

PLA 对土壤微生物生长的影响 及 PLA 的生物降解性

王 敏¹ 秦春君¹ 于 海^{1*} 谷成业¹ 吴德峰² 张 明²

(1. 扬州大学食品科学与工程学院, 扬州 225127; 2. 扬州大学化学化工学院, 扬州 225001)

摘 要 从不同土壤环境中筛选出的 4 类不同土壤微生物 91 株, 分别标记为细菌、固氮菌、分解纤维素菌和放线菌。然后通过将定量的聚乳酸(PLA)分别加入对应液态培养基中, 恒温(30℃)摇床培养, 连续测定这 4 类不同的土壤微生物对 PLA 的降解性能以及该种聚合物对各种微生物生长的影响。结果表明, 虽然在自然界中 PLA 的降解率比较高, 但不同类型的土壤微生物对 PLA 的降解性能却存在明显个体差异。在测试期内, 放线菌对于 PLA 的总降解率最高; 而细菌中 RB-4 的日降解率最高, 达到 3% 左右; 纤维分解菌 HX-8 及固氮菌 RG-28 的日降解率能达到 2.4%。PLA 降解产物对于细菌及纤维分解菌的抑制性普遍较强。

关键词 土壤微生物 PLA 生长 生物降解 影响

中图分类号 X53 文献标识码 A 文章编号 1673-9108(2012)11-4240-05

Effect of polylactic acid (PLA) on growth of edaphon and biodegradation property of PLA

Wang Min¹ Qin Chunjun¹ Yu Hai¹ Gu Chengye¹ Wu Defeng² Zhang Ming²

(1. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China;

2. College of Chemistry Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract Ninety-one strains were isolated from different soil samples in four different parts. These microorganisms were classified as bacteria, azotobacter, cellulose decomposing bacteria and actinomycetes. Then PLA were added to the corresponding liquid medium to determine the effect of those four kinds of different soil microorganisms on the degradation of PLA and the effect of PLA on the growth of various microorganisms. The results indicated that different types of microbials showed significant difference of the degradation ability on PLA. During the test period, the total degradation rate of PLA to Actinomycetes was the highest, and the degradation ability of RB-4 was at the highest rate of around 3%. The average degradation ability of both HX-8 and RG-28 could reach 2.4% everyday. The degradation products of PLA had a strong inhibition to bacteria and cellulolytic bacteria in general.

Key words edaphon; PLA; growth; biodegradation; effect

20 世纪 50 年代, 美国杜邦公司首先由乳酸制得丙交酯, 然后进行开环聚合制成聚乳酸。聚乳酸(PLA)是一种新型可降解材料^[1], 其分解温度为 170~230℃, 热稳定性好, 可塑性强^[2]。由 PLA 制成的产品具有生物降解、生物相容性、光泽度、透明性和耐热性好等优点, 而且还具有一定的耐菌性、阻燃性和抗紫外性等功能, 因此用途很广, 可用作包装材料、纤维和非织造物等, 目前在服装(内衣、外衣)、产业(建筑、农业、林业、造纸)和医疗卫生等领域应用相当广泛^[3-8]。PLA 制品废弃后在土壤或水中, 会自动在微生物、水、酸和碱的作用下彻底地分

解成为二氧化碳和水^[9,10]。PLA 虽然有如上所述优点并且产量逐年呈倍数增长, 但其降解周期长的缺点也同时显露出来, 并且降解产物对于土壤微生物的影响还有待于进一步研究。进入 21 世纪以来, 随着人们环保意识的提高以及 PLA 性质改良技术的不断进步, PLA 在新型材料中的应用及对于提高

