

# 聚丁二酸丁二醇酯高效降解菌的筛选及降解特性

梅雪立<sup>1</sup> 梁英梅<sup>1\*</sup> 田呈明<sup>2</sup> 董骞<sup>1</sup> 孙琪<sup>2,3</sup>

(1. 北京林业大学环境科学与工程学院 北京 100083)

(2. 北京林业大学森林培育与保护教育部重点实验室 北京 100083)

(3. 中山大学生命科学学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室 广东 广州 510006)

**摘要:** 从蔬菜地表微环境空气微生物中分离筛选获得了一株高效降解聚丁二酸丁二醇酯(PBS)的真菌菌株 BFM-X1, 通过形态学和 ITS rDNA 序列测定分析, 确认该菌株为淡色生赤壳属真菌 (*Bionectria ochroleuca*)。该菌株降解 PBS 薄膜的最适温度为 25 °C–30 °C, 培养基初始 pH 为 4.0, 以甘油、大豆油、葡萄糖及 PBS 乳剂分别作为唯一碳源时对 PBS 薄膜均具有很高的降解率; 菌株对 PBS 薄膜的降解率随 PBS 乳剂含量变化的曲线呈倒“U”型, 最佳 PBS 乳剂浓度为 1 g/L, 且对 PBS 的降解呈现诱导期、指数降解期和加速降解期等 3 个阶段。降解初期薄膜表面首先粗糙化, 失去原有的黑色光泽, 随后出现孔洞, 逐渐呈现破碎化, 最后薄膜被完全降解, 降解部位仅残留黑色色素。

**关键词:** 聚丁二酸丁二醇酯(PBS), 真菌, 生物降解, *Bionectria ochroleuca*

## Fungi screening and degradation characteristics for efficient poly (butylenes succinate) degradation

MEI Xue-Li<sup>1</sup> LIANG Ying-Mei<sup>1\*</sup> TIAN Cheng-Ming<sup>2</sup> DONG Qian<sup>1</sup> SUN Qi<sup>2,3</sup>

(1. College of Environmental Science & Engineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

(2. Key Laboratory of Silviculture and Conservation, Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

(3. State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

**Abstract:** A fungal strain BFM-X1 was isolated from air environment on vegetable field, which had a strong ability to degrade poly (butylenes succinate, PBS). Morphological and phylogenetic analysis revealed that strain BFM-X1 was closely related to *Bionectria ochroleuca*. The optimum temperature for strain BFM-X1 degrading PBS film ranged from 25 °C to 30 °C and the initial pH of medium was 4.0. A high degradation rate for PBS film was observed with glucose, glycerole, soybean oil or PBS emulsion as a single carbon source for this strain. The curve of PBS film degradation rate with the increase of the

PBS emulsion concentration showed a resupinate “U”, and the optimum PBS emulsion concentration was 1 g/L. Three phases were exhibited during PBS degradation by BFM-X1. Scanning electron micrographs showed that the surface of PBS film firstly became rough, then some holes appeared on the PBS film and the PBS film gradually disintegrated, at last the PBS film completely degraded.

**Keywords:** Poly (butylenes succinate, PBS), Fungi, Biodegradation, *Bionectria ochroleuca*

塑料及其制品导致的“白色污染”已成为严重的环境问题, 而开发可降解塑料是解决塑料污染的有效途径。聚丁二酸丁二醇酯[poly (butylenes succinate), PBS, 化学分子式 $(H[C_8H_{12}O_4]_n O(CH_2)_4OH)$ ]作为一种新型生物降解塑料<sup>[1]</sup>, 于20世纪90年代进入材料研究领域, 并迅速成为生物降解塑料的研究热点。日本生物塑料协会(JBPA)依据PBS的生物降解性能和其降解产物的无毒性将其纳入了可生物降解塑料的名单<sup>[2]</sup>。

