Osman M, Satti SM, Luqman A, et al. Degradation of polyester polyurethane by *Aspergillus* sp. strain S45 isolated from soil. J Polym Environ, 2018, 26(1): 301-310.
- [19] Danso D, Chow J, Streit WR. Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. Appl Environ Microbiol, 2019, 85(19): e01095-19.
- [20] Skariyachan S, Patil AA, Shankar A, et al. Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants. Polym Degrad Stab, 2018, 149: 52-68.
- [21] Hwang JW, Choi CY, Park S, et al. Biodegradation of gaseous styrene by *Brevibacillus* sp. using a novel agitating biotrickling filter. Biotechnol Lett, 2008, 30(7): 1207-1212.
- [22] Gunawan NR, Tessman M, Schreiman AC, et al. Rapid biodegradation of renewable polyurethane foams with identification of associated microorganisms and decomposition products. Bioresour Technol Rep, 2020, 11: 100513.

(本文责编 陈宏宇)