基金项目: 2009 年江苏省环境材料与工程重点实验室项目

收稿日期: 2011-07-21; 修订日期: 2011-09-07

作者简介: 王敏(1985~), 男, 硕士研究生, 主要从事食品微生物的研究工作。E-mail: 5202wangmin@163.com

* 通讯联系人, E-mail: haiyu0078@163.com

PLA 降解率的研究等都已经引起了国内外学者的极大兴趣。

土壤微生物是生活在土壤中的细菌、真菌、放线菌和藻类等微生物的总称,通常 1 g 土壤中有 $10^6 \sim 10^9$ 个,其种类和数量随成土环境及其土层深度的不同而变化,它们能促进土壤中物质的分解和养分的转化。土壤微生物一般以细菌数量最多,放线菌其次,此外还有酵母、霉菌等。细菌又可分为固氮菌、纤维分解菌等。在现有条件下,废弃 PLA 包装材料的处理以土壤掩埋为主^[11],而经土壤掩埋的 PLA 材料经过自然的理化作用,主要被土壤微生物降解。但对于自然条件下的土壤菌群微生物,PLA 材料的降解速率比较慢,造成大量废弃 PLA 塑料的堆积,进而影响环境。并且,PLA 的降解产物还可能破坏土壤中的菌群结构,进而不利于 PLA 材料的持续性降解。

国内外关于生物降解材料的研究大多侧重于通过 PLA 材料的改性以提高降解效果^[12],而少有从微生物角度研究材料对于微生物自身生长繁殖的影响以及各种微生物的降解差异性的研究^[13]。本课题组从微生物方面研究各种土壤微生物菌株对材料的降解性差异以及 PLA 的降解产物对于各种土壤微生物的影响,筛选出降解率比较高并且具有较强耐 PLA 降解产物的菌株数株,为高效复合降解菌株及其酶液在 PLA 降解方面的应用和未来的研究工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要材料

聚乳酸(PLA)颗粒(比利时 Solvay 公司):1.0 g/25 粒,摩尔质量约为 60 000 g/mol,密度为 1.38 g/cm³

实验室自有菌株:筛选自扬州市不同土壤环境(分别取自花圃园 H、稻田 R、土路 L 表层以下 20 ~ 40 cm 深度土样)的细菌(B)、固氮菌(G)、分解纤维素细菌(X)、放线菌(F)等土壤微生物(例如 HB-24 表示分离自花圃园土壤的经鉴定并编号为 24 的一株细菌)。

1.1.2 主要试剂

所用试剂均为分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司。

平板筛选培养基:细菌采用牛肉膏蛋白胨培养

基,放线菌采用高氏一号培养基,固氮菌采用阿须贝无氮培养基,纤维分解菌用纤维细菌合成培养基^[14]。

测定降解性能及对微生物的影响所用培养基:细菌、分解纤维素细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基,放线菌用高氏一号培养基,固氮菌用 LB 培养基^[14]。

1.1.3 主要仪器

ZHJH-2109B 水平流超净工作台:上海智城分析仪器制造有限公司;YXQ · SG41 · 280 手提式压力蒸汽灭菌锅:上海医用核子仪器厂;BS210S 电子天平:北京赛多利斯天平有限公司;QYC-2102 全温双层摇床:上海福玛实验设备有限公司;5810/5804R 高速离心机:基因有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PLA 试样材料在降解过程中对微生物的影响

采用混合培养的方法,即将 PLA 定量(2%)^[15]加入液体培养基中混合培养,每天定时连续观察并测定,选取指标测定其对微生物的影响。

细菌、固氮菌和分解纤维素细菌采用分光光度计测吸光度 OD₆₃₀ 的方法,作出菌体浓度变化曲线。放线菌采用摇瓶培养观察其颜色、菌体形态等变化。

各种微生物培养时间分别为:细菌、纤维分解菌和固氮菌 5 d,放线菌 21 d^[9]。

1.2.2 PLA 的降解性能

降解性能实验方法为计算在液体培养条件下加入的 PLA 质量变化率 W。

① $W = [(处理前 X 质量 - 处理前 X 质量) / 处理前 X 质量] \times 100\%$ 。

② 日降解率 $w = 质量变化率 W / 时间 t$

上述公式中的 X 指实验材料 PLA。

1.2.3 数据分析

每次实验进行了 3 次平行,测定结果采用 Microsoft Excel 统计处理,SPSS 统计分析软件进行单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 PLA 试样材料对土壤分离微生物的影响

