

参赛学生姓名：周静函、王昊宇、陶成溪

中学：北京王府学校

省份：北京

国家/地区：中国

指导老师姓名：曹金满、张扬

指导老师单位：中国科学院生态环境研究中心、北京王府学校

论文题目：蚯蚓对土壤中微塑料降解的影响

蚯蚓对土壤中微塑料降解的影响

周静函、王昊宇、陶成溪

摘要:

现今，塑料在带来便利的同时也对环境带来了巨大危害。废弃的塑料制品可以在环境中留存数百年。而尽管部分塑料得以处理，降解后遗留的微塑料同样危害巨大。生物降解可能在不损害环境的情况下降解不同类型的塑料。土壤对于自然界中有机物的降解有着巨大的作用，土壤内的土壤生物，及丰富的微生物则是土壤降解物质的关键。本研究实验对象选用对生态系统有着重要调节作用的赤子爱胜蚓 (*Eisenia fetida*)。参与实验的塑料为微聚苯乙烯及微聚乳酸，及一种可降解塑料和一种不可降解塑料。在试验中蚯蚓所在土壤分别加入微聚苯乙烯及微乳酸并设立对照组。培养一定时间后，对土壤和蚯蚓肠道中微生物进行 16S rRNA 测序并提取土壤中剩余微塑料，利用扫描电子显微镜

(SEM) 和傅立叶变换红外吸收光谱仪 (FTIR) 观察微塑料表面特征和官能团，我们发现，蚯蚓的介入对于聚乳酸微塑料 (PLA) 的降解有着显著的促进效果，然而对聚苯乙烯微塑料 (PS) 没有显著影响。并且蚯蚓在对于土壤中的微塑料降解存在选择性，能够对含有杂原子的聚乳酸等微塑料降解有积极影响，而对聚苯乙烯一类的不含杂原子塑料降解的影响较小。

关键词: 蚯蚓、微塑料降解、聚苯乙烯、聚乳酸、降解、生物降解、可降解塑料、不可降解塑料

目 录

第 1 章 引言	7
1.1 研究背景及意义.....	7
1.2 研究目的.....	8
1.3 研究方法.....	8
第 2 章 文献综述	9
2.1 生物可降解塑料和生物不可降解塑料.....	9
2.2 土壤降解.....	9
2.3 生物可降解塑料和生物基塑料的区别.....	10
2.4 微塑料对土壤生物的影响.....	10
2.4.1 微塑料对土壤微生物的影响.....	10
2.4.2 微塑料对土壤动物的影响.....	10
2.5 土壤体系对微塑料的影响.....	11
2.5.1 土壤微生物微塑料降解.....	11
2.5.2 蚯蚓肠道微生物对塑料的降解.....	11
第 3 章 实验材料与方法	13
3.1 实验设计.....	13
3.2 实验材料及蚯蚓驯养.....	13
3.3 土壤理化性质测定.....	15
3.4 蚯蚓解剖以及蚯蚓肠道、土壤微生物 DNA 的提取.....	15
3.5 实验后土壤中微塑料样本的提取.....	16
第 4 章 数据分析	17
4.1 土壤和蚯蚓肠道样本 16sRNA 测序结果分析.....	17
4.2 扫描电子显微镜图像分析.....	21
4.3 傅立叶变换红外吸收光谱图分析.....	22

4.4 数据分析总结	24
第 5 章 总结与展望	26
5.1 结论	26
5.2 创新点	26
5.3 存在的问题	27
5.4 未来展望	27

2024 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2024丘成桐中学科学奖论文公示

图表目录

表 3.1 实验分组操作表.....	12
表 3.2 土壤理化指标.....	13
图 3.1 聚苯乙烯结构式.....	13
图 3.2 聚乳酸结构式.....	13
图 4.1 土壤和蚯蚓肠道细菌 α 多样性.....	16
图 4.2.1 蚯蚓对 PS 和 PLA 暴露下土壤细菌群落结构的影响.....	17
图 4.2.2 PS 和 PLA 对蚯蚓肠道微生物群落结构的影响.....	17
图 4.3.1 不同土壤独有与共享的 ASVs 数.....	18
图 4.3.2 肠道微生物之间独有与共享的 ASVs 数.....	18
图 4.4 属水平上细菌类别热图.....	18
图 4.5 属水平上土壤细菌和肠道微生物群落的组成.....	19
图 4.6.a PS-CK 扫描电子显微镜图.....	20
图 4.6.b PS 扫描电子显微镜图.....	20
图 4.6.c PS-E 扫描电子显微镜图.....	21
图 4.6.d PLA-CK 扫描电子显微镜图.....	21

图 4.6.e PLA 扫描电子显微镜图.....	21
图 4.6.f PLA-E 扫描电子显微镜图.....	21
图 4.7.1 PS 组 FTIR 图像.....	22
图 4.7.2 PLA 组 FTIR 图像.....	22
表 4.1 微塑料透过率数据.....	23

第 1 章 引言

1.1 研究背景及意义

塑料在现代人类社会发展发挥了显著的作用。由于其坚韧，轻便，延展性高，成本低等优势，塑料被广泛运用为产品的原材料，如渔网，农业薄膜，瓶子等等。现如今没有任何材料可以代替塑料的作用。因此，塑料具有较高的需求性，同时也是许多行业的发展基石。在另一方面，塑料对环境带来的危害同样不可忽视。在难以降解的同时，2004年，英国普利茅斯大学教授汤普森等人在《科学》在纸上发表了关于海洋水体和沉积物中塑料碎片的论文，首次提出了“微塑料”的概念，及直径小于 5 毫米的塑料碎片和颗粒 (Thompson et al., 2004)。微塑料对于环境的危害主要体现在其微小的直径上，这意味着与常规塑料垃圾相比，扩散范围更加广大，从而对环境的影响更严重 (Li et al., 2023)。微塑料广受国际关注，并被归纳于四大新污染物之一 (2024)。如今，地球上很难找到一片没有被微塑料触及的土地，无论在海底，人体血液内，甚至南极，都可能检测出微塑料 (Kozlov, 2024)。其危害性不言而喻。塑料是大分子物质，纯塑料的毒性相对较小。而当今塑料毒性主要来源于加工过程中需要添加的有毒添加剂或合成过程中反应不足 (Chen et al., 2024)。当大量有机污染物附着在微塑料表面时，塑料的毒性和危害会从单体阶段开始增加。尽管微塑料污染物摄入在食物链中的转移效率如今尚不清楚，但其传播范围之广，让人类可能通过吸入，摄入及皮肤接触破坏原本肠道微生物群的平衡与稳定。 (“Microplastics Are Everywhere — We Need to Understand How They Affect Human Health,” 2024)微塑料杀人于无形，无所不在的特性让我们迫切地想要寻找一种有效的解决方案。热降解是各国处理塑料最主流的方式。通过机械粉碎，以及高降解从结果来看相对有效，但其庞大的能量损耗让人们不得不考虑一种更加绿色且成本低廉的降解方法 (Lingchen et al., 2021)。而生物降解，在近些年成为了一个较受关注的新降解方式。微生物多样性是生物降解的关键条件。微生物种类繁多，其中包括细菌，部分藻类以及真菌。它们具有体积小，吸收及新陈代谢快，适应性强，突变速度快以及分布广泛的特点。微生物几乎无所不在，它们极强的适应能力赋予了它们在恶劣条件下生存的能力。微生物

群落可以适应新环境并附着于它们，通过释放某种酶。它们能够利用持久的塑料污染作为唯一的碳来源。可以说，生物降解的潜力十分巨大。

1.2 研究目的

据报道，土壤生物包括线虫，两足动物，蜗牛及其他无脊椎动物都会摄取塑料。本研究旨在探究蚯蚓对可降解塑料和不可降解塑料降解的影响。通过实验证明蚯蚓肠道菌群降解塑料的可行性。

1.3 研究方法

本研究内容包括提取土壤，驯化蚯蚓，设计实验，解剖蚯蚓，蚯蚓肠道DNA提取，实验用土壤中的塑料提取，通过扫描电子显微镜观察塑料颗粒表面特征变化，利用傅立叶转换红外吸收仪观察其官能团变化。

第 2 章 文献综述

2.1 生物可降解塑料和生物不可降解塑料

如今，市面上的绝大多数塑料都以石油作为原材料 (World Plastics Council, 2024b)。石油是曾经生物历经百万年自然沉降的最终产物。因此，石油的主要成分也是这些远古生物体内的脂质。矛盾的是，既然石油产自生物，为何其衍生物塑料无法被生物降解？

普遍塑料都以丙烯为原材料 (Admin, 2021)。在制造塑料中，催化剂以及极高的温度迫使各个丙烯单体相互形成极强的碳-碳键。当数个丙烯单体以碳键连接，便形成了由单体长链形成的聚丙烯 (Federation, n.d.-b)。大自然从未制造过这类东西。降解有机物的生物时常需要数亿年时间才能获得破坏自然界中某些常见的化学键。许多微生物可以快速将多糖分解为单糖，甚至通过分解木质素来蚕食木头。但由于塑料这类聚合物并不普遍，所以微生物并没有代谢途径来对它们进行降解 (Cai et al., 2023)。所有塑料都或多或少会经历物理，化学或生物降解。物理化学降解包括风化，日照，氧化，水解等。尽管有些塑料可以通过氧化反应或水解进行降解，但需要时间极长，同时，这类塑料都被认为会在降解后产生微塑料。多数可以通过水解或氧化作用降解的塑料都是生物不可降解塑料 (Filiciotto & Rothenberg, 2020d)。