目前大量的研究主要集中于PBS的合成及改性, 而针对PBS降解菌株的分离筛选及特性的研究较少, 仅从自然环境中分离筛选到部分细菌, 如从土壤中分离得到的 *Bacillus pumilus* 1-A<sup>[3]</sup>和 *Paenibacillus amylolyticus*<sup>[4]</sup>, 以及从堆肥土壤环境中分离得到的杂色曲霉和青霉<sup>[5]</sup>。Nariaki Ishii 等研究了来自于土壤中的 *Aspergillus fumigatus* 菌株 NKCM1706, 该菌株对PBS薄膜的降解率为  $10.5 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ <sup>[6]</sup>; 从农田土壤中分离的 *Fusarium solani* WF-6 在灭菌土壤中14 d对PBS的降解率也只有2.8%<sup>[7]</sup>。尽管PBS生物降解塑料具有很多的优点, 但在自然环境条件下的降解率比其它可生物降解塑料, 如聚己内酯(PCL)、聚 $\beta$ -羟基丁酸酯(PHB)等要低很多, 且受周围环境条件的影响<sup>[8]</sup>。因此, 进一步挖掘高效降解PBS的菌株, 研究其降解特性, 提高环境中PBS的降解效率, 对其生物塑料的推广应用及其残留的生物修复具有重要意义。

本研究对蔬菜地表微环境空气中的PBS降解菌进行了采集、分离和筛选, 获得了一株高效降解PBS的真菌菌株, 同时研究了该菌株的降解特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

PBS 颗粒(相对分子质量:  $1.5 \times 10^5$ )由海尔科化

工程塑料国家工程研究中心股份有限公司提供; PBS 薄膜(厚 20  $\mu\text{m}$ , 相对分子质量:  $2.0 \times 10^5$ )购于日本昭和和高分子化学公司。PBS 乳剂制备参考 Horowitz 等人的方法<sup>[9]</sup>。

PBS 选择性培养基参照 Ishii<sup>[6]</sup>, 并对培养基成分进行了改良(g/L):  $\text{NaNO}_3$  2,  $\text{KCl}$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{MnSO}_4$  0.0005, 琼脂 15, PBS 乳剂 1% (W/V)。采集菌株时所用培养基中加 0.05 g 氯霉素。

### 1.2 降解菌株的采集及分离筛选

试验所用菌株采集于北京市海淀区后八家蔬菜地。将含PBS选择性培养基的培养皿在番茄架下打开, 于空气中曝露 15 min, 然后将其盖好封口, 带回实验室, 置于 28  $^\circ\text{C}$  的恒温培养箱中培养 2-3 d。选择在采集平板上出现典型透明圈的单一菌落按常规方法进行纯化。纯化后的菌株再利用选择性平板透明圈法进行初筛, 挑取出现透明圈 2 cm 以上的菌落于常规 PDA 培养基上保存备用。对初筛获得的真细菌株利用 PBS 薄膜进行复筛, 分别测定菌株对 PBS 薄膜的降解能力, 选取 28  $^\circ\text{C}$  恒温暗培养 10 d 后薄膜降解率高的菌株作为目标菌株。

### 1.3 DNA 提取、扩增及测序

收集在马铃薯葡萄糖液体培养基中培养 1 周的菌丝体, 经液氮研磨后用 DNA 提取试剂盒(Promega 公司)提取 rDNA, 然后以其为模板, 以 ITS1F(5'-CTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')<sup>[10]</sup>和 ITS4(5'-TCTCCGCTTATTGATATGC-3')<sup>[11]</sup>为引物对 ITS (包括 5.8S)区进行 PCR 扩增。扩增产物由上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 序列经 Chromas、Genetyx 软件处理后, 在 NCBI 基因库中进行同源性比对分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

### 1.4 PBS 薄膜降解率的测定方法

用无菌操作法, 在 PBS 选择性平板的中央接种

直径 2 mm 的菌饼, 并以其为中心对称放入 2 cm×2 cm 大小已灭菌的 PBS 薄膜 2 片, 相互间隔为 2 mm, 恒温暗培养。用无菌水反复冲洗定期取样的残留薄膜, 晾干, 然后扫描残存 PBS 薄膜的图像。使用 ImageJ 1.38x 处理扫描图片, 计算薄膜损失的面积。PBS 薄膜的降解率定义为薄膜面积的减少率: 降解率(%)=薄膜损失的面积之和/(2×单片薄膜的面积)×100%。

