



研究报告

利用含油培养基富集、分离和评估海洋产聚羟基脂肪酸酯细菌

郑维爽^{Δ1,2} 于盛洋^{Δ1} 翟生强¹ 黄艺^{1,2,3}

1 北京大学深圳研究院 海洋生物资源与环境研究所 广东 深圳 518057

2 深港产学研基地(北京大学香港科技大学深圳研修院) 广东 深圳 518057

3 北京大学环境科学与工程学院 北京 100871

摘要:【背景】细菌可通过脂肪酸代谢途径耦合聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoate, PHA)合成途径实现合成中长链 PHA; 其拉伸强度、玻璃化温度等加工特性均优于短链 PHA, 是未来工业化 PHA 材料的发展方向。【目标】为了获得新的可代谢油类的产 PHA 细菌, 使用 3 种分离策略从海洋沉积物中分离和鉴定细菌, 并评估菌株产 PHA 的能力。【方法】采集深圳大鹏湾近海沉积物样品; 样品通过直接分离, 5 周连续培养分离, 或 10 周连续提高盐度(3.5%–12.5%)和含油量(1%–10%)富集培养分离, 纯化得到菌株; 通过 16S rRNA 基因相似性及系统进化分析鉴定细菌分类地位, 利用 PHA 聚合酶(PhaC)基因鉴定细菌合成 PHA 的能力; 通过测定基因组框架图, 分析细菌的 PhaC 类型、代谢通路及系统进化关系; 通过气相色谱分析细菌产 PHA 的含量及组成。【结果】从深圳大鹏湾近海底泥样品中分离得到 96 株细菌, *phaC* 基因阳性率达 38%, 其中包含 9 个此前未通过产物证实可产 PHA 的属, 包括尖球菌属(*Acuticoccus*)、海洋源菌属(*Idiomarina*)、盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)、微泡菌属(*Microbulbifer*)、海棍状菌属(*Maritimibacter*)、硝酸盐还原菌属(*Nitratireductor*)、公海橄榄菌属(*Pelagibaca*)、假海栖菌属(*Pseudooceanicola*)和海旋菌属(*Thalassospira*)。除了微泡菌属, 其他 8 个属的细菌通过含油富集法分离获得, 说明含油富集方法有利于发现新的产 PHA 细菌资源。此外, 获得 2 株胞内 PHA 含量高的菌株。*Nitratireductor aquimarinus* SY-2-4 在营养肉汤中培养可累积细胞干重 35.0%的 PHA; *Roseibium aggregate* SN13-21 以丙酮酸盐为碳源, 可累积细胞干重 19.9%的 PHA。【结论】大鹏海域蕴藏着丰富的产 PHA 细菌资源, 值得进一步挖掘研究。梯度增加含油量和盐度的富集方法有利于分离区系不同的产 PHA 细菌, 适用于分离 PHA 资源。获得 2 株潜在 PHA 高产菌, 未来将对菌株进行发酵优化研究。

关键词: 近海沉积物, 聚羟基脂肪酸酯, 中度嗜盐菌, 含油富集, *phaC* 基因

Foundation items: Key Program of Marine Economy Development (Six Marine Industries) Special Foundation of Department of Natural Resources of Guangdong Province (GDNRC[2020]034); China Postdoctoral Science Foundation (2019M662806)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: zhengws@ier.org.cn

Received: 12-03-2021; **Accepted:** 21-04-2021; **Published online:** 09-06-2021

基金项目: 广东省海洋经济发展(海洋六大产业)专项资金项目(粤自然资合[2020]034号); 中国博士后科学基金(2019M662806)

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: zhengws@ier.org.cn

收稿日期: 2021-03-12; 接受日期: 2021-04-21; 网络首发日期: 2021-06-09

Enrichment, isolation, and evaluation of polyhydroxyalkanoate-producing marine bacteria from oil-containing culture medium

ZHENG Weishuang^{△*1,2} YU Shengyang^{△1} ZHAI Shengqiang¹ HUANG Yi^{1,2,3}

1 Marine Institute for Bioresources and Environment, Peking University Shenzhen Institute, Shenzhen, Guangdong 518057, China

2 PKU-HKUST Shenzhen-Hongkong Institution, Shenzhen, Guangdong 518057, China

3 College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract: [Background] Bacteria can synthesize medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (MCL-PHA) through fatty acid metabolic pathway coupled with PHA synthetic pathway. MCL-PHA's tensile strength, glass transition temperature, and other processing properties are better than the short-chain-length PHA, and are the promising candidate for PHA industrialization. [Objective] In order to obtain new PHA-producing bacteria that can metabolize oils, we used three methods to isolate bacteria from marine sediments, identified them, and then evaluated the PHA-producing ability. [Methods] We collected the offshore sediment sample of Dapeng Bay in Shenzhen, and isolated bacteria directly from the sample, each week during the 5-week incubation, or during the 10-week enrichment with stepwise increase of oil content (1%–10%) and salt content (3.5%–12.5%). Then, we identified the strains based on 16S rRNA gene similarity and phylogenetic analysis, tested the PHA-producing ability by sequencing the gene of PHA synthase (PhaC), and determined the types, metabolic pathways, and phylogenetic relationship of PhaC according to the draft genome. The content and composition of PHA were detected by gas chromatography. [Results] A total of 96 strains were isolated and 38% had the *phaC* gene. Among them, 9 genera had not been reported to produce PHA: *Aceticoccus*, *Idiomarina*, *Halobacillus*, *Microbulbifer*, *Maritimibacter*, *Nitratireductor*, *Pelagibaca*, *Pseudooceanicola* and *Thalassospira*, and 8 of the 9 genera except *Microbulbifer* were enriched with oil. Thus, the enrichment with oil helped to discover new PHA-producing bacterial resources. In addition, we obtained 2 strains with high intracellular PHA content: *N. aquimarinus* SY-2-4 could accumulate PHA of 35.0% dry cell weight when cultured in nutrient broth, while *Roseibium aggregate* SN13-21 could use pyruvate as sole carbon source to accumulate PHA of 19.9% dry cell weight. [Conclusion] The offshore environment of Dapeng Bay harbors rich PHA-producing bacterial resources that are worthy of further investigation. The enrichment method of stepwise increase of oil content and salt content is beneficial to isolating different PHA-producing bacteria. Next, fermentation optimization of the 2 high-PHA-content strains will be further investigated.

Keywords: offshore sediment, polyhydroxyalkanoate, moderately halophiles, enrichment with oil, *phaC* gene

聚羟基脂肪酸酯(Polyhydroxyalkanoate, PHA)是由细菌、古菌、真菌和植物等合成的天然高分子基材料,作为细胞内的能量和碳源储存物,广泛应用于农业、工业、医学等领域^[1-3]。根据单体的碳原子数,PHA可被分为单体碳原子数3-5个的短链PHA(Short-Chain-Length PHA, SCL-PHA)和单体碳原子数6-14个的中长链PHA(Medium-Chain-Length PHA, MCL-PHA)^[1-3]。聚羟基丁酸酯(Polyhydroxybutyrate, PHB)属于短链PHA,具

有易断裂、韧性差、熔点高的缺点,加工难度大,使其应用范围受限^[1-3]。聚羟基丁酸羟基己酸酯[Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate), PHBHHx]是中长链与短链PHA的共聚物,具有无色透明、延展性良好、力学性能良好的特点,在医学器械、化妆品和组织工程上具有良好的应用前景^[4]。目前,从PHA发展趋势看,未来市场普遍看好新型中长链PHA。

