

# 一株聚羟基脂肪酸酯合成菌的筛选及鉴定

祁莹莹<sup>#1</sup>, 贾丁柔<sup>#1</sup>, 张红蕾<sup>2</sup>, 刘刚<sup>\*1</sup>, 王冬梅<sup>\*1</sup>

1 河北农业大学生命科学学院, 河北 保定 071000

2 河北大学化学与环境科学学院, 河北 保定 071000

祁莹莹, 贾丁柔, 张红蕾, 刘刚, 王冬梅. 一株聚羟基脂肪酸酯合成菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 881-893.

QI Yingying, JIA Dingrou, ZHANG Honglei, LIU Gang, WANG Dongmei. Screening and identification of a polyhydroxyalkanoate-synthesizing strain[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 881-893.

**摘要:**【背景】传统石油基塑料产品给人类和环境带来的危害日益严重, 聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHA) 作为新型可降解塑料原料越来越受到青睐。但 PHA 生产成本过高, 使其推广应用严重受限。筛选适合大规模生产 PHA 的高产菌株是解决这一问题的重要途径。【目的】以挖掘合成 PHA 的菌种资源为目标, 从极端环境筛选和鉴定新的高产 PHA 合成菌。【方法】通过尼罗蓝平板分离法和 PCR 法分离纯化菌株, 采用 16S rRNA 基因鉴定并通过 MEGA 6.0 软件构建系统发育树, 分析菌株的进化关系, 最后通过尼罗红染色定性分析和气相色谱法定量测定该菌株在不同时期的 PHA 积累量。【结果】从盐碱地垃圾沉积物中分离得到了一株高产 PHA 的菌株, *PhaC* 的 PCR 扩增结果证实了该菌株是 PHA 合成菌, 经 16S rRNA 基因鉴定为 *Pseudomonas brassicacearum*, 将其命名为 NP-2, 进一步优化了菌株 NP-2 的培养条件, 在培养 48 h 时 PHA 积累量最大, 达到 3.78 mg/mL。【结论】NP-2 属于 *Pseudomonas brassicacearum*, 能高产 PHA。本研究为生产 PHA 提供了极端环境的高产 PHA 微生物菌种资源, 为进一步挖掘高产 PHA 菌株积累了数据。

**关键词:** 聚羟基脂肪酸酯; 菌株鉴定; 假单胞菌

资助项目: 2020 年度河北省引进留学人员资助项目(C20200331); 河北省自然科学基金(C2019204280)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the Scientific Research Foundation for Returned Scholars of Hebei Province (C20200331) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2019204280).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: LIU Gang, gangliu2004@126.com; WANG Dongmei, dongmeiwang63@126.com

Received: 2022-06-13; Accepted: 2022-08-13; Published online: 2022-11-02

## Screening and identification of a polyhydroxyalkanoate-synthesizing strain

QI Yingying<sup>#1</sup>, JIA Dingrou<sup>#1</sup>, ZHANG Honglei<sup>2</sup>, LIU Gang<sup>\*1</sup>, WANG Dongmei<sup>\*1</sup>

1 College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

2 College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071000, Hebei, China

**Abstract: [Background]** Due to the aggravating harm of petroleum-based plastic products to humans and the environment, polyhydroxyalkanoates (PHA) are becoming increasingly popular as new biodegradable plastic materials. However, the high production cost restricts the popularization and application of PHA. Screening the strains with high PHA yield for mass production is a key solution to this problem. **[Objective]** To explore the strain resources capable of synthesizing PHA and screen out and identify the high PHA-yielding bacteria from extreme environments. **[Methods]** The strain was isolated and purified by Nile blue A plate culture and PCR methods. The 16S rRNA gene was sequenced for the identification of the strain and the construction of the phylogenetic tree in MEGA 6.0. Finally, the accumulation of PHA in the strain under different conditions was quantified by Nile red staining and gas chromatography. **[Results]** A strain with high yield of PHA was isolated from the garbage sediment of a saline-alkali land. The amplification of *PhaC* confirmed that the strain had the ability to synthesize PHA. Based on the 16S rRNA gene, the strain was identified as *Pseudomonas brassicacearum* and named NP-2. Furthermore, the culture conditions of strain NP-2 were optimized and the maximum accumulation of PHA reached 3.78 mg/mL at the time point of 48 h. **[Conclusion]** NP-2 belongs to *P. brassicacearum* and has high production of PHA. This study provides resources of high PHA-yielding strains in extreme environment for the production of PHA and accumulates data for further mining high PHA-yielding strains.

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates; strain identification; *Pseudomonas*

据统计, 2020 年塑料制品的年产量大约 3.35 亿 t, 由于以石油为原料合成的传统石化塑料制品的大量使用, 对环境造成极大的污染<sup>[1]</sup>。这种传统塑料制品是以聚丙烯为主要原料合成的, 其在自然环境下很难自发降解为单体形式, 通过紫外线照射仅能缓慢分解为小于 5 mm 的塑料微粒及纤维; 而塑料微粒会进入土壤深层, 影响土壤环境, 导致农作物减产; 同时还会漂泊到海洋、河流、湖泊等, 微塑料无处不在, 而且其危害不可见<sup>[2]</sup>。据报道, 在中国南海北部的浮游动物中检测到塑料微粒<sup>[3]</sup>; 而且塑料

微粒可以被陆生植物吸收, 并影响植物的正常生长<sup>[4]</sup>; 在人的粪便中也检测到了塑料微粒, 其可以通过肺或小肠进入血液、淋巴系统和内脏, 导致血栓、肺功能损伤、破坏免疫系统和消化系统, 影响人类健康<sup>[5]</sup>。传统塑料给人类带来了极大的污染和危害, 寻找可降解的塑料原材料是解决日益严重的环境污染问题的重要途径。

目前, 人们关注比较多的可降解塑料原料有聚乳酸(poly lactic acid, PLA)、聚丁二酸丁二醇酯(poly butylene succinate, PBS)和聚羟基脂

肪酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHA)。PLA 是以植物淀粉为底物转化成乳酸聚合而成的一种聚酯, PLA 作为可降解原料具有良好的物理特性, 可广泛应用于多个行业, 如包装行业、医疗等。目前, PLA 的不足是其必须以植物淀粉为底物合成, 大大限制了 PLA 的生产<sup>[6]</sup>。PBS 因其具有力学性能和耐热性, 在包装材料、农用材料及生物医学材料行业也可以广泛使用, 尤其是 PBS 具有优良的生物可降解性, 能够在自然环境下完全降解, 因此, PBS 作为传统塑料的替代品, 是人们十分关注的原料。但是, PBS 的加工主要以石油为主。PHA 是一种由微生物细胞内产生的生物聚酯, 具有突出的生物相容性和生物降解性, 近年来受到人们的广泛关注<sup>[7]</sup>。由于 PHA 由微生物合成, 利用生物工程工业化生产, 可以降低可降解原料的生产成本。因此, PHA 是人们关注的替代传统塑料最理想的可降解塑料原料<sup>[8]</sup>。

