

摘要

南通嗜铜菌 X1^T (*Cupriavidus nantongensis* X1^T) 是嗜铜菌属的一株典型的菌株。研究表明, 菌株 X1^T 可以降解 8 种有机磷农药 (OPs)。对嗜铜菌属的基因遗传操作, 传统的方法比较费时费力, 难以处理。第三代基因编辑方法 CRISPR/Cas9 系统, 可以在生物体的全基因组上进行基因的操纵。该遗传工具的成功使用, 在很多原核和真核生物中都有报道。作为基因编辑工具, CRISPR/Cas9 系统具有很多优点, 如设计和操作简单、高效、准确、使用广泛等。

本研究中, 我们将 CRISPR/Cas9 系统与来自噬菌体的增强同源重组效率的 Red 重组系统结合起来, 在南通嗜铜菌 X1^T 体内进行无痕基因编辑。我们构建了一对针对南通嗜铜菌 X1^T 的基因组有效遗传操作的双质粒系统, 分别将两个质粒命名为 pACasN 和 pDCRH。其中, pACasN 质粒含有 Cas9 效应蛋白表达和 Red 重组系统的序列。pDCRH 质粒含有针对编码 X1^T 菌有机磷水解酶 OpdB 的降解基因 *opdB* 的双引导 RNA, 即 sgRNA, 以及促进同源重组发生的 *opdB* 目的基因的上下游同源臂片段。在南通嗜铜菌 X1^T 中, 两个质粒先后被成功转入菌体。经诱导后, 同源重组发生, *opdB* 基因被成功敲除。经计算, 敲除发生率大于 30%。突变菌 X1^T- $\Delta opdB$ 的生物降解实验表明, *opdB* 基因是 X1^T 菌对有机磷农药的降解代谢的一个关键基因。这是我们首次在嗜铜菌属上采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术进行基因敲除的成功的应用。本研究有利于进一步促进我们对南通嗜铜菌 X1^T 有机磷农药降解的发生过程的了解。

本研究主要结果如下:

(1) 构建了两个用于南通嗜铜菌 X1^T 对有机磷水解酶基因 *opdB* 敲除的质粒。分别命名为 pACasN 和 pDCRH。其中, pACasN 质粒中含有 Cas9 基因和 Lambda Red 重组系统。pDCRH 质粒中含有双 sgRNA 和同源重组修复模板。

(2) 成功将 pACasN 质粒和 pDCRH 质粒首次转入南通嗜铜菌 X1^T, 并稳定遗传。在稳定生长期计算质粒转化效率。其中, pDCRH 质粒转化菌株 X1^T 的效率为 86.1 ± 21.3 CFU/mg; pDCRH 质粒转化菌株 X1^T- $\Delta opdB$ 的效率为 7.4 ± 1.9 CFU/mg。经过两个质粒连续的转入菌株 X1^T, 结果表明, pACasN 的转化效率是第二个质粒 pDCRH 转化效率的 11.6 倍。

(3) 经试剂诱导表达 Cas9 蛋白和 Lambda Red 重组系统, 在平板上筛选到了 *opdB* 基因缺失的 X1^T- $\Delta opdB$ 菌, 突变率大于 30%。

(4) 对含双质粒的 X1^T- $\Delta opdB$ 菌进行质粒消除实现无痕基因编辑。经划线计算, pACasN 质粒的消除效率为 13/16。pDCRH 质粒的消除效率为 4/16。