生物可降解塑料则可以通过不同的降解途径进行降解，这类塑料的降解通常由微生物触发，如真菌，细菌，酶等。由于生物降解的程度已经速率受到多种因素影响。例如湿度，温度等条件。但我们始终可以为生物降解创造一个理想条件，在理想条件下。无氧或有氧微生物都可以将可生物降解塑料降解为甲烷，二氧化碳，水以及其他可以利用的生物质和堆肥。

2.2 土壤降解

土壤生物是土壤最为主要的降解源头，小到微生物，螨虫，大到蚯蚓。它们在土壤中所进行的活动，化学反应可以较为快速地降解有机物，甚至对塑料这类极难降解的材料也可以起到一定作用 (Berg & Laskowski, 2005)。

2.3 生物可降解塑料和生物基塑料的区别

不了解两类塑料之别的人时常容易对生物可降解塑料及生物基塑料进行混淆。生物基塑料由生物材料制造而来，例如植物。它们可以被称为“绿色塑料”，但这并不代表所有生物基塑料都可以被降解。塑料是否可被降解与它们自身的化学结构紧密相关，正如一些石油制塑料也可以被降解一样。从制造角度上来看，生物基塑料足够环保。但它们并不完全属于生物可降解塑料。(Biobased, Biodegradable and Compostable Plastics, 2024)

2.4 微塑料对土壤生物的影响

2.4.1 微塑料对土壤微生物的影响

土壤微生物群落是土壤环境及质量变化的重要指标，同时对土壤环境物质循环起到了不可替代的作用。研究表明，世界 40-50% 的微塑料都积聚在土壤内。因此，土壤生物不可避免地会与土壤微塑料产生接触。同时，土壤生物群落会收到微塑料的影响，其表面会为微生物提供栖息地(Wright et al., 2020)。微生物可以快速附着于粗糙微塑料表面上，形成生物膜。此外，生物膜的形成可以导致特定微生物物种群落规模的扩大(Yu et al., 2024)。同时，生物可降解塑料通过增加土壤微生物的碳源也可以直接影响微生物的生长繁殖，这些额外碳源刺激了土壤微生物的生长，从而影响微生物物种间的合作关系。因此，微塑料对于土壤微生物的群落结构，多样性及稳定性都有一定影响。

2.4.2 微塑料对土壤动物的影响

蚯蚓作为土壤环境中的重要生物，由于其对污染物的敏感性，经常被选作土壤动物实验的模式物种。蚯蚓摄入微塑料会导致肠道物理及化学层面的损伤。通过电子显微镜，实验人员观测到在添加 PE 和 PP 微塑料时在蚯蚓肠道上皮发现了明显的红色区域，代表着肠壁擦伤及变薄。此类现象在暴露于聚酰胺微塑料的鱼肠中也有所发现(Zhang et al., 2022)。同时，微塑料在肠道中的长期驻留会影响生物营养吸收。许多土壤生物无法完全消化分解微塑料导致其在肠道的集聚。(Zhu et al., 2017)肠道与微塑料的长期接触会损害黏膜，并诱发蚯蚓肠道组织的病变及炎症(Chen et al., 2020, Rodeiguez-Seijo et al., 2017)。此外，微

塑料可以通过肠道内皮细胞增多或吞噬细胞迁移至其他组织中。因此，微塑料不仅在肠道中积聚。研究表明，在其他生物体摄入微塑料后，在肝脏，脾脏，肾脏，心脏睾丸等组织或器官中均发现了微塑料。(Burns and Boxall, 2018, Jin et al., 2021, Stock et al., 2019, Walczak et al., 2015)。同时，研究证明，微塑料可以改变跳虫的肠道微生物群落，并影响其繁殖，甚至导致死亡。(Ju et al., 2019) 微塑料还会引发土壤线虫的代谢紊乱，影响其生长发育。

2.5 土壤体系对微塑料的影响

2.5.1 土壤微生物微塑料降解

土壤微生物的降解主要分为物理及化学降解。物理降解改变了物质外观，以及其机械性能。化学降解则改变了物质的化学结构，如破坏化学键，相对分子质量的变化等。土壤微生物在微塑料表面或内部形成生物膜，腐蚀分解其表面或使微塑料碎片化。从而改变微塑料的机械性能及化学结构。同时，粘附于微塑料表面的土壤微生物会分泌酶，如角质酶，蛋白质酶，脂肪酶。微塑料在酶降解作用下将解聚至更小单位，如二聚体及单体。最后，被酶解聚的产物将被微生物同化，作为其碳源或其他营养物质利用。未被同化的解聚产物将经历矿化作用。

2.5.2 蚯蚓肠道微生物对塑料的降解

通过研读论文，我们发现蚯蚓对于塑料的降解有着一定潜力。蚯蚓对土壤塑料降解的潜在影响包括微生物增值，蚯蚓身体接触，酶分泌，微生物殖民，水解产物的吸收等(J. C. Sanchez-Hernandez et al., 2020b)。其中许多研究表明，通过让蚯蚓摄入微塑料可能会对塑料降解产生关键作用。微塑料连续接触蚯蚓肠道环境并进行消化可能会对塑料造成降解，因为蚯蚓肠道可以容纳比周边土壤环境多 4000 倍的微生物(Drake & Horn, 2007c)。土壤生物肠内的微生物与宿主长期共存，并根据宿主生存环境的改变而协同演化。土壤生物通过改变其肠道微生物的生存环境，便可以改变它们吸收其他营养物质的能力，甚至可能将原先无法吸收的物质变为自己可利用的营养物质。蚯蚓作为土壤健康的基础，为土壤内的降解过程发挥着重要作用(Web of Science, n.d.-b)。

相关论文证明虽然蚯蚓肠道并没有对 LDPE 产生明显的降解效应，但实验人员在蚯蚓肠道中发现了更大比例的小型 PLA 和 PBAT 微塑料。所引论文使用的蚯蚓种类为普通蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*)。同时，他们的观察表明，当暴露在土壤的肠道环境中时，只有 PLA 微塑料（也可能发生在 PBAT 为塑料上）会发生解聚。同时，个别研究中指出蚯蚓肠道中的微生物分布直接反映了其所在土壤的微生物分布。由于 PBAT 和 PLA 都是聚酯，因此实验人员认为他们所观测到的降解现象很可能是由于普通蚯蚓独特的肠道环境，其中，微生物以及各类酶的活性要远高于平常土壤的微生物活性。该因素可能触发了脂键的水解反应，加速了生物降解速率。这一科学猜测使得研究人员们做出了这一结论：在没有土壤的情况下，PLA 和 PBAT 也会在蚯蚓肠道中因为研磨和生物降解而粉碎。但事实上，他们的另一实验组（没有摄入土壤的蚯蚓肠道）并没有成功粉碎塑料。即使实验人员通过物理研磨将这一实验组蚯蚓所摄入的塑料颗粒碎片化至更加小的颗粒，但蚯蚓肠道的本土微生物及酶仍然无法触发脂键的水解反应。而在实验组一（上述提到的成功降解组）由于土壤摄入后蚯蚓肠道微生物及酶活性提升，PLA 及 PBAT 在消化道内经历了物理碎片化及解聚。土壤中的微塑料用常规处理手法极难处理，而本土生物的介入虽然不能短期内对污染环境进行可观的清理，但可以从长期上修复环境(Meng et al., 2023d)。蚯蚓对于微塑料的印象不仅在消化道中，有研究表明，蚯蚓自身在土壤中的常规运动也可以促进塑料的腐烂速率，例如其活动中制造的洞穴等(Al-Maliki et al., 2021b)。这进一步让实验人员看到了蚯蚓降解微塑料的潜力，或许它能够成为解决土壤微塑料污染的关键。然而，蚯蚓降解微塑料还存在许多不可忽视的问题。例如，目前已知的可被蚯蚓肠道进行分解的塑料十分局限，通过前人研究，也可以发现能被蚯蚓肠道起作用的微塑料多为结构易降解的塑料，例如 PLA, PBAT。同时，实验表明，摄入微塑料的蚯蚓有着较高的死亡率（四天内 30-80%的死亡率）(Meng et al., 2023d)。这可能是由于微塑料颗粒对蚯蚓肠道的破坏，肠道微生物的紊乱，以及中毒(Huang et al., 2021)。