PHA 是细菌体内产生的一种天然生物聚酯, 是在碳源过量而氮、磷、硫、镁等元素不足的不平衡条件下产生的。PHA 因其单体的分子结构和链长的不同, 根据碳原子数量可将 PHA 分为 2 类: 短链-PHA (scl-PHA) 由 3-5 个碳原子构成; 中长链-PHA (mcl-PHA) 由 6-14 个碳原子构成。合成 PHA 的关键酶是 PHA 合酶(PhaC), PHA 合酶可根据一级结构和亚基组成分为 4 类: I 型 PHA 合酶, 由 60-65 kDa 的 PhaC 单亚基组成, 主要催化形成 C3-C5 的 scl-PHA, 含有 I 型 PHA 合酶的代表性菌株有真氧产碱杆菌(*Ralstonia eutropha*); II 型 PHA 合酶, 由 60 kDa 左右的 PhaC 单亚基组成, 主要催化形成 C6-C14 的 mcl-PHA, 常见于假单胞菌属(*Pseudomonas*), 如恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*); III 型 PHA 合酶由 PhaC 和 PhaE 两种亚基组成, 其中 PhaC

的分子量为 40-53 kDa, PhaE 为 20-40 kDa, 主要催化形成 scl-PHA, 常见于光合细菌, 如紫色硫细菌(purple sulfur bacteria); IV 型 PHA 合酶由 PhaC 和 PhaR 两种亚基组成, 其中 PhaC 的分子量约为 41 kDa, PhaR 约为 22 kDa, 类似于由 PhaE 和 PhaC 亚基组成的 III 型 PhaC, 主要催化合成 scl-PHA, 常见于芽孢杆菌属(*Bacillus*)中, 如巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)<sup>[9]</sup>。I 型、III 型和 IV 型 PHA 合酶均对催化形成 scl-PHA 具有高度专一性, 它们的主要区别在于 PHA 合酶的大小不同, 其活性中心的结合位点不同, 可以存在于不同的微生物中合成 PHA。PHA 不仅具有优异的生物相容性和生物降解性等生物学特性, 同时具有疏水性、旋光性和热塑性, 对人和自然无毒, 最终可被自然界中的微生物降解为二氧化碳和水<sup>[7]</sup>。据报道, 目前发现的自然界中可合成 PHA 的微生物有 60 多个属, 如芽孢杆菌属、假单胞菌属、产碱杆菌属、固氮菌属和根瘤菌属等<sup>[10]</sup>。但合成 PHA 含量较高的只有产碱杆菌属和假单胞菌属等少数微生物<sup>[11]</sup>。因此, 工业上使用这些菌种以合成聚羟基丁酸酯(polyhydroxybutyrate, PHB)、聚羟基丁酸和戊酸的共聚物(poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate, PHBV) 和聚羟基己酸酯(polyhydroxyhexanorate, PHHX), 目前国内采用传统微生物发酵法, 用真氧产碱杆菌合成 PHA, 年产量达 1 000 t<sup>[12]</sup>。同样地, 国外学者也做了很多努力实现了 PHA 的工业化, 利用真氧产碱杆菌通过微生物发酵生产 PHA<sup>[12]</sup>。尽管 PHA 已经实现半工业化, 但是由于其发酵工艺烦琐、使用菌株的底物转化率较低, 导致 PHA 的生产成本较高, 难以广泛推广<sup>[13]</sup>。

PHA 的工业化还存在很多问题, 针对这些问题, 人们从多方面尝试解决。利用基因工程手段对现有菌株的代谢途径进行改造, 如敲除

与 PHA 合成无关的次代谢通路,提高 PHA 的代谢通量;另外,可以尝试改变细胞形态及大小,使细胞内积累更多的 PHA。筛选相对极端环境下的 PHA 合成菌,如清华大学的研究团队从新疆咸水湖寻找到 2 株高度耐盐菌,并对其生长速度和适应性进行改造,由于菌株能适应高盐环境,提高发酵环境的盐浓度后,这种菌在发酵过程中不易染菌、下游提纯工艺简便<sup>[14]</sup>。

综上所述,从极端环境筛选新的 PHA 合成菌并提高 PHA 的产量是非常有效的方式。因此,本研究从宁夏回族自治区银川市盐碱地的沉积物分离筛选新的能够合成 PHA 的菌种,为盐碱地生态系统中微生物的挖掘利用奠定基础,同时为合成 PHA 的微生物菌种资源积累数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 样 品

样品于 2021 年 2 月 25 日采集自宁夏回族自治区银川市金凤区农场(38°33'05.80"N, 106°13'43.71"E)盐碱地垃圾沉积物;所采集的样品为表层 0-15 cm 处的沉积物,采用一次性无菌自封袋带回实验室,于 4 °C 保存。

#### 1.1.2 培 养 基

筛选培养基(g/L): LB 培养基补充 2%葡萄糖,尼罗蓝溶液使用浓度参考文献[15];发酵培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 10.0, 葡萄糖 20.0, 七水硫酸镁 1.0, 磷酸氢二钾 1.0, 磷酸二氢钾 1.0, pH 7.0。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

尼罗红、胰蛋白胨、酵母浸粉等生化试剂,北京索莱宝科技有限公司;尼罗蓝,生工生物工程(上海)股份有限公司;LA Taq 酶,宝日生物技术有限公司;细菌基因组提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;所有引物由安徽

通用生物公司合成。PCR 仪,伯乐生命医学产品(上海)有限公司;气相色谱仪,安捷伦科技有限公司。

### 1.2 菌株的筛选

称取 5 g 所采集的垃圾沉积物加入 50 mL 发酵培养基,充分振荡混匀,35 °C、180 r/min 富集培养 6-8 h。吸取 1 mL 富集培养液稀释至  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$ , 分别均匀涂布于尼罗蓝筛选培养基,35 °C 恒温培养箱中培养,间隔 24 h 在 365 nm 紫外灯下观察,挑取淡蓝色菌落或者黄绿色菌落进一步分离纯化保存<sup>[16]</sup>。

### 1.3 *PhaC* 的扩增

由于革兰氏阳性细菌和阴性细菌无通用的 *PhaC* 基因引物,因此使用 3 对引物。第 1 对引物针对 I 型 *PhaC* (F: 5'-CCYRGATCAACAAG TTCTAC-3'; R: 5'-TTCCAGAACAGMAGGTCG AAGG-3');第 2 对引物针对 II 型 *PhaC* 使用假单胞菌属特异性引物(F: 5'-TAGCATATGAGTGA CAAGAACAAAGAAGAC-3'; R: 5'-CAAGGAT CCGAAACTCAGCGTTCGTGC-3');第 3 对引物针对芽孢菌属的 IV 型 *PhaC* (F: 5'-CGTGCAA GAGTGGGAAAAT-3'; R: 5'-TCGCAATATGA TCACGGCTA-3')。提取 NP-2 基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系: LA Taq 酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$ LA Taq buffer 5  $\mu$ L, dNTP Mix (2.5 mmol/L) 8  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L) 各 2.5  $\mu$ L, 模板(1 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 105 s, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,有条带即为 *PhaC* 基因阳性菌株,将阳性产物送华大基因公司测序,测序结果通过 NCBI 数据库进行相似度比对,并用 MEGA 6.0 构建系统发育树<sup>[17-19]</sup>。