(5) X1^T- $\Delta opdB$ 菌的生物降解实验表明, *opdB* 基因是 X1^T 菌体内有机磷农药降解

代谢的关键基因。

关键词：南通嗜铜菌 X1^T；CRISPR/Cas9；有机磷农药降解基因 *opdB*；双质粒系统；基因敲除

ABSTRACT

Cupriavidus nantongensis X1^T is a type of strain of the genus *Cupriavidus*. Studies have shown that strain X1^T can degrade eight organophosphorus pesticides (OPs). Conventional methods of genetic manipulation of the genus *Cupriavidus* are relatively time-consuming and difficult to handle. The gene editing method of third generation, CRISPR/Cas9 system, allows the manipulation of the whole genome of organisms. The successful uses of this genetic tool have been reported in many prokaryotes and eukaryotes. CRISPR/Cas9-based gene editing system has many advantages, such as simplicity of design and operation, high efficiency, accuracy, and widespread use. In this study, we combined the CRISPR/Cas9 system with the Red recombination system from lambda phage that could improve homologous recombination efficiency for seamless genetic editing in *Cupriavidus nantongensis* X1^T. We constructed the two-plasmid system for efficient genetic manipulation of the genome of *Cupriavidus nantongensis* X1^T, which were named pACasN and pDCRH, respectively. In addition, the pACasN plasmid contained the sequences of Cas9 nuclease and Red recombinase. The pDCRH plasmid contained the dual-single guide RNA (sgRNA) of the target gene of *opdB* encoding organophosphorus hydrolase (OpdB) and the fragments of the upstream and downstream homologous arms of *opdB* that promote the occurrence of homologous recombination in the X1^T strain. For gene editing, two plasmids were transferred to the X1^T strain successively. After induction, homologous recombination occurred and the *opdB* gene was knocked out successfully. The incidence of homologous recombination was calculated over 30%. Biodegradation experiments of the mutant strain of X1^T- Δ *opdB* showed that the *opdB* gene is a key gene responsible for the catabolism of organophosphorus insecticides. This study is the first successful application of the CRISPR/Cas9 system for gene targeting in the genus *Cupriavidus*. It furthered our understanding of the process of degradation of organophosphorus insecticides in the X1^T strain.

The main results of this study are as follows. Firstly, two plasmids were constructed for knocking out the organophosphorus insecticides degradation gene *opdB* in *Cupriavidus nantongensis* X1^T. They were named pACasN and pDCRH, respectively. The pACasN plasmid contained cas9 gene and Lambda Red recombination system. The pDCRH plasmid contained dual sgRNA and homologous recombination repair templates. Secondly, the plasmids of pACasN and pDCRH were successfully transferred into *Cupriavidus*

nantongensis X1^T for the first time. The two plasmids were stably inherited. The transformation efficiency of two plasmids was calculated at the stable growth period. The transformation efficiency was 86.1 ± 21.3 CFU/mg for the pACasN plasmid transferred into the X1^T strain. The transformation efficiency was 7.4 ± 1.9 CFU/mg for the pDCRH plasmid transferred into the X1^T- Δ *opdB* strain. After two successive transfers of the plasmids into the X1^T strain, the results showed that the transformation efficiency of the pACasN plasmid was 11.6 times higher than the other pDCRH plasmid. Thirdly, the mutant strains of X1^T- Δ *opdB* were screened on LB plates when reagent induction was performed to express the proteins of Cas9 and Lambda Red recombinant system. The editing efficiency of the X1^T strain was calculated over 30%. Fourthly, plasmid curing was performed on the X1^T- Δ *opdB* strain harboring two plasmids to achieve seamLess genetic editing. Calculated by scribing on the antibiotic resistance plates, the pACasN plasmid was cured with an efficiency of 13/16 and the pDCRH plasmid was cured with an efficiency of 4/16. Finally, the biodegradation experiments of the X1^T- Δ *opdB* strain showed that the *opdB* gene is a key gene for the catabolism of organophosphorus insecticides in the X1^T strain.

KEYWORDS: *Cupriavidus nantongensis* X1^T; CRISPR/Cas9; organophosphorus insecticides degradation gene *opdB*; the two-plasmid system; gene knockout