细菌中PHA合成主要通过3条途径(图1^[5])。

途径 I 主要合成 SCL-PHA, 该途径以糖酵解产物乙酰辅酶 A 为底物, 通过 β -酮基硫解酶(PhaA)、乙酰乙酰辅酶 A 还原酶(PhaB)和 PHA 聚合酶(PhaC)的作用得到 PHA^[6]。途径 II、III 与 MCL-PHA 合成相关。途径 II 与细菌脂肪酸代谢途径耦合, 以脂肪酸代谢途径中的烯酰辅酶 A 为底物, 在 R-3-羟基烯酰辅酶 A 水合酶(PhaJ)和 PhaC 的作用下合成 PHA^[7], 如豚鼠气胞菌(*Aeromonas caviae*)^[8]。途径 III 利用糖类为碳源,

通过脂肪酸合成途径获得中间产物 3-羟基酯酰酰基载体蛋白, 再在 3-羟基酯酰酰基载体蛋白-辅酶 A 转移酶(PhaG)的作用下转化为 PHA 合成前体 3-羟基酯酰辅酶 A^[9], 最后通过 PhaC 的作用合成 PHA。例如, 假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)利用葡萄糖产聚羟基癸酸酯(Polyhydroxydecanoate, PHD)^[10]。具有产 PHA 能力的假单胞菌属细菌, 例如恶臭假单胞菌(*P. putida*)和嗜油假单胞菌(*P. oleovorans*), 往往同时具有途径 II 和途径 III^[11],

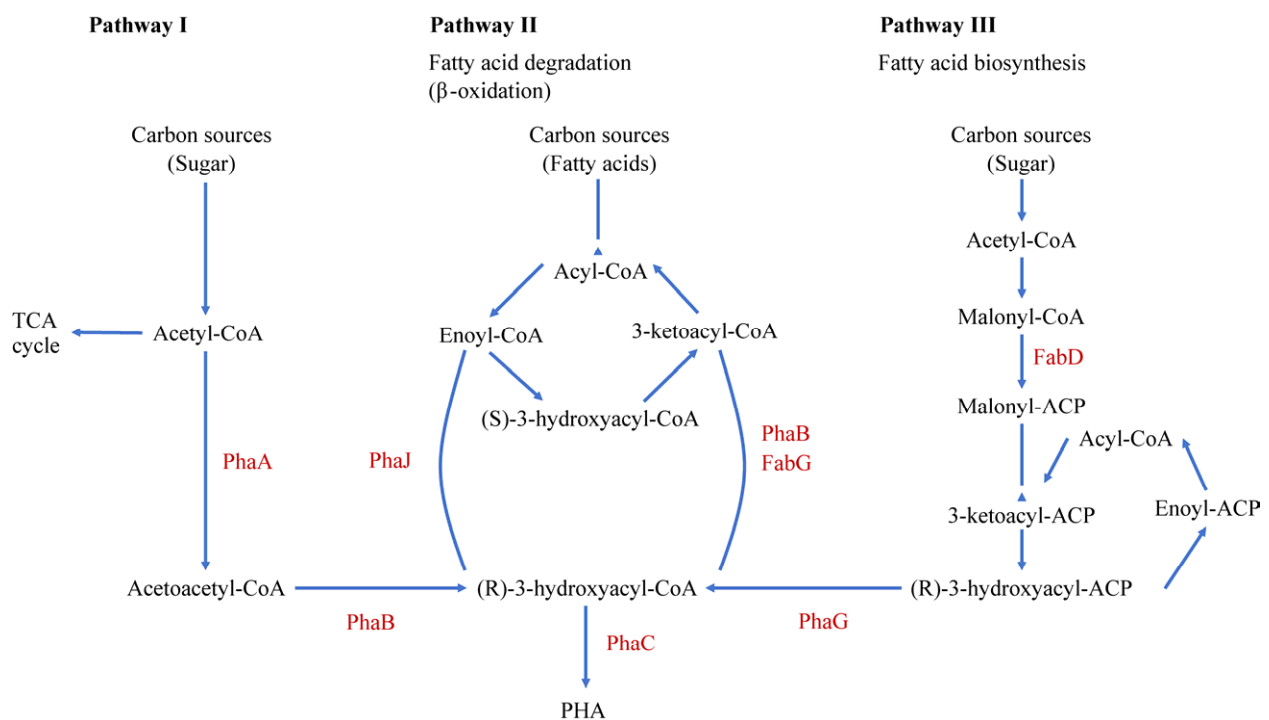


图 1 聚羟基脂肪酸酯的主要合成途径示意图^[5]

Figure 1 Schematic plot of main pathways for PHA synthesis^[5]

注: Acetyl-CoA: 乙酰辅酶 A; Acetoacetyl-CoA: 乙酰乙酰辅酶 A; Acyl-CoA: 酰辅酶 A; Enoyl-CoA: 烯酰辅酶 A; Enoyl-ACP: 烯酰载体蛋白; 3-Ketoacyl-CoA: 3-酮酰辅酶 A; 3-Ketoacyl-ACP: 3-酮酰酰基载体蛋白; Malonyl-CoA: 丙二酸单酰辅酶 A; (S)-3-Hydroxyacyl-CoA: (S)-3-羟基酰辅酶 A; Malonyl-ACP: 丙二酸单酰酰基载体蛋白; (R)-3-Hydroxyacyl-CoA: (R)-3-羟基酰辅酶 A; (R)-3-Hydroxyacyl-ACP: (R)-3-羟基酰基载体蛋白; FabG: 3-酮酰酰基载体蛋白还原酶; FabD: 丙二酰辅酶 A-酰基-载体蛋白转移酶; PhaA: β -酮基硫解酶; PhaB: 乙酰乙酰辅酶 A 还原酶; PhaC: PHA 聚合酶; PhaG: 3-羟基酰基载体蛋白辅酶 A 转移酶; PhaJ: R-3-羟基烯酰辅酶 A 水合酶

Note: Acetyl-CoA: Acetyl coenzyme A; Acetoacetyl-CoA: Acetoacetyl coenzyme A; Acyl-CoA: Acyl coenzyme A; Enoyl-CoA: Enoyl-coenzyme A; Enoyl-ACP: Enoyl acyl carrier protein; 3-ketoacyl-CoA: 3-ketoacyl coenzyme A; 3-ketoacyl-ACP: 3-ketoacyl acyl carrier protein; Malonyl-CoA: Malonyl coenzyme A; (S)-3-hydroxyacyl-CoA: (S)-3-hydroxyacyl coenzyme A; Malonyl-ACP: Malonyl acyl carrier protein; (R)-3-hydroxyacyl-CoA: (R)-3-hydroxyacyl coenzyme A; (R)-3-hydroxyacyl-ACP: (R)-3-hydroxyacyl acyl carrier protein; FabG: 3-oxoacyl-acyl carrier protein reductase; FabD: Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase; PhaA: β -ketothiolase; PhaB: Acetoacetyl-CoA reductase; PhaC: PHA synthase; PhaG: 3-hydroxyacyl acyl carrier protein coenzyme A transferase; PhaJ: (R)-specific enoyl-CoA hydratase

但是利用脂肪酸合成的效率更高^[12-13]。综上所述,细菌合成 MCL-PHA 的能力与其脂肪酸代谢能力密切相关。

目前,工业上主要通过细菌发酵生产 PHA。细菌以脂肪酸或单一糖类为碳源生产中长链 PHA 成本过高,因此,科学家试图以廉价油类进行发酵以降低成本,例如使用废弃棕榈油^[14]、废弃生物柴油^[15]或厨余废油^[16]。调整底物的配比能够改变 PHA 中单体的组成比例^[17],从而改变 PHA 的结晶性质、玻璃化转变温度、熔点等特征,扩展 PHA 的应用范围^[1,17]。因此,寻找能够利用混合脂肪酸碳源的产 PHA 细菌,对开发低成本生产工艺有重要的意义。

