

嗜盐菌耐盐机制相关基因的研究进展

王伟伟 唐鸿志* 许平

(上海交通大学 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要:嗜盐微生物能够在高盐环境中生存,其耐盐机制一直是微生物学家研究的热点。目前嗜盐微生物耐盐机制的研究主要集中在细胞吸 K^+ 排 Na^+ 作用、胞内积累小分子相容性溶质及嗜盐酶的氨基酸组成特性三个方面。文章从基因水平综述了嗜盐菌的耐盐机制,并对其在高盐废水处理上的应用进行讨论与展望。

关键词:嗜盐菌,耐盐基因,高盐废水

Salt-tolerance related genes in halophilic bacteria and archaea

WANG Wei-Wei TANG Hong-Zhi* XU Ping

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Halophilic microorganisms can thrive at hypersaline environments, and the mechanisms of salt-tolerance in halophilic microorganisms focused on the following three points: mechanisms of potassium-absorbing and sodium exclusion; accumulation of intracellular compatible solutes; the amino acid composition of halophilic enzyme. This paper reviewed the molecular mechanisms of salt-tolerance in halophilic bacteria and archaea, and discussed the prospects of the application in hypersaline wastewater treatment.

Keywords: Halophilic bacteria and archaea, Salt-tolerance related genes, Hypersaline wastewater

在过去的几十年中,人们发现在地球上无论何种极端环境,只要有液态水,就会有生命的存在^[1]。其中嗜极微生物(极端微生物)是这类特殊生命存在的代表,寻找分离嗜极微生物并且深入了解其耐受极端理化环境的机制,成为生命研究新的热点,同时这也为地外生命的寻找提供必要的理论基础^[2]。嗜盐微生物是嗜极微生物中的一个重要分支,这类微生物只有处在较高浓度的盐环境下才能获得最

适生长状态。然而高盐环境对于普通微生物的毒害作用明显,主要原因是高渗透压的胁迫下细胞膜和酶遭到破坏,进而抑制微生物的生理活动。嗜盐微生物以其特殊的生理结构组成和代谢调控机制,能在高盐的极端环境中栖息繁殖。

嗜盐微生物引起国内外学者的广泛兴趣,相关文献报道主要集中在三个方面:一是典型嗜盐菌株分离纯化及系统分类学研究;二是耐高盐的分子及

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 31270154, 31230002, 31121064);上海市青年科技启明星项目(No. 13QA1401700)

*通讯作者: Tel: 86-21-34206647-805; ✉: tanghongzhi@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2014-07-04; 接受日期: 2014-08-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-11

生化机制研究;三是嗜盐菌株的工业应用方面。对于耐高盐相关基因的研究尚少且不系统,对此笔者综述了嗜盐微生物耐盐的分子机理。

1 高盐生态环境下的嗜盐微生物

高盐生态环境类型包括盐滩、蒸发池、天然湖泊及深海中高盐盆地等,这些环境有着各自独特的理化环境,如总盐浓度、pH 值、离子组成及温度等方面,但是高渗透压是微生物生存于这类环境中必须共同面对的“难关”。在全球各地的高盐生态系统中,研究者分析其中微生物种类多样性,并对重要嗜盐菌进行系统分类,其中有代表性的高盐生态系统如大盐湖(美国),死海,中国新疆地区的盐湖,中国内蒙古地区的盐湖,非洲盐碱湖,西伯利亚南部的盐湖,印度、土耳其、西班牙和以色列等地的盐场,及位于深海中高盐海水等环境^[3-5]。不同的高盐环境中呈现出嗜盐微生物种类的多样性,究其原因同属高盐环境但却拥有各自独特的生境,如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Na^+ 等离子浓度有所差异,不同的 pH 环境(偏碱性或中性)以及深海环境下的高压低温等,这些复杂的盐浓度、温度、压力及 pH 等环境条件交互影响,可能是导致嗜盐菌株的嗜盐机理多样性的原因。另一方面,多样的高盐生态环境中进化出多种不同类型的嗜盐微生物,为抗高盐相关基因的发掘提供了广阔的资源库。

嗜盐细菌普遍存在于各种盐浓度的环境中,按照其最适生长的盐浓度范围可将其分为轻度嗜盐菌(生长最适盐浓度为 0.2–0.5 mol/L)、中度嗜盐菌(生长最适盐浓度为 0.5–2.0 mol/L)和极端嗜盐菌(生长最适盐浓度为 3.0 mol/L 以上)^[6]。极端嗜盐菌中代表菌属为盐杆菌属(*Halobacterium*),并且嗜盐古菌多为极端嗜盐古菌,如嗜盐碱杆菌属(*Natronobacterium*)等;嗜盐真细菌中代表有嗜盐放线多孢菌(*Actinopolyspora halophila*)和盐绿外硫红螺菌(*Ectothiorhodospira halochloris*),对盐需求类似极端嗜盐古菌;真核生物中的绿藻类盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)甚至可以耐受饱和 NaCl 环境^[2,7]。