### 1.5 电镜观察

降解过程中的 PBS 残留膜经喷金处理后, 利用扫描电子显微镜(SEM, S-3400N, Japan-Hitachi Ltd, 加速电压 10 kV)观察表面形态特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 PBS 降解菌的分离筛选及鉴定

从番茄架地表微环境空气中分离纯化 38 株真菌菌株, 经初筛得到 27 株出现 2 cm 以上透明圈的菌株, 然后进行复筛, 获得 1 株可以完全降解 PBS 薄膜的高效真菌菌株 BFM-X1。

通过 PCR 扩增及序列测定, 得到了菌株 BFM-X1 的 ITS (包括 5.8S) 区域基因序列, 所得序列利用 BLAST 软件与数据库中的已知序列进行比对和同源性分析, 发现菌株 BFM-X1 的 ITS 区域基因序列(DDBJ、EMBL 和 GenBank 登录号: AB470910) 与 *Bionectria ochroleuca* 的同源性在 99% 以上。结合形态特征(图 1)鉴定菌株 BFM-X1 为淡色生赤壳属菌 *Bionectria ochroleuca* (Schwein.) Schroers & Samuels。

### 2.2 温度与降解性能的关系

按 1.4 所示方法在含 PBS 选择性培养基的平板上接入薄膜及菌株, 分别置于 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 下恒温暗培养, 18 d 后分别取出未完全降解的 PBS 薄膜并统计其降解率。结果如图 2 所示, 菌株 BFM-X1 在不同温度下对 PBS 薄膜的降解效果差异明显, 可降解温度范围为 15 °C–35 °C, 最适降解温度范围为 25 °C–30 °C。在最适降解温度下, 培养 18 d 后薄膜的降解率达到 80% 以上。在 10 °C 和 40 °C 下, 菌株 BFM-X1 对 PBS 薄膜均未表现出降解效应, 这与高温和低温环境下菌株的生长被抑制有关。

### 2.3 初始 pH 与降解性能的关系

用 0.1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 将含 PBS 选择性培养基的初始 pH 分别调整为 4.0 到 11.0, 梯度为 1。在调整过 pH 的培养基上接入 PBS 薄膜和菌株, 28 °C 下恒温暗培养 16 d, 然后分别取出未完全降解的 PBS 薄膜并统计其降解率。以在调整过 pH 的各培养基上仅放入 PBS 薄膜, 不接菌, 作为对照。结果显示, 在不同的初始 pH 下, 菌株 BFM-X1 对 PBS 薄膜的降解效果存在明显的差异(图 3)。初始 pH 为 4.0 时降解效果最好, 第 16 天的降解率达到 75.16%。其它 pH 条件下(pH 5.0–11.0) PBS 薄膜的降解率均处在较低水平(<35%); 当 pH 11.0 时, 16 d 的降解率仅 13.35%。不同 pH 条件下不接菌对照中的 PBS 薄膜没有发生面积损失, 这说明单纯的酸碱环境在短期内不会对 PBS 薄膜造成影响。

