

## 研究报告

## 一株耐盐反硝化细菌的筛选、鉴定和特性及其产物四氢嘧啶的检测

翁南海<sup>1,2</sup>, 王焕宇<sup>1,2</sup>, 张磊<sup>1,2</sup>, 田凤蓉<sup>3</sup>, 王开春<sup>3</sup>, 王淑军<sup>\*1,2</sup>

1 江苏海洋大学 海洋生物资源与环境重点实验室 海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 225005

2 江苏海洋大学 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222000

3 中蓝连海设计研究院有限公司, 江苏 连云港 222004

翁南海, 王焕宇, 张磊, 田凤蓉, 王开春, 王淑军. 一株耐盐反硝化细菌的筛选、鉴定和特性及其产物四氢嘧啶的检测[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2335-2348.

WENG Nanhai, WANG Huanyu, ZHANG Lei, TIAN Fengrong, WANG Kaichun, WANG Shujun. A salt-tolerant denitrifying bacterial strain: screening, identification, characterization, and detection of its product ectoine[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2335-2348.

**摘要:**【背景】石化工业废水具有高盐含氮的特点, 高盐度会对微生物代谢造成抑制, 导致普通反硝化微生物难以在高盐环境下有效脱氮。【目的】筛选在高盐条件下仍能保持反硝化能力的菌株并研究其特性。【方法】富集筛选出一株耐盐反硝化细菌, 对其进行生理生化特性和 16S rRNA 基因序列鉴定, 对其生长条件进行优化并测定该菌株反硝化能力, 对菌株在高盐环境下的产物进行定性定量分析。【结果】经鉴定菌株 YA16-1 为表皮短杆菌(*Brevibacterium epidermidis*), 可对硝态氮进行反硝化作用, 在盐度为 3%、初始氮浓度为 55 mg/L 的条件下, 18 h 的硝态氮转化率达到 97%; 初始硝态氮浓度为 250 mg/L 时, 24 h 内硝态氮转化率达到 100%。该菌株的最适生长条件为: 2% NaCl, 碳源为玉米芯粉, 氮源为酵母粉, pH 值为 6.0, 培养温度为 30 °C。菌株在盐度为 2%–15% 的培养基内生长良好。在 15% 盐度下, 菌株通过产四氢嘧啶维持渗透压, 产量为 0.89 mg/mL。【结论】菌株 YA16-1 具有良好的耐盐能力和反硝化能力, 在高盐废水处理、保护生态环境和四氢嘧啶的制备具有潜在的应用价值。

**关键词:** 反硝化细菌; 耐盐菌; 高盐含氮废水; 四氢嘧啶

资助项目: 江苏海洋大学青年基金(KQ20015); 国家重点研发计划(2018YFC0311106); 江苏省高等教育优势学科(PAPD); 江苏省研究生创新项目(SJCX20-KYCX2021-070)

This work was supported by the Jiangsu Ocean University Youth Fund (KQ20015), the National Key Research and Development Program of China (2018YFC0311106), the Jiangsu Province Higher Education Advantageous Disciplines (PAPD), and the Jiangsu Postgraduate Innovation Project (SJCX20-KYCX2021-070).

\*Corresponding author. E-mail: sjwang@jou.edu.cn

Received: 2023-02-14; Accepted: 2023-04-17; Published online: 2023-05-10

# A salt-tolerant denitrifying bacterial strain: screening, identification, characterization, and detection of its product ectoine

WENG Nanhai<sup>1,2</sup>, WANG Huanyu<sup>1,2</sup>, ZHANG Lei<sup>1,2</sup>, TIAN Fengrong<sup>3</sup>, WANG Kaichun<sup>3</sup>, WANG Shujun<sup>\*1,2</sup>

1 Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 225005, Jiangsu, China

2 Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222000, Jiangsu, China

3 Sinochem Bluestar Lehigh Engineering Institute Limited Company, Lianyungang 222004, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] Petrochemical wastewater contains nitrogen and has high salt content, which inhibits microbial metabolism and makes it difficult for common denitrifying microorganisms to effectively remove nitrogen. [Objective] To screen out and characterize the strains capable of efficiently removing nitrogen under high salt conditions. [Methods] A strain of salt-tolerant denitrifying bacterium was screened out and identified based on the physiological and biochemical properties and 16S rRNA gene sequence. The growth conditions of the strain were optimized and the denitrification capacity was measured. The products of the strain under high salt conditions were analyzed qualitatively and quantitatively. [Results] The strain YA16-1 was identified as *Brevibacterium epidermidis* and had the ability of denitrifying nitrate-nitrogen. It showed the nitrate-nitrogen removal rates of 97% in 18 h at 3‰ salinity and 55 mg/L initial nitrogen and 100% in 24 h at 250 mg/L initial nitrate-nitrogen. The optimum growth conditions for this strain were 2% NaCl, corn cob meal as the carbon source, yeast powder as the nitrogen source, pH 6.0, and 30 °C. The strain grew well in media with salinity ranging from 2‰ to 15‰. At 15‰ salinity, the strain maintained osmotic equilibrium by producing ectoine with the maximum titer of 0.89 mg/mL. [Conclusion] YA16-1 has good salt tolerance and denitrifying ability, demonstrating the potential of being applied in the treatment of high-salt wastewater and the production of ectoine.