2 嗜盐微生物的耐盐机制相关基因

2.1 与胞内 Na^+ 排出机制相关基因

嗜盐菌能在高盐环境下生存,高浓度 Na^+ 是嗜盐菌正常生长所依赖的,高 Na^+ 浓度可以维持细胞壁结构完整,同时保证细胞功能正常。但是胞内 Na^+ 浓度过高对于微生物细胞有毒害作用,需要 Na^+ 排出系统来维持胞内稳定适宜的 Na^+ 浓度。钠离子泵广泛存在于微生物系统中,这些膜离子泵不断的将 Na^+ 泵出,维持细胞膜内稳定的 Na^+ 浓度,其中具有与代表性的是 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白,通过与 H^+ 的输入偶联,将胞内的钠离子泵出。高效的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白存在于一些嗜盐微生物中,在微生物耐受高盐环境胁迫的应答中起到了不可忽视的作用^[8]。一株中度嗜盐细菌盐芽孢杆菌 *Halobacillus aidingensis* AD-6^T 分离自新疆盐湖中,能耐受能力 0.5%–20.0% 的盐浓度(NaCl),该菌的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白有很高的活性, *nhaH* 基因经体外克隆后导入大肠杆菌 KNabc 中,使得这种缺少 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的大肠杆菌能够在 0.2 mol/L NaCl 或者 10 mmol/L LiCl 盐溶液中存活,可见 *nhaH* 基因在排出钠离子、维持大肠杆菌 KNabc 细胞内渗透压的过程中起到关键作用^[9]。Yang 等从一株中度嗜盐细菌盐芽孢杆菌 *Halobacillus dabanensis* strain D-8^T 克隆出编码 Na^+/H^+ 转运蛋白的 *nhaH* 基因,经体外克隆异源表达后证明其具有增强菌株耐盐能力的作用^[10]。

2.2 与胞内 K^+ 积累机制相关基因

在嗜盐微生物中存在一种依赖累积胞内高浓度 K^+/Cl^- 来维持渗透压平衡的机制,嗜盐古菌这类极端嗜盐微生物以此来抵御极高盐环境。嗜盐菌可以累积胞内 K^+ ,高浓度 K^+ 不仅能调节渗透压,并且核糖体及酶也是 K^+ 浓度依赖型。微生物中存在多种 K^+ 通道,在大肠杆菌中有关 K^+ 转运系统的研究比较完善,其中广泛发挥作用的是组成表达型 Trk 系统和转录调控型 Kdp 系统,后者对 K^+ 亲和性明显高于前者,但是这两个系统在高渗透压诱导下

活性都会得到增强^[11]。

在嗜盐菌中存在类似的 K^+ 转运系统, 且多为单向转运蛋白, 在外界高盐环境条件下能够实现胞内累积高浓度 K^+ 来平衡胞内外渗透压。在嗜盐单胞细菌 *Halomonas elongata* DSM 2581^T 中发现 3 个基因: *trkA* (1 374 个碱基), *trkH* (1 449 个碱基) 和 *trkI* (1 479 个碱基) 与其 K^+ 吸收密切相关, 这 3 个基因表达蛋白与大肠杆菌 *E. coli* 中 Trk 系统相关蛋白类似; 敲除实验表明 TrkI 是 *H. elongata* 中主要的 K^+ 转运系统, 当 TrkH 和 TrkI 同时失活时细胞无法积累 K^+ ; *trkA* 基因缺失的突变株同样会丢失 K^+ 转运功能, 这表明 TrkI 系统和 TrkH 系统都依赖于这种类型的 TrkA 蛋白^[12]。除了 Trk 类 K^+ 转运系统, 一些嗜盐古菌中存在 Kdp 类 K^+ 转运系统, Jörg-Christian Greie 等对于极端嗜盐古菌 *Halobacterium salinarum* 中 Kdp 类 K^+ 系统研究较为透彻。嗜盐古菌会通过累积胞内等摩尔浓度的 KCl 来平衡外界高渗透压, 嗜盐古菌 *Halobacterium salinarum* R1 和 *Halobacterium* sp. NRC-1 中存在由 ATP 驱动 K^+ 转运系统 KdpFABC, 由基因 *kdpFABC* 编码表达, 该系统受胞外环境中 K^+ 浓度调控, 进而来调节 K^+ 转运以保证胞内离子浓度处于与外界环境平衡状态; 另外在基因簇 *kdpFABCQ* 下游存在一个 *cat3* 基因(即 *kdpQ* 基因), 该基因表达产物是诱导整个基因簇 *kdpFABCQ* 表达所必不可少的条件^[13]。*H. salinarum* 中 *kdpFABCQ* 基因簇构成一个操纵子, *kdpFABCQ* 基因受复杂的调控机理来控制, 涉及到负转录调控因子, 并受到一种未知机制来进一步调控; *kdpFABCQ* 基因被转录成一条单链多顺反子 mRNA, 该基因簇上游启动子 *Pkdp* 的转录调控受到 3 种不同因子交互作用, 其中主要调节作用来自上游保守区操纵基因的负调控, 另外一个未知且独立于该操纵子的因子起到次要调控作用, 最后, 启动子 *Pkdp* 的表达水平还受到这个操纵子最后一个基因——*kdpQ* 的进一步调控; 由此表明在嗜盐古菌中 Kdp 系统相关基因的表达调控机制有别于细菌, 二者可能选择了不同的进化方向^[14]。在