耐盐是另一个与细菌合成 PHA 相关的生理特征。研究显示,PHA 合成与细菌抗逆性相关,高盐度能够提高 PHA 的产量^[18]。同时,使用高盐培养基发酵还能实现不灭菌发酵,进一步降低生产成本^[19]。这 2 个优势使得对盐具有耐受能力的嗜盐菌(Halophiles)成为了最有潜力的一类 PHA 生产菌株。综上所述,本研究使用油类作为碳源,通过逐步提高培养基盐度和含油量,定向筛选可利用油类、能耐受中等盐度的菌株,并评估其作为 PHA 生产菌株的能力,为开发廉价 PHA 生产工艺提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

样品采集自广东省深圳市大鹏湾海域(E114°28'32.50", N22°29'10.87")。采样时间为 2019 年 7 月 22 日,潜水采集水深 10 m 处的近海海底表层 10 cm 的底泥 100 g,4 °C 条件下送至实验室,当天开始富集分离,样品编号为 S。

1.1.2 培养基

海洋细菌培养基: NH₄Cl 1.00 g, CH₃COONa 2.00 g, 蛋白胨 0.20 g, 酵母粉 0.20 g, 丙酮酸钠 1.25 g, EDTA 1.00 g, MgSO₄ 0.10 g, 5% NaHCO₃

溶液 20.0 mL, 5% KH₂PO₄ 溶液 4.0 mL, pH 7.0, 陈海水补足 1 L, 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min^[20]。

含油富集培养基: 陈海水中添加 1%–10% (体积分数)混合食用植物油(花生油:菜籽油=1:1)和 NaCl (0–9 g/L)。花生油按照国家标准规定大于 5% 的组成: 棕榈酸(C16:0 8.0%–14.0%)、油酸(C18:1 35.0%–69.0%)和亚油酸(C18:2 13.0%–43.0%)^[21]。菜籽油按照国家标准规定大于 5% 的组成: 棕榈酸(C16:0 1.5%–6.0%)、油酸(C18:1, 8.0%–60.0%)、亚油酸(C18:2, 11.0%–23.0%)、亚麻酸(C18:2, 5.0%–13.0%)、花生一烯酸(C20:1, 3.0%–15.0%)和芥酸(C22:1, 3.0–60.0)^[22]。

菌株分离使用 2216E 固体培养基,青岛海博生物技术有限公司。

PHA 累积使用营养肉汤(Nutrient Broth, NB)合成培养基和无机盐培养基(Mineral Medium, MM)^[21]; 营养肉汤合成培养基,生工生物工程(上海)股份有限公司; 2 种无机盐培养基分别添加 1%葡萄糖作为碳源(MM1),或 1%丙酮酸钠作为碳源(MM2)。

1.1.3 主要试剂和仪器

3-羟基丁酸甲酯、3-羟基癸酸甲酯、苯甲酸甲酯, Sigma-Aldrich 公司。

恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司; PCR 仪, TaKaRa 公司; 凝胶电泳系统,北京凯元信瑞仪器有限公司; 蓝光透色仪,上海勤翔科学仪器有限公司; 冷冻干燥仪, Christ 公司; 气相色谱仪,岛津公司; DB-WAX 色谱柱, Agilent Technologies 公司。

1.2 细菌的分离与纯化

采用 3 种分离策略: (1) 样品直接稀释涂布分离, (2) 样品经过 1–5 周的延长培养后分离, (3) 样品经过梯度增加盐度和含油量培养后分离。所有菌株使用 2216E 平板进行涂布及三区划线法纯化,纯化后的菌株于含 1%氯化钠的 15%甘油管内保藏于–80 °C。

直接分离和延长培养分离^[20]: 无菌操作下称

取 1.0 g 供试底泥样品, 加入装有 100 mL 海洋细菌培养基的锥形瓶中, 30 °C、160 r/min 恒温振荡培养 35 d。第 0、7、14、21、28、35 天(第 0 天对应直接分离)时, 稀释 1 mL 培养液至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 涂布于 2216E 平板上, 30 °C 恒温培养 48 h 后挑取具有不同形态特征的单菌落。菌株编号为 SN, 其后的数字表示培养的天数, SN0-1 即为样品直接分离获得的菌株。

含油富集分离: 无菌操作下称取 1.0 g 供试样品, 加入装有 100 mL 含油量 1%、盐度 3.5% 的含油富集培养基的锥形瓶中, 30 °C、160 r/min 恒温振荡培养 77 d, 每 7 d 以 1% 的接种量转接至新鲜的含油富集培养基中, 同时提高含油量 1%、盐度 1.0%。培养第 7、42 和 77 天取 1 mL 培养液, 稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} , 涂布于 2216E 平板上, 30 °C 恒温培养 48 h 后挑取具有不同形态特征的单菌落。SY1 表示含油量 1% 和盐度 3.5% 的富集样品, 对应编号以 SY 开头的菌株; SY5 表示含油量 5% 和盐度 7.5% 的富集样品, 对应编号以 SY-1 和 SY-2 开头的菌株; SY10 表示含油量 10%、盐度 12.5% 的富集样品, 对应编号以 SY10 开头的菌株。

1.3 细菌 16S rRNA 基因的鉴定

采用菌落 PCR 方法进行纯化细菌的 16S rRNA 基因片段扩增。挑取单菌落加入含 50 μ L 无菌水的灭菌 PCR 管中, 95 °C、10 min 得到菌落 PCR 模板。菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增引物为 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')。PCR 反应体系: 2 \times PCR Master Mix 25 μ L, 正向引物(100 μ mol/L) 1 μ L, 反向引物(100 μ mol/L) 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 6 min; 94 °C 45 s, 54 °C 30 s, 72 °C 90 s, 31 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 所得序列上传至美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),

序列号为 MW422635–MW422730, 利用 BLAST 工具和 RefSeq 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)比对鉴定分离地位, 并用 MEGA X 最大似然法构建 16S rRNA 基因系统进化树^[23], 确定底泥样品分离细菌的相似性及系统进化地位。

1.4 细菌 *phaC* 基因的鉴定

菌落 PCR 模板制备方法同 1.3。PHA 聚合酶分为 4 种类型, 目前尚无通用引物, 由于 III 型 PhaC 主要来自光合类细菌, 非目标菌群, 未对其进行检测。使用引物包括: (1) 针对 I 型和 II 型 PhaC 的引物 PHACGNF (5'-CCYRGATCAACAAGTTCTAC-3') 和 PHACGNR (5'-TTCCAGAACAGMAGGTCGAAGG-3')^[24]; (2) 针对芽孢杆菌属(*Bacillus*)的 IV 型 PhaC 的引物 BmphaC015F (5'-CGTGCAAGAGTGGGAAAAAT-3') 和 BmphaC931R (5'-TCGCAATATGATCACGGCTA-3')^[25]。PCR 反应体系和条件同 1.3。PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 蓝光透色仪观察胶体, 有条带的样品即为 *phaC* 基因阳性菌株。

1.5 产 PHA 细菌的基因组测定和注释

选择来自未报道单菌产 PHA 属的细菌以及产 PHA 的潜在新菌, 利用 Illumina HiSeq X Ten 测序平台测定其基因组数据。由于部分菌株保藏后失活, 共测定 8 株 *phaC* 基因阳性菌株的基因组框架图(广东美格基因科技有限公司), 基因组上传 NCBI 数据库, 序列号为 JAEKJZ000000000、JAEKJR000000000、JAEKJS000000000、JAEKJT000000000、JAEKJW000000000、JAEKJX000000000、JAEKJY000000000 和 JAEKIS000000000。8 株 *phaC* 阳性细菌的 16S rRNA 基因与 4 株已知产 PHA 细菌菌株的 16S rRNA 基因构建系统发育树, 方法同 1.3。利用 KEGG 数据库(<https://www.kegg.jp/>)注释 8 个基因组中的功能基因, 并下载 4 株产已知 PHA 细菌的相关信息。4 株细菌菌株为(KEGG 基因组编号): 贪铜钩虫菌(*Cupriavidus necator* H16, 最初分类