第 3 章 实验材料与方法

3.1 实验设计

本实验通过模拟蚯蚓在受微塑料污染的土壤中的活动情况，探究蚯蚓、蚯蚓肠道微生物及土壤微生物组成对土壤中存在的微塑料造成的影响。本实验设立 4 组实验，每组实验设立 4 个平行重复组（如表 3.1 所示）。其中，第一组加入微聚苯乙烯（记为 PS-1、PS-2、PS-3、PS-4）；第二组加入微聚苯乙烯和蚯蚓（记为 PSE-1、PSE-2、PSE-3、PSE-4）。第三组加入微聚乳酸（记为 PLA-1、PLA-2、PLA-3、PLA-4）；第四组加入微聚乳酸和蚯蚓（记为 PLAE-1、PLAE-2、PLAE-3、PLAE-4）。一二组为对照，三四组为对照。蚯蚓在实验土壤中驯化 7 天，16 组平行实验按预设分别加入等于土壤质量 2% 的微聚苯乙烯和微聚乳酸（以下统称为微塑料），加入蚯蚓后培养 18 天。对土壤和蚯蚓肠道进行 16S rRNA 测序，探究不同处理组下微生物群落结构的变化。使用密度分离法提取土壤中的剩余微塑料，后利用扫描电子显微镜（SEM）和傅立叶变换红外吸收光谱仪（FTIR）观察其表面特征，探究不同处理组下微塑料的表面变化。

蚯蚓设置	未放置蚯蚓		放置蚯蚓	
塑料种类	PLA	PS	PLA	PS
组别编号	PLA-1	PS-1	PLA-E-1	PS-E-1
	PLA-2	PS-2	PLA-E-2	PS-E-2
	PLA-3	PS-3	PLA-E-3	PS-E-3
	PLA-4	PS-4	PLA-E-4	PS-E-4

表 3.1 实验分组操作表

3.2 实验材料及蚯蚓驯养

实验中所用的土壤采集自中国北京昌平(40°10'N, 116°10'E)的田地表面约 10 cm 土层。使用孔径为 2 mm 的不锈钢筛进行了简单处理，去除了土壤中含有的杂物。之后在室外(平均气温 24.5 °C)进行为期一周的晾晒，使用研钵对风

干后的土块进行研磨，并再次通过孔径为 2 mm 的不锈钢筛。实验用土壤的 pH 值为 7.9，有机质总含量为 18.3 mg/kg，其他理化指标见表 3.2。

Soils ^a	pH	EC μs/cm	Clay %	Silt %	Sand %	TC mg/kg	TOC mg/kg	TN mg/kg
WF	7.9	619	5.5	27.6	66.9	12.2	5.2	0.9

表 3.2 土壤理化指标

赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)购买自江苏一龙蚯蚓厂。在到货后检查蚯蚓的健康状态，筛选状态不合格的蚯蚓。在筛选完毕后，将沾土的合格蚯蚓用去离子水冲洗干净，转移至已铺好湿润滤纸的不锈钢盆中。

将实验土壤置于不锈钢盆中，控制土壤含水率维持在最大含水率的 30%左右，均匀撒燕麦粉到土壤表面作为蚯蚓食物，将清洗后的蚯蚓放置于土壤中，将不锈钢盆放入恒温恒湿培养箱（温度 20 °C，相对湿度 75 %）中，培养 7 天。培养过程中定期向土壤中加入去离子水，维持土壤含水率在最大含水率的 30%左右。

在 16 个 2 L 烧杯（共 4 个处理组，每个处理组各有 4 个平行）中分别加入 588 g 实验土壤。在第一、二处理组的 2 L 烧杯中加入 12 g 微聚苯乙烯（图 3.1，CAS:9003-53-6,50 μm，东莞凯萱塑胶科技有限公司），在第三、四处处理组的 2 L 烧杯中加入 12 g 微聚乳酸（图 3.2，CAS: 26100-51-6,50 μm，东莞凯萱塑胶科技有限公司）。将加入的微塑料和土壤混合均匀。向每个烧杯中加入去离子水，使土壤含水率为最大含水率 30%左右。

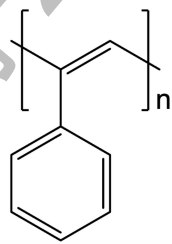


图 3.1 聚苯乙烯结构式

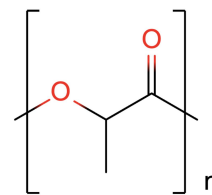


图 3.2 聚乳酸结构式

驯化结束后选用健康的成熟蚯蚓作为实验对象。去除蚯蚓表面的大块泥土，选择长度相似的 13 条蚯蚓分别加入每个 2L 烧杯。将所有 2L 烧杯用有孔锡纸覆盖后，放置在恒温恒湿培养箱（温度 20 °C，相对湿度 75%）中，培养蚯蚓 18 天。在过程中定期向土壤中加入去离子水，维持土壤含水率在最大含水率 30%左右。

3.3 土壤理化性质测定

土壤 pH 值：称取干燥的实验土壤（过 10 目不锈钢筛）20 g，加入 25 mL 去离子水。使用水平振荡器（180 rpm）将样品振荡 5 min，静置 30 min，后用 pH 计测量土壤 pH 值。

土壤电导率：称取干燥的实验土壤（过 10 目不锈钢筛），加入 100 mL 去离子水。用水平振荡器（180 rpm）振荡样品 30 min，静置 30 min 后取 60 mL 上清液放入离心管中，离心 30 min（3000 r/min）。使用电导仪测量土壤提取液的电导率。

土壤有机质：将风干后的实验土壤过 10 目不锈钢筛后，研磨过 100 目不锈钢筛。称取 25 mg 处理后土壤，滴入盐酸（2 mol/L）80 μ L。使用多孔铜板和电热板将试样蒸干 1 h。使用元素分析仪测定有机质含量。

土壤含水率：取实验土壤放入容器，烘干称重后得到含水量。

3.4 蚯蚓解剖以及蚯蚓肠道、土壤微生物 DNA 的提取

将蚯蚓从烧杯中取出分组放入离心管中，向离心管内加满无水乙醇杀死蚯蚓。在超净台内，使用次氯酸钠溶液（0.5%）清洗蚯蚓 3 次，再用去离子水冲洗蚯蚓 3 次。将塑料薄膜用针头固定在泡沫板上，喷洒 75%乙醇溶液进行消毒。

分别取蚯蚓，用针头固定在塑料薄膜上，使用解剖刀取出蚯蚓肠道备用。

往 2 mL Lysing Matrix E 管中加入 500 mg 蚯蚓肠道样品，再加入 978 μ L 磷酸钠缓冲液和 122 μ L MT 缓冲液，后将样品置于 FastPrep 仪器中（时间：40

s, 速度: 6.0 m/s), 离心 5 min (14500 rpm)。转移上清液至离心管中, 加入 150 μ L 蛋白沉淀液, 手摇 10 次, 充分混合后将混合物离心 5 min (14500 rpm)。取出上清液到 15 mL 管中, 加入 1 mL 重悬硅珠溶液。手动振荡 2 min, 把管放在架子上静置 3 min, 后移除 500 μ L 上清液。将 600 μ L 的 DNA 溶液转移到自旋过滤器中, 离心 1 min (14500 rpm), 清除废液。再次离心 2 min (14500 rpm), 清除废液, 然后将自旋过滤器置于室温下风干 5 min。加入 50-100 μ L DES 洗脱液, 离心 1 min (14500 rpm), 得到提取出的 DNA, 放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。 ("FastDNA SPIN Kit for Soil User Manual", 2021)

土壤微生物 DNA 提取操作步骤同上, 将 500 mg 蚯蚓肠道样品替换为 500 mg 土壤样品。将提取出的 DNA 样本送做 16S rRNA 测序。

3.5 实验后土壤中微塑料样本的提取

将土壤放置于电热恒温鼓风干燥箱 (40 $^{\circ}$ C) 中烘干, 取出研磨后过 10 目不锈钢筛。配置 7.5 kg 氯化锌溶液 (去离子水: 氯化锌质量比 1.5:2), 备用。在每个平行实验组的处理后实验土壤中各称取 50 g 土壤样本, 放入 500 mL 蓝盖瓶中, 后加入 300 mL 氯化锌溶液, 使用水平振荡器 (200 rpm) 振荡 30 min。静置分层后, 转移上清液至 1 L 烧杯中。重复以上操作 2 次, 沉降烧杯中的液体 2 天。

取烧杯中的上清液, 使用真空过滤装置进行抽滤 (滤膜为 20 μ m 尼龙滤膜)。在过程中, 用稀盐酸冲洗样本表面的氯化锌, 后用去离子水反复冲洗分离提取装置仪器和滤器内壁, 冲洗液同样过滤。将滤膜上的剩余物质取出放入消解管中, 加入适量 30%过氧化氢, 于石墨消解炉消解 2.5 天 (60 $^{\circ}$ C)。

再次使用真空过滤装置抽滤消解溶液 (滤膜同上), 抽滤过程中用去离子水不断冲洗烧杯和滤器内壁, 使物质集中在滤膜上, 冲洗液同样过滤。将滤膜取下放置在培养皿中, 室温干燥备用。