选取纯化后的细菌 45 株、纤维分解菌 6 株、固氮菌 29 株、放线菌 11 株做摇瓶培养实验,测 OD₆₃₀,绘出生长曲线,并作比较。通过测所培养土

壤微生物悬浮液 OD_{630} , 分析试样材料对土壤分离微生物浓度的影响, 可将影响程度分为 3 类: 一类为促进作用; 一类为抑制作用; 最后一类为无明显影响 (表 1)。由于篇幅限制, 本实验仅选择各类微生物菌群中具有典型实验特征的几株菌作详尽叙述。

表 1 PLA 对于土壤分离微生物的影响
Table 1 Effect of PLA on growth of edaphon

土壤微生物	促进作用 (+)	抑制作用 (-)	无明显影响 (/)	总计
细菌	19 (42.2%)	13 (28.9%)	13	45
纤维分解菌	3 (50%)	2 (33.3%)	1	6
固氮菌	18 (62.1%)	3 (10.3%)	8	29
放线菌	7 (63.6%)	3 (27.3%)	1	11

2.1.1 PLA 试样材料对细菌生长的影响

实验分析可知, PLA 对于细菌有促进作用的有 19 株, 有抑制作用的为 13 株, 无明显影响的有 13 株。选取典型菌株 LB-30、HB-24 作为分析对象。图 1 为试样材料 PLA 对细菌生长影响的典型曲线。

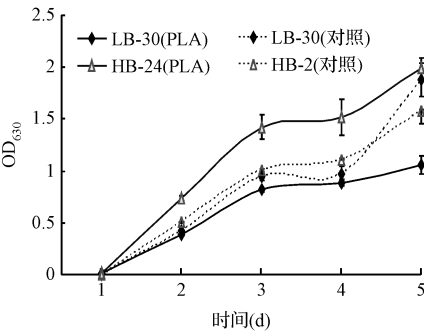


图 1 PLA 对细菌生长影响的典型曲线
Fig. 1 Typical curves of PLA effects on bacteria growth

由图 1 可知, 菌株 LB-30、HB-24 对照组的生长曲线相近, 但加入 PLA 后, PLA 能明显促进菌株 HB-24 的生长, 而对 LB-30 则表现出一定的抑制。加入 PLA 材料对于菌株 LB-30 开始前 4 天无明显作用, 4 d 后具有明显的抑制作用且差异性显著 ($P < 0.05$); 而加入的 PLA 材料则表现出对菌株 HB-24 明显的促进作用 ($P < 0.05$), 并且在第 4 天左右达到稳定期, 这表明: HB-24 可能可以吸收利用 PLA 的降解产物, 并作为某些营养元素的补充而促进自身繁殖; 相反, PLA 的降解产物乳酸分子则可能对菌株 LB-30 有一定的毒害作用。

2.1.2 PLA 试样材料对纤维分解菌生长的影响

实验分析可知, PLA 对于纤维分解菌有促进作用的有 3 株, 有抑制作用的为 2 株, 无明显影响的有 1 株。以 RX-5 和 LX-1 为例, 对纤维素分解菌生长受 PLA 材料的影响作一介绍。其中 PLA 材料对 RX-5 表现出抑制性且抑制性较强; 而 PLA 对 LX-8 菌株则表现出较高的促进性 ($P < 0.05$)。

由图 2 可知, 该 2 株菌的对照组最终浓度相近, 但加入 PLA 材料后, 最终浓度差别很大。这可能表明: 加入 PLA 材料对于菌株 RX-5 具有一定的抑制作用, 并且对于菌株对数期的影响更显著 ($P < 0.05$), PLA 的降解产物在低浓度时能较强抑制该菌株的生长; 而培养时加入 PLA 对菌株 LX-1 的繁殖则有明显促进作用 ($P < 0.05$), 并能显著提高菌悬液的最终浓度。