为 *Ralstonia eutropha* T00416; 具有合成 SCL-PHA 的 I 型 *PhaC*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium* QM B1551; T01208; 具有合成 SCL-PHA 的 IV 型 *PhaC*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa* PAO1; T00035; 具有合成 MCL-PHA 的 II 型 *PhaC*)和豚鼠气单胞菌(*A. caviae* 8LM; T05190; 具有合成 SCL MCL-PHA 的 I 型 *PhaC*)。基因组之间的平均核苷酸相似度(Average Nucleotide Identity, ANI)^[26]使用 EzBioCloud 网站的工具(<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>)计算, 比对所用的模式菌株基因组从 NCBI 数据库下载(GCF_000168975)。

1.6 细菌产 PHA 的种类

8 株 *phaC* 基因阳性菌株分别使用单一碳源(丙酮酸盐、葡萄糖)和复合碳源(来自牛肉浸膏和酵母提取物)培养(培养基配方见 1.1.2)。取 100 mL 液体培养基于锥形瓶中, 在 30 °C、150 r/min 条件下培养 4 d。菌液 4 000 r/min 离心 20 min 后冻干、提取并进行气相色谱分析(Gas Chromatography, GC), 测定方法和含量计算方法参考 Juengert 等^[27]。提取测试步骤主要包括: 5–10 mg 冻干样品加入 1 mL 氯仿和 1 mL 含 15% (体积分数)浓硫酸的甲醇溶液, 100 °C 油浴 150 min, 进行甲酯化反应, 反应完成后, 冰浴冷却 5 min, 加入 1 mL 去离子水, 充分混匀 30 s, 静置 1 min, 取下层有机相 150 μ L 放入 GC 小管中, 加入 150 μ L 内标, 用于色谱分析。选用 DB-WAX 型号色谱柱, 使用 3-羟基丁酸甲酯和 3-羟基癸酸甲酯为气相色谱标准品的出峰时间作为参考, 苯甲酸甲酯作为内标标准化峰面积。

1.7 数据分析

研究中所有统计学分析使用 R 语言(4.0.1)的 vegan、ape 和 ggplot2 程序包完成^[28]。富集样品之间比较采用基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析(Principal Co-Ordinates Analysis, PCoA), 结果显著性使用相似性分析(Analysis of Similarities, ANOSIM)检验。以序列相似度<98.7%^[29]的标准划分物种水平, 通过韦恩图分析 2 个采样点可培

养细菌的异同。为了确定细菌所在属是否曾报道单菌具有产 PHA 的特性, 我们进行了 3 步检索。首先通过 LPSN 数据库(List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature; <https://lpsn.dsmz.de/>)判断备选属名是否发生分类地位改变, 如有改变, 对所有曾用名进行后续检索; 然后将属名与 Koller 等^[30]2013 年总结产 PHA 细菌和古菌名单进行对比确定备选名单; 最后, 通过 Web of Knowledge 数据库搜索, 使用关键词 [genus name AND (poly*hydroxyalkano* OR poly*hydroxy*butyrate*)] 搜索, 检索执行时间 2021 年 1 月, 检索年份 2010 年至 2021 年。如果搜索无结果返回, 或返回文献中未报道纯菌发酵产物的鉴定结果, 则确定该属细菌尚未报道单菌具有产 PHA 特性。

2 结果与分析

2.1 海洋源产 PHA 细菌的分离和筛选

自广东省深圳市大鹏海域近海沉积物样品中共分离出 96 株细菌菌株, 基于分子生物学鉴定, 菌株来自 13 个科 26 个属, 变形菌门(*Proteobacteria*)细菌占优势地位(79%, 图 2)。共获得 *phaC* 基因阳性菌 36 株(图 2 中星号菌株), 来自 9 个科、17 个属, PHA 阳性率 38%。*phaC* 阳性菌中红细菌科(*Rhodobacteraceae*)占 50%, 芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)占 17%, 海洋源菌科(*Idiomarinaceae*)和盐单胞菌科(*Halomonadaceae*)各占 8%, 其余为食烷菌科(*Alcanivoracaceae*)、微泡菌科(*Microbulbiferaceae*)、交替单胞菌科(*Alteromonadaceae*)、红螺菌科(*Rhodospirillaceae*)和叶杆菌科(*Phyllobacteriaceae*)。其中 9 个属此前未报到具有产 PHA 能力: 尖球菌属(*Acuticoccus*)、海洋源菌属(*Idiomarina*)、盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)、微泡菌属(*Microbulbifer*)、海棍状菌属(*Maritimibacter*)、硝酸盐还原菌属(*Nitratireductor*)、公海橄榄菌属(*Pelagibaca*)、假海栖菌属(*Pseudooceanicola*)和海旋菌属(*Thalassospira*), 其中微泡菌属仅分离自普通富集。

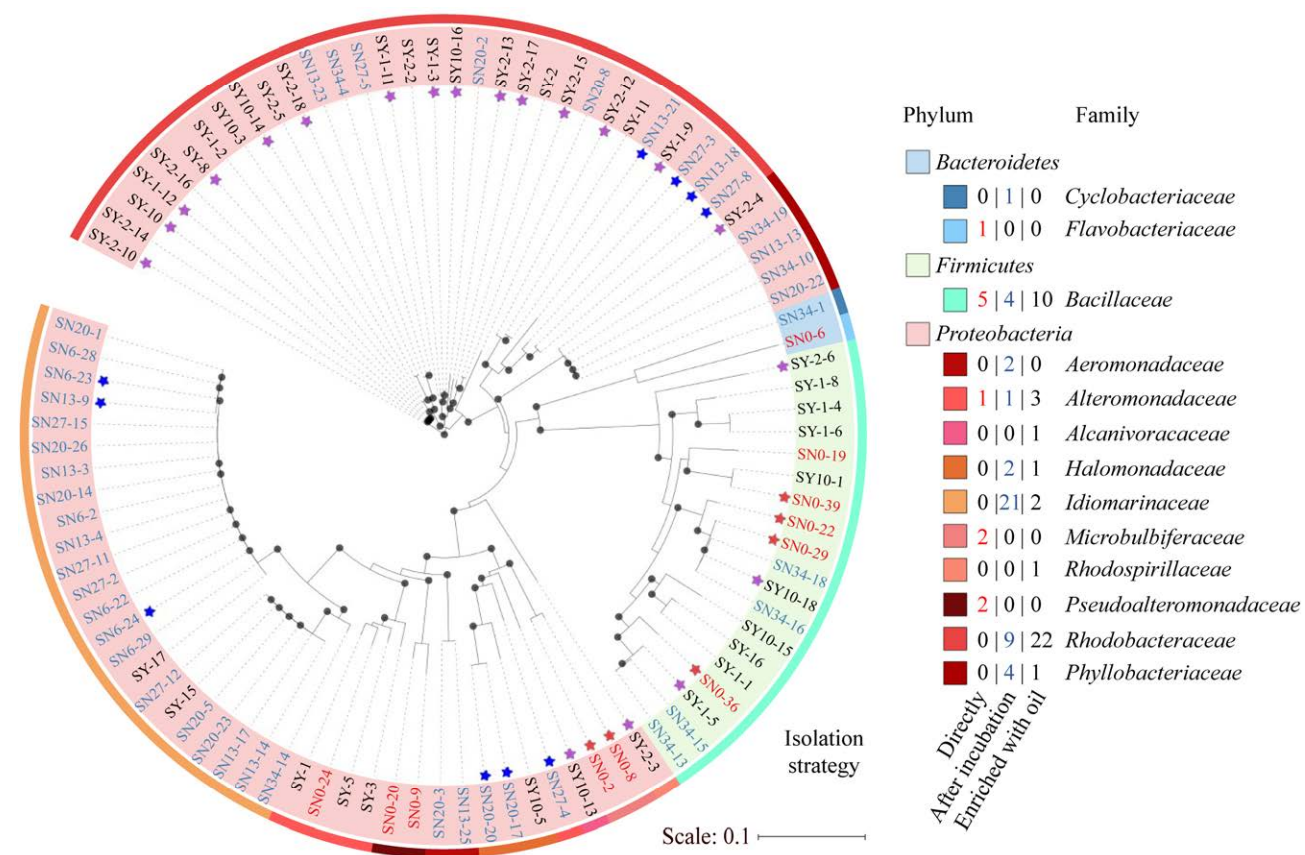


图 2 近海沉积物 3 种分离策略获得的可培养细菌基于 16S rRNA 基因构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of culturable bacteria isolated from offshore sediment sample using 3 isolation strategies