第 4 章 数据分析

4.1 土壤和蚯蚓肠道样本 16sRNA 测序结果分析

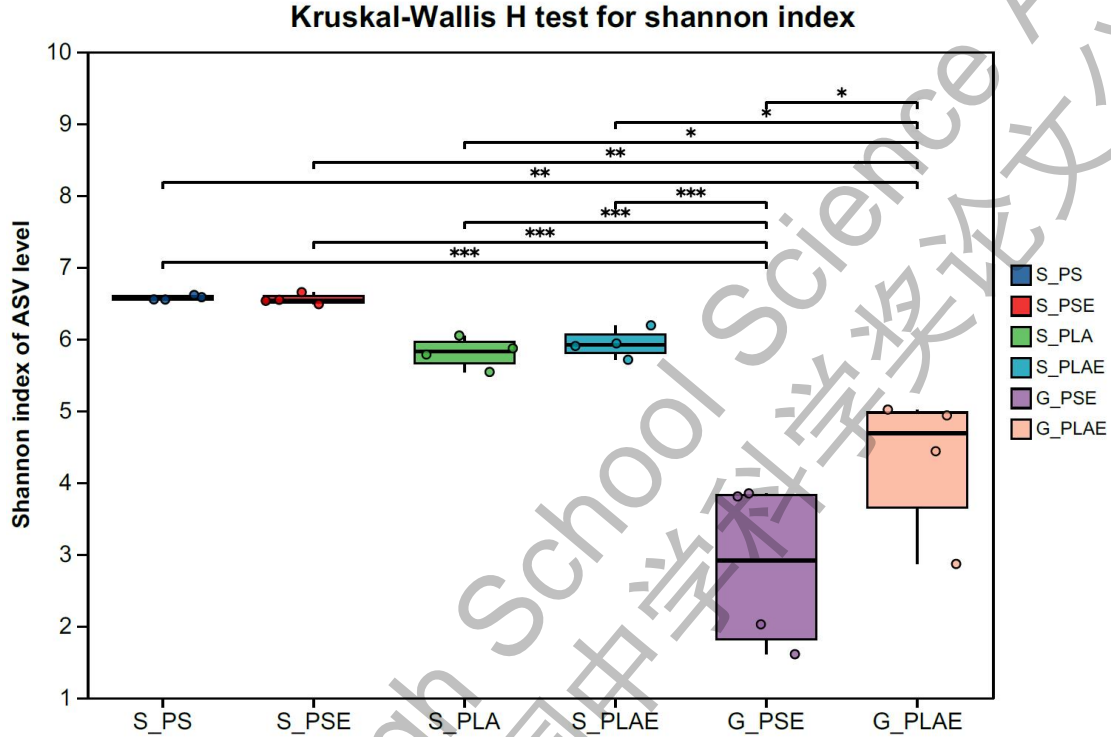


图 4.1 土壤和蚯蚓肠道细菌 α 多样性

基于 Shannon 指数的 α 多样性箱线图表明，不同处理下的土壤细菌 α 多样性均显著高于蚯蚓肠道，表明土壤环境提供了比蚯蚓肠道更具多样性和稳定性的栖息环境。在 PS 微塑料暴露下的土壤细菌 α 多样性显著高于 PLA。这可能是由于 PS 的化学稳定性较高，较难被分解，从而导致微塑料对土壤环境的扰动较小，使得土壤环境保持多样化的微生物群落。而 PLA 由于更容易降解，可能释放出更多有机物，改变了土壤中的营养和代谢环境，导致一些特定的微生物种群占优，从而引起 α 多样性的降低。在 PS 和 PLA 暴露下，加入蚯蚓对土壤的细菌 α 多样性均没有显著影响。而 PS 暴露下的蚯蚓肠道中细菌 α 多样性显著低于 PLA 暴露下的蚯蚓肠道。这可能是由于 PS 难以降解，蚯蚓在消化道内无法充分处理 PS 微塑料，导致某些对 PS 不适应的微生物减少。相比之下，PLA

较易被降解，蚯蚓消化 PLA 时可能产生更多适合微生物生长的降解产物，这些产物可能促进了某些微生物的繁殖，进而提高了 α 多样性。

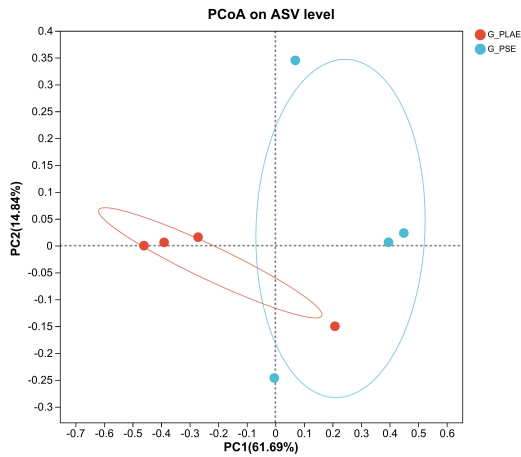


图 4.2.1

图 4.2.1 PS 和 PLA 对蚯蚓肠道微生物群落结构的影响

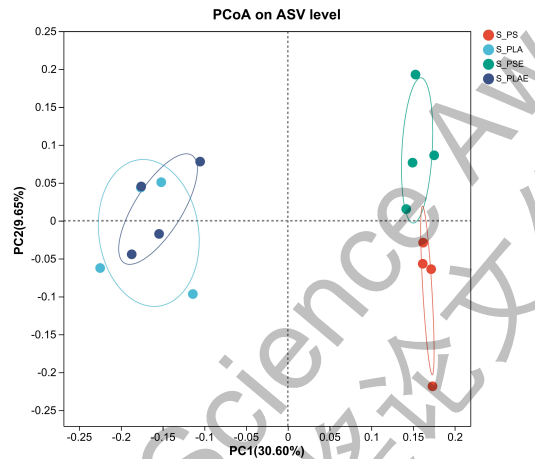


图 4.2.2

图 4.2.2 蚯蚓对 PS 和 PLA 暴露下土壤细菌群落结构的影响

基于 Bray-Curtis 距离的 PCoA 图显示，不同类型的微塑料暴露显著改变了土壤细菌群落结构。在 PS 的暴露下，蚯蚓的存在对土壤细菌群落有显著影响，但是在 PLA 的暴露下，蚯蚓的存在对土壤细菌群落结构的影响不显著。蚯蚓肠道微生物 PCoA 图表明，PS 和 PLA 暴露下蚯蚓肠道细菌群落结构具有显著差异。PS 微塑料可能作为一种物理屏障(Gao et al.2022b)，影响了土壤结构和微生物的栖息环境，而蚯蚓的活动进一步加剧了这种影响，导致土壤细菌群落发生显著变化。相反，PLA 更容易降解并与土壤混合，其降解产物可能更快被微生物利用，蚯蚓的存在未能显著改变 PLA 处理下的群落结构。

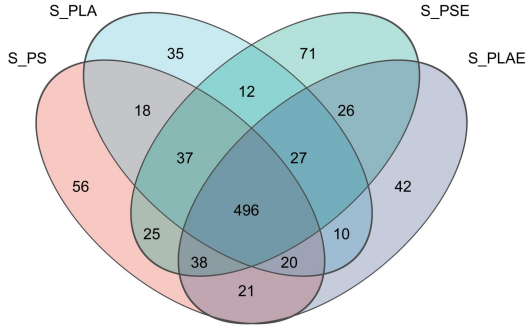


图 4.3.1

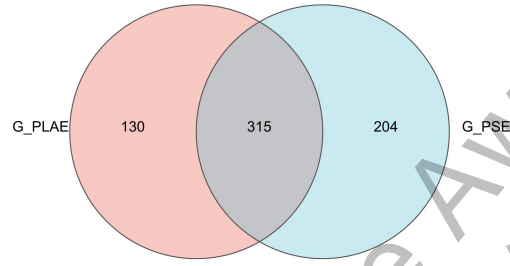


图 4.3.2

图 4.3.1 不同土壤独有与共享的 ASVs 数

图 4.3.2 肠道微生物之间独有与共享的 ASVs 数

所有四组土壤处理中，PS、PLA，蚯蚓暴露的处理组中共有 496 个共享的 ASVs，独特的 ASVs 的最低数量发现在 PLA 暴露的土壤细菌中。在 PS 和 PLA 单独暴露下，两组蚯蚓有 315 条共享的 ASVs，分别占 PLA 和 PS 暴露下蚯蚓肠道微生物 ASVs 的 70.79%和 60.69%。