目 录

第一章 绪论	1
1.1 微生物对农药降解的研究现状	1
1.2 嗜铜菌属研究现状	2
1.2.1 嗜铜菌的生物学特性	2
1.2.2 嗜铜菌属的应用研究	2
1.2.3 南通嗜铜菌 X1 ^T 对有机磷农药降解的研究进展	4
1.3 基因编辑方法	5
1.3.1 基因编辑技术的发展	5
1.3.2 CRISPR/Cas9 基因编辑的原理	7
1.3.3 CRISPR/Cas9 的应用研究进展	9
1.3.4 Lambda Red 重组系统的研究进展	11
1.3.5 SacB 基因促进质粒消除的研究进展	11
1.3.6 嗜铜菌属的基因编辑方法	13
1.4 课题研究背景和意义及主要内容	13
1.5 课题研究思路和技术路线	14
第二章 材料与方法	17
2.1 实验材料与方法	17
2.1.1 实验主要菌株	17
2.1.2 实验仪器	17
2.1.3 实验试剂及材料	18
2.1.4 微生物培养基的配制	19
2.1.5 有机磷农药工作液的配制	20
2.2 X1 ^T 菌全基因组 DNA 提取	20
2.3 CRISPR/Cas9 对 X1 ^T 菌的基因编辑	21
2.3.1 X1 ^T 菌基因编辑双载体构建	21
2.3.2 sgRNA 的设计与合成	24
2.3.3 X1 ^T 菌感受态细胞的制备	25
2.3.4 双质粒转化	26
2.3.5 诱导表达突变系统	26
2.3.6 双质粒消除	26
2.4 有机磷农药的降解	27

2.5 X1 ^T 菌 <i>opdB</i> 基因生物信息学分析	27
第三章 结果分析	28
3.1 X1 ^T 菌全基因组提取与目的基因上下游同源臂扩增	28
3.1.1 X1 ^T 菌全基因组提取	28
3.1.2 目的基因上下游同源臂的扩增	28
3.2 sgRNA 的设计及双质粒系统的构建	29
3.2.1 sgRNA 的设计及脱靶性预测	29
3.2.2 双质粒系统的构建	30
3.3 菌株 X1 ^T -pACasN 和菌株 X1 ^T -pACasN-pDCRH 的构建	31
3.3.1 pACasN 质粒转入 X1 ^T 菌构建菌株 X1 ^T -pACasN.....	31
3.3.2 pDCRH 质粒转入 X1 ^T 菌构建菌株 X1 ^T -pACasN-pDCRH.....	32
3.4 双质粒转化效率	33
3.5 基因编辑效率	35
3.6 双质粒消除效率	36
3.7 X1 ^T 菌有机磷农药降解基因 <i>opdB</i> 的敲除验证与降解能力分析	38
3.7.1 有机磷农药降解基因 <i>opdB</i> 的敲除验证	38
3.7.2 有机磷农药的降解代谢分析	40
3.8 X1 ^T 菌 <i>opdB</i> 基因编码的 OpdB 有机磷水解酶生物信息学分析.....	40
3.8.1 OpdB 有机磷水解酶一级结构分析.....	40
3.8.2 OpdB 有机磷水解酶二级结构分析.....	41
3.8.3 OpdB 有机磷水解酶三级结构分析.....	42
第四章 讨论	44
第五章 结论	47
参考文献	48
作者简介	58