K^+ 限制条件下 *kdp* 启动子(*Pkdp*)可以促进下游基因表达, 依据该启动子的这一个特性, 构建在 *H. salinarum* 可复制的逐步诱导表达型载体 *pKIKPkdp*, 可以实现目的基因的可控型诱导表达, 提高目的基因 50 倍的表达量; 通过对载体 *pKIKPkdp* 基因表达模式的特性研究, 展示了一种新颖的可逐步诱导表达系统^[15]。

2.3 与胞内小分子相容性物质积累机制相关基因

在高盐压力下, 嗜盐微生物会摄取、合成并积累亲和溶质, 如糖类、氨基酸、四氢嘧啶、甜菜碱及海藻糖等, 这些小分子量物质高度可溶, 既能提高胞内水活度, 又不影响细胞正常代谢。亲和溶质的积累补偿了外界高渗透压条件下导致的内外部渗透压不均衡, 在一定程度上缓解了高盐环境对细胞的胁迫, 此外这类小分子相容性溶质在细胞内能够被迅速地合成和降解, 有利于嗜盐微生物克服高盐环境下的渗透压^[8]。

氨基酸类有机渗透溶质是一类最早从中度嗜盐菌中发现的渗透保护剂, 其中常见的为脯氨酸、谷氨酸及谷氨酰胺等。脯氨酸是某些革兰氏阳性菌中主要的渗透保护剂, 如中度嗜盐细菌盐球菌属中 *Salinicoccus roseus* 和 *Salinicoccus hispanicus* 等, 这些嗜盐菌积累高浓度脯氨酸策略主要集中在三个方面: 促进自身合成、加快体外转运、或是减少降解^[8]。早期关于渗透压力适应性的研究报道, 多是以沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 作为模式系统, 发现有 3 条相互独立的脯氨酸转运系统: PutP、ProP 和 ProU, 当细胞需要代谢脯氨酸作为碳源或者氮源时, PutP 系统发挥主要的脯氨酸转运作用; 当细胞需积累胞内高浓度脯氨酸应对高渗环境时, ProP 和 ProU 系统开始发挥主要作用^[16]。基因 *proA*、*proB* 及 *proC* 是编码脯氨酸生产代谢的基因, 研究发现 *proAB* 基因操纵子的突变体会导致脯氨酸过表达, 使得细胞内亲和溶质脯氨酸积累, 从而使得微生物具有耐高渗透压的能力^[17-18]。在高渗透压胁迫下某些革兰氏阴性菌中谷氨酸的含量上升, 尽管谷氨酰胺含量也会同时

上升,但是谷氨酰胺的上升水平远低于谷氨酸,这可能表明谷氨酸是调节渗透压的主要物质^[16]。谷氨酸合成的两条主要途径:转氨作用和 α -酮酸还原氨化,这两步反应中的关键酶分别是谷氨酸脱氢酶和谷氨酰胺合成酶及谷氨酸合成酶。一株中度嗜盐细菌盐芽孢杆菌 *Halobacillus halophilus* 依赖合成谷氨酸和谷氨酰胺作为主要相容性溶质,得以在 1.0–1.5 mol/L NaCl 下生长,其中谷氨酸脱氢酶和谷氨酸合成酶的表达不受盐调控,但是谷氨酰胺合成酶活性受到盐调控,特别是 Cl^- 的刺激作用显著, Cl^- 能提升谷氨酰胺合成酶 3 倍的产量,进而提升胞内谷氨酸和谷氨酰胺浓度^[19]。其中在高渗条件下谷氨酸脱氢酶和谷氨酸合成酶的转录调控研究目前还没有相关的报道。

四氢吡啶及其衍生物 β -羟基四氢吡啶是一类普遍存在于细菌中相容性溶质,在高渗透压环境中可作为生命活动的保护剂。在一株耐盐的龟裂链霉菌 *Streptomyces rimosus* C-2012 中,四氢吡啶的生物合成以天冬氨酸半醛起始,需要三步酶促作用,分别是二氨基丁酸转氨酶(Diaminobutyrate transaminase, EctB)、二氨基丁酸乙酰基转氨酶(Diaminobutyrate acetyl transferase, EctA)和 N-乙酰二氨基丁酸脱水酶(又称四氢吡啶合成酶-Ectoine synthase, EctC);四氢吡啶可通过四氢吡啶羟化酶(Ectoine hydroxylase, EctD)形成 β -羟基四氢吡啶。在链霉菌属中四氢吡啶及其羟化衍生物的合成由保守基因簇 *ectABCD* 编码的蛋白控制,*ectABCD* 操作子受到盐的正调控,在高盐压力下四氢吡啶及其衍生物 β -羟基四氢吡啶的积累依赖于 *ectABCD* 操作子转录后的刺激作用,并且该基因簇的表达受产物正反馈作用较弱^[20]。在假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* DSM5190^T 中存在一个基因簇 *ectABCD-ask*,该基因簇可以控制羟基四氢吡啶的合成,并且在该基因在大肠杆菌中异源表达生产羟基四氢吡啶的过程中,会受到盐诱导下的原来固有启动子的调控作用^[21]。关于四氢吡啶合成基因的转录调控模型,以需盐色盐杆菌属 *Chromohalobacter salexigens* 和