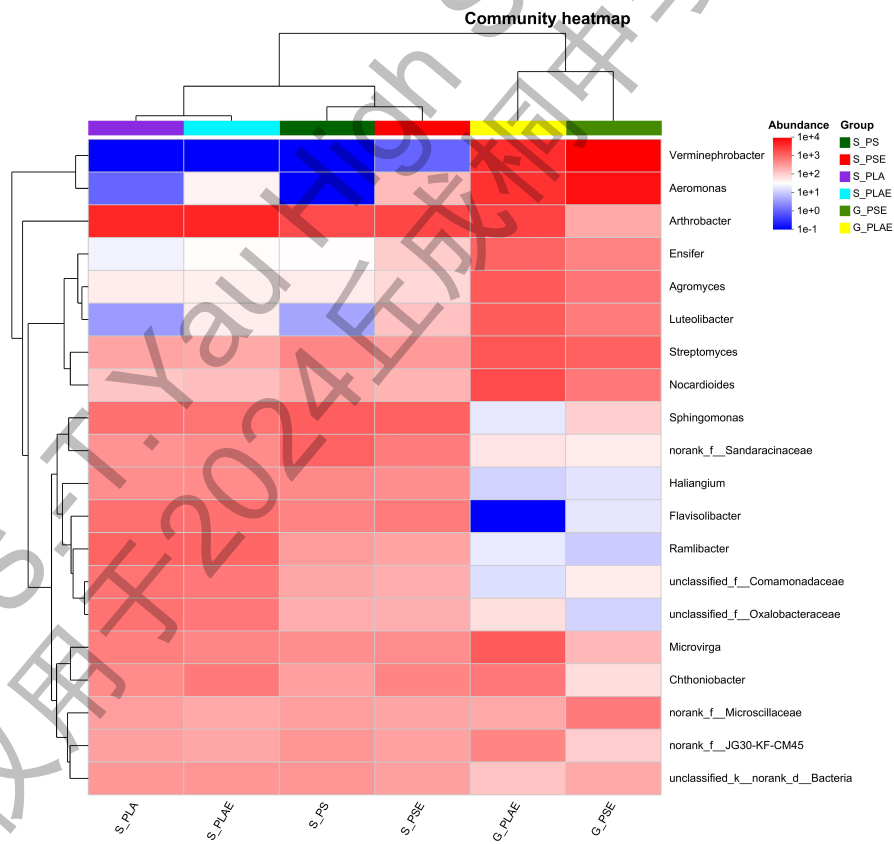


图 4.4 属水平上细菌类别热图

在 PS 暴露下, 与对照组相比, *Luteolibacter* (苍黄杆菌属)、*Aeromonas* (气单胞菌属) 和 *Verminephrobacter* (嗜虫杆菌属) 的相对丰度呈现显著增加趋势。PS 微塑料作为惰性物质, 虽然难以被降解, 但其表面可能形成了生物膜, 供一些对碳源依赖度低的微生物定殖, 例如, *Verminephrobacter* 和 *Luteolibacter* 的相对丰度在 PS 暴露的土壤中显著增加, 这些微生物可能参与了生物膜的形成, 帮助 PS 在土壤中的物理稳定性。在蚯蚓的肠道微生物组成中, *Aeromonas* 和 *Verminephrobacter* 也均为两组中显著富集的菌属, 可能与蚯蚓在消化 PS 过程中产生的副产物有关。与对照组相比, 在 PLA 的暴露下, 蚯蚓的添加对土壤中大多数细菌无显著变化, 仅有 *Luteolibacter* 和 *Aeromonas* 的相对丰度呈现显著增加趋势, 表明这些微生物可能对 PLA 的降解产物具有更高的利用率, 适应 PLA 暴露的土壤环境。

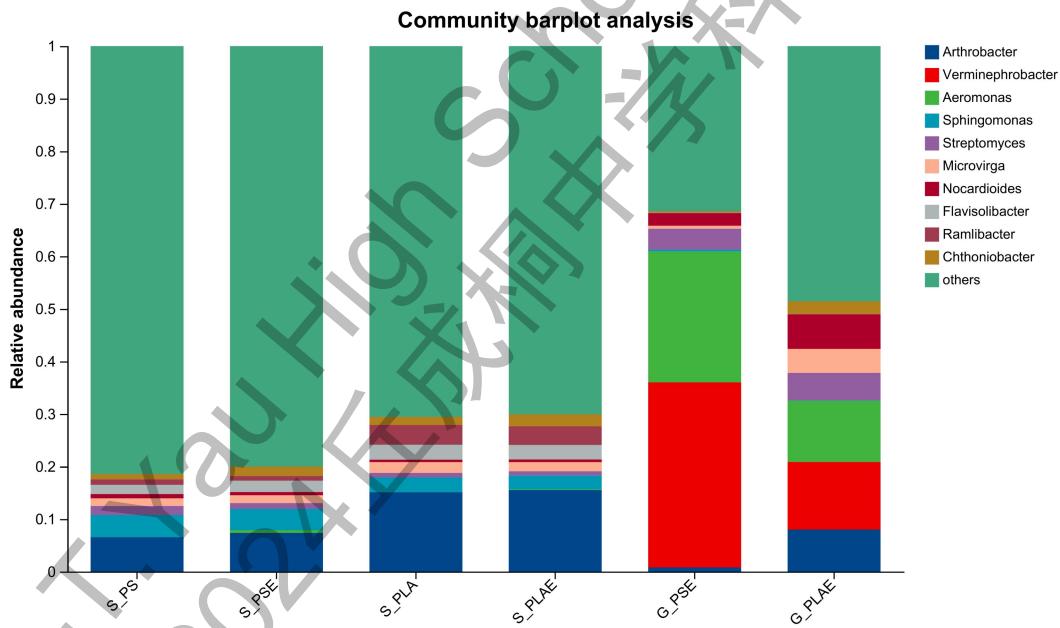


图 4.5 属水平上土壤细菌和肠道微生物群落的组成

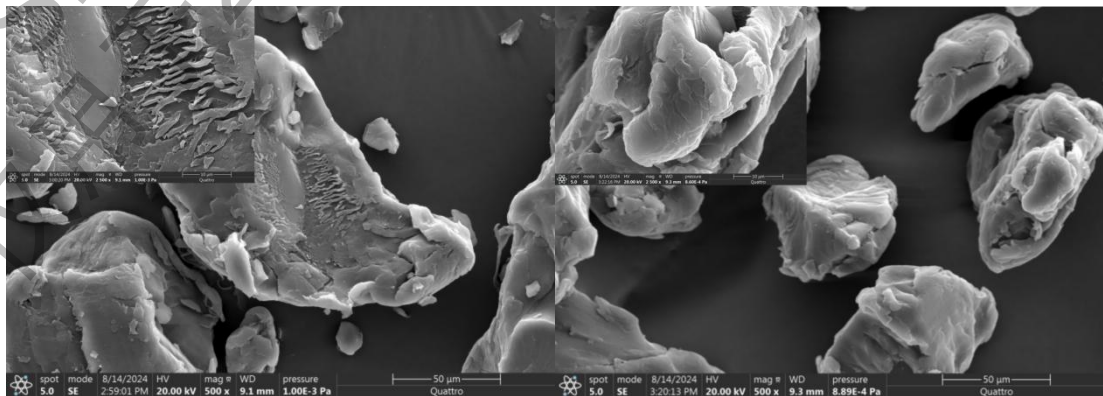
进一步分析属水平上土壤细菌群落的组成, 可以发现, 在 PS 和 PLA 的暴露土壤下, 与 PS 暴露对比, PLA 可以显著增加土壤中 *Arthrobacter* (节杆菌属) 和 *Ramlibacter* 的相对丰度, 蚯蚓的存在可以提高土壤中 *Aeromonas* 的相对丰度。在蚯蚓的肠道微生物组中, PS 暴露的蚯蚓中 *Aeromonas* 和

Veminephrobacter 的相对丰度显著高于 PLA 组；PLA 组中 *Arthrobacter*、*Microvirga* (微枝形杆菌属) 和 *Nocardioides* (诺卡氏菌属) 的相对丰度显著高于 PS 组。*Nocardioides* 在先前研究中被认为是对塑料有降解行为的细菌菌属 (Ma et al., 2023)。

在 PLA 暴露下, *Arthrobacter* 和 *Ramlibacter* 的相对丰度显著增加。这两种微生物以其在复杂有机物降解中的作用而闻名, 尤其是 *Arthrobacter*, 通常被认为是能够分解塑料和有机聚合物的关键菌群之一 (Han et al., 2020b)。PLA 在土壤中的降解主要通过水解作用, 生成乳酸单体, 随后被一些特定的微生物进一步代谢。*Arthrobacter* 和 *Ramlibacter* 可能是利用 PLA 降解产物的关键微生物, PLA 的水解产物为这些微生物提供了丰富的碳源, 从而促进了它们的生长。与对照组相比, 蚯蚓显著加速了 PLA 的降解过程, 这可能是由于蚯蚓的肠道为 PLA 降解产物提供了理想的环境, 促进了对 PLA 有降解作用的微生物 (如 *Arthrobacter*) 的富集。蚯蚓肠道的湿润和富氧环境可能加速了 PLA 的物理分解, 使得微生物更容易接触到 PLA 降解后的有机物质。这些细菌可能通过其分泌的酶参与 PLA 的进一步降解。依据以往研究, *Aeromonas* (气单胞菌属) 的 PHB (聚羟基丁酸酯) 降解酶的相关研究 (Amir et al., 2023), 本研究推断 *Aeromonas* 中也具有可以降解聚乳酸等含有脂基塑料的菌种。

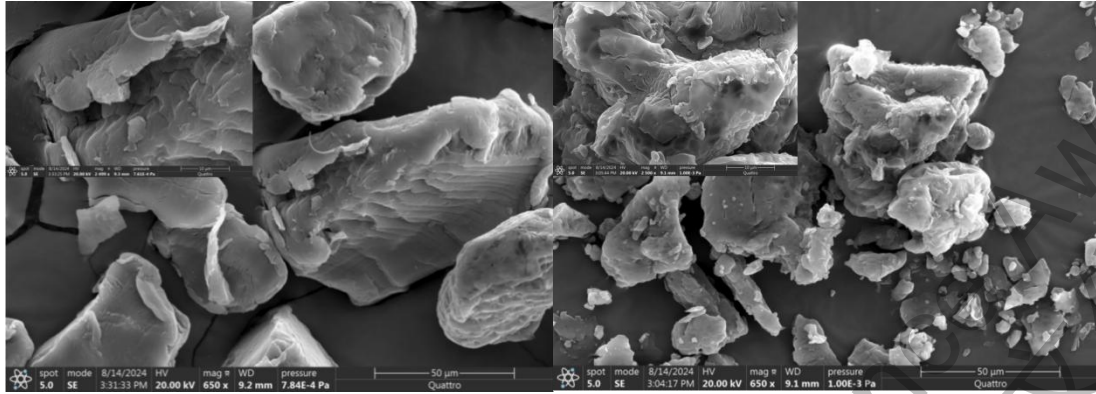
4.2 扫描电子显微镜图像分析

使用扫描电子显微镜对未做处理的微塑料 (PS-CK, PLA-CK)、未加入蚯蚓的经处理微塑料样本 (PS, PLA) 以及加入蚯蚓处理过后的微塑料样本 (PS-E, PLA-E) 进行扫描, 观察其表面特征。如下图所示。其中, 大图为 50 μm 比例扫描的图像, 而左上角的小图为 10 μm 比例放大扫描的图像。