插图清单

图 1-1	CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建双质粒系统敲除 X1 ^T 菌 <i>opdB</i> 基因	15
图 1-2	双质粒基因敲除实验技术路线	16
图 3-1	X1 ^T 菌全基因组 DNA 的提取 1%琼脂糖凝胶电泳	28
图 3-2	<i>opdB</i> 基因上游 600 bp 同源臂 PCR 图	29
图 3-3	<i>opdB</i> 基因下游 600 bp 同源臂 PCR 图	29
图 3-4	pACasN 质粒组成图谱	30
图 3-5	pDCRH 质粒组成图谱	31
图 3-6	pACasN 质粒电转化 X1 ^T 菌的 1%琼脂糖凝胶电泳检测 <i>cas9</i> 基因	32
图 3-7	pDCRH 质粒电转入 X1 ^T - Δ <i>opdB</i> 菌的 1%琼脂糖凝胶电泳检测 <i>Neo</i> 基因	33
图 3-8	双质粒电先后转化 X1 ^T 感受态细胞的恢复生长情况	34
图 3-9	双质粒转化 X1 ^T 菌在生长稳定期的菌落数	35
图 3-10	L-阿拉伯糖诱导的含双质粒的 X1 ^T 菌 <i>opdB</i> 基因的菌液 PCR	36
图 3-11	6% w/v 蔗糖平板上菌株 X1 ^T - Δ <i>opdB</i> 的生长情况	36
图 3-12	挑选的突变菌 X1 ^T - Δ <i>opdB</i> 在含四环素的琼脂平板上划线的生长情况	37
图 3-13	挑选的突变菌 X1 ^T - Δ <i>opdB</i> 在含新霉素的琼脂平板上的生长情况	38
图 3-14	X1 ^T 菌 <i>opdB</i> 基因敲除的菌液 PCR 验证	39
图 3-15	突变型 X1 ^T 菌的 Sanger 测序图谱	39
图 3-16	ProtScale analysis: OpdB 蛋白质疏水性分析	41
图 3-17	Smart analysis: OpdB 蛋白质结构域分析	41
图 3-18	PSI-PRED analysis: OpdB 蛋白质二级结构分析	42
图 3-19	PDB analysis: OpdB 蛋白质三级结构分析	42

附表清单

表 2-1	实验所需的仪器与设备	17
表 2-2	实验所需的生化试剂与材料	18
表 2-3	实验所用到的菌株与质粒	22
表 2-4	实验所需的主要引物	23
表 2-5	sgRNAs 序列和碱基配对位置	23
表 3-1	20 mg/L 的 8 种有机磷农药经 X1 ^T 菌与 X1 ^T - Δ opdB 24 h 反应的残留量	40

第一章 绪论

1.1 微生物对农药降解的研究现状

化学农药的广泛使用，残留物在环境中的存在已造成严重的污染问题，可影响动物健康。微生物可用于农药污染的生物修复，具有经济、有效实用、可持续性的特点。例如，Akshita Mehta 等人从农业土壤样本中分离马拉硫磷和毒死蜱降解菌，通过进一步筛选对两种有机磷农药的降解效率，确定了最有效的进一步研究的三种分离菌。在三种分离株中，PMD-15 对 71.3%的毒死蜱和 85%的马拉硫磷被降解，被鉴定为阿萨姆考克氏菌 (*Kocuria assamensis*)^[1]。Abd Elaziz S. A. Ishag 等人从苏丹地区农药污染的土壤中分离出三种菌株，进行了农药生物降解微生物及降解速率的表征，分别为沙福芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌沙漠亚种、蜡样芽孢杆菌。其农药降解遵循双阶段模型，三种菌株均能降解毒死蜱、马拉硫磷和乐果，在开始时农药降解非常明显，且随着潜伏期的延长而增加，蜡样芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌沙漠亚种对毒死蜱、马拉硫磷和乐果的毒性从第 14、7 和 3 天开始降低，然而，在沙福芽孢杆菌中，对毒死蜱和马拉硫磷的降解速率从第 3 天开始下降，对乐果的降解速率从第 14 天开始下降^[2]。有机磷农药(OPs)也是食品中常见的残留污染物，Shaofeng Yuan 等人研究了 10 种乳酸菌对 4 种有机磷农药的降解能力，结果表明，一些乳酸菌可以在有机磷农药存在的环境中存活，并且可短时间内进行显著降解。其中，植物乳杆菌亚种 *L. plantarum* 20261 展现出最高的降解能力^[3]。该菌株产生的磷酸酶对 OPs 的降解起关键作用，且在体外可迅速降解 OPs。模拟胃肠液耐受性实验显示，乳酸菌在体内对农药氧化损伤具有潜在的保护作用。Phatcharida Inthama 等人从百草枯处理过的农业土壤中分离出一株百草枯降解菌，并鉴定命名为阿氏芽孢杆菌 MoB09，其可在无氮介质中生长，最适生长和降解条件为 30℃，pH 为 7 的环境，研究发现该菌具有促进植物生长的特性，在百草枯污染的土壤的豇豆生长实验中，不仅可对百草枯农药残留进行修复，而且与对照组相比，观察到了更长的根和茎，另外在干旱胁迫条件下也能促进豇豆的生长^[4]。许多降解农药的微生物已被分离鉴定，微生物对环境中农药残留的修复发挥着重要的作用，部分微生物还能提高作物生产力，这对解决化学农药造成的土壤污染，减少人类健康和环境风险具有重要意义。