**Keywords:** denitrifying bacterium; salt-tolerant bacterium; high-salt nitrogen-containing wastewater; ectoine

高含氮废水是指含有大量硝态氮( $\text{NO}_3^-$ -N)、氨态氮( $\text{NH}_4^+$ -N)和亚硝态氮( $\text{NO}_2^-$ -N)等各类含氮化合物的废水,其中硝态氮是高氮废水的主要污染物<sup>[1]</sup>。硝态氮是总氮的重要组分,可由有机氮和氨态氮转化而来,以硝酸盐为原料的工业排放废水中含有硝态氮<sup>[2]</sup>。据2020年我国生态环境部调查数据显示,每年我国仅硝态氮

废水的排放量已达百万 $\text{t}^{[3]}$ ,特别是制造氮肥和电子元件方面排放 $\text{NO}_2^-$ 的污水硝态氮浓度高达1 500 mg/L,人们长期饮用硝态氮含量超过10 mg/L的水会引起高铁血红蛋白症,当血液高铁血红蛋白含量达到70 mg/L即可引发窒息。高氮污水的排放将会造成严重的生态灾害,甚至威胁到居民的身体健康<sup>[4]</sup>。

目前处理含氮废水的方法主要有物理化学法和生物法。物理化学法常见的方法有电渗析、离子交换、反渗透、化学还原和光催化氧化等<sup>[5-6]</sup>。生物法去除硝态氮就是利用异养微生物反硝化细菌的协调作用将废水中的  $\text{NO}_3^-$  转化为  $\text{N}_2\text{O}$  和  $\text{N}_2$  气体<sup>[7-8]</sup>。生物法因其低成本、无副作用及脱氮彻底等特点被普遍用作处理含氮废水<sup>[9-10]</sup>。姚晓丽等<sup>[11]</sup>将一种反硝化细菌菌液投入到湖北一景观湖中,4个月后湖水总氮含量降低了36%左右,水质得到明显改善。处理水产养殖废水的传统方法是利用藻类的吸收作用,但对氮的去除效果很差。Kern等<sup>[12]</sup>将反硝化细菌投入鱼虾养殖废水中,结果发现废水中硝态氮、亚硝态氮几乎全部去除。王凤等<sup>[13]</sup>将异养反硝化细菌投入到模拟地下水的微生物滤池中,结果发现在20℃时,该系统对硝态氮的降解率达到90%左右,显示出大规模处理污水的能力。

通常工业废水伴随着高盐的问题,高渗环境会抑制微生物代谢,导致普通反硝化微生物难以在高盐环境下有效脱氮<sup>[14]</sup>,影响其反硝化效果。目前,对具有耐盐性反硝化细菌的报道较少。耐盐反硝化细菌为了平衡细胞内外渗透压,会在胞内产生一定浓度相容性溶质。四氢嘧啶(ectoine)又称1,4,5,6-四氢-2-甲基-嘧啶羧酸,是一种环状氨基酸衍生物<sup>[15]</sup>,可帮助微生物抵御环境胁迫如紫外辐射、高渗透压等<sup>[16]</sup>。四氢嘧啶在医学、化妆品和生物保护等领域具有广泛用途,如可用于制作个人防护装备来增强抗菌抗病毒性能<sup>[17]</sup>,添加在化妆品中可以延缓肌肤老化美白等<sup>[18]</sup>,在癌症方面可以添加在化疗保护剂中<sup>[19]</sup>,还可以用作药剂预防帕金森氏病等<sup>[20]</sup>。

本研究从连云港海边土壤中筛选一株耐高盐反硝化细菌,并且探究其耐盐能力、脱氮效果、产四氢嘧啶能力及最适培养条件,以期为

生物法处理高盐、高硝态氮废水提供菌株,为含盐污水的处理提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

样品采自连云港在海一方公园海岸土壤(34°45'31.98"N, 119°22'12.86"E)。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

酵母粉、蛋白胨、NaCl、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{CH}_3\text{COOH}$ 、 $\text{CH}_3\text{COONa}$ 、乙醇、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{FeSO}_4$ 、甲胺、戊二醛、可溶性淀粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、浓氨水,阿拉丁试剂(上海)有限公司。乙腈和甲醇为色谱纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司。

DNA提取试剂盒和细菌微量生化反应管,生工生物工程(上海)股份有限公司;硝态氮检测试剂盒和亚硝态氮检测试剂盒,北京连华科技有限公司。

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,Agilent公司;酶标仪,Thermo公司;多参数水质分析仪,北京连华科技有限公司;Quanta 450 FEG 带能谱仪场发射扫描电镜,Thermo公司。

