

# 利用丁酸合成 PHA 高效菌株的筛选及摇瓶发酵特性研究

陈志强<sup>1,2</sup>, 李云蓓<sup>2</sup>, 温沁雪<sup>2</sup>

(1. 城市水资源开发利用(北方)国家工程研究中心, 哈尔滨 150090; 2. 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室, 哈尔滨 150090)

**摘要:**从活性污泥中分离到 1 株能够利用丁酸合成聚羟基脂肪酸酯(PHA)的细菌 WD-3, 对该菌株积累 PHA 的发酵特性进行了研究, 包括 PHA 产量随碳氮比、pH、发酵时间的变化, 并考察了整个发酵过程中碳源、氮源、生物量、pH 值和 PHA 产量之间的关系。结果表明, 当 C/N 为 35, pH 为 7.0 时, WD-3 的 PHA 合成能力最高。在最佳培养条件下, 细胞生长达到稳定期时, 该菌 PHA 产量高达  $3.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 占细胞干重的 45.4%, 且 PHV 所占比例达到三分之一。经 16S rRNA 基因测序分析, 初步确定该菌属于  $\gamma$ -变形菌纲中的肠杆菌属 *Enterobacter*。

**关键词:**聚羟基脂肪酸酯(PHA); 丁酸; 菌株; 碳氮比; 发酵时间

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)03-0828-05

## Isolation of a PHA Producing Strain with Butyric Acid as the Carbon Source and Its Shaking-Flask Fermentation Character

CHEN Zhi-qiang<sup>1,2</sup>, LI Yun-bei<sup>2</sup>, WEN Qin-xue<sup>2</sup>

(1. National Engineering Research Center of Urban Water Resources, Harbin 150090, China; 2. State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

**Abstract:** A bacterial strain WD-3, with high polyhydroxyalkanoates (PHA) yield was isolated from activated sludge. Its fermentation characters including the effects of C:N ratio, pH, fermentation time on the PHA production were also primary studied. The results showed that the optimal C/N ratio and pH were 35 and 7.0, respectively. PHA accumulation increased rapidly during the stable growth stage. The maximum PHA yield was  $3.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the strain accumulated PHA up to 45.4% of its cellular dry weight, and the proportion of PHV occupied one-third of the PHA production. Analysis of its 16S rRNA sequence showed that strain WD-3 belongs to *Enterobacter*.

**Key words:** polyhydroxyalkanoates (PHA); butyric acid; strain; C:N ratio; fermentation time

PHA 是许多原核生物在非平衡生长条件(如 N、P、S、Mg 限制或  $\text{O}_2$  限制)下合成的细胞内碳源与能源储存物<sup>[1,2]</sup>。它不仅具有类似于化学合成塑料的理化性质,而且具有生物可降解性、生物相容性、压电性和光学活性等优良特性,在工业、农业、医药、食品、环保等行业有着广阔的应用前景,是一类新型高分子热塑材料<sup>[3]</sup>。自然界中许多属、种的细菌在胞内都能积累 PHA 颗粒。自 1926 年 Lemoigne<sup>[4]</sup>从巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)中分离得到 PHB 开始,相继在包括光能自养、化能自养和异养菌在内的 65 个属 300 多个种的微生物细胞内发现了 PHB 的存在,其中主要的属有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、产碱杆菌属(*Alcaligenes*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、甲基营养菌属(*Methylotheoph*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、红螺菌属(*Rhodospirillum*)和肠道杆菌的某些菌属。这些菌属的微生物在不同条件

下积累 PHA 产量有一定差异<sup>[5]</sup>。

与传统塑料相比,PHA 的生产成本仍然相对较高。Salehizadeh 等<sup>[6]</sup>的研究表明,PHA 的生产成本中 30% 来源于底物中的碳源。微生物能够利用并且合成 PHA 的碳源有烷烃、脂肪酸和糖类等<sup>[7]</sup>。如果使用回收资源作为底物合成 PHA,其生产成本可以降低 50%<sup>[8]</sup>。

高浓度有机废水作为废弃资源,经过厌氧发酵后,其液相产物主要是由小分子有机酸组成,为了降低 PHA 的生产成本同时资源化利用有机废水厌氧发酵废液中的含碳有机物,本课题组提出将这 2 个

收稿日期: 2009-04-28; 修订日期: 2009-08-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(50708025); 中国博士后科学基金项目(20080430921); 哈尔滨市留学回国人才研究专项资金项目(2007RFLXS013); 城市水资源与水环境国家重点实验室开放课题项目(08UWQA06)