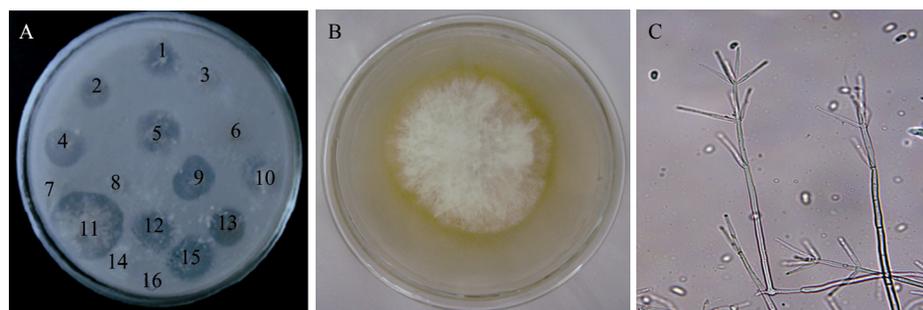


图 1 菌株 BFM-X1 筛选及鉴定

Fig. 1 Screening and identification of strain BFM-X1

注: A: 初筛透明圈; B: PDA 培养基上 28 °C 培养 7 d 的菌落形态; C: 孢子梗及分生孢子。

Note: A: Colonies and clear zones; B: Colonies on a PDA-plate cultured at 28 °C for 7 days; C: Verticillate conidiophore of anamorph of strain BFM-X1.

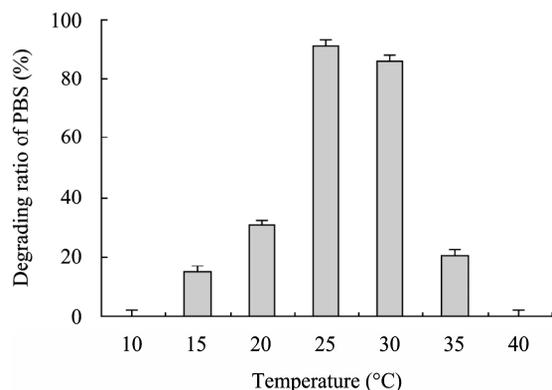


图2 温度对菌株降解 PBS 的影响  
Fig. 2 Effect of temperature on PBS degradation

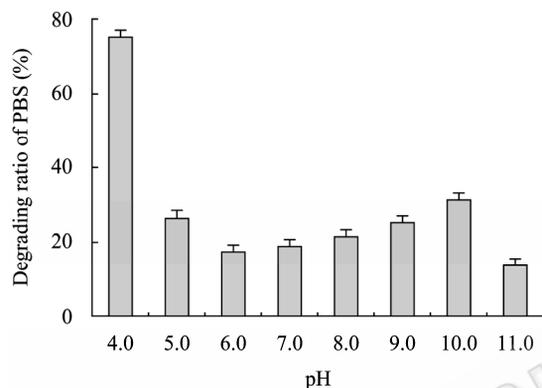


图3 初始 pH 值对菌株降解 PBS 的影响  
Fig. 3 Effect of initial pH of medium on PBS degradation

#### 2.4 不同碳源与降解性能的关系

分别用甘油、大豆油、葡萄糖替换 PBS 选择性培养基中的 PBS 乳剂, 制成相应唯一碳源的培养基。然后在各培养基中接入 PBS 薄膜及菌株, 28 °C 下恒温暗培养。从接种后第 2 天起隔日取样, 统计薄膜的降解率。结果显示, 菌株 BFM-X1 可以分别以甘油、大豆油、葡萄糖及 PBS 乳剂为唯一碳源对 PBS 薄膜产生降解作用, 并且具有高的降解率(图 4)。以 PBS 乳剂作为碳源时, 第 8 天后开始大幅度加速降解; 而其它 3 种碳源下均都在第 10 天后进入加速降解期。说明 PBS 乳剂作外加碳源时对菌株 BFM-X1 降解 PBS 的诱导催化作用所需时间短, 最早产生大量降解 PBS 的胞外酶。胞外酶降解机制是生物降解塑料重要的降解机理之一, 研究发现 PHB 的降解是因为细菌和真菌分泌的胞外酶的作用<sup>[12-13]</sup>, 其它水不溶性可生物降解塑料, 如聚丁二酸/己二