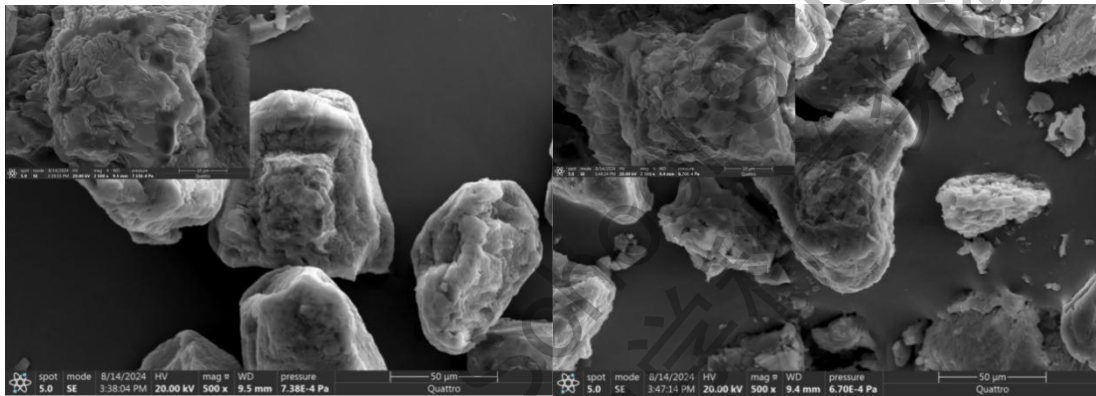
PS-CK (图 4.6.a)

PS (图 4.6.b)



PS-E (图 4.6.c)

PLA-CK (图 4.6.d)



PLA (图 4.6.e)

PLA-E (图 4.6.f)

扫描电镜图显示，PS-CK 和 PLA-CK 代表两种未处理的微塑料，PS 和 PLA 为未加蚯蚓的土壤中提取的微塑料样本，PS-E 和 PLA-E 为加蚯蚓的土壤中提取的微塑料样本。根据电镜图像可以发现，两种微塑料的形状和大小不规则，PS 表面相比于 PLA 更为光滑（图 4.6.a，图 4.6.d）。PS 微塑料颗粒经过土壤老化处理表面变得光滑，但是否添加蚯蚓对 PS 表面的形态的影响并不明显（图 4.6.b，图 4.6.c）。PLA 微塑料颗粒经过土壤老化处理，表面变得粗糙且褶皱增加（图 4.6.e，图 4.6.f），且土壤中 PLA 的重量对比 PS 显著下降，证明 PLA 被降解。添加蚯蚓的 PLA 相比于不加蚯蚓的 PLA 颗粒更加破碎不规则（图 4.6.e，图 4.6.f）。

4.3 傅立叶变换红外吸收光谱图分析

使用傅立叶变换红外吸收光谱仪（FTIR）对未做处理对微塑料（PS-CK，PLA-CK）、未加入蚯蚓的经处理微塑料样本（PS，PLA）以及加入蚯蚓处理

过后的微塑料样本 (PS-E, PLA-E) 进行扫描, 观测其官能团以及共价键种类。将 PS 与 PLA 的 FTIR 扫描曲线分组后得到两组图像 (图 4.7.1, 图 4.7.2)。

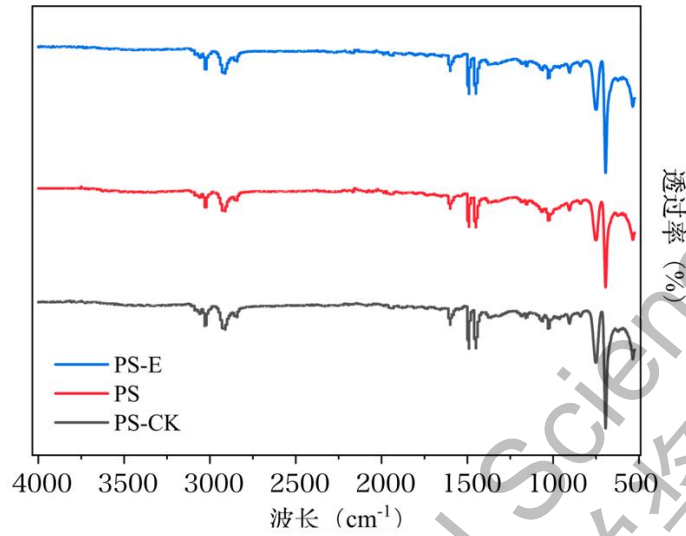


图 4.7.1

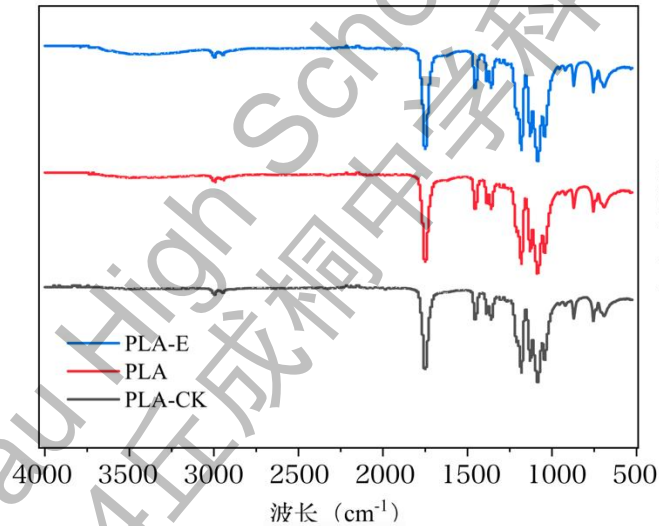


图 4.7.2

傅里叶红外光谱图 (FTIR) 表明, 与原始聚乳酸 (PLA) 微塑料相比, 添加蚯蚓处理组的微塑料在 2530 cm^{-1} (分子内缔合-OH 键) 以及 1285 cm^{-1} 处和 1420 cm^{-1} 处 (-COOH 键) 的透过率均显著增强; 且在在 3483 cm^{-1} 处 (羧酸中的-O-H 单键) 出现新的较宽的吸收带, PLA 在此处大约产生 2.2% 的吸收, 而 PLA-E 有 4.1% 的吸收 (具体的透过率数据如表 4.1 所示), 这可能是由于聚乳酸中脂基水解成醇和羧酸, 因而表明蚯蚓可以加速 PLA 的破碎及降解, 进而暴

露出跟多的表面官能团。相较于 PS，与原始聚苯乙烯 (PS-CK) 相比，添加蚯蚓处理，并没有显著改变其表面的官能团，1650 处 (碳碳双键，C=C，吸收峰) 并没有明显变化。表明未出现更多的碳碳双键，则表明没有出现更多的苯乙烯单体 (含有碳碳双键)，说明蚯蚓不能促进其生物降解。

波长	透过率		
	3480	3500	3520
PLA-CK	99.0%	98.8%	98.9%
PLA	98.1%	97.8%	98.2%
PLA-E	96.0%	95.9%	96.4%

表 4.1 微塑料透过率数据

4.4 数据分析总结

PS 和 PLA 微塑料扫描电子显微镜图像分析总结:

研究发现微聚苯乙烯 (PS) 在土壤中老化后表面更加平整，然而是否添加蚯蚓对其表面特征的影响并不明显。微聚乳酸 (PLA) 经过一定时间的土壤老化处理，其表面变得粗糙且褶皱有所增加，添加蚯蚓的 PLA 相比于未加蚯蚓的 PLA 颗粒更加破碎不规整。

通过分析傅立叶变换红外吸收光谱 (FTIR) 谱图，得到 PS 和 PLA 微塑料傅立叶红外光谱分析总结:

经处理的微聚乳酸与原始的微聚乳酸的 FTIR 谱图对比可知，添加蚯蚓处理后的微聚乳酸颗粒在氢氧单键 (-O-H) 处的吸收带大于未有蚯蚓活动参与的微聚乳酸颗粒，而不含蚯蚓的微聚乳酸颗粒又大于原始的微聚乳酸颗粒。由此表明，未经蚯蚓处理的微聚乳酸中产生的新的氢氧单键归功于聚乳酸中脂基的自然降解，经蚯蚓处理过后的微聚乳酸产生了更多的氢氧单键。