作者简介: 陈志强(1974~),男,博士,副教授,主要研究方向为环境污染控制与资源化, E-mail: czq0521@tom.com

过程相偶联,使微生物能够利用厌氧发酵废液中的小分子有机酸为碳源合成 PHA。

本研究通过尼罗兰平板初筛与气相色谱复筛相结合等手段,成功地从大豆废水处理厂的活性污泥中分离到 1 株能够利用小分子有机酸高产 PHA 的细菌,并对其利用丁酸为碳源合成 PHA 的特性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品

实验用活性污泥取自哈高科大豆废水处理厂二沉池污泥。

1.1.2 培养基

(1)分离培养基 牛肉浸膏 3 g · L<sup>-1</sup>,蛋白胨 10 g · L<sup>-1</sup>,NaCl 5 g · L<sup>-1</sup>,琼脂粉 20 g · L<sup>-1</sup>,尼罗兰染色剂(终浓度 50 μg/mL),pH 7.0。

(2)筛选培养基 种子培养基:蛋白胨 10 g · L<sup>-1</sup>,牛肉膏 5 g · L<sup>-1</sup>,NaCl 10 g · L<sup>-1</sup>,pH 7.0。

发酵培养基:丁酸钠 12 g · L<sup>-1</sup>,硫酸铵 0.5 g · L<sup>-1</sup>、无机元素液(L<sup>-1</sup>) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 8.9 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g,柠檬酸铁铵 60 mg, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 10 mg, 及 1 mL 微量元素液,内含: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.3 g, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.2 g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 30 mg, NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 30 mg, NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 20 mg, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 10 mg。

1.2 实验方法

1.2.1 产 PHA 菌株的筛选

(1)菌株初筛 将稀释至合适梯度的活性污泥样品涂布在分离培养基平板上,30℃培养 24 ~ 48 h 后,在紫外灯下观察,挑选出具有荧光的菌落。

(2)复筛 将初筛获得的菌株在发酵培养基中进行摇瓶培养,30℃培养 60 h,定量检测 PHA 含量,选出 1 ~ 2 株菌,进一步研究其发酵条件。

1.2.2 发酵条件

(1)种子培养 从活化后的斜面接两环菌苔于种子培养基中,30℃、150 r/min摇瓶培养 18 ~ 24 h。

(2)发酵培养 将活化后的种子培养物,8 000 r/min离心 2 min 后,接种到发酵培养基中,250 mL 三角瓶,装液量 60 mL,接种量 5%,30℃、150 r/min摇瓶培养 48 ~ 72 h。

1.3 分析方法

1.3.1 PHA 定性观察及定量分析

PHA 的定性观察利用苏丹黑染色法<sup>[9]</sup>;PHA 定

量分析利用传统气相色谱<sup>[10]</sup>改进后的方法,样品的预处理过程为首先取 4 mL 左右发酵混合液,离心分离后弃去上清液,经过冰箱预冻后放置于真空冷冻干燥机中冷冻干燥,冷冻干燥后的样品,称重后直接加入一定比例的氯仿、甲醇、苯甲酸和硫酸的混合溶液,而后在 105℃条件下进行消解。消解后的样品,加入超纯水、去离子水或者蒸馏水剧烈振荡后低温静置后,取下层有机相进行色谱分析。色谱分析采用 FID 检测器。

1.3.2 其他常规参数分析

细胞干重测定:将离心后弃去上清的样品冷冻干燥,然后在分析天平上称重即可;氮氮测定:采用纳氏试剂分光光度法;挥发酸测定:气相色谱。

2 结果与分析

2.1 产 PHA 菌株的筛选

2.1.1 初筛

在紫外灯下,从尼罗兰平板上挑取有荧光的单菌落,再用苏丹黑染色,以视野中黑色颗粒的多少为筛选标准,初步筛选得到 8 株具有合成 PHA 能力的菌株。

2.1.2 复筛

将初筛获得的菌株进行摇瓶培养,并利用气相色谱测定其中 PHA 的含量,结果见表 1。经过比较后以编号 WD-3 的菌株作为研究对象。实验结果表明 WD-3 与其它几株菌相比生物量较高,且 PHA 的合成能力较强。因此,将这株菌作为出发菌株,对其进行进一步的研究。