酸-丁二醇酯(PBSA)等, 在其降解过程中也发现此降解机制<sup>[14]</sup>。

#### 2.5 PBS 乳剂含量与降解性能的关系

将 PBS 选择性培养基中 PBS 乳剂的含量分别调整为 0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 g/L, 然后在各不同乳剂含量的平板上接入薄膜和菌株, 28 °C 下恒温暗培养 16 d, 分别统计薄膜的降解率, 结果如图 5 所示。菌株 BFM-X1 对 PBS 薄膜的降解率随 PBS 乳剂含量变化曲线呈倒“U”型, 可利用的碳源浓度范围较宽 (0.5-10.0 g/L)。最佳 PBS 浓度为 1 g/L, 在此浓度下 PBS 薄膜的降解率在第 16 天时达到 97.81%; 在 PBS 乳剂含量为 1-10 g/L 的范围内, 薄膜的降解率呈明显的下降趋势。当 PBS 乳剂含量增至 10 g/L 时, 菌株 BFM-X1 对 PBS 薄膜表现出极弱的降解性, 第 16 天时的降解率仅为 4.23%。

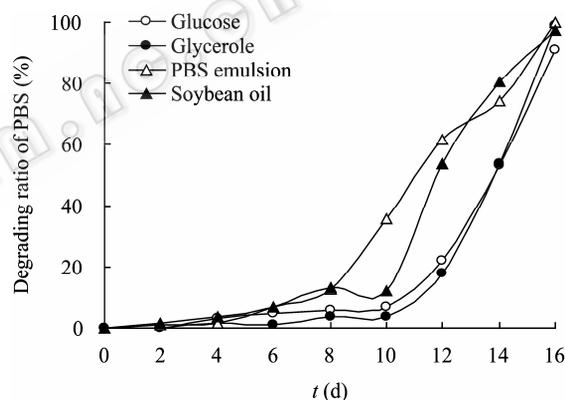


图4 不同碳源对菌株降解 PBS 的影响  
Fig. 4 Effect of various carbon sources on PBS degradation

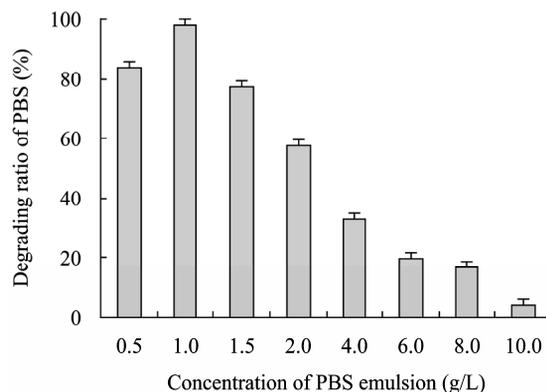


图5 PBS 乳剂浓度对菌株降解 PBS 的影响  
Fig. 5 Effect of concentration of PBS emulsion on PBS degradation

## 2.6 降解性能与时间的关系

在 28 °C、初始 pH 4.0、PBS 乳剂含量为 1 g/L 的最佳降解条件下, PBS 薄膜降解率随菌株 BFM-X1 作用时间的延长而逐渐增加(图 6), 并呈现诱导期、指数降解期和加速降解 3 个时期。在诱导期, 薄膜的面积损失比较缓慢, 第 6 天时的降解率仅为 5.6%。第 6 天后开始进入加速降解阶段, 到第 14 天时薄膜降解率高达 97.9%, 已接近完全降解。

PBS 薄膜在降解过程中的表面形态变化如图 7 所示。降解前(A)薄膜质地均匀、密实, 表面光滑有黑色光泽。随着降解的进行, 薄膜表面首先变的粗糙, 失去原有的黑色光泽, 并在菌体延伸到的部位开始出现裂缝(B); 第 4 天时表面开始出现孔洞结构(C), 并且随着时间的延长孔洞逐渐变大加深(第 8 天), 塑料表面结构单元之间聚合物相互分离, 呈现破碎化; 在最后的加速降解期 PBS 薄膜已基本成为小链段的碎片, 这些小碎片分散到培养基中, 被菌

株 BFM-X1 进一步同化吸收, 直至完全降解, 表面上只剩下黑色色素留在降解部位(D)。菌株 BFM-X1 对 PBS 薄膜的降解行为与陈珊等<sup>[15]</sup>分离的真菌对 PHB 膜的降解行为一致; 与可控堆肥条件下 PBS 及其共聚物 PBSA 薄膜的宏观生物降解行为类似<sup>[16]</sup>。