注: 产 PHA 细菌以星号标记在系统发育树上; 系统发育树基于 1 000 次 Bootstrap 测试的邻接法构建, Bootstrap 值大于 0.5 的以黑色圆圈表示; 图例中的数字表示不同分离策略获得的菌株数, 字体颜色分别表示样品直接分离(红色)、延长培养分离(蓝色)和含油富集分离(黑色)

Note: PHA-producing bacteria are indicated by stars at the phylogenetic tree tips; Neighbor-joining phylogenetic tree is based on bootstrap 1 000 replicates and bootstrap values >0.5 are indicated by black circles; The numbers in the legend indicate strains isolated using different isolation strategies; Font colors indicate the sample was isolated directly (red), after incubation (blue) or after enriched with oil (black)

分离出潜在新菌 15 株(与模式菌株相似度<98.7%), 来自红细菌科、盐单胞菌科、假交替单胞菌科(*Pseudoalteromonadaceae*)、黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)和芽孢杆菌科(表 1)。

研究使用 3 种分离策略: 直接分离、延长培养分离和含油富集分离, 分别获得 11、41 和 44 株菌株, 其 PHA 阳性菌的比例分别为 55%、29%和 49%。ANOSIM 检验结果显示 3 种处理之间区别显著 (Permutations=999 , $R=11.43$, $P=0.002$)。图 3A 显示直接分离(SN-0)、延长培养

(SN-1–SN-5)和含油富集(SY1、SY5 和 SY10)中可培养细菌区系发生变化。图 3B 显示 3 种分离策略, 在种水平上最高仅有 2%相同, 说明分离策略极大影响了可培养细菌的物种组成。

2.2 产聚羟基脂肪酸酯细菌的代谢通路特征

共测定 5 株首次报道产 PHA 的菌株、2 株产 PHA 的潜在新菌及其 1 株产 PHA 潜在新菌的参比菌株的基因组, 它们的分类信息及基因组特征见表 2。其余 4 个未报道单菌产 PHA 的属因活化失败未获得检测数据。

表 1 基于 16S rRNA 基因序列 V1-V3 区的潜在新物种的物种分类信息
Table 1 The taxonomy of potential novel species based on V1-V3 region of 16S rRNA gene

Taxonomy					Strains	16S rRNA gene similarity (%)
Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	
<i>Bacteroidetes</i> <i>Firmicutes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Lutimonas</i>	<i>vermicola</i>	SN0-6 96.80
	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>circulans</i>	SY10-15 97.70
				<i>Bacillus</i>	<i>stratosphericus</i>	SN0-36 97.31
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Cytobacillus</i>	<i>firmus</i>	SY-1-5 97.76
				<i>Cytobacillus</i>	<i>firmus</i>	SN34-13 97.53
				<i>Cytobacillus</i>	<i>firmus</i>	SN34-15 97.54
				<i>Acuticoccus</i>	<i>yangtzensis</i>	SY-1-9 96.68
				<i>Maritimibacter</i>	<i>alkaliphilus</i>	SY-2-5 98.32
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Maritimibacter</i>	<i>alkaliphilus</i>	SY-2-18 98.33
				<i>Pseudooceanicola</i>	<i>marinus</i>	SY-2 98.09
				<i>Pseudooceanicola</i>	<i>marinus</i>	SY-2-15 98.08
				<i>Alteromonas</i>	<i>oceanii</i>	SY-3 97.65
				<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>pyridensis</i>	SN0-20 97.90
		<i>Oceanospirillales</i>	<i>Halomonadaceae</i>	<i>Halomonas</i>	<i>aestuarii</i>	SN20-17 97.41
				<i>Halomonas</i>	<i>saccharovitans</i>	SN20-20 97.25

注：Taxonomy 以字母顺序排列
Note: Taxonomy is ordered alphabetically

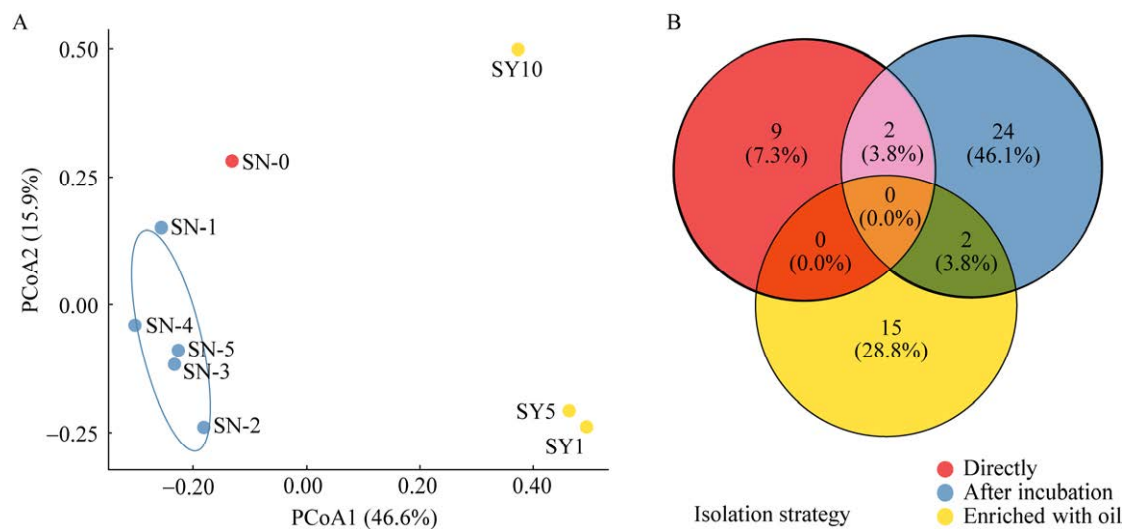


图 3 3 种分离策略对近海沉积物中可培养细菌群落组成的比较

Figure 3 Comparison of culturable bacteria community composition isolated from offshore sediment using 3 isolation strategies

注：A：物种组成随富集时间变化的主坐标轴分析；B：3 种策略分离菌株在种水平上的韦恩图；红色为样品，编号 SN-0；蓝色为样品培养 1–5 周，编号为 SN-1–SN-5；黄色为含油富集培养样品，SY1、SY5 和 SY10 含油量为 1%、5% 和 10%

Note: A: PCoA plot of bacterial community composition of 3 isolation strategies; B: Venn diagram of strains at species level using 3 isolation strategies; Red indicates the bacterial isolated directly from sample, which are designated as SN-0; Blue indicates the ones isolated after incubation for 1 to 5 weeks, which are designated as SN-1 to SN-5; Yellow indicated the ones isolated the sample enriched with 1%, 5% or 10% oil, which are designated as SY1, SY5 and SY10