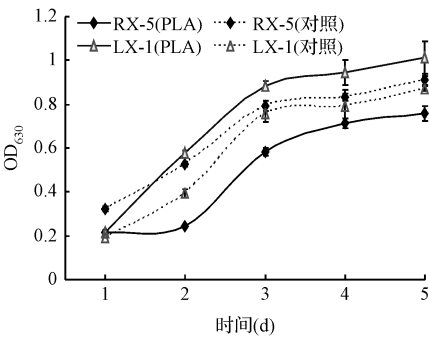


图 2 PLA 对于纤维分解菌生长影响的典型曲线
Fig. 2 Typical curves of PLA effects on cellulose decomposing bacteria growth

2.1.3 PLA 试样材料对固氮菌生长的影响

实验分析可知, PLA 对于固氮菌有促进作用的有 18 株, 有抑制作用的为 3 株, 无明显影响的有 8 株, 现选取典型菌株 RG-18 及 RG-28 作详细叙述。

由图 3 可知, 未加入 PLA 时, RG-18 的生长速率及稳定期的菌悬液浓度均大于 RG-28; 而加入 PLA 后, 虽然在对数期 RG-18 的生长速率仍较高, 但随后出现明显下降 ($P < 0.05$), 并率先进入稳定期, 最终浓度亦相近。这表明: 对于固氮菌 RG-28, PLA 对其有明显的促进作用 ($P < 0.05$), 且对数期较强, 证明该菌株能有效利用乳酸, 并促进自身生长繁殖; 对于另一株固氮菌 RG-28, 加入 PLA 对该菌株有促进作用, 且促进作用非常明显, 差异性显著 ($P < 0.05$), 并在第 4 天左右达到稳定期。

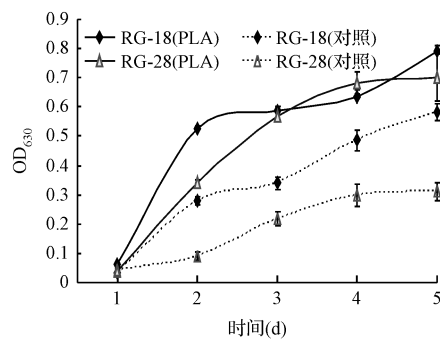


图 3 实验材料对于固氮菌生长的影响

Fig 3 Typical curves of PLA effects on azotobacter growth

2.1.4 PLA 试样材料对放线菌生长的影响

实验分析可知,PLA 对于放线菌有促进作用的有 7 株,有抑制作用的为 3 株,无明显影响的有 1 株 ($P<0.05$)。以 LF-1 为例,没有加入 PLA 试样材料的放线菌培养液 3 周内状态稳定,实验期内一直保持黄褐色透明培养基,乳黄色菌体状态;而加入 PLA 试样材料的培养液摇瓶培养 4 d 后菌体颜色开始变化,约 7 d 后菌体明显变黑,14 d 左右菌体消融,至实验期结束消融殆尽。由此可以证明:大多数放线菌对 PLA 的总降解率都比较高,但 PLA 降解产物对某些放线菌菌株如 LF-1 的生长繁殖有一定的抑制作用,这可能是由于乳酸的积聚破坏了其细胞壁,从而干扰了其增值。

2.2 菌株对于 PLA 试样材料的降解效果

PLA(特别是改性过的 PLA)是一种新兴的,由可再生资源——乳酸聚合而成的高分子聚酯。因为其具有优良的物理化学性能、生物相容性及生物可降解性,且对环境及人体无毒害作用,而被认为是一种最具潜力的绿色生物塑料^[16]。

由表 2 可知,在所有的菌株中,纤维分解菌及固氮菌对于 PLA 的日降解率相对都比较高,但总降解率低。6 株纤维分解菌对于实验材料均表现出降解性,而固氮菌中则有 27 株对于 PLA 分解明显,占 93.1%。放线菌的总降解率(W)最高,但具有显著的差异性($P<0.05$)。而在 45 株细菌中,有 88.9% 的菌株对 PLA 总降解率(W)大于 1%。通过计算日降解率,得到日降解率(w)大于 1.8% 的菌株 5 株,其中细菌有 2 株,分别为 RB-4、LB-20;固氮菌 2 株,分别是 RG-28、HG-8;纤维分解菌 1 株,HX-8,如表 2 所示。在一定的环境下,放线菌 LF-1 及 HF-2 的总降解率(W)能到达近 20%,纤维分解菌 HX-8 以及固氮菌 RG-28 的日降解率(w)能达到 2.4% 左右。