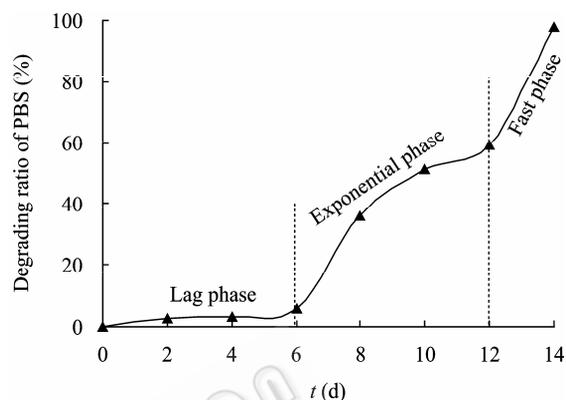


图 6 PBS 降解过程  
Fig. 6 PBS degradation curve

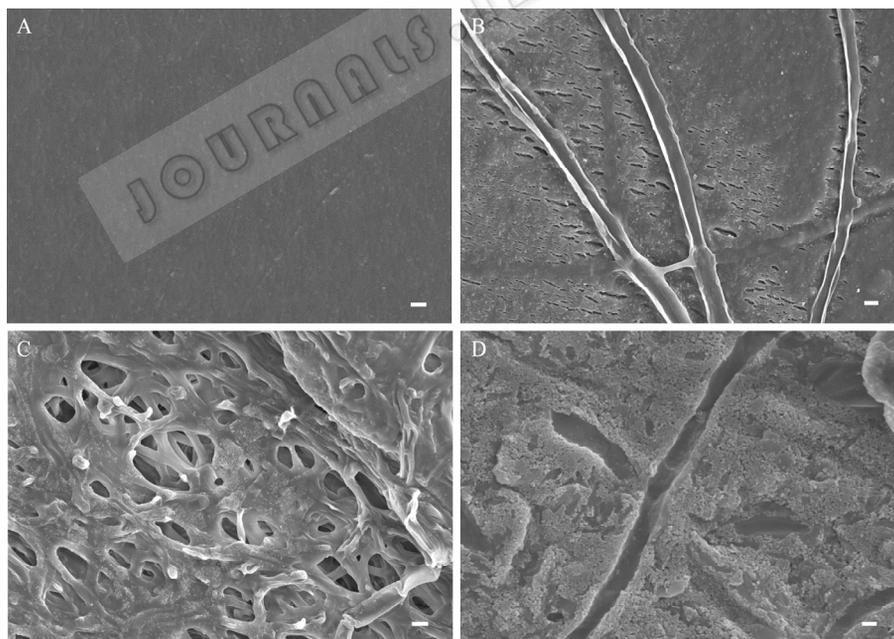


图 7 菌株 BFM-X1 作用不同时间后, PBS 薄膜表面电镜照片

Fig. 7 Scanning electron micrographs during PBS film degradation by BFM-X1

注: A: 原始 PBS 薄膜; B, C, D: 分别经菌株作用 4, 6, 10 d 后的残留 PBS 薄膜。标尺: 20  $\mu$ m。

Note: A: Original PBS film; B, C, D: PBS film after degradation by strain BFM-X1 for 4, 6 and 10 days. Bars: 20  $\mu$ m.