表 1 不同菌株生物量及 PHA 含量对比

| Table 1 Accumulated PHA and cell dry weight of different strains |                          |           |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
| 编号                                                               | 菌体干重/g · L <sup>-1</sup> | PHA 干重比/% |
| WD-1                                                             | 2.5                      | 18        |
| WD-3                                                             | 6.25                     | 21        |
| WD-4                                                             | 3.57                     | 11.3      |
| WD-8                                                             | 1.8                      | 11        |
| WD-10                                                            | 1.67                     | 6.5       |
| WD-11                                                            | 2.87                     | 8.9       |

2.2 菌株积累 PHA 的影响因素静态实验

2.2.1 碳源对菌体生长和 PHA 积累的影响

为了考察碳源对 WD-3 细胞生长及 PHA 合成情况的影响,设计碳源的单因素影响实验,硫酸铵的浓度为 1 g · L<sup>-1</sup>,发酵培养时间为 72 h。实验结果如表 2 所示。

从表 2 中可看出,WD-3 在分别以乙酸钠、丙酸钠和丁酸钠为碳源时,菌体生长情况良好,其中以丁

酸钠为碳源时,菌体干重最大达到  $6.66\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,乙酸钠次之. PHA 的合成情况在以丁酸钠为碳源时产量最高,达到细胞干重的 34.4%,乙酸钠为碳源时,产量为 25.2%,碳源的不同,同时还会影响到 PHA 的单体组成,根据表 2 所示,当碳源不同时,WD-3 所合成的 PHB 与 PHV 所占的比例不相同,当以乙酸钠和丁酸钠为碳源时,PHB 的比例大于 PHV,而当以丙酸钠为碳源时,PHV 所占产物的比例大于 PHB,即当碳源为奇数碳,菌体内部合成的  $\text{PHV} > \text{PHB}$ ,碳源为偶数碳时, $\text{PHB} > \text{PHV}$ . 这可能与微生物合成 PHA 的途径的差异性有关.

表 2 碳源对细胞生长和 PHA 合成的影响

Table 2 Effects of carbon sources on PHA composition accumulated by WD-3 of 72h culture

| 碳源  | 浓度<br>/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 菌体干重<br>/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | PHB: PHV | PHA 干重比<br>/% |
|-----|--------------------------------------|----------------------------------------|----------|---------------|
| 乙酸钠 | 20.2                                 | 6.11                                   | 53:47    | 25.2          |
| 丙酸钠 | 18.76                                | 5.76                                   | 35:65    | 21.4          |
| 丁酸钠 | 17.1                                 | 6.66                                   | 77:23    | 34.4          |

2.2.2 碳氮比对菌体生长与 PHA 积累的影响

聚羟基脂肪酸酯( polyhydroxyal-kanoates ,PHA )是原核微生物在碳、氮营养失衡的情况下,作为碳源和能源贮存而合成的一类热塑性聚酯<sup>[11]</sup>,因此发酵底物中碳氮比对菌体 PHA 的合成情况会有显著的影响. 为了确定本研究获得的菌株在不同营养比底物中 PHA 的合成情况,实验设计了不同的碳氮比,初步确定发酵时间为 72 h,碳源为丁酸钠,寻找最佳的底物碳氮比组成. 实验结果如表 3 所示.

表 3 不同碳氮比条件下菌种生长及 PHA 的合成情况

Table 3 PHA yield and the growth of strain WD-3 in the substrate with different carbon and nitrogen ratios

| C/N   | 丁酸钠浓度<br>/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 硫酸铵浓度<br>/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 菌体干重<br>/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | PHA 干重比<br>/% |
|-------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|---------------|
| (摩尔比) |                                         |                                         |                                        |               |
| 35    | 17.01                                   | 1                                       | 6.34                                   | 22.3          |
| 40    | 17.84                                   | 1                                       | 4.00                                   | 14.7          |
| 45    | 18.74                                   | 1                                       | 6.68                                   | 17.6          |

从表 3 可以看出,C/N 为 35 时,PHA 产率最高,达到 22.3%. 在 C/N 为 45 时,菌体生长情况最好,但此时的 PHA 产率并不高. 分析原因可能与不同的碳氮比下,菌体内合成 PHA 的速率也不相同,因此达到 PHA 最大合成量的时间也不相同,C/N 为 35 的条件下,菌体生长达到稳定期所需时间可能比 C/N 为 45 时短,在菌体生长达到稳定期后,相对于

大量的菌体,底物浓度开始成为限制因素时,微生物开始在细胞内部大量合成 PHA. 鉴于以上原因,在高 C/N 时,可考虑延长发酵时间,使底物中碳源和氮源的浓度之比达到 PHA 积累的要求. 这可能在一定程度上有利于菌体合成 PHA.