#### 1.1.3 培养基

筛选培养基(g/L):甘油0.25,葡萄糖0.25,甲醇0.50,甲胺0.20,苯酚0.10,苯胺0.050,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0.25,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.25,酵母粉0.10,蛋白胨0.20,牛肉膏0.20,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.35,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.10,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.25,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.25,尿素0.25,  $\text{NaNO}_3$  0.25,  $\text{MgSO}_4$  0.10,  $\text{CaCl}_2$  0.10, NaCl 45.25,琼脂(固体培养基添加)20.00。

反硝化脱氮培养基(g/L):  $\text{KNO}_3$  0.40,乙酸钠1.28, NaCl 30.00,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.30,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03, pH 7.0。

四氢嘧啶诱导培养基(g/L): 葡萄糖 10.00, 酵母粉 3.00, NaCl 150.00 (菌株可以生长的最高盐浓度),  $\text{MgSO}_4$  2.00,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.55,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.005 0,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.00,  $\text{CaCl}_2$  0.20。

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 30.0。

明胶培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 葡萄糖 20.0, 明胶 200.0, pH 7.4。

## 1.2 菌株的分离与筛选

配制 NaCl 浓度为 5% 的 LB 液体培养基, 并加入甘油 250 mg/L、葡萄糖 250 mg/L、甲醇 50 mg/L, 在 30 °C、160 r/min 条件下对土壤样品富集培养 24 h, 培养液明显浑浊, 镜检菌群种类丰富多样, 将培养液以 10 倍倍比进行梯度稀释, 取 10  $\mu\text{L}$  稀释液均匀涂布在固体筛选培养基上, 35 °C 培养直至长出菌落。将单菌落进一步分离纯化, 选取反硝化能力最好的菌株编号为 YA16-1。

## 1.3 菌株鉴定

### 1.3.1 菌株的形态特征观察

菌株 YA16-1 种子液以 1% 的接种量接至 LB 液体培养基中, 30 °C、160 r/min 培养 20 h 后, 取适量菌液进行革兰氏染色, 用光学显微镜观察菌体形态。取 30 °C、160 r/min 培养 20 h 的菌液 2 mL, 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。菌体用蒸馏水清洗 3 次, 用磷酸缓冲液清洗 1 次, 15 000 r/min 离心 5 min 弃上清。将沉淀物加适量纯水制成悬浮液, 干燥后, 滴加 0.1% 戊二醛溶液固定 1 h, 滴加 0.5% 戊二醛溶液置换固定 2 h, 最后滴加 2.5% 戊二醛溶液 4 °C 固定 12 h<sup>[21]</sup>, 对样品进行扫描电子显微镜观察。

### 1.3.2 菌株生理生化特性

取 35  $\mu\text{L}$  菌液接种到 13 种细菌微量生化反应管[乳糖、甘露糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗

糖、阿拉伯糖、硝酸盐(还原)、尿素、 $\text{H}_2\text{S}$ 、蕈糖、七叶苷、木糖、果糖]以及明胶培养基中, 然后将反应管及培养基排列整齐, 于 35 °C 培养箱中培养 18–24 h, 观察并记录结果, 明胶培养基培养 48–72 h 观察结果。

### 1.3.3 菌株的 16S rRNA 基因序列分析

用 DNA 提取试剂盒提取菌株 YA16-1 的 DNA, 扩增引物为 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGCTT-3')。PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): PCR Mix (2 $\times$ ) 25  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , 模板(204 ng/ $\mu\text{L}$ ) 4  $\mu\text{L}$ , 无菌水 19  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序得到的序列提交 GenBank 进行 BLAST 比对, 选取相似性最高的 19 株菌, 使用 MEGA 7.0 软件以 neighbor-joining 法采用 bootstrap analysis 构建系统发育树。

## 1.4 菌株耐盐范围测定及反硝化能力测定

### 1.4.1 菌株耐盐范围的初步探究

种子液以 10% 的接种量接种于不同盐度梯度(3%、5%、10% 和 15%) 的 LB 液体培养基中, 30 °C、160 r/min 培养, 每 4 h 取适量菌液测定其  $OD_{600}$  值。

### 1.4.2 菌株反硝化能力测定

种子液以 20% 的接种量接种于反硝化脱氮培养基中(初始硝态氮浓度为 55 mg/L, C/N 为 20/1), 30 °C、120 r/min 培养 48 h。定时取样测定硝态氮和亚硝态氮浓度。

### 1.4.3 氮源浓度对菌株反硝化能力的影响

种子液以 20% 的接种量接种于不同浓度硝态氮的反硝化脱氮培养基中(初始硝态氮浓度设置为 100、150、200 和 250 mg/L), 同时增加培养基中乙酸钠的量, 保证培养基中 C/N 为 20/1,

30 °C、120 r/min 培养 48 h。定时测定硝态氮和亚硝态氮浓度。

## 1.5 菌株培养条件研究

### 1.5.1 温度、pH 及盐度对菌株生长的影响

#### 1) 温度对菌株生长的影响

种子液以 10%的接种量接种于 LB 液体培养基中。在不同温度(20、25、30、35、40 和 45 °C)下, 160 r/min 培养 24 h 检测菌液  $OD_{600}$  值。