表 2 大鹏海域近海沉积物分离产 PHA 细菌的基因组特征

Table 2 Genome features of PHA-producing bacteria isolating from Dapeng offshore sediment sample							
Strains	Taxonomy	16S rRNA gene similarity (%)	Genome size (Mb)	Scaffold	N50 (Mb)	GC content (%)	Gene number
SN20-17	<i>Halomonas denitrificans</i>	98.2	4.58	31	0.54	61.9	4 129
SN0-2	<i>Microbulbifer salipaludis</i>	99.7	3.98	3	2.28	58.4	3 434
SY-2-6	<i>Halobacillus kuroshimensis</i>	99.7	3.85	15	0.53	47.0	4 286
SY-2-4	<i>Nitratireductor aquimarinus</i>	99.9	4.69	38	0.39	62.0	4 626
SN13-21	<i>Roseibium aggregata</i>	100.0	6.44	21	1.87	59.0	6 365
SY-2-12	<i>R. aggregata</i>	98.9	6.12	15	0.67	60.9	5 999
SY10-16	<i>Pelagibaca abyssi</i>	100.0	5.21	75	0.22	65.3	5 142
SY-2-3	<i>Thalassospira povalilytica</i>	100.0	4.52	9	1.34	54.8	4 528

注：Taxonomy：16S rRNA 基因相似度最高的有效发表模式菌株的物种名

Note: Taxonomy is the valid published name of the most similar type strain based on 16s rRNA gene sequence

根据 16S rRNA 基因相似度小于 98.7% 的标准^[29]，推测 SN20-17 为盐单胞菌属(*Halomonas*)的潜在新物种。SY-2-12 与 *Roseibium aggregata* IAM^T (= *Labrenzia aggregata*) 的核苷酸相似度(ANI) 为 77.3%，小于属的划分标准 95%^[26]，推测其为玫瑰菌属的潜在新物种。图 4 显示了 8 株测序细菌的

糖类和油类代谢通路以及主要 PHA 合成、降解调控相关的基因的分布。其中 SY-2-6 和 SN0-2 这 2 株细菌在基因组中未注释出任何与已知 PHA 合成有关的基因。这 2 株细菌曾通过 PHACGN 引物扩增获得 500 bp 片段，通过对基因组的短序列 BLAST，定位引物所在位置，发现为未知蛋白，

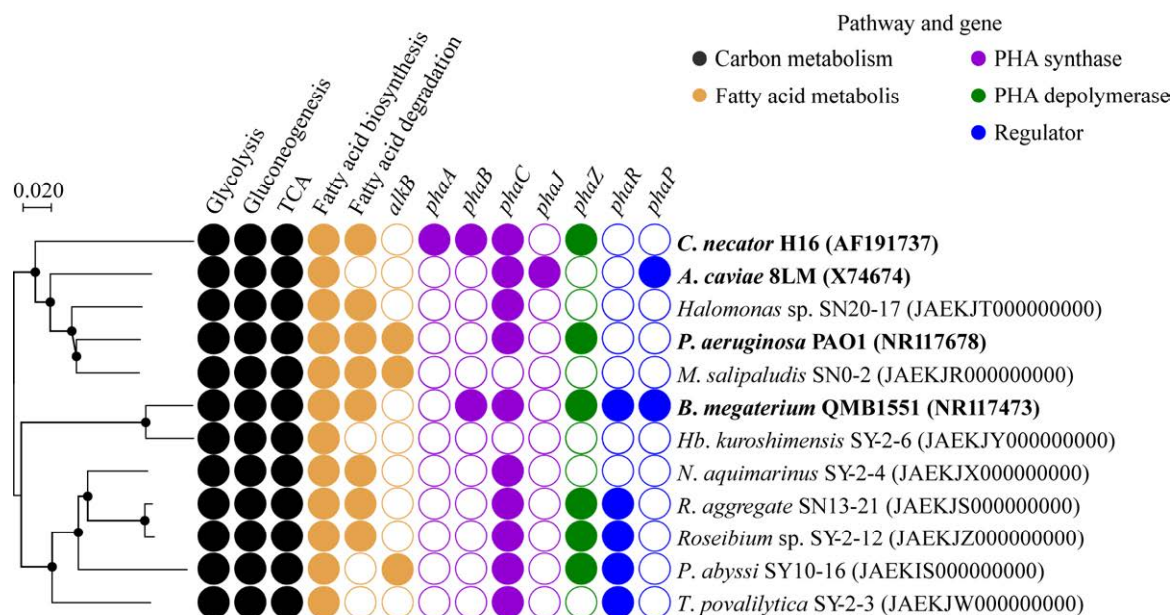


图 4 近海沉积物中产 PHA 细菌的代谢途径和 PHA 合成基因

Figure 4 Metabolic pathways and PHA synthesis genes of PHA-producing bacteria isolated from offshore sediment

注: 系统发育树基于 1 000 次 Bootstrap 测试的邻接法构建, Bootstrap 值大于 0.5 的以黑色圆圈表示; 括号中标注 16S rRNA 基因序列的序列号; 代谢通路信息从左至右分别对应 KEGG 代谢通路图: map00010、map00010、map00020、map00061 和 map00071; 4 个参比菌株用粗体表示

Note: Neighbor-joining phylogenetic tree is based on bootstrap 1 000 replicates and bootstrap values >0.5 are indicated by black circles; Accession number of 16S rRNA gene sequences are shown in brackets. The metabolic pathways correspond to KEGG pathway maps: map00010, map00010, map00020, map00061 and map00071 in KEGG; four reference genomes are in bold

该序列上缺少关键活性位点(数据未发表)。

2.3 细菌中聚羟基脂肪酸酯的含量和种类

8 株近海沉积物分离的 *phaC* 阳性菌株利用 3 种碳源产 PHA 的组成和含量见表 3。全部 *phaC* 阳性菌株都可表达其 PHA 合成能力, 合成 PHA 的成分和含量受碳源种类的影响。其中, *N. aquimarinus* SY-2-4 和 *R. aggregate* SN13-21 累积 PHA 占细胞干重比值分别达到了 35.0% 和 19.9%, 应进一步优化发酵条件, 确定其作为生产菌株的潜力。

3 讨论与结论

在 PHA 工业化生产中, 中长链 PHA 因易于加工受到广泛关注。为了增加对产 MCL-PHA 的细菌资源的理解, 本研究基于 PHA 代谢特点出发, 对广东省深圳市大鹏湾近海底泥样品使用 3 种分离方法(直接分离、延长培养分离和含油富集培养分离), 得到 96 株可培养细菌, 优势菌群主要来自变

形菌门(79%)。样品可培养细菌中, 潜在新物种比例达 15%, *phaC* 基因阳性菌株的比例达 38%, 高于目前报道的海洋细菌中产 PHA 细菌的比例。例如自法属波利尼西亚群岛的五类海洋样品(包括底泥、动物、微生物垫、微生物膜和水样)中得到的 760 株单菌中, 95 株为 PHA 阳性菌, 阳性率为 12%^[31]; 自大西洋南部海域的底泥及水样中分离出的 155 株单菌中, 30 株为 PHA 阳性菌, 占比 19%^[32]。此外, 本研究新报道 9 个属细菌具有 *phaC* 基因, 并通过产物检测确认 5 个属可产 PHA。以上结果说明, 大鹏湾海域的产 PHA 细菌资源丰富, 但开发不足, 需进一步挖掘。

本项目利用含油富集法, 分离获得与直接培养及延长培养显著不同的细菌区系。含油富集法以混合植物油为碳源, 盐度梯度增加至 3.5%、7.5% 和 12.5%, 获得的可培养细菌与原油海洋污染区域

表 3 8 株细菌菌株利用 3 种碳源产聚合物分析
Table 3 Analysis of polymer synthesized from 3 different carbon sources in 8 strains