1.2 嗜铜菌属研究现状

1.2.1 嗜铜菌的生物学特性

嗜铜菌属是一类革兰氏阴性菌，杆状，带鞭毛运动的，属化能异养或化能无机营养型，氧化代谢^[5]。它对重金属铜具有高度的抗性，并且受到其刺激生长^[6]。在过去的几十年，嗜铜菌属类细菌在各种生存环境下陆续被发现。例如，N. S. MAKKAR 等人，在土壤中发现嗜铜菌新种 N-1，作为非捕食者，可依靠简单的营养条件来存活。然而，当土壤中的有效营养成分下降时，作为捕食者，与分歧杆菌、固氮菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、链霉菌等革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌参与竞争性生长^[7]。Junwei Yan 等人，在活性污泥中分离的一株嗜铜菌 T2，可以进行生物处理废水^[8]。Pieter Monsieurs 等人，在航空空间站的饮用水系统和冷凝水再生系统，以及航天维修设备的空气颗粒等缺乏营养的环境中，分离出三种嗜铜菌^[9]。Claire Amadou 等人，在大豆根部发现台湾嗜铜菌 LMG19424 作为根瘤菌与豆科进行共生固氮，促进了植物的生长^[10]。在临床上，嗜铜菌 *gilardii* 引起机会性感染通常被认为是低致病性的^[11]。然而，Kobayashi 等经临床采集无免疫缺陷患者伤口样本，发现嗜铜菌 *gilardii* 对免疫功能低下或无免疫疾病也有致病性的可能^[12]。另外在牙科临床研究表明，氟斑牙患者的唾液微生物群多样性中存在嗜铜菌 *pauculus*，与普通健康人群的相比，丰度上存在上升趋势^[13]。Jayashree Ray 等人，在野外地下水中，分离鉴定出一株巴西嗜铜菌 4G11，与巴西嗜铜菌 DSM 序列同源性在 99%以上^[14]。Masaki Okunaga 等人，在洗澡水的微生物丰度中发现了嗜铜菌属的存在，并表明嗜铜菌属与引起呼吸道疾病的军团菌具有高度相关性^[15]。

1.2.2 嗜铜菌属的应用研究

嗜铜菌属在生态环境中应用十分广泛，具有很多优点。例如，嗜铜菌的存在可以用作重金属污染的潜在指示信号^[16]。嗜铜菌在生态环境保护中也具有很多功能。研究表明，它可以降解芳香族化合物及反硝化废水处理。Junwei Yan 等人从活性污泥中分离出一株嗜铜菌 *oxalaticus* T2，在琥珀酸钠为碳源，C/N 比为 10，30 °C，150 r/min 和 pH 为中性的单因素实验下，T2 菌的反硝化条件最佳，T2 菌可以在 12 小时内去除 NO₃⁻-N，并可以同时去除 69 mg/L 的 NO₃⁻-N 和 1000 mg/L 的苯酚，其中，苯酚是通过邻位途径降解的，硝酸盐是通过硝酸盐转化的异化硝酸还原为铵的途径去除的^[8]。另外，也有多种嗜铜菌菌株报道，可以降解苯酚类芳烃污染物。例如，Jun Min 等人研究，嗜铜菌 sp. CNP-8 具有高效的 2, 4, 6-三溴苯酚降解活性，并在降解过程中发现，hnp 系列基因转录上调，双组分 FAD 依赖性单加氧酶 HnpAB 通过连续的氧化和水解脱溴反应转化 2, 4, 6-三溴苯酚，生成 6-溴-1,2,4-苯三醇作为解环的底物，经检