2.2.3 发酵时间对菌体生长和 PHA 积累情况影响

PHA 的大量积累主要是发生在菌体生长达到稳定期后,在不同的底物浓度下,微生物生长达到稳定期的时间不相同,菌体积累 PHA 的速率也不相同. 因此,考察在 C/N 为 45 条件下,延长菌体发酵时间,每 12 h 取一次样,观察随着发酵时间的延长,菌体内 PHA 合成情况的变化. 实验结果如图 1 所示.

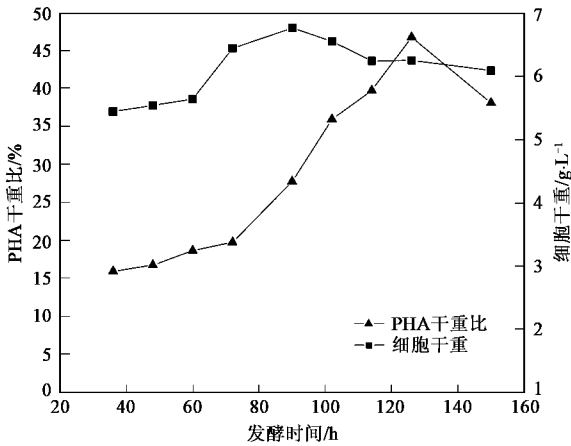


图 1 发酵时间对 WD-3 生长和合成 PHA 的影响  
Fig. 1 Influence of fermentation time on the growth and PHA synthesis of the WD-3

实验结果表明,PHA 的积累与菌体生长呈明显的正相关,即生长协同性,这与其他研究报道相符<sup>[12]</sup>,发酵时间延长有利于 PHA 的合成. 在 0 ~ 50 h,菌体生长处于适应期,细胞量有少量增加,此时 PHA 积累较缓慢;在 50 ~ 100 h,菌体生长处于对数期,细胞菌体干重随着培养时间的延长而明显增加;PHA 合成呈缓慢增长;100 ~ 120 h 期间,菌体生长进入稳定期,细胞生长较为稳定出现下降趋势,PHA 开始在细胞内大量合成,这可能是与在发酵后期底物中碳源与氮源的浓度降低,微生物正常的生长繁殖受到影响,同时发酵后期底物中的碳氮比较高,促使 PHA 大量合成. 120 h 以后,菌体干重呈下降的趋势,并且胞内 PHA 含量的降低较为明显. 这可能是由于 PHA 是细菌细胞内能源和碳源的储存物,在菌体生长的中后期可被降解利用而减少. 该菌株增殖速度较快,在对数增长后期,细胞干重达到 6.62

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  ,PHA 积累量达到  $3.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  .

2.2.4 培养基初始 pH 值对菌体生长及 PHA 积累的影响

根据上述实验结果 ,考察在最佳碳源和最佳氮源浓度下 ,C/N 为 35 的情况下 ,发酵培养基不同初始 pH 值对菌体生长和产物形成的影响 ,发酵时间为 72 h ,结果如图 2 所示.

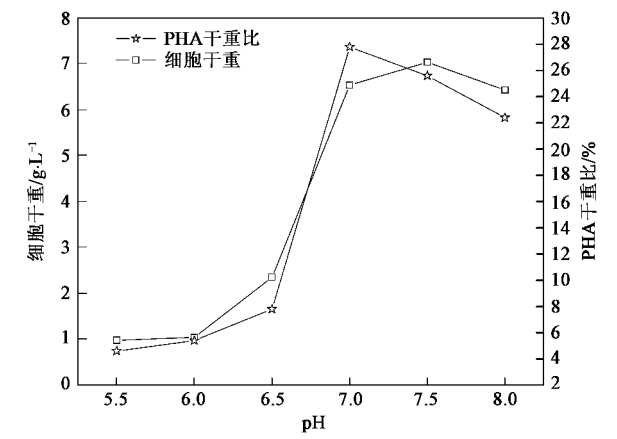


图2 pH 值对 WD-3 生长及 PHA 合成的影响  
Fig.2 Influence of pH on the growth and PHA synthesis of the WD-3

从图 2 可知 ,pH 值对 WD-3 的影响主要是体现在菌体的正常生长.  $\text{pH} < 7.0$  和  $\text{pH} > 8.0$  的环境不利于 WD-3 的生长. 细胞干重以及 PHA 的干重比都处于较低的水平 ;此外 ,PHA 浓度和细胞干重随 pH 的增加逐渐增大 ,pH 在  $7.0 \sim 7.2$  之间时 ,细胞干重和 PHA 干重比达到最大值 ,分别为  $7.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $1.96 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ;从 pH 7.5 开始 ,PHA 干重比开始下降 ,因此 pH  $7.0 \sim 7.2$  为 WD-3 合成 PHA 的最佳初始 pH 值.