### 1.4 菌株的鉴定

PCR 模板制备和体系同 1.3, 使用细菌 16S

rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TCGCAATATGAT CACGGCTA-3')<sup>[20]</sup>, PCR 反应体系: *LA Taq* 酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 10 $\times$ *LA Taq* buffer 5  $\mu$ L, dNTP Mix (2.5 mmol/L) 8  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L) 各 2.5  $\mu$ L, 模板(1 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 10 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,用产物回收试剂盒将产物纯化后送华大基因公司测序。比对测序结果与 NCBI 模式菌株序列的差异,并用 MEGA 6.0 构建系统发育树<sup>[21]</sup>。

## 1.5 PHA 定量分析

### 1.5.1 尼罗红染色法测定 PHA 含量

尼罗红分子内含有恶嗪环,呈碱性,能够进入细胞特异性识别 PHA,可以作为 PHA 积累阶段快速估计 PHA 含量的工具<sup>[22]</sup>。用 DMSO 溶解尼罗红固体至浓度为 80  $\mu$ g/mL,染色步骤为:取 1 mL 培养 2 d 的菌液,12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀,用 ddH<sub>2</sub>O 涡旋;加入 50  $\mu$ L 尼罗红染色液,室温染色 30 min;12 000 r/min 离心 5 min,弃上清;用 ddH<sub>2</sub>O 重悬,重复 1 次;加入 1 mL ddH<sub>2</sub>O,酶标仪测定 535 nm 荧光强度。以 PHA 标准品作对照,计算 PHA 含量。

### 1.5.2 气相色谱法(GC-MS)测定 PHA 含量

将 NP-2 菌液按 5%的接种量接种发酵培养基在 35  $^{\circ}$ C、160 r/min 条件下培养 48 h,12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀,用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤 2 次后冻干,记录菌体干重。

将冻干后的菌体充分研磨,准确称取菌体 1 mg,加入氯仿 0.1 mL、甲醇 0.07 mL、浓硫酸 0.03 mL,100  $^{\circ}$ C 反应 4 h,冷却至室温后加入 0.2 mL 去离子水,涡旋混匀后静置分层,取下层氯仿相加足量无水硫酸镁充分干燥,吸取氯仿相,使用 0.22  $\mu$ m 针式过滤器过滤后进行

气相检测。进样量 1  $\mu$ L,分流比 5:1,载气为氮气,流速为 5 mL/min,进样口温度 180  $^{\circ}$ C,柱温:80  $^{\circ}$ C 维持 1 min,20  $^{\circ}$ C/min 升温至 110  $^{\circ}$ C 维持 15 min,以 PHA 标准品作对照<sup>[23]</sup>。

## 1.6 菌株合成 PHA 的发酵条件研究

### 1.6.1 温度对 PHA 积累量的影响

在 100 mL 三角瓶中加入 50 mL 发酵培养基(pH 7.0),再加入 2.5 mL 的 NP-2 菌液,设定温度分别为 25、30、35 和 40  $^{\circ}$ C,在摇床中 180 r/min 培养 48 h,使用气相色谱法对 PHA 含量进行测定,并记录细胞干重。每个实验组设 3 个重复。

### 1.6.2 pH 对 PHA 积累量的影响

发酵培养基使用 1 mol/L 的 HCl 溶液和 NaOH 溶液调节 pH 值分别为 6.5、7.0、7.5 和 8.0,50 mL 的发酵培养基中加入 2.5 mL 的 NP-2 菌液,以 1.6.1 得到的最适培养温度、180 r/min 振荡培养 48 h,测定细胞干重和 PHA 含量。每个实验组设 3 个重复。

### 1.6.3 摇床转速对 PHA 积累量的影响

取 1.6.2 最优 pH 的发酵培养基 50 mL,加入 2.5 mL 的 NP-2 菌液,设定摇床转速分别为 140、160、180 和 200 r/min,在最适培养温度下培养 48 h,测定细胞干重和 PHA 含量。每个实验组设 3 个重复。

### 1.6.4 接种量对 PHA 积累量的影响

在 1.6.1-1.6.3 获得的优化后培养条件下,取发酵培养基 50 mL,接种量分别设定为 1%、5%、10%和 15%,在 30  $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下培养 48 h,测定细胞干重和 PHA 含量。每个实验组设 3 个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选结果

为了筛选 PHA 合成菌,从宁夏回族自治区

银川市盐碱地采集的垃圾沉积物经富集、稀释处理,并将其涂于尼罗蓝筛选平板上培养 48 h,在 365 nm 紫外光下进行观察,有菌落发出黄绿色荧光(图 1),表明此菌株细胞内积累了 PHA。

在 PHA 合成过程中的关键酶是 PhaC,研究者通常通过 PCR 扩增 *PhaC* 来鉴定 PHA 合成菌。为进一步验证尼罗蓝平板法初步筛选的菌株为 PHA 合成菌,提取该菌株的 DNA 为模板,用设计的特异性引物 PCR 扩增 *PhaC*,使用琼脂糖凝胶电泳检测,在 1 700 bp 左右观察到单一条带。PCR 产物经测序后,使用 NCBI 数据库对该序列进行相似度分析,使用 MEGA 6.0 软件的邻近法构建系统发育树(图 2)。将 *PhaC* 的序列提交至 NCBI 数据库,登录号为 OP169011。菌株 NP-2 与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, 登录号为 WP\_214913708.1)处在同一分支,同时将 NP-2 的 *PhaC* 与 *Pseudomonas fluorescens* 的 *PhaC* 氨基酸序列进行比较(图 3),发现菌株 NP-2 的 *PhaC* 属于 II 型 *PhaC*。

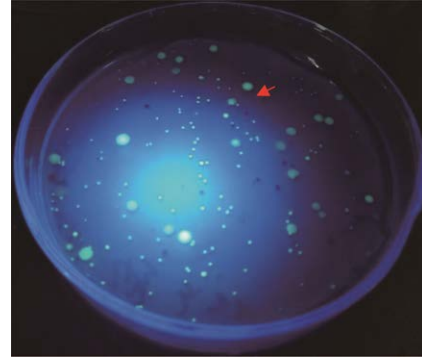


图 1 尼罗蓝平板筛选

Figure 1 Nile blue plate screening.

## 2.2 菌株的鉴定结果

通过 16S rRNA 基因的方法对 2.1 中筛选到的 PHA 合成阳性菌进行鉴定,以该菌株的 DNA 为模板,用 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测观察到 1 500 bp 左右有单一条带,与预期的 16S rRNA 基因片段大小相符。经测序后,将基因序列与 NCBI 数据库的模式菌株进行 BLAST 比较分析,用 MEGA 6.0 构建系统发育树(图 4),该序列已提