Strains	Carbon source	PHA content of CDW (W/W, %)	PHA composition (mol%)	
			3HB	3HV
<i>Halomonas</i> sp. SN20-17	Pyruvate	3.5	94	6
	Glucose	1.0	31	69
	NB	0.7	71	29
<i>M. salipaludis</i> SN0-2	Pyruvate	1.1	35	65
	Glucose	1.1	67	33
	NB	0.2	29	71
<i>Hb. kuroshimensis</i> SY-2-6	Pyruvate	1.8	91	9
	Glucose	2.0	57	43
	NB	0.6	60	40
<i>N. aquimarinus</i> SY-2-4	Pyruvate	NA	NA	NA
	Glucose	2.4	93	7
	NB	35.0*	97	3
<i>R. aggregate</i> SN13-21	Pyruvate	19.9*	98	2
	Glucose	2.4	92	8
	NB	0.8	79	21
<i>Roseibium</i> sp. SY-2-12	Pyruvate	7.5*	98	2
	Glucose	NA	NA	NA
	NB	ND	ND	ND
<i>P. abyssi</i> SY10-16	Pyruvate	0.4	62	38
	Glucose	0.9	28	72
	NB	3.5	13	87
<i>T. povalilytica</i> SY-2-3	Pyruvate	1.6	87	13
	Glucose	1.2	33	67
	NB	0.4	31	69

注: NB: 营养肉汤; CDW: 细胞干重; 3HB: 3-羟基丁酸; 3HV: 3-羟基戊酸; NA: 未检测; ND: 未检出; *: PHA 含量>5%
Note: NB: Nutrient broth; CDW: Cell dry weight; 3HB: 3-hydroxybutyric acid; 3HV: 3-hydroxyvalerate; NA: Not available; ND: Not detected; *: The numbers of PHA content larger than 5%

的优势菌群相似, 包括食烷菌属(*Alcanivorax*)、硝酸盐还原菌属(*Nitratireductor*)、玫瑰菌属(*Roseibium*)和海旋菌属细菌(*Thalassospira*)^[33-35]。与延长培养相比, 含油富集获得的 *phaC* 阳性菌株比例提高 20%, 而且本研究得到的 9 个未被报道的产 PHA 属细菌中, 有 8 个来自含油富集策略, 说明含油富集策略能进一步发掘样品中的产 PHA 细菌资源。含油富集培养分离的目标菌株是具油类代谢潜力的中度嗜盐菌, 但从基因组注释的结果看并非所有含油富集获得的 PHA 菌株都具有脂肪酸降解途径或烷烃降解途径(具有烷烃单加氧酶

基因, Alkane Monooxygenase, AlkB)。这说明在混菌体系中, 部分细菌可利用其他细菌的代谢产物存活。所获得细菌代谢特征需要通过进一步的研究确定。

基于菌株基因组框架图测试结果和单一菌株发酵产物测定结果, 我们发现菌株 *N. aquimarinus* SY-2-4 的 PHA 累积量达细胞干重的 35.0%, 后续将对其产 PHA 能力进行进一步的评估。过去的研究表明, 硝酸盐还原菌属细菌是活性污泥中的优势菌群, 随着活性污泥中 PHA 的累积, 硝酸盐还原菌属的占比从 0.06%增加至 1.62%^[36], 因此, 推

测 PHA 累积与硝酸盐还原菌属相关。本研究结果首次确认硝酸盐还原菌可产 PHA, 进一步支持该属细菌在活性污泥累积 PHA 中发挥重要作用。

研究获得的 15 株潜在新菌中, 1 株盐单胞菌属和 1 株玫瑰菌属的潜在新菌通过单一菌株发酵发现可产 PHA。盐单胞菌属细菌是重要的 PHA 生产菌株, 据报道通过优化可累积超过细胞干重 80% 的 PHA^[37], 并能实现不灭菌海水发酵生产^[19]。本研究报道的 *Halomonas* sp. SN20-17 PHA 含量较低, 无进一步开发的潜力(表 3)。部分玫瑰菌属细菌能够生产二甲基硫丙酸内盐, 还原硝酸盐, 降解油类和累积 PHA, 在海洋物质循环, 特别是硫循环中有重要的作用^[38]。本研究中从含油富集与普通培养中均分离出可产 PHA 的玫瑰菌属细菌。*Roseibium* sp. SY-2-12 和 *R. aggregate* SN13-21 分别可累积细胞干重 7.5% 和 19.9% 的 PHA (表 3), 具有进一步研究的价值。

从碳源利用的角度分析, 累积 PHA 含量最高的 2 株细菌 *N. aquimarinus* SY-2-4 与 *R. aggregate* SN13-21 都能以葡萄糖作为碳源合成 PHA, 其基因组中都具有完整的相关代谢途径(图 4)。值得注意的是 SN13-21 利用糖代谢的核心物质丙酮酸盐的效率高于葡萄糖, 但是无法高效地转化 NB 中的营养物质; 而 SY-2-4 将 NB 中的复合碳源转化为 PHA 的能力远超过其转化葡萄糖的能力(表 3)。由于 NB 中的碳源主要来自牛肉浸膏和酵母提取物, 其中富含氨基酸, 因此我们推测来自硝酸盐还原菌属的 SY-2-4 具有更强的氨基酸代谢能力和硝酸盐代谢能力。但是, 比较 *N. aquimarinus* 和 *R. aggregate* 的模式菌株^[39-40]发现 2 个菌株都具有硝酸盐还原的能力, *N. aquimarinus* 基于 20NE (API) 结果仅有弱氨基酸代谢能力, *R. aggregate* 相关研究不足。进一步比较 2 个细菌的 10 个氨基酸代谢途径 (map00250-00280、00310、00330-00360、00380, 数据未展示) 发现 2 个菌株都具有相关氨基酸的代谢途径, SY-2-4 的特有基因并未形成完整

的氨基酸代谢途径。目前, 尚无对 *N. aquimarinus* SY-2-4 能利用 NB 大量合成 PHA 的原因的推测, 还需进一步的研究。

本研究寻找的重点为产 MCL-PHA 的细菌。本研究分离出 8 株产 PHA 菌株的基因组注释结果表明(图 4), 1 株 *Halomonas* sp. SN20-17 的 PhaC 属于 II 型, 可合成 MCL-PHA。*N. aquimarinus* SY-2-4、*R. aggregate* SN13-21、*Roseibium* sp. SY-2-12、*P. abyssi* SY10-16 和 *T. povalilytica* SY-2-3 菌株的 PhaC 与巨大芽孢杆菌相似, 属于 IV 型, 需要与 PhaR 亚基共同发挥作用, 主要合成 SCL-PHA。虽然 IV 型 PhaC 以合成 PHBV 为主, 但是也存在合成特殊单体的例子^[41]。因此, 未来在对 PHA 含量较高的 SY-2-4、SN13-21 和 SY-2-12 的研究中, 我们需提供 C6 以上的底物, 确定其产 MCL-PHA 的能力。此外, 2 株 *M. salipaludis* SN0-2 和 *Hb. kuroshimensis* SY-2-6 未注释出 PHA 合成相关基因。从同批次的测序数据看(表 2), SN0-2 和 SY-2-6 基因组大小小于 4 Mb, N50 分别为 2 278 604 bp 和 533 008 bp, 其组装完成度较高, 因完整度导致未注释到 PhaC 的可能性较低。SY-2-6 与已测序的 *Hb. Kuroshimensis* (GenBank 登录号 GCF_000425705.1) 区别小(对比数据未展示), 而且该基因组中也未注释出 PhaC。*M. salipaludis* SN0-2 无参考基因组数据。此外, 我们利用 *phaC* 基因引物重新进行菌落 PCR, 未能成功获得条带。我们推测这 2 株细菌的 PHA 聚合酶较为新颖, 因此与现有引物结合度不高, 导致扩增不稳定。目前推测这 2 株细菌负责合成 PHA 的酶可能与已知 PhaC 存在差异, 具体发挥 PHA 合成的基因需通过后续研究确认。

本研究对近海底泥样品进行细菌分离纯化, 发现海洋中也存在高比例的产 PHA 细菌, 说明与土壤环境相比, 海洋中也具有丰富的产 PHA 细菌资源。因此, 后续将对大鹏海域的其他位点进行进一步的研究。此外, 通过含油富集方法获得