甲基微菌属 *Methylobaculum alcaliphilum* 中为代表,在 *C. salexigens* 中 *ectABC* 基因分别从两个启动子区域开始转录,分别是 *ectA* 上游的启动子区域 *PectA* 和 *ectBC* 上游的启动子区域 *PectB*;而羟基四氢吡啶的合成基因 *ectD* 启动子区域为上游的 *PectD*,并且 EctR 蛋白可以激活基因 *ectD* 的转录^[22]。在耐盐菌甲基微菌 *Methylobaculum alcaliphilum* 20Z 中发现了一个新的转录调控因子 EctR1,其中 *ect* 操纵子的转录从两个启动子起始,分别是 *ectAp1* 和 *ectAp2* (*ectAp1p2*);并且发现在 *M. alcaliphilum* 20Z 中 EctR1 是 *ectABC-ask* 操纵子的负调控因子^[23]。

甘氨酸甜菜碱是另外一种微生物用作渗透保护剂的相容性溶质。某些蓝藻及可以固定 CO_2 的原核生物可以合成甜菜碱,但是绝大多数的嗜盐细菌依赖从外界转运获得的甜菜碱或者其前体物质胆碱,来积累其胞内浓度以抵抗高渗环境。甜菜碱的合成一般是以胆碱为底物,通过生物转化合成甘氨酸甜菜碱的转化。从一株中度嗜盐细菌盐芽孢杆菌 *Halobacillus dabanensis* D-8^T 克隆出 *gbsAB* 基因,分别表达甘氨酸甜菜醛脱氢酶和胆碱脱氢酶,将其在大肠杆菌中异源表达,可以在含有 0.7 mol/L NaCl 和 1.0 mmol/L 胆碱的 M63 培养基中生长;另外还发现 *gbsTIAB* 基因簇,其中 *gbsT* 和 *gbsI* 编码的氨基酸序列分别与甜菜碱转运和调节蛋白同源^[24]。在一株中度嗜盐单胞细菌 *Halomonas elongata* DSM 3043 中发现一个 4.6 kb 的基因簇,将其克隆到 *E. coli* 中可以实现从胆碱到甜菜碱的转化反应,但并不能实现胆碱的转运^[25]。类似于脯氨酸,甜菜碱的摄取转运也是通过 ProP 系统和 ProU 系统来实现的,其中低亲和力 ProP 系统发挥的作用要强于 ProU 系统;这两个转运系统实际上发挥着普遍性渗透调节物质的转运功能,包括脯氨酸、甜菜碱、胆碱-O-硫酸和肉碱等,在嗜盐菌的渗透适应方面发挥重要作用^[26]。胆碱在高渗透压的条件下能发生转化生成甜菜碱,因此胆碱可看做是一种间接的渗透保护剂。胆碱的摄取依赖两条转运系统,其中一条途径

由基因 *betT* 编码蛋白控制；在大肠杆菌中基因 *betA* 和 *betB* 在胆碱转化为甜菜碱过程中发挥重要作用；*betABT* 这 3 个基因与 *lacZ* 基因是一个转录融合单位，在渗透压力下其转录效率提升 7–10 倍^[16]。在嗜盐海球菌(*Marinococcus halophilus*)中发现了甘氨酸甜菜碱转运基因 *betM*；另外在楚氏喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus trueperi*)中克隆了甘氨酸甜菜碱转运蛋白基因 *betH*，在甘氨酸甜菜碱缺陷菌株 *E. coli* MKH13 中异源表达，能够使其积累甘氨酸甜菜碱^[27]。

海藻糖作为胞内的相容性溶质存在广泛，费氏丙酸杆菌 *Propionibacterium freudenreichii* 中在高渗透压力的应答反应下会积累高浓度的海藻糖；在该菌株中发现两条海藻糖合成途径：一是海藻糖-6-磷酸合成酶/磷酸酶途径(Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase, OtsA-OtsB)，二是海藻糖合酶(Trehalose synthase, TreS)途径；实验表明在高渗透压影响下，OtsA-OtsB 合成海藻糖途径得到加强^[28]。

5-氨基-3,4-二氢吡咯-2-甲酸乙酯(ADPC)是一种在中度嗜盐单胞细菌 *Halomonas elongata* 突变株中意外发现的相容性溶质，是四氢吡啶合成途径中副反应的产物；由于其能保护菌株在高盐环境胁迫下生长并且可以稳定酶结构避免酶变性，具有典型相容性溶质的特性，是迄今为止首次发现借助基因工程手段来实现人工合成的相容性溶质^[3,29]。

2.4 高盐环境下嗜盐酶稳定机制

高盐离子浓度对于普通蛋白保持其活性状态是不利的，但是嗜盐菌中嗜盐酶需要在较高盐浓度才能保证其结构与活性的稳定。嗜盐菌细胞膜外有呈六角形排列的 S 单层，这个 S 单层由磺化的糖蛋白组成，由于磺酸基团的存在使 S 层呈负电性，因此使组成亚基的糖蛋白得到屏蔽，在高盐环境中保持稳定，同时这些糖蛋白由于负电性可以在细胞壁外表面束缚 Na^+ ，维持细胞完整性^[6]。嗜盐酶中酸性氨基酸的比例远高于同源酶系的非嗜盐类型，其中赖氨酸、异亮氨酸和亮氨酸含量明显降低，天冬