素, *hnpA* 同源物分布在几种细菌属, 但是完整的 *hnpABC* 簇只在嗜铜菌中检索到, 并且在基因组中属于严格保守的, 这增强了我们对嗜铜菌属在卤代酚污染物的适应与解毒的理解^[17]。Jyoti Tiwari 等人研究, 嗜铜菌 a3 能利用 2-氯-4-硝基苯酚作为唯一碳氮源, 相对于 pH 为 7, 在 pH 为 8 时, 菌株具有较高的降解率和生长趋势, 并在浓度为 0.3 mmol/L 以下时可作为接种量 OD₆₀₀ 为 0.005 的嗜铜菌 a3 的生长底物, 另外有机养分的添加可以促进菌的生长和降解, 降解 2-氯-4-硝基苯酚的过程伴随着亚硝酸盐离子的释放, 生成 2-氯对苯二酚中间体, 2-氯-4-硝基苯酚的存在下, 菌株 a3 的生长会改变了膜通透性和诱导信号转导蛋白^[18]。Marie-Katherin Zühlke 等人发现, 可降解联苯的嗜铜菌 *basilensis* SBUG 290 使用各种芳香化合物为碳源, 具有将与联苯结构相关的激素活性物质塑料聚合物成分之一的双酚 A 转化的能力, 经过环裂变途径, 五种产物均显示出雌性激素降低^[19]。对于农作物生产方面造成的化学农药污染, 嗜铜菌具有对农药进行保留吸附与降解行为。例如, Thomas Z. Lerch 等人研究了生物膜形成对嗜铜菌 *necator* JMP134 代谢 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)的影响, 嗜铜菌 *necator* JMP134 能以 2, 4-D 为碳源, 沙粒为固相, 形成生物膜, 且仅需一天孵育, 细菌和外聚合物即可在沙粒表明被观察到, 在 2, 4-D 的降解实验中, 含沙样品的浓度始终低于对照组, 表明嗜铜菌 *necator* JMP134 具有对 2, 4-D 矿化和保留的能力, 其胞外多糖对 2,4d 的积累可能是促使嗜铜菌 *necator* JMP134 利用该分子的一种活性机制^[20]。Vartika Srivastava 等人在高浓度的六氯环己烷暴露的土壤中, 林丹 (γ -六氯环己烷), 分离出一株马来西亚嗜铜菌, 在 100 mg/L 浓度的六氯环己烷浓度下, 对四种六氯环己烷异构体包括林丹 (γ -六氯环己烷), 具有 80%以上的降解率, 因此该马来西亚嗜铜菌可以作为农药林丹污染地的修复^[21]。嗜铜菌也能在废水抗生素共存条件下进行废水硝酸盐的去除和抗生素的降解。Shizong Wang 等人在反硝化生物反应器中分离出能降广谱抗菌剂三氯生的稳定反硝化菌群, 其中就包括嗜铜菌, 三氯生在好氧和缺氧条件下均对菌群反硝化产生副作用的影响。但缺氧条件下微生物混合培养物反硝化能完全去除硝酸盐, 而三氯生只能在有氧的条件下才有脱氯作用^[22]。嗜铜菌也对真菌毒素及其副产物具有生物降解解毒的作用。例如, Mohammed AL-Nussairawi 等人研究了多种嗜铜菌对五种主要的真菌毒素的降解和解毒能力, 其中 7 株嗜铜菌可以降解赭曲霉毒素 A (OTA), 4 株嗜铜菌能降解黄曲霉毒素 B1 (AFB1), 4 株嗜铜菌能降解玉米赤霉烯酮 (ZON), 3 株嗜铜菌可以降解 T-2 毒素 (T-2), 没有嗜铜菌可以降解脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON), 两株嗜铜菌菌株降解两种真菌毒素, 即 *metalliduriens* CCUG -13724^T (AFB1, T-2)和嗜铜菌 *oxalaticus* (AFB1, ZON); 两株嗜铜菌菌株可降解三种真菌毒素 (ZON, OTA, T-2), 即 *pinatubonensis* DSM -19553^T 和 *basilensis*, 而嗜铜菌 *numazuensis* DSM -15562^T 降解四种真菌毒素 (AFB1, ZON, OTA, T-2)^[23]。