### 3 讨论

微生物的采样生境很丰富, 水域、空气、土壤和动植物体内均有大量分布。日本学者对不同水环境中的可降解生物塑料的菌株进行了筛选, 发现不同水环境中均存在能降解 PBSA、PCL 和 PHB 的菌株, 这些菌株大部分属于假单胞菌属(*Pseudomonas*) 和不动杆菌属(*Acinetobacter*), 且对 PHB 的降解效果最好<sup>[17]</sup>。本研究从菜园地表微环境空气中分离筛选到了 1 株高效降解 PBS 的真菌菌株 BFM-X1, ITS 序列同源性分析鉴定为淡色生赤壳属(*Bionectria ochroleuca*) 真菌, 这是首次发现 *Bionectria* 属真菌菌株能够降解 PBS。在 28 °C、初始 pH 4.0、PBS 乳剂含量为 1 g/L 时, 该菌株 14 d 对 PBS 薄膜的降解率为 97.9%, 而孙琪等从土壤中筛选的菌株 *Alternaria* sp. HJ03 对 PBS 薄膜的降解率 18 d 时为 79.4%<sup>[18]</sup>, 农田土壤中分离的 *Fusarium solani* WF-6 在灭菌土壤中 14 d 对 PBS 的降解率也只有 2.8%<sup>[7]</sup>, 而且菌株 BFM-X1 在灭菌土壤中 15 d 对 PBS 的降解率可达到 26.7% (相关研究将另文报道), 其降解效果明显优于目前已报道的相关真菌菌株对 PBS 的降解。

自然环境中存在着很多不稳定的因素, 这些因素直接或间接的影响着微生物对 PBS 的降解。我国土壤 pH 在地理分布上南低北高, 由五指山黄壤的 3.6–3.8 逐渐增加到吉林、内蒙古、华北碱土的 10.5, 结合我国土壤的酸碱分布规律, 本研究选取初始 pH 4.0–11.0 的范围来测定其对菌株降解性能的影响, 发现菌株 BFM-X1 在偏酸性环境中对 PBS 有较好的降解性, 最适初始 pH 为 4.0。这与其它研究发现的真菌的最适降解 pH 偏酸性的结果一致<sup>[19–20]</sup>。不同 pH 条件下降解速率存在差异的原因可能是 pH 影响了降解酶的分泌及酶活力<sup>[21]</sup>。如 Kakugawa 等人从酵母菌株 *Kurtzmanomyces* sp. I-11 提取的脂肪酶的活性 pH 范围为 1.9–7.2, 在 pH 4.0 时活性最高<sup>[22]</sup>。

Maeda 等人发现, 改变碳源条件将影响菌株的降解酶活性, 从而改变菌株的降解性能<sup>[14]</sup>。PBS 降解菌杂色曲霉 [*Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tirab.,]

可以在较宽的 PBS 浓度范围内大量生长<sup>[5]</sup>。本研究结果显示, 菌株 BFM-X1 在低碳源浓度 (PBS 乳剂含量为 0.5–2.0 g/L) 下对 PBS 薄膜的降解率较高, 当增加 PBS 乳剂含量时薄膜的降解率明显降低。因此, 随着 PBS 乳剂含量的增加薄膜的降解率明显降低, 这可能是因为高浓度的外加碳源使菌株转变为营养生长, 不再利用 PBS 薄膜中的碳源物质。

微生物的生命活动对碳源有较高的依赖性, 多要求有特定的碳源。Oda 等发现更换碳源后, 菌株的降解性能会下降<sup>[20]</sup>。Teeraphatpornchai 等从土壤中分离得到的 *Paenibacillus amylolyticus* TB-13 菌株能够以 PLA、PBSA 乳剂作为碳源降解 PBS 薄膜, 但不能将它们作为唯一碳源物质利用<sup>[4]</sup>; Maeda 等分离出的 *Aspergillus oryzae* RIB40 也仅能将 PBS 乳剂和 PBSA 乳剂作为唯一碳源物质利用<sup>[14]</sup>。菌株 BFM-X1 不仅能够利用 PBS 乳剂作为唯一碳源降解 PBS 薄膜, 同时还可以将葡萄糖、甘油以及大豆油分别作为唯一碳源降解 PBS 薄膜, 在碳源的选择上 BFM-X1 优于其它降解菌株。

对产业化而言, 当不同产品的最终降解水平接近时, 首选廉价且容易获得的外加碳源。葡萄糖作为一种廉价易得的物质, 是大多数微生物生长时的首选碳源。对于菌株 BFM-X1, 葡萄糖不仅可以作为其生长碳源, 同时也可以作为诱导外加碳源促使菌株产生胞外酶降解 PBS 薄膜, 当其作为外加碳源时第 16 天 PBS 的降解率可达 90%, 这表明了菌株 BFM-X1 良好的应用潜力, 为其产业化应用奠定了基础。今后有望直接利用该菌株或该菌株的发酵液来快速降解各种 PBS 基塑料废弃物, 减少白色污染, 保护环境, 其社会效益和生态效益显著。