#### 2) pH 对菌株生长的影响

种子液以 10%的接种量接种于不同 pH 值的 LB 液体培养基中。在最适温度下, 160 r/min 培养 24 h 检测菌液  $OD_{600}$  值(pH 梯度: 乙酸-乙酸钠缓冲液: 4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0; MES 缓冲液: 5.0、5.5 和 6.0; PIPES 缓冲液: 6.5、7.0; HEPES 缓冲液: 7.5、8.0; NaOH: 9.0、10.0 和 11.0)。

#### 3) 盐度对菌株生长的影响

种子液以 10%的接种量接种于不同盐度(0%、2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%和 20%)的 LB 液体培养基中, pH 为最适 pH, 在最适温度下, 160 r/min 培养 24 h 检测菌液  $OD_{600}$  值。

### 1.5.2 碳、氮源对菌株生长的影响

选择 15 种碳源(乙酸钠、葡萄糖、蔗糖、淀粉、麸皮、甘油、玉米淀粉、麦芽糊精、红糖、甲醇、玉米芯粉、米糠、乳糖、蕈糖、麦芽糖)和 14 种氮源(牛肉膏、大豆蛋白胨、氯化铵、硫酸铵、硝酸钠、酵母粉、玉米浆、柠檬酸氢二铵、麦芽浸粉、鱼粉蛋白胨、干酪素、豆粕、尿素、亚硝酸钠), 其中, 氮源培养基原配方中酵母粉 5 g/L 改为葡萄糖 10 g/L, 采用优化后 pH、盐度和温度, 160 r/min 培养 24 h 检测其  $OD_{600}$  值。

## 1.6 菌株产四氢嘧啶能力检测

菌株 YA16-1 于 30 °C、160 r/min 培养 20 h,

以 5%接种量接种于诱导培养基, 30 °C、160 r/min 培养 84 h, 采用改良乙醇抽提法抽提细菌胞内四氢嘧啶。用等渗的 NaCl 溶液充分洗涤菌体沉淀 2 次, 10 000 r/min 离心 5 min, 加入 5 mL 70 °C的 80%乙醇溶液, 剧烈涡旋抽提四氢嘧啶 30 min, 10 000 r/min 离心 15 min; 抽提 2 次, 上清液约 10 mL 于 50 °C旋蒸干燥, 用 3 mL 超纯水重溶。采用色谱柱 SB C18 (4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m, Agilent), 流速 1.0 mL/min, 流动相 A (水), 流动相 B (乙腈)、流动相比比例 A:B 为 10:90, 柱温 30 °C, 检测波长 204 nm, 进样量 2  $\mu$ L, 保留时间 4 min, 通过高效液相色谱检测菌体的四氢嘧啶含量。

## 1.7 分析方法

硝态氮采用酚二磺酸光度法<sup>[22]</sup>测定; 亚硝态氮采用 N-(1-萘基)-乙二胺光度法<sup>[22]</sup>测定; 四氢嘧啶含量测定采用高效液相色谱法。

# 2 结果与讨论

## 2.1 菌株 YA16-1 的分离与鉴定结果

### 2.1.1 菌株形态特征结果

将菌株 YA16-1 进行革兰氏染色观察, 结果见图 1A, 菌株为革兰氏阳性菌。菌株在扫描电镜下形态见图 1B, 可见细菌个体为短杆状。菌株在筛选培养基中的菌落形态见图 1C, 观察菌落形态特征发现, 该菌株的单菌落为圆形, 橙色, 边缘光滑, 直径约为 2.0–3.0 mm。

### 2.1.2 菌株生理生化特性结果

由表 1 可知, 菌株 YA16-1 明胶液化呈阴性, 不水解或发酵木糖, 不能产生硫化氢, 不能利用尿素, 可还原硝酸盐, 可以发酵或水解乳糖、甘露糖、蕈糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、葡萄糖和七叶苷。以上生理生化结果表明菌株 YA16-1 符合表皮短杆菌(*Brevibacterium epidermidis*)特征。