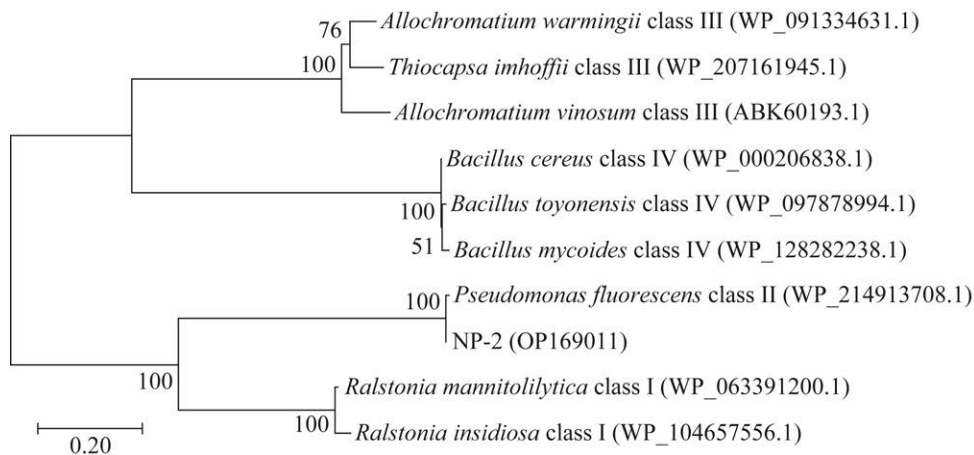


图 2 菌株 NP-2 与相关菌株基于 *PhaC* 氨基酸序列构建的系统发育树 括号中序号是相关菌株的登录号;分支点上的数字是 bootstrap 支持率;标尺刻度 0.20 是序列差异的分支长度

Figure 2 The phylogenetic tree based on *PhaC* amino acid sequences of NP-2 and related strains. The numbers in parentheses are accession numbers of related strains; The numbers in each branch points are percentages supported by bootstrap; Bar=0.20 is nucleotide divergence.

NP-2	MSNKNNDDLKQCASENTLGLNFVVGRLRRKDLLASARMVLTQAIKQPLHSVKHVAHFVGVELKKNVLFGRSELQPAGDDRRFN	80
WP_214913708.1	MSNKNNDDLKQCASENTLGLNFVVGRLRRKDLLASARMVLTQAIKQPLHSVKHVAHFVGVELKKNVLFGRSELQPAGDDRRFN	80
Consensus	msnknnddlkyqasentlglnpvvgllrrkdllasarmvltqaikqplhsvkhvahfgvelkknvlfgrselqpagddrrfn	
NP-2	DPAWSQNPLYKRYLQTYLAWRKELHAWIDFSSLSPODISRGHFVINLMTTEAMAPTNSAANPAAWKRFETGGKSLLDGLS	160
WP_214913708.1	DPAWSQNPLYKRYLQTYLAWRKELHAWIDFSSLSPODISRGHFVINLMTTEAMAPTNSAANPAAWKRFETGGKSLLDGLS	160
Consensus	dpawsqnplykrylqtylawrkelhawid ssslspqdisrghfvinlmtteamaptnsaanpaa krffetggkslldgls	
NP-2	HLAKDLVINGGMPSQVDMGAFEVGKSLGVTEGAVVFRNDVLELIQYRPIEQVHERPLLVPVPPQINKFYVFDLSPDKSLA	240
WP_214913708.1	HLAKDLVINGGMPSQVDMGAFEVGKSLGVTEGAVVFRNDVLELIQYRPIEQVHERPLLVPVPPQINKFYVFDLSPDKSLA	240
Consensus	hlakdlv nggmppsqvdmgafevgkslgvtegavvfrndvleliqyrpитеqvherpllvpvppqinkfyvfdlspdksla	
NP-2	RFCLRSNVQTFIVSWRNPTKEQREWGLSTYIEALKEAVDVVTAITGSKDVNMLGACSGGITCTALLGHYAALGKKNVNAL	320
WP_214913708.1	RFCLRSNVQTFIVSWRNPTKEQREWGLSTYIEALKEAVDVVTAITGSKDVNMLGACSGGITCTALLGHYAALGKKNVNAL	320
Consensus	rfclrsnvqtfivswrnptkeqrewglstyealkeavdvvtaitgskdvnmlgacsggitctallghyaalgekkvnal	
NP-2	TLLVSVLDTLDTDVALFVDEQTLAALKRHSYQAGVLEGRDMAKVF FAWMRPNDIWNYWVNNYLLGNEPPVFDILFWNND	400
WP_214913708.1	TLLVSVLDTLDTDVALFVDEQTLAALKRHSYQAGVLEGRDMAKVF FAWMRPNDIWNYWVNNYLLGNEPPVFDILFWNND	400
Consensus	tllvsvldttdtdvalfvdeqtleaalkrhsyqagvlegrdmakvfawmrpndliwnywvnnyllgneppvfdilfwnnd	
NP-2	TTRLPAAFHGDLEIEMFKNNPLIRPNALEVCGTPIIDLKQVTADIFSLAGTNDHITPWKSCYKSAQLFGGKVEFVLSSSGHI	480
WP_214913708.1	TTRLPAAFHGDLEIEMFKNNPLIRPNALEVCGTPIIDLKQVTADIFSLAGTNDHITPWKSCYKSAQLFGGKVEFVLSSSGHI	480
Consensus	ttrlpaafhgdliemfknnplirpnalevcgtpidlkqvтаdifslagtndhitpwkscyksaqlfggkvefvlsssghi	
NP-2	QSILNPPGNPKSRYMTSEDMPEKKAEDWQENSTKHTDSWWLHWQAWQAERSGKLLKAPTILGNKTYPAGEAAPGTYVHE	558
WP_214913708.1	QSILNPPGNPKSRYMTSEDMPEKKAEDWQENSTKHTDSWWLHWQAWQAERSGKLLKAPTILGNKTYPAGEAAPGTYVHE	558
Consensus	qsilnppgnpksrymtsedmp kaedwqenstkhтdswwlhwqawqaersgkllkapt lgnktypageaapgtyvhe	

图 3 菌株 NP-2 与 WP\_214913708.1 氨基酸序列比对

Figure 3 Amino acid sequence alignment of strain NP-2 and WP\_214913708.1.

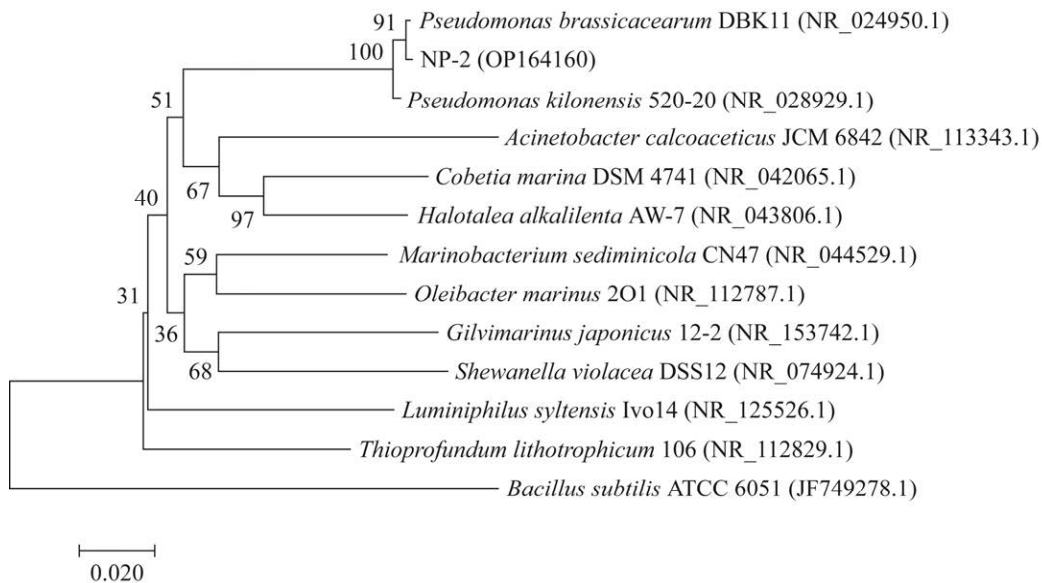


图 4 菌株 NP-2 与相关菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中序号是相关菌株的登录号；分支点上的数字是 bootstrap 支持率；标尺刻度 0.020 是序列差异的分支长度

Figure 4 The phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of NP-2 and related strains. The numbers in parentheses are accession numbers of related strains; The numbers in each branch points are percentages supported by bootstrap; Bar=0.020 is nucleotide divergence.