氨酸与谷氨酸比例较高；嗜盐蛋白表面带电残基及酸性氨基酸增加，蛋白表面的高负电荷，使得蛋白溶解度升高，并且在高盐环境中更具柔韧性^[30]。借助嗜盐酶氨基酸组成特点可以指导传统酶进行嗜盐方向改造，增强酶在高盐环境下活性。嗜盐酶在一定盐浓度下才能保证酶活性及稳定性，最适盐浓度范围在 1.0–4.0 mol/L 之间；研究表明在极端嗜盐古菌盐盒菌 *Haloarcula marismortui* 中的苹果酸脱氢酶和 2Fe-2S 铁氧还原蛋白因其表面高负电荷存在而变得更易溶解，在高盐环境中这类蛋白易于保持活性构象和稳定结构^[31]。极端嗜盐微生物如极端嗜盐古菌 *Halobacteriaceae* 和嗜盐细菌 *Salinibacter* 通过积累 KCl 来维持渗透压平衡，在他们的蛋白中发现有大量的酸性氨基酸存在，但是在 *Halanaerobiales* 中虽然胞内积累 KCl 但是基因组信息显示其蛋白质组不具备偏酸性；此外即便在亲缘关系很近的嗜盐古菌嗜盐红螺菌 *Halorhodospira halophila* 和 *Halorhodospira halochloris* 中，发现在二者 KCl 积累和蛋白质组酸性问题上都有明显差异；这些差异现象引起对耐盐机制问题相互关联性的重新思考^[32]。

本文通讯作者参与完成了一株中度嗜盐细菌地中海马特尔氏菌 *Marteella* sp. AD-3 的基因组测序工作，在 DDBJ/EMBL/GenBank 上编号为 AYG000000000，菌株 AD-3 基因组序列共有 4 753 609 个碱基，GC 含量为 62.3%；该菌株能够在 0.1%–15.0% 的盐浓度范围内生长并且能够高效降解多环芳烃类化合物；分析该菌基因组序列发现有 242 个编码区注释为膜转运相关基因，这些基因有助于对 *Marteella* sp. AD-3 耐高盐机制进行深入研究^[33]。此外，对中度嗜盐菌 *Marteella* sp. AD-3 中与菲降解过程相关的水杨酸-5-羟化酶进行了酶学性质的研究，该酶活力受到盐浓度影响，在 0.5%–8.0% 的盐浓度范围内活性较高，在 3.0% 盐度下活性最高，实验结果表明该酶具有一定的盐依赖性^[34]。普通微生物难以集高效降解有机污染物与适应高盐环境能力于一身，但是菌株 *Marteella* sp.

AD-3 是从石油污染的高盐度土壤中分离出来,能够在高盐环境下降解多环芳烃,对高盐环境下多环芳烃污染修复方面具有重要的研究价值,结合已获得的全基因组信息发掘该菌株中多环芳烃降解基因簇以及与耐高盐相关基因,探究二者协同发挥作用的机理,对于研究微生物高效处理高盐环境中有机污染物方面具有一定的指导意义。

2.5 嗜盐菌耐盐机制小结

积累相容性溶质来抵抗外界高盐环境是嗜盐菌主要的耐盐机制,四氢吡啶、甜菜碱、海藻糖、谷氨酸及脯氨酸等作为主要的小分子相容性溶质代表,在不同类型的嗜盐菌株中能够克隆获得这些相容性溶质的合成基因;与相容性溶质转运及调控相关基因在 *M. alcaliphilum* 和 *C. salexigens* 中已有所研究。 Na^+/H^+ 转运蛋白对于维持嗜盐菌胞内正常 Na^+ 浓度具有十分重要的作用,高效的 Na^+/H^+ 转运蛋白在中度嗜盐菌中广泛存在,并且氨基酸序列相似性较高,相关基因如 *nhaH* 等经体外克隆表达发挥功能。嗜盐古菌及少数极端嗜盐细菌依赖积累 K^+ 应对高渗透压胁迫,Trk 系统和 Kdp 系统主要负责 K^+ 的转运,在 *H. salinarum* 中 Kdp 系统及其受外界 K^+ 浓度调控机制的研究较为深入。低亲和力的 ProP 系统和高亲和力的 ProU 系统是两个相互独立系统,在高渗透压下对脯氨酸及甜菜碱等的摄入具有重要作用,在肠道菌及根瘤菌中研究比较详尽。部分耐盐相关基因所属菌株及功能(表 1)。

3 耐盐基因在工业及环境领域的应用与展望

嗜盐微生物在工业及环境领域内有着潜在的应用价值,集中体现在:(1)嗜盐微生物可以改善传统食品加工工艺;(2)高盐环境下嗜盐微生物及新型嗜盐酶发挥催化作用;(3)实现在高盐培养基中积累某些特定化合物,如四氢吡啶、甘油等;(4)嗜盐微生物能产生非高盐生长所必需的独特化合物,如细菌视紫红质等;(5)相比非嗜盐微生物,利用嗜盐微生物来生产某些化合物具有明显优势,如 β -胡萝卜素等;(6)嗜盐微生物应用于高盐