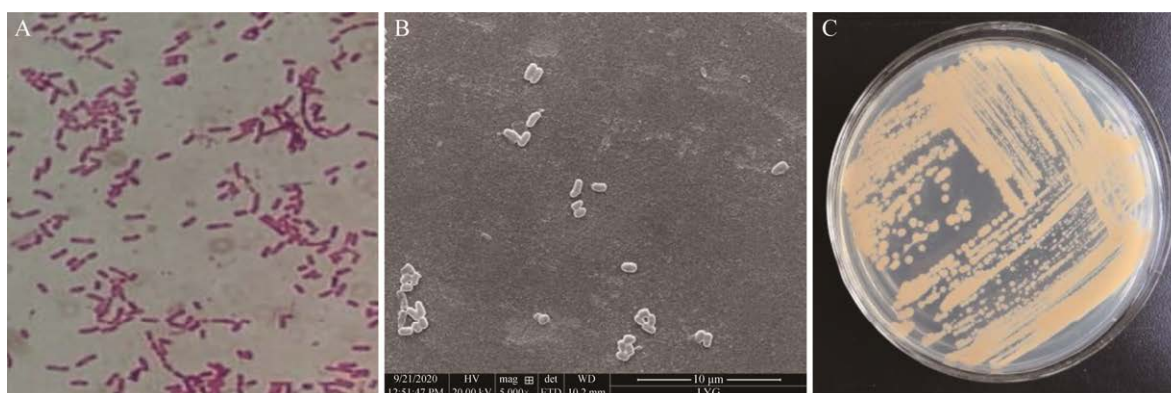


图1 菌株 YA16-1 形态特征观察 A: 光学显微镜下菌株个体形态(10×100). B: 扫描电镜下菌株个体形态(×5 000). C: 菌株菌落形态特征

Figure 1 Observation of morphological characteristics of strain YA16-1. A: Individual morphology of strain under optical microscope (10×100). B: Individual morphology of the strain under scanning electron microscope (×5 000). C: Morphological characteristics of bacterial colonies.

### 2.1.3 菌株 16S rRNA 基因序列分析结果

16S rRNA 基因序列为 1 397 bp, 提交 GenBank 数据库进行同源性比对, 菌株 YA16-1 为短杆菌属(*Brevibacterium* sp.)。用软件 MEGA

7.0 构建系统发育树, 如图 2 所示: 菌株 YA16-1 与 *Brevibacterium epidenmidis* 关系最接近, 相似度达到 99.57%, 确定菌株 YA16-1 为表皮短杆菌(*B. epidenmidis*)。菌株 YA16-1 为短杆菌属, 是不生孢子、革兰氏阳性的杆状细菌。

## 2.2 菌株耐盐范围的测定及反硝化能力

### 2.2.1 菌株耐盐范围的初步探究结果

如图 3 所示, 菌株 YA16-1 在 3% 盐度下生长速度最快, 生长量最高, 最高  $OD_{600}$  值可达 1.54。同时, 菌株生长速度随盐度的增长而降低, 但在 15% 的高盐下菌株仍可生长, 在 48 h 左右  $OD_{600}$  值达到 1.34, 初步判定该菌株有较高的耐盐能力, 可适应高盐环境。Wang 等<sup>[23]</sup>分离的耐盐反硝化细菌 F1 最高可耐受 7% 盐度, 最高可在 1% 盐度下保持较高的反硝化能力。Cheng 等<sup>[24]</sup>从海堤泥水分离的耐盐反硝化菌 F2 最高可耐受 7% 盐度, 最高可在 3% 盐度下保持较高的反硝化能力。菌株 YA16-1 对盐的耐受能力优于菌株 F1 和菌株 F2, 最高可在 15% 盐度下良好生长, 并且可在 3% 盐度下 18 h 内将 97% 的硝态氮转化成亚硝态氮, 在高盐条

表1 生理生化反应结果

Table1 Physiological and biochemical reaction results of the strain

生理生化指标	Strain YA16-1
Physiological and biochemical indicators	
乳糖 Lactose	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
阿拉伯糖 Arabinose	+
葡萄糖 Glucose	+
硫化氢 Hydrogen sulfide	-
尿素 Urea	-
甘露糖 Mannose	+
蕈糖 Muscarine	+
果糖 Fructose	+
木糖 Xylose	-
七叶苷 Heptaoside	+
麦芽糖 Maltose	+
蔗糖 Sucrose	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.