交至 NCBI 数据库, 登录号为 OP164160。由图 4 可知, 所筛选菌株与 *Pseudomonas brassicacearum* 的相似度最高, 且处在同一分支, 可以确定该菌为 *Pseudomonas brassicacearum*, 并将此菌株命名为 NP-2。

## 2.3 PHA 定量分析结果

### 2.3.1 尼罗红染色技术分析 PHA 含量

尼罗红染料能够进入细胞内与 PHA 特异性结合, 常用于 PHA 的定量分析, 荧光强度越高, PHA 含量越高, 颜色的深浅与 PHA 含量成正比。用发酵培养基摇床培养菌株 NP-2, 在 24、48、72 和 96 h 分别取发酵液, 离心收集菌体沉

淀、重悬, 用尼罗红染色液检测细胞内 PHA 的积累量, 发现不同时间收集的 NP-2 菌体都能够被尼罗红染色呈红色(图 5A), 说明 NP-2 能够积累 PHA。根据荧光强度量化产生的 PHA, 通过测定在波长 535 nm 的荧光强度, 该菌株 NP-2 在 48 h 时产生的 PHA 含量最高, 为 0.404 mg/mL (图 5B)。

### 2.3.2 GC-MS 分析 PHA 含量

为了进一步准确测定菌株 NP-2 细胞内 PHA 的积累量, 收集 NP-2 发酵液的菌体沉淀, 以 PHA 标准品为对照, 通过 GC-MS 分析, 菌株 NP-2 保留时间为 4.5 min (图 6), 与 PHA 标

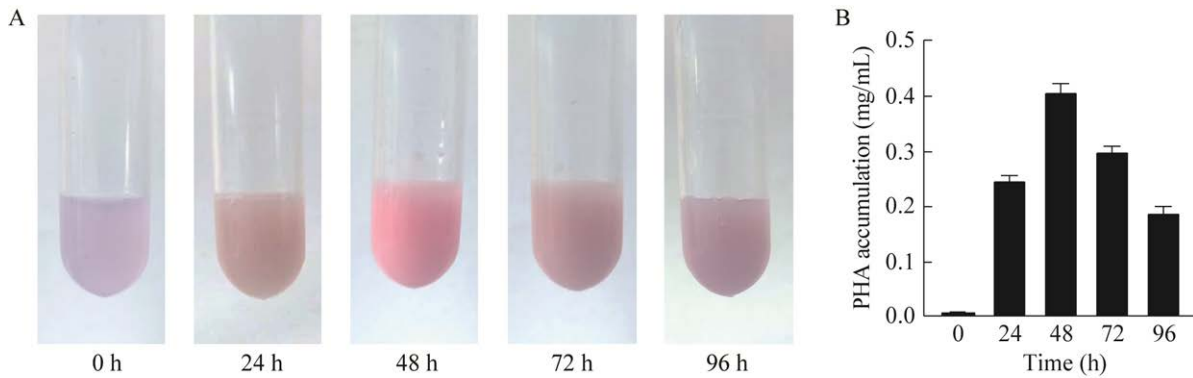


图 5 尼罗红染色分析 PHA 含量

Figure 5 The content of PHA was analyzed by Nile red staining.

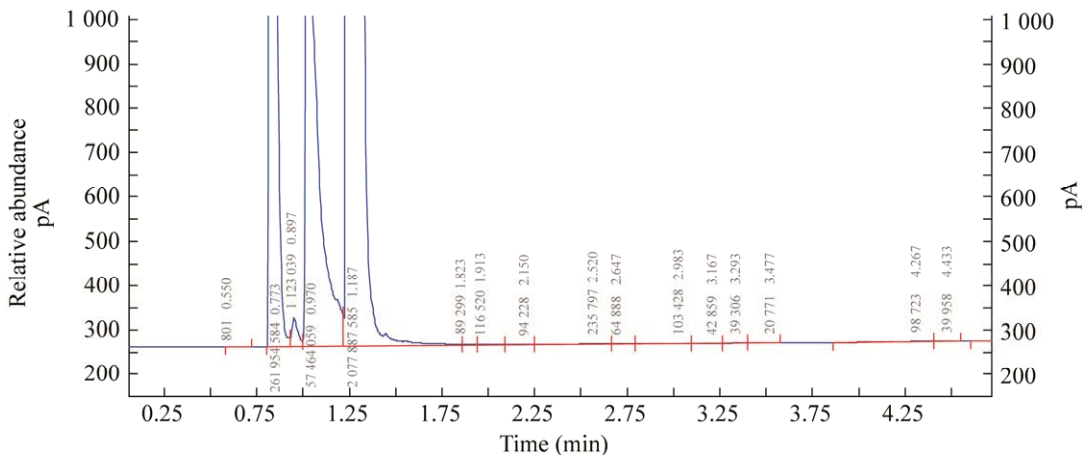


图 6 GC-MS 分析 PHA 含量

Figure 6 PHA content was analyzed by GC-MS.



准品一致,证明该菌株 NP-2 确实产生了 PHA, 积累量为 0.68 mg/mL。

## 2.4 菌株合成 PHA 的发酵条件

将纯化后的 PHA 合成菌 NP-2 接种到发酵培养基中培养 48 h, 使用气相色谱法对 PHA 含量进行测定。以温度为变量的培养实验结果如图 7 所示。在 30 °C 和 35 °C 时 NP-2 的生长状态较好, 在 30 °C 时 PHA 积累量最高, 达到 3.6 mg/mL, 明显高于 25 °C 和 40 °C 条件下 NP-2 的 PHA 积累能力。不同培养温度下 PHA 的显著性差异表明了温度对 NP-2 在 25 °C ( $P<0.001$ ) 和 40 °C ( $P<0.001$ ) 下 PHA 的积累有着显著性影响, 说明 NP-2 在温度为 30–35 °C 的范围内具有较高 PHA 积累潜力。

以 pH 为变量的培养试验结果如图 8 所示, 在不同 pH 的培养条件下, 菌株 NP-2 的 PHA 积累能力存在显著的差异。PHA 积累量最高的是 pH 7.0 的培养条件, 达到 3.4 mg/mL。pH 6.5 的条件下 NP-2 的生长和 PHA 积累量处于 pH 7.5–8.0 之间, 数据显著性分析结果( $P>0.05$ )显

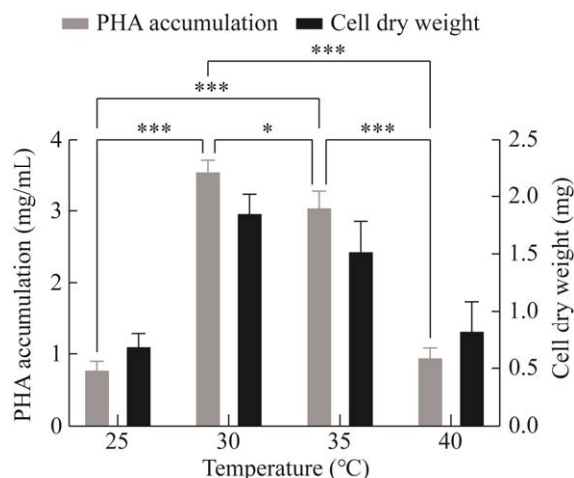


图 7 温度对菌株 NP-2 积累 PHA 的影响

Figure 7 Effect of temperature on accumulation of PHA in strain NP-2. \*:  $P\leq 0.05$ ; \*\*:  $P\leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P\leq 0.001$ . The same below.