环境中有机污染物降解或转化,生产可替代能源等方面^[35-36]。

特别是在环境污染修复上,嗜盐微生物具有广阔的应用前景。高盐富含典型有机污染物的废水类型多样,如腌渍皮革厂排放废水,石化煤化厂排放废水以及垃圾渗滤液等,每年排放量巨大,给生态环境和人类健康带来严重威胁,亟待得到有效处理。常规微生物在高盐废水的环境修复过程中很难发挥作用,嗜盐微生物在高盐环境下有着天然的优势,关于嗜盐微生物处理高盐废水中有机污染物、重金属污染及有机磷污染问题等方面已有相关报道^[37]。嗜盐微生物具备有机污染物降解能力,如石油烃污染物降解、芳香烃类污染物降解和有机磷污染物的降解等,一些嗜盐微生物还可以降低高盐有机废水的 COD^[38]。但是相关报道研究集中在嗜盐微生物菌株分离及污染物降解功能验证上,对于其耐高盐及有机污染物降解的分子机制研究报道较少,由此引发对嗜盐微生物耐盐基因研究及进一步应用上的思考。

由于被污染环境中盐度及有机污染物种类不一,发掘能耐受高盐有机污染物降解菌可以有效解决上述问题,与传统筛选分离微生物方法相比,通过基因工程改造优势菌株能够更快获得目的菌株。从基因及代谢调控层面深入了解嗜盐微生物耐高盐机制,可以挖掘出优良的耐高盐基因元件,对传统污水处理优势菌株进行基因工程改造。根据实际需要,结合合成生物学手段,构建耐高盐基因或者蛋白质生物元件标准化元件库,设计新的代谢网络和途径,重构目标菌株^[39],将抗高盐元件整合到目的菌株中,赋予不同污染物降解菌株以高盐耐受能力,使其能在高盐环境下发挥应用价值,特别是在高盐废水处理上的应用,增强在高盐废水中的处理效果。鉴于高盐有机废水中复杂环境,需要相关的调控转运基因发挥作用,同时借助优化菌群结构,合理配置菌群比例,同时发挥菌群协同效应,配置功能互补的污水处理菌群,提升污染物降解谱,减少或消除有害物质产生。

表 1 部分耐盐相关的基因功能及其所属菌株			
Table 1 Part of salt-tolerance related genes with the functions and the stains			
耐高盐相关基因	微生物种属	具体功能	参考文献
Salt-tolerance related gene	Microorganism	Function	Reference
Na ⁺ 排出相关基因			
Na ⁺ antiporter biosynthesis genes			
<i>nhaH</i> 基因	<i>Halobacillus aidingensis</i>	该基因表达 Na ⁺ /H ⁺ 逆向转运蛋白，是高效的 Na ⁺ 排出泵，增强菌株的抗高盐能力	[9-10]
<i>nhaH</i> gene	AD-6 ^T ; <i>Halobacillus dabanensis</i> strain D-8 ^T		
胞内小分子相容性物质合成相关基因			
Compatible solutes biosynthesis genes			
四氢吡啶及 β-羟基四氢吡啶合成基因： <i>ectABCD</i> 基因簇	<i>Streptomyces rimosus</i> C-2012; <i>Pseudomonas stutzeri</i> DSM5190T	以天冬氨酸半醛起始，经过二氨基丁酸转氨酶 (EctB)，二氨基丁酸乙酰基转氨酶(EctA)和 N-乙酰二氨基丁酸脱水酶(四氢吡啶合成酶-EctC)三步酶促反应合成；四氢吡啶可通过四氢吡啶羟化酶 (EctD)形成 β-羟基四氢吡啶	[21-22]
Ectoine and hydroxyectine biosynthesis gene cluster: <i>ectABCD</i>			
甘氨酸甜菜碱合成相关基因： <i>gbsT</i> , <i>gbsI</i> , <i>gbsA</i> 及 <i>gbsB</i>	<i>Halobacillus dabanensis</i> D-8 ^T ; <i>Halomonas elongate</i> DSM 3043	该基因簇表达蛋白可以实现氯化胆碱到甜菜碱的转化	[24-25]
Glycine betaine biosynthesis genes: <i>gbsT</i> , <i>gbsI</i> , <i>gbsA</i> , and <i>gbsB</i>			
海藻糖合成基因： <i>otsA</i> , <i>otsB</i> 及 <i>treS</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	途径一，在海藻糖-6-磷酸合成酶(OtsA)和海藻糖-6-磷酸酶(OtsB)作用下合成海藻糖；途径二，在海藻糖合成酶(TreS)作用下，将麦芽糖转变成海藻糖	[28]
Trehalose biosynthesis genes: <i>otsA</i> , <i>otsB</i> , and <i>treS</i>			
谷氨酸及谷氨酰胺合成基因： <i>gdh</i> 和 <i>gs</i>	<i>Halobacillus halophilus</i>	谷氨酸合成途径中关键酶分别是谷氨酸脱氢酶 (GDH)和谷氨酰胺合成酶及谷氨酸合成酶(GS)	[19]
Glutamate and glutamine biosynthesis genes: <i>gdh</i> and <i>gs</i>			
脯氨酸合成基因： <i>proA</i> , <i>proB</i> 及 <i>proC</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> ;	编码脯氨酸生产代谢的基因，过表达脯氨酸会增强细胞耐高渗透压的能力	[17-18]
Proline biosynthesis gene: <i>proA</i> , <i>proB</i> , and <i>proC</i>	<i>Escherichia coli</i>		
胞内小分子相容性物质转运相关基因			
Compatible solutes transport genes			
K ⁺ 转运系统：Trk 系统和 Kdp 系统	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Halobacterium salinarum</i>	Trk 系统(组成型表达)和 Kdp 系统(转录调控型)，这两个系统在渗透压力下活性都会得到明显的加强，来累积胞内 K ⁺ 浓度抵抗高浓度的盐环境	[11-15]
K ⁺ transport system: Trk system and Kdp system			
脯氨酸及甜菜碱转运系统：ProP 系统和 ProU 系统	<i>Salmonella typhimurium</i> ;	ProP 系统与 ProU 系统相互独立 ,在高渗条件下对积累高浓度脯氨酸及甜菜碱发挥着重要作用；其中 ProP 系统发挥的作用要强于 ProU 系统	[16,26]
Proline and betaine transport system: ProP system and ProU system	<i>Escherichia coli</i>		
甜菜碱转运相关基因： <i>betM</i> 和 <i>betH</i>	<i>Marinococcus halophilus</i> ;	分别从 <i>Marinococcus halophilus</i> 和 <i>Halobacillus trueperi</i> 获得 <i>betM</i> 和 <i>betH</i> 基因，表达的蛋白具有甘氨酸甜菜碱转运功能，随着胞外盐浓度上升而积累胞内甜菜碱浓度	[27]
Betaine transport genes: <i>betM</i> and <i>betH</i>	<i>Halobacillus trueperi</i>		