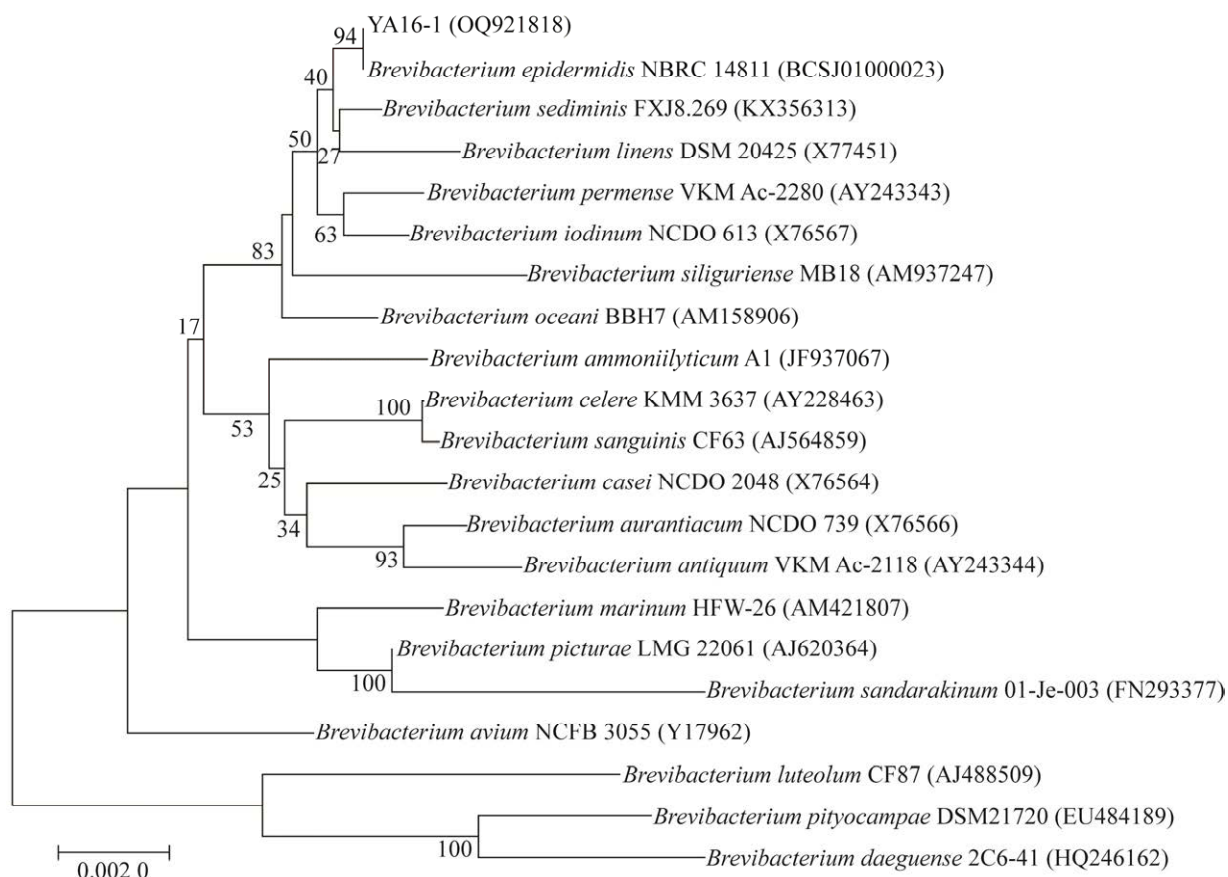


图2 菌株 YA16-1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号表示该菌在 GenBank 数据库中的登录号; 分支上的数字表示置信度; 标尺代表遗传系数

Figure 2 Phylogenetic tree constructed by strain YA16-1 based on 16S rRNA gene sequences. The serial number in parentheses indicates GenBank accession number; The number at the branch represents the confidence interval; The scale represents the coefficient of genetic variation.

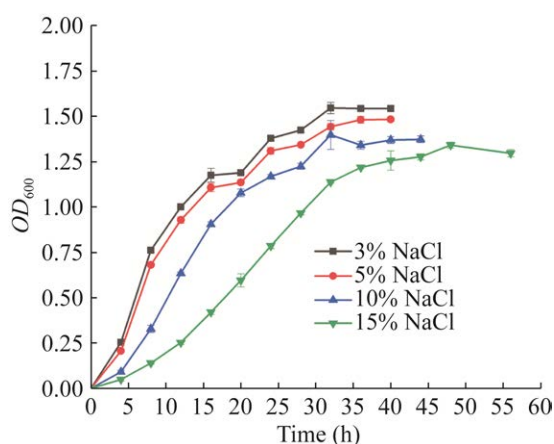


图3 菌株 YA16-1 在不同盐度下的生长情况

Figure 3 Growth of strain YA16-1 at different salinity.

件下具备更好的反硝化能力。菌株 YA16-1 具有应用于处理高盐含氮废水的可能。

## 2.2.2 菌株反硝化能力

由图 4 可知, 在 3% 盐度下, 菌株 YA16-1 在培养至 6 h 时硝态氮转化率达到 69%, 18 h 时硝态氮转化率已经达到 97%, 此后硝态氮含量趋于平稳, 证明该菌株可利用硝酸盐进行反硝化, 将硝态氮转化为亚硝态氮, 同时亚硝态氮浓度呈现先高后低的趋势, 在 24 h 之后亚硝态氮含量降低。赵丹等<sup>[25]</sup>研究表明, 菌株 ZD-8 亚硝态氮在 6 h 积累量达到最高, 之后逐渐

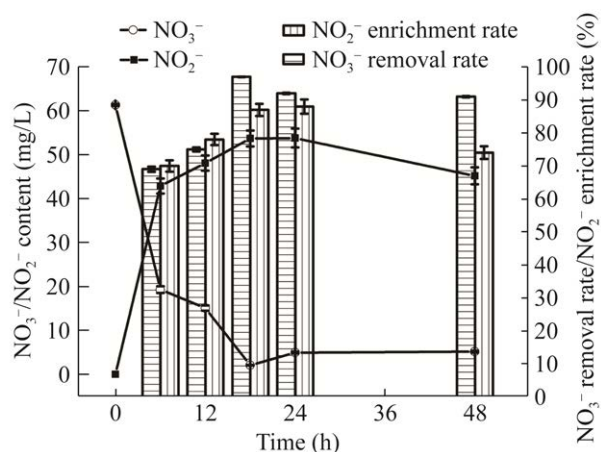


图4 菌株YA16-1反硝化能力

Figure 4 Denitrification capability of strain YA16-1.