表 2 土壤微生物对于 PLA 降解性能的对比

Table 2 Comparison of degradation properties of edaphon for PLA (%)

菌 株	降解率	菌 株	降解率	菌 株	降解率	菌 株	降解率
细 菌	—	RB-38	2.11	RG-2	1.93	RG-18	2.19
RB-39	1.89	HB-2	6.56	LG-7	4.37	RG-28	12.66
LB-27	0.46	RB-32	2.67	RG-30	1.21	RG-27	3.55
RB-31	2.13	LB-23	5.43	LG-1	2.44	放线菌	—
RB-40	1.28	RB-23	0.25	RG-32	6.78	LF-4	11.64
LB-20	9.87	HB-1	1.25	LG-3	5.23	HF-1	13.20
HB-2	6.51	LB-34	4.86	RG-22	0.78	HF-2	18.38
HB-1	5.19	RB-34	7.18	RG-21	1.05	HF-3	13.24
LB-17	1.66	LB-16	2.11	RG-5	2.65	LF-5	11.22
HB-24	1.98	LB-27	1.89	HG-13	3.76	HF-4	6.12
RB-35	2.56	HB-5	7.12	HG-20	2.34	RF-1	12.11
HB-10	2.30	LB-22	3.27	HG-14	1.08	LF-7	11.20
HB-16	3.12	HB-12	1.88	LG-17	1.55	LF-3	8.13
RB-21	0.97	HB-6	4.06	HG-13	7.35	RF-2	12.58
LB-1	2.19	HB-5	2.03	LG-6	5.22	LF-1	19.55
HB-13	3.88	RB-24	1.68	HG-9	4.31	纤维分解菌	—
LB-2	0.56	HB-11	1.11	HG-8	10.05	LX-6	4.86
LB-3	1.08	RB-4	15.2	LG-4	1.23	RX-5	8.54
HB-12	1.90	HB-9	0.45	LG-3	3.11	LX-1	5.50
RB-1	7.55	固氮菌	—	LG-11	1.60	HX-3	6.05
RB-2	0.95	HG-10	2.11	LG-15	1.22	HX-8	12.45
LB-4	4.25	HG-3	1.93	LG-16	1.86	LX-16	4.23
RB-3	0.67	RG-35	0.23	RG-20	7.88		

3 讨 论

土壤微生物是自然界物质降解的主体,从土壤中筛选对于聚合物(如 PLA)具有高降解率的菌株并研究降解产物对于菌株本身影响的研究显得很有意义。所筛选的土壤微生物经过实验比较,不同微生物对材料的降解性差异很大,而且菌株分解 PLA 的同时分解产物也对菌体产生促进或抑制作用。由实验可知,PLA 降解物对 33.3% 纤维分解菌具有明显抑制作用,对 28.9% 细菌有抑制作用,对放线菌有 27.3%,而对固氮菌则有 10.3% 表现出抑制作用。本实验筛选出的放线菌中有 2 株总降解率比较高,达到 20% 左右。而日降解率大于 1.8% 的菌株 5 株,其中细菌有 2 株,固氮菌 2 株,纤维分解菌 1

株。其中 HX-8 以及 RG-28 的日降解率能达到 2.4% 左右。据此,可以选择降解率比较高且降解产物对菌体无抑制或有促进作用的菌株制取菌悬液或粗酶液。高效的降解菌或降解酶不但可以加速 PLA 的降解,而且其各级水解产物都可以作为聚合物合成的原料,从而实现 PLA 的循环利用^[16]。在未来的研究中,高效 PLA 分解菌株的分离、高效分解菌的分解机制以及 PLA 降解产物对于菌株的影响仍然是我们工作的重点。如果降解产物对分解微生物负面影响较小或对于菌株的抑制能得到改善,那么高效分解菌液或发酵粗酶液就可以用于循环系统,这将进一步降低生产成本,加快生物循环系统的构建。