示 pH 值在 6.5、7.5 和 8.0 时 PHA 积累能力不具有显著性影响。在 pH 8.0 的条件下 NP-2 的生长和 PHA 积累量最低, 与 pH 7.0 ( $P<0.001$ ) 和 7.5 ( $P<0.001$ ) 时存在显著差异, 这一结果说明 pH 对于 NP-2 积累 PHA 的能力具有显著影响。

以摇床转速为变量的培养试验结果如图 9 所示, 在不同转速的培养条件下, 转速 180 r/min 的培养条件 PHA 积累量最高, 达到 3.3 mg/mL。除了在转速 140 r/min 和转速 180 r/min 之间

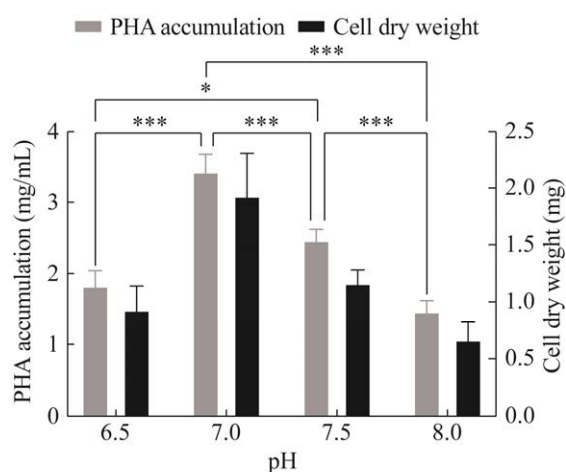


图 8 pH 对菌株 NP-2 积累 PHA 的影响

Figure 8 Effect of pH on accumulation of PHA in strain NP-2.

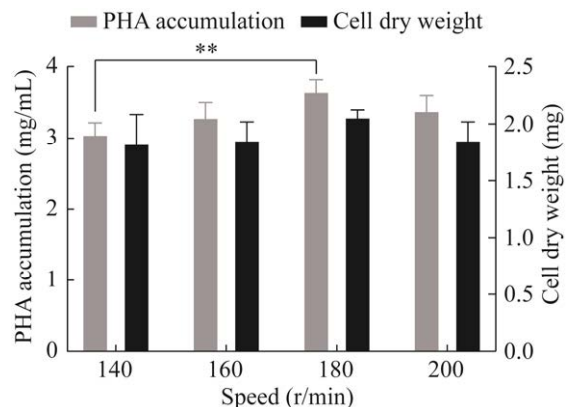


图 9 摇床转速对菌株 NP-2 积累 PHA 的影响

Figure 9 Effect of shaker speed on accumulation of PHA in strain NP-2.

( $P < 0.05$ ) PHA 积累量有着显著性差异, 在转速为 160 r/min 和 200 r/min 时与 180 r/min 相比较, 数据显著性分析结果( $P > 0.05$ )显示差异不显著。这一结果说明菌株 NP-2 在转速 180 r/min 时具有较高合成 PHA 的潜力。

以接种量为变量的培养试验结果如图 10 所示, 在不同接种量的培养条件下, 5%接种量的培养条件 PHA 积累量最高, 达到 4.1 mg/mL。在 10%和 15%接种量的培养条件下, PHA 积累量相近, 显著性检测结果( $P > 0.05$ )显示接种量在 10%和 15%对 PHA 积累能力不具有显著性影响。在 1%接种量条件下 PHA 积累量最低, 与 5%接种量( $P < 0.001$ )存在显著性差异, 说明 NP-2 在 5%接种量的培养条件下具有较高合成 PHA 的能力。

经单因素发酵条件优化, 在温度为 30 °C、pH 为 7.0、转速为 180 r/min、接种量为 5%的条件下, 菌株 NP-2 的 PHA 积累量为 3.78 mg/mL (图 11), 说明温度和 pH 对 *Pseudomonas brassicacearum* 中 PHA 合成量有直接影响。之前已报道 *Pseudomonas putida* 以甘油为底物, 通过添加前

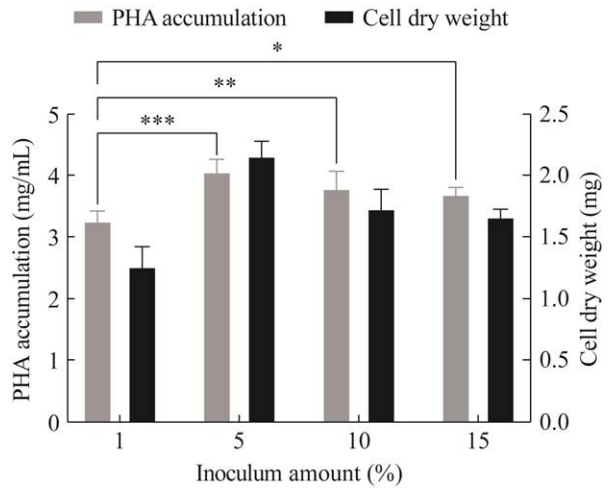


图 10 接种量对菌株 NP-2 积累 PHA 的影响  
Figure 10 Effect of inoculum amount on accumulation of PHA in strain NP-2.

体物质辛酸钠, PHA 的平均产量为 4.56 g/L<sup>[24]</sup>; 从生物柴油污染的沉积物中分离纯化的 *Pseudomonas mendocina* 经条件优化后在 35 °C 下 PHA 积累量为 2.6 g/L<sup>[25]</sup>。从废水样品中分离纯化的 *Bacillus* 以葡萄糖为碳源, PHA 积累量为 3.09 g/L<sup>[26]</sup>。与上述研究结果相比, *Pseudomonas brassicacearum* 合成 PHA 具有一定潜力。