2.3 菌株 WD-3 积累 PHA 的动态研究

利用动态实验 ,对菌种 WD-3 在发酵过程中 PHA 的积累与碳源、氮源、生物量及 pH 值之间的关系进行了探讨.

实验所用发酵条件为 :利用 1 L 三角瓶 ,装液量为 300 mL 接种量 5% ,C/N 为 35 ,碳源为丁酸钠 ,氮源为硫酸铵 ,温度  $30^\circ\text{C}$  ,初始 pH 为 7.0. 实验结果如图 3 所示.

由实验结果看出 ,pH 值在整个发酵过程当中呈稳定上升趋势. 在发酵前期  $0 \sim 70 \text{ h}$  ,挥发酸即碳源大量消耗 ,氮源也明显下降 ,此阶段细胞干重增长较快 ,菌体处于对数增长期 ,而此时 PHA 的增长较缓慢 ,这可能是由于该阶段的碳源以及氮源主要被用

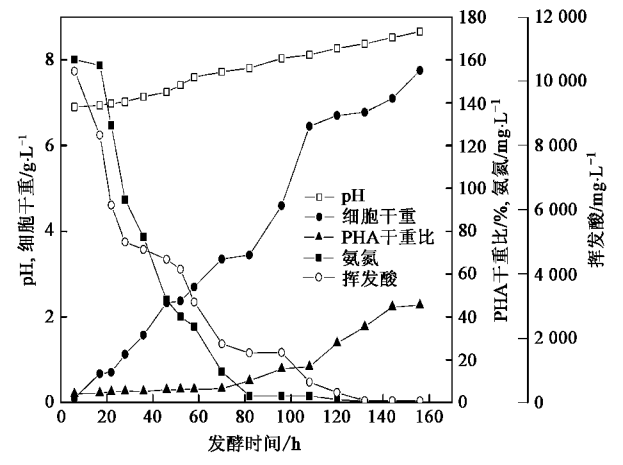


图3 菌株积累 PHA 的动态研究  
Fig.3 Dynamic research of accumulating PHA

于细胞自身的生长 ,为后期 PHA 的积累做准备. 在  $70 \sim 140 \text{ h}$  期间 ,硫酸铵基本上耗尽 ,VFAs 有少量剩余 ,整个体系中碳源相对于氮源来说过剩 ,较高的碳氮比促使 PHA 大量合成 ,达到细胞干重 45.4% .其中 PHB: PHV 为 2:1 ,可见 ,WD-3 能够利用单一碳源同时合成 PHB 和 PHV 这 2 种单体 ,而在对真养产碱杆菌的研究中发现 ,真养产碱杆菌以奇数碳源为底物时时合成 PHV ,偶数碳源为底物时合成 PHB<sup>[13]</sup> .与 PHV 相比 ,PHB 的性能较脆 ,不利于加工生产 ,而 PHBV 则具有良好的可塑性<sup>[14]</sup> ,对于日后应用以及 PHA 的改性具有重大的意义. 在后续的实验 中 ,结合工程应用的实际要求 ,笔者将通过研究优化发酵方式及发酵条件 ,尽可能缩短发酵时间.

研究中还观察到在发酵培养的过程当中 ,在培养至 48 h 后 ,发酵液黏度明显增加 ,呈黏稠状态 ,颜色也发生改变 ,由初期的无色变为粉红色. 造成这种变化的原因目前尚不清楚.

2.4 菌种的初步鉴定

研究以提取的 WD-3 菌株的总 DNA 为模板 ,利用 16S rDNA 序列的特异扩增引物进行 PCR ,将获得的 PCR 产物送上海生工生物技术公司进行测序. 序列在 GenBank 进行注册 ,获得了序列号 :FJ440555. 利用 MEGA 4.0 软件进行数据分析建立了基于 16S rDNA 基因的系统进化树. 进而 ,以 Biolog 微生物分类鉴定系统进行了鉴定. 从分析结果可见 ,该菌株与 *Enterobacter* 的相似性最高 ,达到 98% . 所以初步鉴定此菌属于肠杆菌属 ,暂时命名其为 *Enterobacter* WD-3. 所构建的 16S rDNA 基因进化树见图 4.