另一方面,生物酶同样应用于废水处理工程中,高效、环保且无二次污染,固定化酶技术的应用提高了酶处理废水的稳定性,提升了酶的利用率。在高盐废水处理中,酶的活性会受到高盐浓度的抑制,进而降低废水处理效果,对此某些嗜盐微生物产生有机磷酸脱水酶制剂已用于净化盐环境中的有机磷化学毒剂^[38]。从耐盐酶氨基酸组成特性获得启发,对用于废水处理的生物酶进行人工修饰改造,改变蛋白质的表面氨基酸种类,提升酸性氨基酸比例,但不改变酶的活性位点,维持或者提升酶的生物活性,以期得到耐高盐活力强的生物酶,提高废水的处理效果。

所以,嗜盐微生物中耐高盐相关基因具有重要的理论研究价值,结合合成生物学等方法将其用于重要污水处理菌株的定向嗜盐改造,借鉴嗜盐酶分子特性对污水处理生物酶进行嗜盐性修饰改造,在环境污染修复方面具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Harrison JP, Gheeraert N, Tsigelnitskiy D, et al. The limits for life under multiple extremes[J]. Trends in Microbiology, 2013, 21(4): 204-212
- [2] Rothschild LJ, Mancinelli RL. Life in extreme environments[J]. Nature, 2001, 409(6823): 1092-1101
- [3] Ma YH, Galinski EA, Grant WD, et al. Halophiles 2010: life in saline environments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(21): 6971-6981
- [4] Pagaling E, Wang HZ, Venables M, et al. Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(18): 5750-5760
- [5] Bodaker I, Sharon I, Suzuki MT, et al. Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment[J]. The ISME Journal, 2010, 4(3): 399-407
- [6] Liu TH, Zhou PJ. Halophilic microorganisms[J]. Microbiology China, 1999, 26(3): 232 (in Chinese)
刘铁汉, 周培瑾. 嗜盐微生物[J]. 微生物学通报, 1999, 26(3): 232
- [7] Kamekura M. Diversity of extremely halophilic bacteria[J]. Extremophiles: Life under Extreme Conditions, 1998, 2(3): 289-295
- [8] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(2): 504-544
- [9] Zou YJ, Yang LF, Wang L, et al. Cloning and characterization of a Na⁺/H⁺ antiporter gene of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus aidingensis* AD-6^T[J]. Journal of Microbiology, 2008, 46(4): 415-421
- [10] Yang LF, Jiang JQ, Zhao BS, et al. A Na⁺/H⁺ antiporter gene of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8^T: cloning and molecular characterization[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 255(1): 89-95
- [11] Csonka LN, Hanson AD. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology[J]. Annual Review of Microbiology, 1991, 45: 569-606
- [12] Kraegeloh A, Amendt B, Kunte HJ. Potassium transport in a halophilic member of the bacteria domain: identification and characterization of the K⁺ uptake systems TrkH and TrkI from *Halomonas elongata* DSM 2581^T[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(3): 1036-1043
- [13] Strahl H, Greie JC. The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* R1 responds to potassium limitation by expression of the K⁺-transporting KdpFABC P-type ATPase and by a decrease in intracellular K⁺[J]. Extremophiles: Life under Extreme Conditions, 2008, 12(6): 741-752
- [14] Kixmuller D, Strahl H, Wende A, et al. Archaeal transcriptional regulation of the prokaryotic KdpFABC complex mediating K(+) uptake in *H. salinarum*[J]. Extremophiles: Life under Extreme Conditions, 2011, 15(6): 643-652
- [15] Kixmuller D, Greie JC. Construction and characterization of a gradually inducible expression vector for *Halobacterium salinarum*, based on the kdp promoter[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(7): 2100-2105
- [16] Csonka LN. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1989, 53(1): 121-147
- [17] Mahan MJ, Csonka LN. Genetic analysis of the *proBA* genes of *Salmonella typhimurium*: physical and genetic analyses of the cloned *proB*⁺ A⁺ genes of *Escherichia coli* and of a mutant allele that confers proline overproduction and enhanced osmotolerance[J]. Journal of Bacteriology, 1983, 156(3): 1249-1262
- [18] Smith LT. Characterization of a gamma-glutamyl kinase from *Escherichia coli* that confers proline overproduction and osmotic tolerance[J]. Journal of Bacteriology, 1985, 164(3): 1088-1093
- [19] Saum SH, Sydow JF, Palm P, et al. Biochemical and molecular characterization of the biosynthesis of glutamine and glutamate, two major compatible solutes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(19): 6808-6815
- [20] Sadeghi A, Soltani BM, Nekouei MK, et al. Diversity of the ectoine biosynthesis genes in the salt tolerant *Streptomyces* and evidence for inductive effect of ectoines on their accumulation[J]. Microbiological Research, 2014, DOI: 10.1016/j.micres.2014.02.005
- [21] Seip B, Galinski EA, Kurz M. Natural and engineered hydroxyectoine production based on the *Pseudomonas stutzeri* *ectABCD-ask* gene cluster[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(4): 1368-1374
- [22] Mustakhimov II, Reshetnikov AS, Khmelenina VN, et al. Regulatory aspects of ectoine biosynthesis in halophilic bacteria[J]. Microbiology, 2010, 79(5): 583-592
- [23] Mustakhimov II, Reshetnikov AS, Glukhov AS, et al. Identification and characterization of EctR1, a new transcriptional regulator of the ectoine biosynthesis genes in the halotolerant methanotroph *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(2): 410-417
- [24] Gu ZJ, Wang L, LeRudulier D, et al. Characterization of the glycine betaine biosynthetic genes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8^T[J]. Current Microbiology, 2008, 57(4): 306-311
- [25] Canovas D, Vargas C, Kneip S, et al. Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043 [J]. Microbiology, 2000, 146 (2): 455-463
- [26] da Costa MS, Santos H, Galinski EA. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 1998: 117-153