而反观微聚苯乙烯，原始微聚苯乙烯和蚯蚓参与实验和不参与实验的微聚苯乙烯的傅立叶变换红外吸收光谱对比，碳碳双键吸收峰 (1650 cm^{-1} 处) 无明

显变化，这表明蚯蚓参与和没有蚯蚓出现的微聚苯乙烯与原始的微聚苯乙烯相比没有出现更多的碳碳双键。

土壤和蚯蚓土壤样本 DNA 的 16s-rRNA 测序结果总结:

PS 和 PLA 微塑料在土壤中的降解表现出显著不同的微生物响应。PS 和 PLA 微塑料对土壤细菌群落及蚯蚓肠道微生物产生了不同的影响，主要原因在于两者的化学稳定性和降解特性不同。PS 的惰性导致微生物仅在其表面形成生物膜，而无法直接降解。而 PLA 由于其较易降解的特性，在土壤和蚯蚓肠道中都显著增加了某些能够代谢降解产物的微生物（如 *Arthrobacter* 和 *Aeromonas*）的相对丰度。

第 5 章 总结与展望

5.1 结论

由于塑料的种种优质特性，人类的生活已经被越来越多的塑料制品包围。与此同时，微塑料对土壤乃至环境的污染与危害成为了一个严峻的问题。本研究通过模拟蚯蚓在微塑料污染土壤的生活情况，探究蚯蚓对两种微塑料在土壤中的降解过程产生的影响。通过综合土壤和蚯蚓肠道样本的 16s-rRNA 测序分析结果、扫描电子显微镜图像以及傅立叶红外光谱分析结果以及前人研究成果，本研究得到了以下结论：

(1)在实验范围内，蚯蚓在土壤中的存在对微聚乳酸的降解有明显的促进效果。聚乳酸含有可水解基团，因此蚯蚓在土壤中的活动会对聚乳酸一类包含可水解基团的塑料降解过程造成积极影响(Dilshad et al., 2021)。

(2)蚯蚓对微聚苯乙烯的降解过程并没有明显的作用。聚苯乙烯是一类不含可水解基团的塑料，因而拥有相对更加稳定的性质。其这一特性导致其降解过程在短时间内无法被蚯蚓造成显著影响。

(3)对比先前研究发现 (Meng et al., 2023)，蚯蚓对较大的聚乳酸微塑料颗粒（如 200 微米）无明显降解行为，而对本研究中收到较小的微塑料颗粒具明显的加速降解。

(4)Veminephrobacter（嗜虫杆菌属）、Aeromonas（气单胞菌属）和 Microvirga（微枝形杆菌属）中可能含有潜在的降解菌种或菌群。

5.2 创新点

(1)选取了两种在性质上不相同的塑料进行实验，涵盖塑料种类更加全面，并且目前对比两种塑料降解程度的研究较少。

(2)目前大部分实验中都关注于土壤生物本身，而土壤生物内肠道微生物发挥的作用并没有被太过关注，本实验对土壤和蚯蚓肠道中的微生物群落结构进行了分析。

(3)实验选用了 50 μm 的微聚苯乙烯和微聚乳酸，对比之前的研究，所用微塑料的直径更小。

(4)考虑到多个方面的因素，探究了土壤和蚯蚓相互作用对微塑料降解产生的影响。

5.3 存在的问题

(1)没有对微塑料降解进行总体定量分析和检测，因此无法判断蚯蚓具体吸收的微塑料质量。

(2)由于实验过程完全在实验室完成，同时蚯蚓和土壤并不来自同一位置，自然环境没有完全还原。这有可能对蚯蚓的活性及其他方面有影响，进而影响实验结果。

(3)实验只包含了一种土壤及一种蚯蚓，研究对象较为单一，可以通过完成多种土壤和蚯蚓品种来完善研究程度。

(4)实验方法存在局限性，检测使用的仪器精度有限。同时，也没有通过进一步的实验验证菌群参与降解的过程。

5.4 未来展望

微塑料对环境的影响在短期内都会是一个棘手的问题，应该继续探索能够有效帮助如聚丙烯一类难以降解的塑料降解的方法。首先，对于实验后提取出的微塑料样本，可以使用如核磁共振波谱法（NMR）等更高精度的仪器对其进行分析和深入研究。结合先前研究，可以尝试将天然淀粉一类的其他化合物作为添加剂加入 PS 中以加快其降解速率（Chen, 2009），或考虑从黄粉虫肠道内分离有降解特性的相同菌种添加至蚯蚓体内，从而增加蚯蚓肠道菌群的降解效率。从本研究中可以看出不同结构对降解效率的影响，因此未来可以着重从塑料的结构入手，寻找更多潜在的生物促进降解方法。同时，也可以尝试分离丰度较高的微生物，进一步探究其帮助塑料降解的能力。

参考文献

- [1]Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., McGonigle, D., & Russell, A. E. (2004). Lost at sea: Where is all the plastic? *Science*, 304(5672), 838. <https://doi.org/10.1126/science.1094559>
- [2]Li, W., Zu, B., Yang, Q., Guo, J., & Li, J. (2023). Sources, distribution, and environmental effects of microplastics: a systematic review. *RSC Advances*, 13(23), 15566–15574. <https://doi.org/10.1039/d3ra02169f>
- [3]Kozlov, M. (2024). Landmark study links microplastics to serious health problems. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-024-00650-3>
- [4]Chen, J., Zhang, S., Xu, W., Chen, C., Chen, A., Lu, R., Jing, Q., & Liu, J. (2024). Exploring long-term global environmental impacts of chlorinated paraffins (CPs) in waste: Implications for the Stockholm and Basel Conventions and the global plastic treaty. *Environment International*, 108527. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108527>
- [5]Microplastics are everywhere — we need to understand how they affect human health. (2024). *Nature Medicine*, 30(4), 913. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-02968-x>
- [6]World Plastics Council. (2024b, April 2). How plastics are made - World Plastics Council. World Plastics Council. <https://worldplasticscouncil.org/resource/how-plastics-are-made/>
- [7]Admin. (2021, October 30). Plastic: it's not all the same. *Plastic Oceans International*. <https://plasticoceans.org/7-types-of-plastic/>
- [8]Federation, B. P. (n.d.-b). How is plastic made? A simple Step-By-Step explanation. *British Plastics Federation*. <https://www.bpf.co.uk/plastipedia/how-is-plastic-made.aspx>
- [9]Cai, Z., Li, M., Zhu, Z., Wang, X., Huang, Y., Li, T., Gong, H., & Yan, M. (2023). Biological degradation of plastics and microplastics: A recent perspective on associated mechanisms and influencing factors. *Microorganisms*, 11(7), 1661. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071661>
- [10]Filiciotto, L., & Rothenberg, G. (2020d). Biodegradable plastics: Standards, policies, and impacts. *ChemSusChem*, 14(1), 56–72. <https://doi.org/10.1002/cssc.202002044>
- [11] Berg, B., & Laskowski, R. (2005). Decomposers: soil microorganisms and animals. In *Advances in ecological research/Advances in Ecological Research* (pp. 73–100). [https://doi.org/10.1016/s0065-2504\(05\)38003-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2504(05)38003-2)
- [12] Biobased, biodegradable and compostable plastics. (2024, July 24). *Environment*. https://environment.ec.europa.eu/topics/plastics/biobased-biodegradable-and-compostable-plastics_en

- [13]Wright, R. J., Erni-Cassola, G., Zadjelovic, V., Latva, M., & Christie-Oleza, J. A. (2020b). Marine plastic debris: a new surface for microbial colonization. *Environmental Science & Technology*, 54(19), 11657-11672. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02305>
- [14]Yu, Z., Qiu, D., Zhou, T., Zeng, L., & Yan, C. (2024). Biofilm enhances the interactive effects of microplastics and oxytetracycline on zebrafish intestine. *Aquatic Toxicology*, 270, 106905. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106905>
- [15]Zhu, D., Bi, Q., Xiang, Q., Chen, Q., Christie, P., Ke, X., Wu, L., & Zhu, Y. (2017). Trophic predator-prey relationships promote transport of microplastics compared with the single *Hypoaspis aculeifer* and *Folsomia candida*. *Environmental Pollution*, 235, 150-154. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.058>
- [16]Chen, Y., Liu, X., Leng, Y., & Wang, J. (2019). Defense responses in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187, 109788. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109788>
- [17]Rodriguez-Seijo, A., Lourenço, J., Rocha-Santos, T., Da Costa, J., Duarte, A., Vala, H., & Pereira, R. (2016). Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. *Environmental Pollution*, 220, 495-503. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.092>
- [18]Jin, H., Ma, T., Sha, X., Liu, Z., Zhou, Y., Meng, X., Chen, Y., Han, X., & Ding, J. (2020). Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123430. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123430>
- [19]Stock, V., Böhmert, L., Lisicki, E., Block, R., Cara-Carmona, J., Pack, L. K., Selb, R., Lichtenstein, D., Voss, L., Henderson, C. J., Zabinsky, E., Sieg, H., Braeuning, A., & Lampen, A. (2019). Uptake and effects of orally ingested polystyrene microplastic particles in vitro and in vivo. *Archives of Toxicology*, 93(7), 1817-1833. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02478-7>
- [20]Walczak, A. P., Hendriksen, P. J. M., Woutersen, R. A., Van Der Zande, M., Undas, A. K., Helsdingen, R., Van Den Berg, H. H. J., Rietjens, I. M. C. M., & Bouwmeester, H. (2015). Bioavailability and biodistribution of differently charged polystyrene nanoparticles upon oral exposure in rats. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(5). <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3029-y>
- [21]Ju, H., Zhu, D., & Qiao, M. (2019b). Effects of polyethylene microplastics on the gut microbial community, reproduction and avoidance behaviors of the soil springtail, *Folsomia candida*. *Environmental Pollution*, 247, 890-897. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.097>
- [22]韩玉娟&滕应. (2024) 土壤中生物可降解塑料的生态效应及微生物降解研究进展. *土壤学报*. DOI:10.11766/trxb202405270210