8 个此前未基于产物报道的产 PHA 的属, 说明含油富集方法有利于获得新型的产 PHA 细菌资源。后续研究中, 我们将从 2 个方面推进研究, 其一研究 PhaC 结构未知的菌株, 为发现新型的 PHA 聚合酶提供理论基础, 其二优化 PHA 积累量高的菌株的发酵条件, 确定其用于工业生产的价值。

REFERENCES

- [1] Lee SY, Choi JI, Wong HH. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1999, 25(1/2/3): 31-36
- [2] Steinbüchel A, Lütke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms[J]. Biochemical Engineering Journal, 2003, 16(2): 81-96
- [3] Han J, Hou J, Liu HL, Cai SF, Feng B, Zhou J, Xiang H. Wide distribution among halophilic archaea of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(23): 7811-7819
- [4] Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials[J]. Biomaterials, 2005, 26(33): 6565-6578
- [5] Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2007, 82(3): 233-247
- [6] Doi Y, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Kunioka M. Nuclear magnetic resonance studies of poly(3-hydroxybutyrate) and polyphosphate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(11): 2932-2938
- [7] Fiedler S, Steinbüchel A, Rehm BH. The role of the fatty acid β -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the *fadBA* operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*[J]. Archives of Microbiology, 2002, 178(2): 149-160
- [8] Doi Y, Kitamura S, Abe H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)[J]. Macromolecules, 1995, 28(14): 4822-4828
- [9] Taguchi K, Aoyagi Y, Matsusaki H, Fukui T, Doi Y. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21(7): 579-584
- [10] Simon-Colin C, Raguénès G, Costa B, Guezennec J. Biosynthesis of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenneci* from various carbon sources[J]. Reactive and Functional Polymers, 2008, 68(11): 1534-1541
- [11] Mozejko-Ciesielska J, Szacherska K, Marciniak P. *Pseudomonas* species as producers of eco-friendly polyhydroxyalkanoates[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2019, 27(6): 1151-1166
- [12] Gutiérrez-Gómez U, Servín-González L, Soberón-Chávez G. Role of β -oxidation and de novo fatty acid synthesis in the production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(9): 3753-3760
- [13] Eggink G, De Waard P, Huijberts GNM. The role of fatty acid biosynthesis and degradation in the supply of substrates for poly(3-hydroxyalkanoate) formation in *Pseudomonas putida*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1992, 103(2/3/4): 159-163
- [14] Daniş Ö, Ogan A, Birbir M. Polyhydroxyalkanoates production from renewable and waste materials using extremophiles/recombinant microbes[A]//Sani RK, Krishnaraj Rathinam N. Extremophilic Microbial Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Biofuels, Value-Added Products, and Usable Power[M]. Cham: Springer, 2018: 207-227
- [15] 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
- [16] Sharma PK, Munir RI, De Kievit T, Levin DB. Synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from vegetable oils and free fatty acids by wild-type and mutant strains of *Pseudomonas chlororaphis*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2017, 63(12): 1009-1024
- [17] Hartmann R, Hany R, Geiger T, Egli T, Witholt B, Zinn M. Tailored biosynthesis of olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas putida* GPo1 with improved thermal properties[J]. Macromolecules, 2004, 37(18): 6780-6785
- [18] Pacholak A, Gao ZL, Gong XY, Kaczorek E, Cui YW. The metabolic pathways of polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides synthesized by *Haloferax mediterranei* in response to elevated salinity[J]. Journal of Proteomics, 2021, 232: 104065
- [19] Tan D, Xue YS, Aibaidula G, Chen GQ. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(17): 8130-8136
- [20] Mu DS, Liang QY, Wang XM, Lu DC, Shi MJ, Chen GJ, Du ZJ. Metatranscriptomic and comparative genomic insights into resuscitation mechanisms during enrichment culturing[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 230
- [21] General Administration of Quality Supervision and Quarantine of the People's Republic of China, National

- Standardization Administration of China. GB/T 1534-2017 Peanut oil[S]. Beijing: China Standard Press, 2017 (in Chinese)
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 1534-2017 花生油[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [22] General Administration of Quality Supervision and Quarantine of the People's Republic of China, National Standardization Administration of China. GB/T 1536-2004 Canola oil[S]. Beijing: China Standard Press, 2004 (in Chinese)
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 1536-2004 菜籽油[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004
- [23] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549
- [24] López-Cortés A, Rodríguez-Fernández O, Latisnere-Barragán H, Mejía-Ruiz HC, González-Gutiérrez G, Lomeli-Ortega C. Characterization of polyhydroxyalkanoate and the phaC gene of *Paracoccus seriniphilus* E71 strain isolated from a polluted marine microbial mat[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(1): 109-118
- [25] 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: 562014
- [26] Yoon SH, Ha SM, Lim J, Kwon S, Chun J. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(10): 1281-1286
- [27] Juengert J, Bresan S, Jendrossek D. Determination of polyhydroxybutyrate (PHB) content in *Ralstonia eutropha* using gas chromatography and Nile red staining[J]. *Bio-Protocol*, 2018, 8(5): e2748
- [28] R Core Team. R: a language and environment for statistical computing[Z]. 2018, <https://www.R-project.org/>
- [29] Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(9): 635-645
- [30] Koller M, Salerno A, BrauneGG G. Polyhydroxyalkanoates: basics, production and applications of microbial biopolyesters[A]//Stevens VC. *Bio-Based Plastics*[M]. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2013: 137-170
- [31] Wecker P, Moppert X, Simon-Colin C, Costa B, Berteaux-Lecellier V. Discovery of a mcl-PHA with unexpected biotechnical properties: the marine environment of French *Polynesia* as a source for PHA-producing bacteria[J]. *AMB Express*, 2015, 5(1): 1-9
- [32] Takahashi RYU, Castilho NAS, Silva MACd, Miotto MC, Lima AOdS. Prospecting for marine bacteria for polyhydroxyalkanoate production on low-cost substrates[J]. *Bioengineering*, 2017, 4(3): 60
- [33] Dashti N, Ali N, Eliyas M, Khanafer M, Sorkhoh NA, Radwan SS. Most hydrocarbonoclastic bacteria in the total environment are diazotrophic, which highlights their value in the bioremediation of hydrocarbon contaminants[J]. *Microbes and Environments*, 2015, 30(1): 70-75
- [34] Al-Awadhi H, Dashti N, Kansour M, Sorkhoh N, Radwan S. Hydrocarbon-utilizing bacteria associated with biofouling materials from offshore waters of the Arabian Gulf[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012, 69: 10-16
- [35] Djahnit N, Chernai S, Catania V, Hamdi B, China B, Cappello S, Quatrini P. Isolation, characterization and determination of biotechnological potential of oil-degrading bacteria from Algerian centre Coast[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(3): 780-795
- [36] Woraittun N, Suwannasilp BB. Polyhydroxyalkanoate production from different carbon substrates using sludge from a wastewater treatment plant: microbial communities, polymer compositions, and thermal characteristics[J]. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 2017, 36(6): 1754-1764
- [37] Fu XZ, Tan D, Aibaidula G, Wu Q, Chen JC, Chen GQ. Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals[J]. *Metabolic Engineering*, 2014, 23: 78-91
- [38] Xu TT, Yu M, Liu JL, Lin HY, Liang JC, Zhang XH. Role of RpoN from *Labrenzia aggregata* LZB033 (*Rhodobacteraceae*) in formation of flagella and biofilms, motility, and environmental adaptation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(7): e02844-02818
- [39] Jang GI, Hwang CY, Cho BC. *Nitratireductor aquimarinus* sp. nov., isolated from a culture of the diatom *Skeletonema costatum*, and emended description of the genus *Nitratireductor*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(11): 2676-2681
- [40] Bibi F, Jeong JH, Chung EJ, Jeon CO, Chung YR. *Labrenzia suaedae* sp. nov., a marine bacterium isolated from a halophyte, and emended description of the genus *Labrenzia*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(4): 1116-1122
- [41] Tsuge T, Hyakutake M, Mizuno K. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(15): 6231-6240