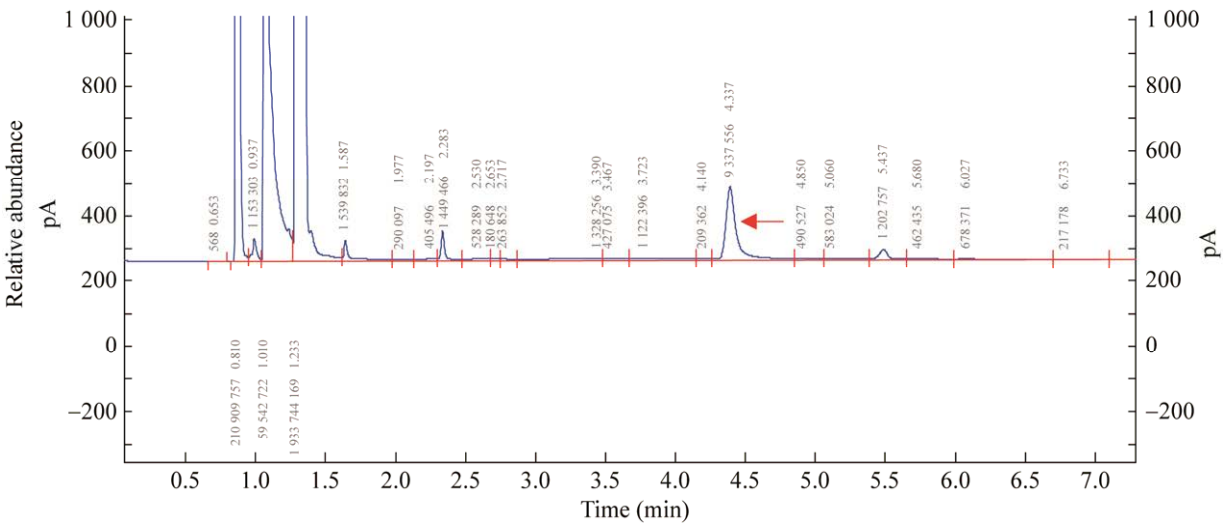


图 11 GC-MS 分析 PHA 含量  
Figure 11 PHA content was analyzed by GC-MS.

### 3 讨论与结论

由于正在广泛使用的石油基塑料是环境污染的主要原因, 为了彻底改善环境污染问题, PHA 因其独特的生物可降解性而在世界范围内备受关注。然而, 目前 PHA 的低产量是制约 PHA 实现工业化生产的主要原因, 所以从极端环境筛选 PHA 合成菌成为一种趋势。近期, Ling 等<sup>[27]</sup>从干旱、盐度较大的新疆咸水湖寻找一株耐盐菌并对其进行改造, 使其在开放式条件下能够利用淡水进行发酵合成 PHA, 大大降低了 PHA 的生产成本。本试验从宁夏回族自治区银川市盐碱地采集垃圾沉积物, 通过尼罗蓝平板分离筛选得到一株能够合成 PHA 的菌株 NP-2, 对菌株 NP-2 通过分子生物学方法鉴定为 *Pseudomonas brassicacearum*。在分子水平推测了 *Pseudomonas brassicacearum* 具有合成 PHA 的潜力, 而且假单胞菌属具有良好的生长速率和细胞中 PHA 含量较高的特点, 是实现低成本合成 PHA 的潜在微生物。

在发酵条件优化实验中, 以温度为变量的实验中观察到, 不同温度对 NP-2 的生长和 PHA 积累水平有着显著影响。NP-2 高效积累 PHA 的温度区间为 30–35 °C, 其中 30 °C 为 PHA 积累的最佳温度。在之前的研究中, 一株 *Pseudomonas putida* 在 28 °C 具有较高的 PHA 积累能力<sup>[28]</sup>, 地中海假单胞菌 (*Pseudomonas mediterranea*) 和皱纹假单胞菌 (*Pseudomonas corrugate*) 在 30 °C 对 PHA 积累具有较好的效果<sup>[29]</sup>。

以 pH 为变量的实验中观察到, pH 对 NP-2 的生长和 PHA 积累水平有着显著影响。pH 的变化对菌体生长、繁殖及产物积累影响重大, 同时不同微生物的最适 pH 不同, NP-2 高效积累 PHA 的 pH 值为 7.0。在王海飙<sup>[30]</sup>的研究中, 一株嗜盐单胞菌 (*Halomonas*) 在偏碱性的条件

下才能积累 PHA, 而 PHA 积累最适 pH 值为 9.0。顾进进<sup>[31]</sup>的研究中, pH 8.0 是芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) PHA 积累的最适 pH。李庆辉<sup>[32]</sup>的报道中, 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 积累 PHA 的最适 pH 值为 7.0, 与本文研究的 *Pseudomonas brassicacearum* 积累 PHA 的最适 pH 一致。

以摇床转速为变量的实验中观察到, 菌株 NP-2 在摇床转速 160、180 和 200 r/min 的实验组中 PHA 积累量相近, 显著性检测结果 ( $P > 0.05$ ) 显示这几组摇床转速对 NP-2 积累 PHA 的能力不具有显著性影响。造成这一现象的原因可能与发酵液中溶解氧的大小有关, 在发酵过程中摇床转速越快, 溶解氧的溶解速度越快, 菌株 NP-2 的生长和 PHA 积累水平在摇床转速为 160、180、200 r/min 时不受较大影响, 说明该菌株对于氧浓度的变化有一定的适应性<sup>[28]</sup>。

以接种量为变量的实验中观察到, 5% 接种量的培养条件下 PHA 积累量最高, 在 1% 与 5% 接种量时 PHA 积累量存在显著性差异, 导致这一结果的原因可能是 1% 的接种量相对较小, 在 48 h 时尚未达到 PHA 积累的对数期; 而在 10% 和 15% 接种量的培养条件下, PHA 积累量与 5% 接种量相比有所下降, 这可能是因为接种量增加导致发酵液溶氧不足, 影响菌株生长及 PHA 合成<sup>[33]</sup>。

综上所述, 本研究通过对菌株 NP-2 积累 PHA 的发酵条件进行探究。实验结果显示, 该菌株在温度为 30 °C、pH 值为 7.0、转速为 180 r/min、接种量为 5% 的条件下, PHA 积累量达到 3.78 mg/mL, 结果表明该菌株具有较高的 PHA 积累和环境适应能力。因此, 进一步利用基因工程技术在菌株遗传和代谢调控等基因重组方面深入探究假单胞菌属合成产量更高、具有更优性能的 PHA 是目前研究的主要方面<sup>[34]</sup>。本研究在

盐碱地土壤垃圾沉积物中分离筛选合成 PHA 的细菌属于假单胞菌属, 具有 PhaC 和产生 PHA 的能力, 为进一步发掘利用盐碱地环境中的微生物菌种和培养获得高产 PHA 菌株积累了数据。