- [27] Zhao BS, Yang LF, Wang L, et al. Study progress on compatible solutes in moderately halophilic bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 937-941 (in Chinese)
赵百锁, 杨礼富, 王磊, 等. 中度嗜盐菌相容性溶质机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 937-941
- [28] Cardoso FS, Castro RF, Borges N, et al. Biochemical and genetic characterization of the pathways for trehalose metabolism in *Propionibacterium freudenreichii*, and their role in stress response[J]. Microbiology, 2007, 153(1): 270-280
- [29] Witt EM, Davies NW, Galinski EA. Unexpected property of ectoine synthase and its application for synthesis of the engineered compatible solute ADPC[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(1): 113-122
- [30] Graziano G, Merlino A. Molecular bases of protein halotolerance[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2014, 1844(4): 850-858
- [31] Mevarech M, Frolov F, Gloss LM. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt[J]. Biophysical Chemistry, 2000, 86(2/3): 155-164
- [32] Oren A. Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes[J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: a315
- [33] Cui CZ, Li PP, Liu G, et al. Genome sequence of *Marteella* sp. strain AD-3, a moderately halophilic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium[J]. Genome Announcements, 2014, 2(1): e01189-13
- [34] Dong F, Cui CZ, Feng TC, et al. Characterization of salicylate 5-hydroxylase for phenanthrene degradation using moderately halophilic *Marteella* sp. AD-3[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(8): 985-993 (in Chinese)
董斐, 崔长征, 冯天才, 等. 中度嗜盐菌 *Marteella* sp. strain AD-3降解菲过程中水杨酸-5-羟化酶的酶学性质[J]. 微生物学报, 2012, 52(8): 985-993
- [35] Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms[J]. Environmental Technology, 2010, 31(8/9): 825-834
- [36] Zhuang XL, Han Z, Bai ZH, et al. Progress in decontamination by halophilic microorganisms in saline wastewater and soil[J]. Environmental Pollution, 2010, 158(5): 1119-1126
- [37] Zhao BS, Wang H, Mao XW. The recent advances in Halophilic microorganisms for environmental bioremediation[J]. Microbiology China, 2007, 34(6): 1209-1212 (in Chinese)
赵百锁, 王慧, 毛心慰. 嗜盐微生物在环境修复中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(6): 1209-1212
- [38] Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology[J]. Extremophiles: Life under Extreme Conditions, 2001, 5(2): 73-83
- [39] Khalil AS, Collins JJ. Synthetic biology: applications come of age[J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(5): 367-379

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度) 和 N (当量浓度) 等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体) 表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 Da 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 跟数字之间加一空格(%除外), 有些计量单位不能省略, 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3%–6% 不可写成 3–6% 等。