降低, 与本研究结果相似。同时发现菌株处于对数期时反硝化速率最快, 在平稳期时去除率达到最大, 证明该菌株在对数期时大量利用硝态氮来促进其生长<sup>[26]</sup>。张成龙等<sup>[27]</sup>将反硝化细菌应用到人工湿地中, 结果发现菌株 *Acinetobacter johnsonii* ZX<sub>2</sub> 在湿地运行初脱氮率为 86%, 在湿地运行末期脱氮率达到 93%; 菌株 *Pseudomonas putida* ZF<sub>7</sub> 在湿地运行初脱氮率为 83%, 在湿地运行末期脱氮率达到 91%, 与本试验具有相似的结果, 但本试验菌株 YA16-1 反硝化速率更快。本试验最初将 C/N 设置为 10/1, 结果发现在 48 h 时硝态氮去除率只有 78.3%, 证明 C/N 也对菌株反硝化能力有影响。周钱刚等<sup>[28]</sup>研究表明 C/N 对菌株硝态氮的降解有很大影响, C/N 在 5.0 左右时去除效果平均为 50%, 当 C/N 大于 7 后系统对硝态氮的去除率可达 70%。

### 2.2.3 氮源浓度对菌株反硝化能力的影响结果

不同浓度梯度硝态氮对菌株反硝化能力有一定的影响。接种菌液后每 24 h 取样测定硝态氮和亚硝态氮浓度。结果如图 5 所示, 在 3% 盐度下, 该菌株对硝态氮转化率随初始硝态氮浓度的增加而增加, 初始硝态氮浓度为 200 mg/L

时, 菌株 48 h 内硝态氮转化率达到 93%, 而初始硝态氮浓度为 250 mg/L 时, 菌株 24 h 内硝态氮几乎全部转化, 证明氮源含量越高, 菌株活性越高, 从而反硝化能力增强。司圆圆等<sup>[29]</sup>对反硝化培养基进行了优化, 以 NaNO<sub>2</sub> 为氮源、Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O 为碳源、pH 值为 7.0、温度为 30 °C、转速为 160 r/min, 测得菌株脱氮率为 96.5%, 与本试验有类似的结果。然而本试验只增加了初始氮浓度, 其他条件均未改变, 证明本菌株反硝化能力更强。多种因素均可影响菌株的反硝化能力, 蔡茜<sup>[30]</sup>的研究表明: Fe<sup>3+</sup> 对菌株的反硝化能力有重大影响, 当 Fe<sup>3+</sup> 浓度达到 15 mg/L 时, 硝态氮几乎全部去除, 与未加 Fe<sup>3+</sup> 去除速率提升了近 30%; 而朱云等<sup>[31]</sup>研究了摇床转速对菌株反硝化速率的影响, 当转速为 50 r/min 时, 硝态氮去除率为 9.19%; 当转速上升至 100 r/min 时, 硝态氮去除率为 93.33%; 当转速继续上升至 150 r/min 时, 硝态氮去除率为 99.35%。完整的反硝化过程为细菌将硝态氮还原成亚硝态氮再进一步将亚硝态氮还原成氮气或含氮气体<sup>[32]</sup>。菌株 YA16-1 不能完成整个反硝化作用, 该菌主要将硝态氮还原为亚硝态氮来实现反硝化作用。研究发现厌氧氨氧化 (anammox) 菌能以 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 作为电子受体将 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 氧化成氮气。薛晶晶等<sup>[33]</sup>通过短程硝化-厌氧氨氧化耦合短程反硝化工艺处理废水, 可实现对废水中总氮去除率达到 78.9%。短程反硝化菌可配合厌氧氨氧化菌形成耦合工艺用于去除水体中的氨氮、硝氮及亚硝氮<sup>[34]</sup>。

### 2.3 菌株培养条件

图 6A 结果表明, 菌株在 20–30 °C 内生长良好, 并且在 30 °C 生长状况最佳。30 °C 以上菌株生长速度逐渐降低, 45 °C 时菌株几乎不能生长, 说明菌株体内蛋白质类物质会随温度升高而活性下降, 代谢过程停止, 最终导致菌株