## REFERENCES

- [1] LAW KL. Plastics in the marine environment[J]. Annual Review of Marine Science, 2017, 9: 205-229.
- [2] DAI ZF, ZHANG HB, ZHOU Q, TIAN Y, CHEN T, TU C, FU CC, LUO YM. Occurrence of microplastics in the water column and sediment in an inland sea affected by intensive anthropogenic activities[J]. Environmental Pollution, 2018, 242(Pt B): 1557-1565.
- [3] SUN XX, LI QJ, ZHU ML, LIANG JH, ZHENG S, ZHAO YF. Ingestion of microplastics by natural zooplankton groups in the northern South China Sea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 115(1-2): 217-224.
- [4] SUN XD, YUAN XZ, JIA Y, FENG LJ, ZHU FP, DONG SS, LIU J, KONG X, TIAN H, DUAN JL, DING Z, WANG SG, XING B. Differentially charged nanoplastics demonstrate distinct accumulation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Nature Nanotechnology, 2020, 15(9): 755-760.
- [5] SCHWABL P, KÖPPEL S, KÖNIGSHOFER P, BUCSICS T, TRAUNER M, REIBERGER T, LIEBMANN B. Detection of various microplastics in human stool: a prospective case series[J]. Annals of internal medicine, 2019, 171(7): 453-457.
- [6] MULLA MZ, RAHMAN MRT, MARCOS B, TIWARI B, PATHANIA S. Poly lactic acid (PLA) nanocomposites: effect of inorganic nanoparticles reinforcement on its performance and food packaging applications[J]. Molecules: Basel, Switzerland, 2021, 26(7): 1967.
- [7] MOCHANE MJ, MAGAGULA SI, SEFADI JS, MOKHENA TC. A review on green composites based on natural fiber-reinforced polybutylene succinate (PBS)[J]. Polymers (Basel), 2021, 13(8): 1200.
- [8] CHOI SY, CHO IJ, LEE Y, KIM YJ, KIM KJ, LEE SY. Microbial polyhydroxyalkanoates and nonnatural polyesters[J]. Advanced Materials: Deerfield Beach, Fla, 2020, 32(35): e1907138.
- [9] MUNEEER F, RASUL I, AZEEM F, SIDDIQUE MH, ZUBAIR M, NADEEM H. Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): efficient replacement of synthetic polymers[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2020, 28(9): 2301-2323.
- [10] PRADOS E, MAICAS S. Bacterial production of hydroxyalkanoates (PHA)[J]. Universal Journal of Microbiology Research, 2016, 4(1): 23-30.
- [11] 郑冰心. PHA 生产菌株的选育及其混合发酵条件的优化[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2014. ZHENG BX. Breeding of PHA production strain and optimization of mixed fermentation conditions[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2014 (in Chinese).
- [12] TAN D, WANG Y, TONG Y, CHEN GQ. Grand challenges for industrializing polyhydroxyalkanoates (PHAs)[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(9): 953-963.
- [13] SUJATHA K, SHENBAGARATHAI R. A study on medium chain length-polyhydroxyalkanoate accumulation in *Escherichia coli* harbouring *phaC1* gene of indigenous *Pseudomonas* sp. LDC-5[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(6): 607-614.
- [14] 王颖, 陈国强. 合成生物学技术在聚羟基脂肪酸酯 PHA 生产中的应用[J]. 中国科学(生命科学), 2015, 45(10): 1003-1014. WANG Y, CHEN GQ. Application of synthetic biology for the production of polyhydroxyalkanoates[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2015, 45(10): 1003-1014 (in Chinese).
- [15] KITAMURA S, DOI Y. Staining method of poly (3-hydroxyalkanoic acids) producing bacteria by Nile blue[J]. Biotechnology Techniques, 1994, 8(5): 345-350.
- [16] BALAKRISHNA PILLAI A, JAYA KUMAR A, THULASI K, KUMARAPILLAI H. Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2017, 48(3): 451-460.
- [17] MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ CA, LÁTISNERE-BARRAGÁN H, GARCÍA-MALDONADO JQ, LÓPEZ-CORTÉS A. Screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico[J]. PeerJ, 2018, 6: e4780.
- [18] ZHANG G, HANG XM, GREEN P, HO KP, CHEN GQ. PCR cloning of type II polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from two *Pseudomonas* strains[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 198(2): 165-170.
- [19] NAYAK PK, MOHANTY AK, GAONKAR T, KUMAR A, BHOSLE SN, GARG S. Rapid identification of polyhydroxyalkanoate accumulating members of *Bacillales* using internal primers for *phaC*

- gene of *Bacillus megaterium*[J]. ISRN Bacteriology, 2013, 2013: 1-12.
- [20] JAVAID H, NAWAZ A, RIAZ N, MUKHTAR H, UL HAQ I, SHAH KA, KHAN H, NAQVI SM, SHAKOOR S, RASOOL A, ULLAH K, MANZOOR R, KALEEM I, MURTAZA G. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by the valorization of biomass and synthetic waste[J]. *Molecules*, 2020, 25(23): 5539.
- [21] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [22] SPIEKERMANN P, REHM BHA, KALSCHEUER R, BAUMEISTER D, STEINBÜCHEL A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds[J]. *Archives of Microbiology*, 1999, 171(2): 73-80.
- [23] BAIDURAH S, KUBO Y, KUNO M, KODERA K, ISHIDA Y, YAMANE T, OHTANI H. Rapid and direct compositional analysis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in whole bacterial cells by thermally assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography[J]. *Analytical Sciences*, 2015, 31(2): 79-83.
- [24] 靳大耀. 恶臭假单胞菌和其混菌以甘油为底物合成 PHA 发酵条件的优化[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2018.
- JIN DY. Optimization of fermentation conditions for synthesizing PHA from glycerol by *Pseudomonas putida* and its mixed consortium[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2018 (in Chinese).
- [25] CHANASIT W, HODGSON B, SUDESH K, UMSAKUL K. Efficient production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Pseudomonas mendocina* PSU using a biodiesel liquid waste (BLW) as the sole carbon source[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2016, 80(7): 1440-1450.
- [26] MOHAPATRA S, MOHANTA PR, SARKAR B, DAWARE A, KUMAR C, SAMANTARAY DP. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus* strain isolated from waste water and its biochemical characterization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 2017, 87(2): 459-466.
- [27] LING C, QIAO GQ, SHUAI BW, SONG KN, YAO WX, JIANG XR, CHEN GQ. Engineering self-flocculating *Halomonas campaniensis* for wastewaterless open and continuous fermentation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(4): 805-815.
- [28] 张永杰. 产聚羟基丁酸(PHB)菌株的筛选鉴定及发酵工艺优化[D]. 开封: 河南大学硕士学位论文, 2017.
- ZHANG YJ. Screening and identification of PHB strain and optimization of fermentation technology[D]. Kaifeng: Master's Thesis of Henan University, 2017 (in Chinese).
- [29] PALMERI R, PAPPALARDO F, FRAGALA M, TOMASELLO M, DAMIGELLA A, CATARA A. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through conversion of glycerol by selected strains of *Pseudomonas mediterranea* and *Pseudomonas corrugata*[J]. *Chemical Engineering Transactions: CET Journal*, 2012, 27: 1721-1728.
- [30] 王海飙. 一株合成 PHB 的嗜盐菌筛选及其产物特性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2016.
- WANG HB. Isolated a halophilic strain with PHB-accumulating ability and researched its product characteristics[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2016 (in Chinese).
- [31] 顾进进. 产胞内 PHA 的芽孢杆菌的发酵工艺及基因组学研究[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2018.
- GU JJ. Fermentation process and genome studies for producing intracellular PHA from *Bacillus* sp.[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2018 (in Chinese).
- [32] 李庆辉. PHA 合成菌筛选、鉴定及其合成特性研究[D]. 长春: 长春理工大学硕士学位论文, 2019.
- LI QH. Study on screening, identification and synthetic product determination of a PHA producing bacterium[D]. Changchun: Master's Thesis of Changchun University of Science and Technology, 2019 (in Chinese).
- [33] 徐玉婷. 聚-β-羟基丁酸酯高产菌株的选育及发酵条件优化的初步研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2013.
- XU YT. The preliminary study of poly-β-hydroxybutyrate producing strain and optimization of fermentation conditions[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2013 (in Chinese).
- [34] CHEN GQ, JIANG XR. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2017, 2(3): 192-197.