参考文献

- [1] 曹燕琳,尹静波.生物可降解聚乳酸的改性及其应用研究进展.高分子通报,2006,(10):90-94
Cao Y. L., Yin J. B. Progress in modification and application of biodegradable polylactic acid. Polymer Bulletin, 2006,(10):90-94(in Chinese)
- [2] Barry S., Harry S. Methods for cumulative effects assessment. Environ. Impact Asses., 1995,15(1):81-106
- [3] Auras R., Harte B., Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. Macromol. Biosci., 2004,4(9):835-864
- [4] Vinke T., Rabago K. R., Glassner D. A., et al. The sustainability of nature works polylactide polymers and ingo polylactide fibers: An update of the future. Macromol. Biosci., 2004,4(6):551-564
- [5] Webbar, Yang J., Ameer G. A. Biodegradable polyester elastomers in tissue engineering. Expert. Opin. Biol. Ther., 2004,4(6):801-812
- [6] Erwin T. H. V., Kari R. R. B., David A. G., et al. Applications of life cycle assessment to Nature Works™ polylactide(PLA) production. Polym. Degrad. Stab., 2003,80(3):403-419
- [7] Guan J. J., Eskridge K. M., Hanna M. A. Acetylated starch-polylactic acid loose-fill packaging materials. Ind. Crops. Prod., 2005,22(2):109-123
- [8] 钮金芬,姚秉华,闫焯.生物降解塑料聚乳酸研究进展.工程塑料应用,2010,38(4):89-91
- Niu J. F., Yao B. H., Yan Y. Research progress of biodegradable polylactic acid. Engineering Plastics Application, 2010,38(4):89-91(in Chinese)
- [9] 王剑峰.生物可降解材料聚乳酸的研究进展.化学工程与装备,2010,(7):118-119
Wang J. F. Progress of biodegradable polylactic acid (PLA). Chemical Engineering and Equipment, 2010,(7):118-119(in Chinese)
- [10] 邹君,凌秀琴.可生物降解性高分子材料——聚乳酸.广西化纤通讯,2000,(2):35
Zhou J., Lin X. Q. Biodegradable polymer materials—PLA. Guangxi Chemical Communication, 2000,(2):35(in Chinese)
- [11] 马靓.生物降解塑料聚乳酸(PLA)的研究及其在包装领域的应用.包装工程,2010,31(3):119-127
Ma L. Polylactic acid and its application in the packaging field. Packaging Engineering, 2010,31(3):119-127(in Chinese)
- [12] 张旺玺.可降解聚乳酸的合成及改性研究进展.塑料工业,2006,34(7):1-3
Zhang W. X. Progress in synthesis and modification of biodegradable poly(lactic acid). China Plastics Industry, 2006,34(7):1-3(in Chinese)
- [13] 王蕾,张敏,田小艳,等.土壤中降解聚己内酯(PCL)微生物菌种的筛选及降解性能.环境化学,2010,29(5):857-859
Wang L., Zhang M., Tian X. Y., et al. Screening and degradation of soil polycaprolactone(PCL) biodegradable strains. Environmental Chemistry, 2010,29(5):857-859(in Chinese)
- [14] 李阜棣,喻子牛,何绍江.农业微生物学实验技术.北京:中国农业出版社,1996. 305
- [15] 苗瑞东,于海,吴德峰,等.聚己内酯的降解性能及其对微生物的影响.塑料工业,2009,37(9):50-52
Miao R. D., Yu H., Wu D. F. Degradation behavior of polycaprolactone and its effect on microorganism. Plastics Industry, 2009,37(9):50-52(in Chinese)
- [16] 李凡,王莎.聚乳酸(PLA)生物降解的研究进展.微生物学报,2008,48(2):262-268
Li F., Wang S. Research progress in biodegradation of polylactic acid(PLA). Journal of Microbiology, 2008,48(2):262-268(in Chinese)