### 参考文献

- [1] 高明, 王秀芬, 郭锐, 等. PBS 基生物降解材料的研究进展[J]. 高分子通报, 2004, 10(5): 51–55.
- [2] Kunioka M, Ninomiya F, Funabashi M. Biodegradation of poly (butylene succinate) powder in a controlled compost at 58 °C evaluated by naturally-occurring carbon 14 amounts in evolved CO<sub>2</sub> based on the ISO 14855-2 method[J]. Molecular Sciences, 2009, 10(10): 4267–4283.

- [3] Hayase N, Yano H, Kudoh E, et al. Isolation and characterization of poly(butylene succinate-co-butylene adipate)-degrading microorganism[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 97(2): 131-133.
- [4] Teeraphatpornchai T, Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, et al. Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(1): 23-28.
- [5] 赵剑豪, 王晓青, 曾军, 等. 聚丁二酸丁二醇酯在堆肥条件下的生物降解性能研究[J]. *功能高分子学报*, 2004, 17(4): 666-670.
- [6] Ishii N, Inoue Y, Tagaya T, et al. Isolation and characterization of poly(butylene succinate)-degrading fungi[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2008, 93(5): 883-888.
- [7] Abe M, Kobayashi K, Honma N, et al. Microbial degradation of poly(butylene succinate) by *Fusarium solani* in soil environments[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2010, 95(2): 138-143.
- [8] Kasuya K, Takagi K, Ishiwatari S, et al. Biodegradabilities of various aliphatic polyesters in natural waters[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 59(1/3): 327-332.
- [9] Horowitz DW, Sanders JKM. Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications[J]. *Journal of American Chemical Society*, 1994, 116(7): 2695-2702.
- [10] Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. *Molecular Ecology*, 1993, 2(2): 113-118.
- [11] White TJ, Bruns TD, Lee SB, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. eds. *PCR protocols, a guide to methods and applications*[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [12] Jendrossek D, Handrick R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 56: 403-432.
- [13] 陈珊, 刘东波, 夏红梅, 等. 聚  $\beta$ -羟基丁酸酯解聚酶相关性质的研究[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(3): 50-54.
- [14] Maeda H, Yamagata Y, Abe K, et al. Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67(6): 778-788.
- [15] 陈珊, 刘东波, 夏红梅, 等. 13 株真菌对聚  $\beta$ -羟基丁酸酯膜的降解特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(4): 395-399.
- [16] 赵剑豪, 王晓青, 曾军, 等. 聚丁二酸丁二醇酯及聚丁二酸/己二酸-丁二醇酯在微生物作用下的降解行为[J]. *高分子材料科学与工程*, 2006, 22(2): 137-140.
- [17] 森文彦, 海老原昇, 上原健, 等. 生分解性プラスチック分解菌の水系生息調査研究[J]. *千葉県産業支援技術研究所研究報告*, 2005, 3: 15-22.
- [18] 孙琪, 梁英梅, 田呈明, 等. 一株聚丁二酸丁二醇酯降解菌的筛选及降解特性[J]. *北京林业大学学报*, 2010, 32(6): 130-134.
- [19] Nakamura K, Tomita T, Abe N, et al. 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.
- [20] Oda Y, Asari H, Urakami T, et al. Microbial-degradation of poly(3-Hydroxybutyrate) and polycaprolactone by filamentous fungi[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 80(3): 265-269.
- [21] Hoshino A, Isono Y. Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipases with special reference to rapid and complete degradation of poly(L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp.[J]. *Biodegradation*, 2002, 13(2): 141-147.
- [22] Kakugawa K, Shobayashi M, Suzuki O, et al. Purification and characterization of a lipase from the glycolipid-producing yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11[J]. *Bio-science Biotechnology & Biochemistry*, 2002, 66(5): 978-985.