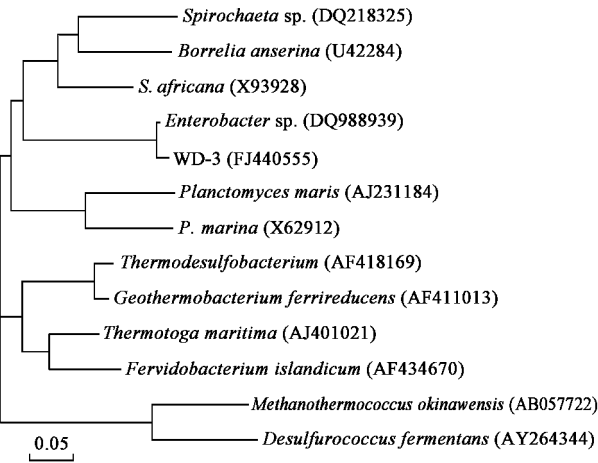


图4 菌株WD-3的16S rDNA进化树

Fig.4 16S rDNA phylogenetic tree of the strain WD-3

3 结论

(1)本研究通过对大豆废水污泥样品进行筛选,获得了1株能够利用丁酸合成PHA的菌株.在实验条件下,细胞干重达到6.62 g/L,PHA合成量占细胞干重45.4%,积累量达到3.01 g/L.

(2)该菌株能够利用单一碳源同时合成PHB和PHV聚合物,PHV所占比例达到三分之一.

(3)经过初筛及复筛获得的菌株经初步鉴定为*Enterobacter*属内微生物,暂时命名为*Enterobacter* WD-3.

参考文献：

[ 1 ] Oeding V ,Schiegel H G. Beta-ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulate on of Poly-beta-hydroxybutyrate metabolism[ J ]. Biochem ,1973 ,134 239-248.

[ 2 ] Senior P J , Dawes E A. The regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* [ J ].

Biochem ,1973 ,134 225-238.

[ 3 ] 赵良启 ,田杰生 吴柏和 ,等. 自养黄杆菌合成羟基丁酸和羟基戊酸共聚体的发酵研究[ J ]. 微生物学报 ,1996 ,36( 5 ) : 351-359.

[ 4 ] Lemoigne M. Products of dehydration and of polymerization of hydroxybutyric acid[ J ]. Bull Soc Chem Biol ,1926 ,8 778-782.

[ 5 ] 刘芝兰 ,张世炜 ,卓仁禧. 聚-β-羟基丁酸一种可生物降解的热塑性材料[ J ]. 生物科学动态 ,1989 ,10( 6 ) :11-17.

[ 6 ] Salehizadeh H , Van Loosdrecht M C M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture : recent trends and biotechnological importance[ J ]. Biotechnol Adv ,2004 ,22 ( 3 ) : 261-279.

[ 7 ] Steinbüchel A. Polyhydroxyalkanoic acids[ A ]. In : Byrom D ( ed ). Biomaterials :novel materials from biological sources[ C ]. New York :Stockton Press ,1991. 123-213.

[ 8 ] Serafim L S , Lemos P C , Oliveira R , *et al.* Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions[ J ]. Biotechnol Bioeng , 2004 ,87( 2 ) :145-160.

[ 9 ] Burdon K L. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried ,fixed slide preparations[ J ]. Bacteriol ,1946 ,52 : 665-678.

[ 10 ] 姚樱. 影响聚糖菌生长和代谢的关键因素及聚糖菌合成聚羟基烷酸的初步研究[ D ]. 上海 :同济大学 ,2007.

[ 11 ] 张帅 ,辛嘉英 ,王冬梅. 生物可降解塑料聚 β-羟基丁酸酯的研究进展[ J ]. 科技资讯 2008 ( 3 ) :7.

[ 12 ] Purushothanman M ,Anderson R K L. Industrial by products as cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates biodegradable plastics [ J ]. Bioproc Biosyst Eng 2001 ,24 :131-136.

[ 13 ] Chanprateep S ,Kulpreecha S. Production and characterization of biodegradable terpolymer poly ( 3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate-co-4-Hydroxybutyrate ) by *Alcaligenes* sp. A-04 [ J ]. J Biosci Bioeng ,2006 ,101( 1 ) 51-56.

[ 14 ] 宋水山 ,王文新 ,冯文亮. 恶臭假单胞菌由辛酸积累PHA的初步研究[ J ]. 河北省科学院学报 ,2001 ,18( 4 ) 241-244.