- [23] Sanchez-Hernandez, J. C., Capowicz, Y., & Ro, K. S. (2020b). Potential use of earthworms to enhance decaying of biodegradable plastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(11), 4292–4316. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05450>
- [24] Drake, H. L., & Horn, M. A. (2007c). As the Worm Turns: The Earthworm Gut as a Transient Habitat for Soil Microbial Biomes. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 169–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093139>
- [25] Web of Science. webofscience.clarivate.cn/wos/wosec/full-record/WOS:001138193100001.
- [26] Meng, K., Lwanga, E. H., Van Der Zee, M., Munhoz, D. R., & Geissen, V. (2023d). Fragmentation and depolymerization of microplastics in the earthworm gut: A potential for microplastic bioremediation? *Journal of Hazardous Materials*, 447, 130765. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130765>
- [27] Al-Maliki, S., Al-Taey, D. K. A., & Al-Mammori, H. Z. (2021b). Earthworms and eco-consequences: Considerations to soil biological indicators and plant function: A review. *Acta Ecologica Sinica*, 41(6), 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2021.02.003>
- [28] Huang, Z., Weng, Y., Shen, Q., Zhao, Y., & Jin, Y. (2021). Microplastic: A potential threat to human and animal health by interfering with the intestinal barrier function and changing the intestinal microenvironment. *The Science of the Total Environment*, 785, 147365. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147365>
- [29] Zhang, Fan, et al. “Current Technologies for Plastic Waste Treatment: A Review.” *Journal of Cleaner Production*, vol. 282, Feb. 2021, p. 124523. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124523>.
- [30] 郝瑀然. 四问新污染物治理 生态环境部权威解读_政策解读_中国政府网. www.gov.cn/zhengce/2022-03/30/content_5682516.htm.
- [31] Dutchen, By Stephanie. “Microplastics Everywhere.” *Harvard Medicine Magazine*, 4 Apr. 2024, magazine.hms.harvard.edu/articles/microplastics-everywhere#:~:text=We%20encounter%20microplastics%20everywhere%3A%20from%20trash%2C%20dust%2C%20fabrics%2C,products%2C%20rain%2C%20seafood%2C%20produce%2C%20table%20salt%2C%20and%20more.
- [32] Thacharodi, Aswin, et al. “Microplastics in the Environment: A Critical Overview on Its Fate, Toxicity, Implications, Management, and Bioremediation Strategies.” *Journal of Environmental Management*, vol. 349, Jan. 2024, p. 119433. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119433>.
- [33] Sanchez-Hernandez, J. C., Capowicz, Y., & Ro, K. S. (2020b). Potential use of earthworms to enhance decaying of biodegradable plastics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(11), 4292–4316. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05450>

- [34] "Interaction of Microplastics and Soil Animals in Agricultural Ecosystems." *Current Opinion in Environmental Science & Health*, vol. 26, Apr. 2022, p. 100327. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2022.100327>
- [35] "FastDNA SPIN Kit for Soil User Manual." MP Biochemicals, 2021, www.mpbio.com. Accessed 30 Aug. 2024.
- [36] Gao, H., Liu, Q., Yan, C., Mancl, K., Gong, D., He, J., & Mei, X. (2022). Macro-and/or microplastics as an emerging threat effect crop growth and soil health. *Resources, Conservation and Recycling*, 186, 106549. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106549>
- [37] Ma, Y., Wang, J., Liu, Y., Wang, X., Zhang, B., Zhang, W., Chen, T., Liu, G., Xue, L., & Cui, X. (2023). NoCardioides: "Specialists" for Hard-to-Degrade Pollutants in the environment. *Molecules*, 28(21), 7433. <https://doi.org/10.3390/molecules28217433>
- [38] Han, Y., Wei, M., Han, F., Fang, C., Wang, D., Zhong, Y., Guo, C., Shi, X., Xie, Z., & Li, F. (2020b). Greater Biofilm Formation and Increased Biodegradation of Polyethylene Film by a Microbial Consortium of *Arthrobacter* sp. and *Streptomyces* sp. *Microorganisms*, 8(12), 1979. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121979>
- [39] Amir, M., Bano, N., Gupta, A., Zaheer, M. R., & Roohi, N. (2023). Purification and characterization of extracellular PHB depolymerase enzyme from *Aeromonas caviae* Kuk1-(34) and their biodegradation studies with polymer films. *Biodegradation*, 35(2), 137–153. <https://doi.org/10.1007/s10532-023-10051-4>
- [40] Dilshad, E., Waheed, H., Ali, U., Amin, A., Ahmed, I. (2021). General Structure and Classification of Bioplastics and Biodegradable Plastics. In: Kuddus, M., Roohi (eds) *Bioplastics for Sustainable Development*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-1823-9_2
- [41] Meng, K., Lwanga, E. H., Van Der Zee, M., Munhoz, D. R., & Geissen, V. (2023). Fragmentation and depolymerization of microplastics in the earthworm gut: A potential for microplastic bioremediation? *Journal of Hazardous Materials*, 447, 130765. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130765>
- [42] Erum, D., Hasnain, W., Umar, A., Arshia, A., & Iftikhar, A. (2021) General Structure and Classification of Bioplastics and Biodegradable Plastics, *Bioplastics for Sustainable Development*: 61-82.
- [43] Chen, G. (2009). Introduction of Bacterial Plastics PHA, PLA, PBS, PE, PTT, and PPP. In *Microbiology monographs* (pp. 1-16). https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_1
- [44] 沈叶红 (2011). 黄粉虫肠道菌的分离和取食. East China Normal University

致谢

我们的课题始于想解决一些和我们的生活息息相关的问题，而微塑料则是这些问题中离我们最近且最值得探索的。在总结了一些之前的研究后，我们自己尝试了用白腐菌去降解聚己二酰己二胺，一种被应用于各个领域的塑料。我们得到了显著的成果，于是从中得到了启发，其他种类的细菌中可能也存在可以降解塑料的方法。

在三个人共同的调研后，我们总结归纳了每个人提出的想法，得出了最终选题。至此，我们正式开始了我们的研究。在这里，感谢我们学校的生物老师，张扬老师在最开始探索选题、对选题的初步理论解释、设计初版实验方案以及后期论文撰写的过程中无偿给我们的指导和帮助。在整个设计实验、进行试验到最后的数据分析和论文撰写的过程中，我们三人平均分配了所有任务，付出了同等的努力和贡献。

在设计实验时，我们按照先前搜索到的文献，一起设计了第一版实验方案，规划了实验计划。但由于实验周期短，我们发现如果按照原定的计划完成实验，很有可能赶不上研究报告的提交截止，于是不得不压缩了原定的实验时间。在确定下来初步的实验计划之后，我们发现学校的实验室并不能满足实验方案所涉及的一些仪器以及其他条件。我们拜访了段桂兰教授，征得同意后借用了中科院生态环境研究中心的实验室，感谢段教授为我们提供的专业实验室使用机会。感谢我们的父母为我们的研究提供了经济支持，让我们得以购买实验中所涉及到的各类器皿和材料。

在实验的进行阶段，大部分的工作是三人一起完成，少数由于时间安排是两两一组完成，但我们三人各自完成的任务量基本相同。感谢实验室的曹金满老师在实验开始前无偿地帮助我们精确化题目，指导我们修改最初实验方案中存在的不足以及调整实验计划，同时在实验过程中帮助我们避免误操作，带我们学习数据的分析方法。在实施实验时，我们遇到的最大问题在土壤剩余微塑料的提取部分。抽滤时起初只采用了去离子水冲洗滤器内壁，以达到促进样本过滤效果的目的。但由于先前加入的氯化锌溶液，很多杂质会在过滤时被卡在滤膜上，过滤效果会随着抽滤量增加而变差。于是，王昊宇想到了可以用稀盐

酸冲洗以取出样本表面附着的氯化锌。在向老师确认后，同时使用去离子水和稀盐酸冲洗滤器内壁，大大增加了抽滤效率和成果。

在实验的尾声，由周静函和陶成溪负责使用仪器获取数据，王昊宇负责对得出的数据进行分析和计算。结束实验后，我们三人分工共同完成了这篇研究报告。其中陶成溪负责摘要、引言以及文献综述，周静函负责实验设计、总结与展望和致谢，王昊宇负责大纲和数据分析部分。

感谢实验室的王泽文、刘燕青和殷跃老师，无偿地指点了我们解剖提 DNA 的过程及使用表征仪器的操作方法和分析技巧。

2024 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2024丘成桐中学科学奖论文公示