在工业化生产上, 嗜铜菌属可以作为再生资源, 用于多种物质的生产。Hannes 等

人研究表明,嗜铜菌 *necator* 作为一种氢氧化细菌,可以利用氢气和二氧化碳形成的合气,分泌生产海藻糖,形成可再生未来生物经济的一部分^[24]。Avinash D. Deshmukh 等人通过超声波辅助,促进了嗜铜菌 *necator* 生产环境友好型的可降解的生物聚合物聚羟基丁酸酯 PHB^[25]。另外,据 Jeongvin An 研究,嗜铜菌 *cauae* PHS1 可以利用一系列底物,通过发酵技术,在嗜热条件下,可以作为一种前途光明的生物塑料的聚羟基丁酸酯 PHB 的生产者^[26]。Paolo Costa 研究表明,食品加工废物可以刺激嗜铜菌 *necator* DSM 545 生长和积累聚羟基脂肪酸的能力,并且红苹果和甜瓜的残渣被发现是最适合生产聚羟基脂肪酸聚合物的原料,这些新型底物引起了未来对 *C. necator* 的工艺优化与放大的研究^[27]。Vickie Modica 等人指出, *Cupriavidus necator* 是一种代谢多功能的生物,它具有使用空气中发现的元素来生产可供食用的营养丰富的产品的潜力。富含蛋白质的粉末的生产就来自于缺乏聚羟基丁酸酯的 *Cupriavidus necator* 细菌的全细胞生物量的热处理^[28]。

嗜铜菌属还能在金属矿化区等极端条件下活泼生存,通过自身解毒途径耐重金属,并利用金属及其化合物作为营养来源,还原固定银、铂、金等金属,参与贵金属的生物地球化学循环和地质矿床的形成^[29-31]。在农业生产方面,研究表明,台湾嗜铜菌在含镉的土壤中,促进了水稻的生长,减少了水稻的镉从根到地上的易位,这为重金属污染的土壤中粮食作物生产的有效利用提供了一种思路与见解^[32]。Aniko Konya 等人发现,在重金属 Cd 污染的环境下,微生物群落的丰富度降低,一些微生物菌属如嗜铜菌属,变得更具有生长优势。并在一些类型和浓度的重金属污染下,形成了高效的苯和甲苯的降解聚合体^[33]。

1.2.3 南通嗜铜菌 X1^T 对有机磷农药降解的研究进展

南通嗜铜菌 *Cupriavidus nantongensis* X1^T 是一株有机磷农药降解菌,是嗜铜菌属下一种典型的菌株,具有两条环状染色体和一条环状质粒序列^[34]。鉴定出四个 CRISPRs 相关的基因,可用于基因编辑。GenBank 的全基因组信息登录号为 CP014844, CP014845 和 CP014846^[34]。经基因比对和注释,质粒序列中发现具有一个有机磷水解酶的亚类基因 (*opdB*),经克隆表达并验证其功能,含 *opdB* 基因的阳性克隆细胞可以将毒死蜱降解为 TCP,并证明了 *opdB* 编码的有机磷水解酶主要断裂为毒死蜱的磷氧键,其次为磷硫键,这种降解机制与对其他 8 种农药,如三唑磷,对硫磷,水胺硫磷,丙溴磷,马拉硫磷,硫线磷,杀扑磷,乐果等母体结构的破坏机制相同^[35]。

X1^T 菌具有降解底物谱广,降解效率高等优点。Shi 等人研究了南通嗜铜菌 X1^T 对 8 种有机磷农药 (OP) 的母体化合物的降解特性,并对 OPs 水解酶基因进行了克隆生物信息学分析,测定了粗酶液与菌体酶活进行了比较^[36]。其结果显示, X1^T 菌可以在 48 h 对 6 种有机磷农药如毒死蜱、甲基对硫磷、对硫磷、杀螟硫磷、三唑磷、辛

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/116220240002010143>