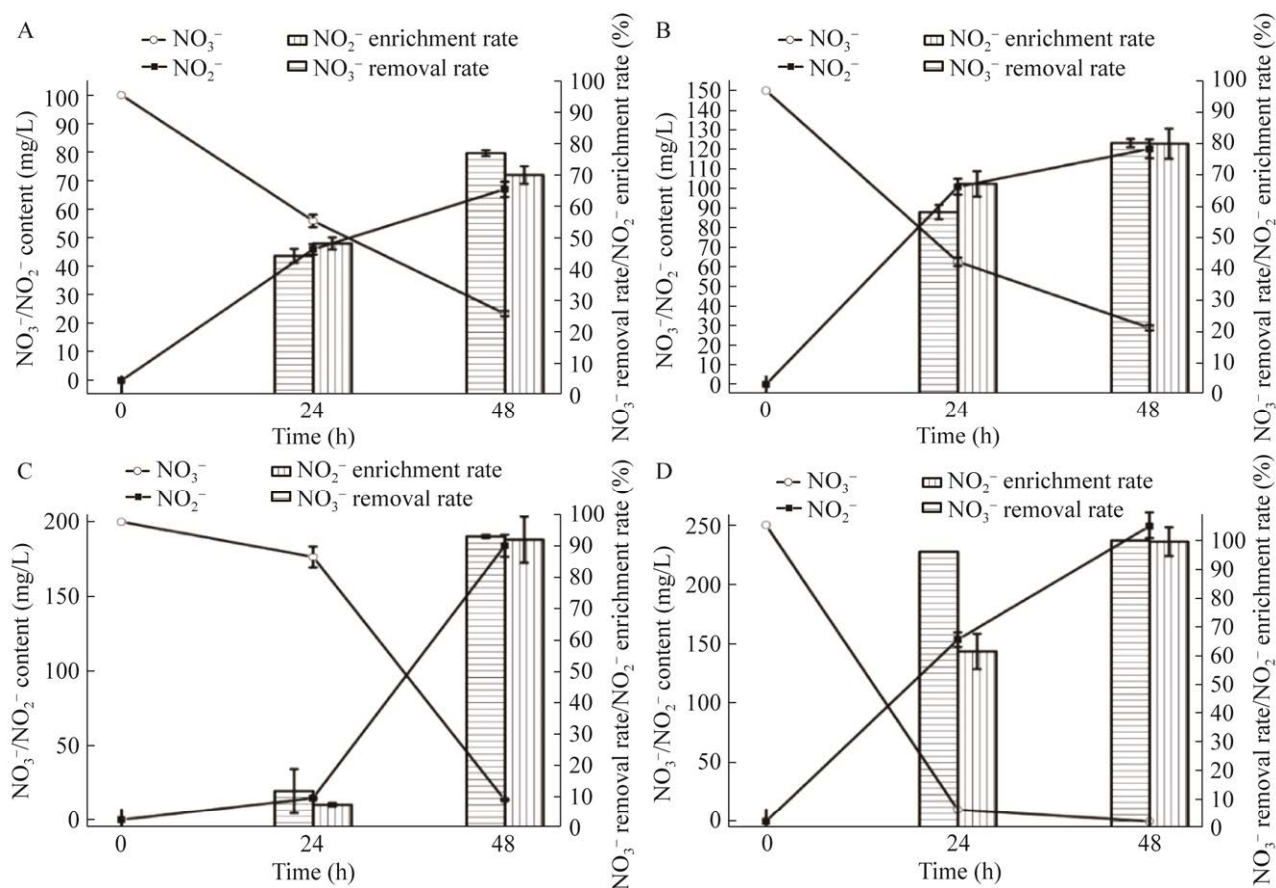


图5 菌株YA16-1不同氮源浓度下的反硝化能力 A: 初始氮源浓度为100 mg/L. B: 初始氮源浓度为150 mg/L. C: 初始氮源浓度为200 mg/L. D: 初始氮源浓度为250 mg/L

Figure 5 Denitrification capability of strain YA16-1 at different concentrations of nitrogen sources. A: Initial nitrogen source concentration of 100 mg/L. B: Initial nitrogen source concentration of 150 mg/L. C: Initial nitrogen source concentration of 200 mg/L. D: Initial nitrogen source concentration of 250 mg/L.

死亡。图6B结果表明菌株在pH值小于5.0和pH值大于10.0的范围下生长速度缓慢,在pH 5.0–8.0之间生长状况良好,并在pH 6.0(乙酸-乙酸钠缓冲液)时生长量最大,证明该菌适合在弱酸性、偏中性的环境中生长。过高或过低的pH值会破坏细胞稳态,抑制菌株生理活性<sup>[35]</sup>。图6C结果表明,该菌株在0%–2%盐度下生长速度逐渐提高,盐度大于2%时,菌株的生长速度随盐度的增加而降低,最适盐度在2%左右。但在14%以下盐度依然保持较高的生长量,证明该菌株在较高盐度的环境下也可生

长,也体现出盐度过高会使细菌脱水、中毒、物质吸收过程受干扰阻断,从而对细菌生长产生影响。图6D、6E结果表明,该菌株最适碳源为玉米芯粉,最适氮源为酵母粉。固体有机碳源具有缓慢释放有机物的优点而成为液体碳源的替代碳源,微生物则可利用纤维素类碳源中的可溶性碳源和易分解物质促进其生长。同时,玉米芯粉具有价格低、易获取和使用成本较低等特点,有利于菌株制剂的生产。本研究为大规模制备菌剂提供理论基础。

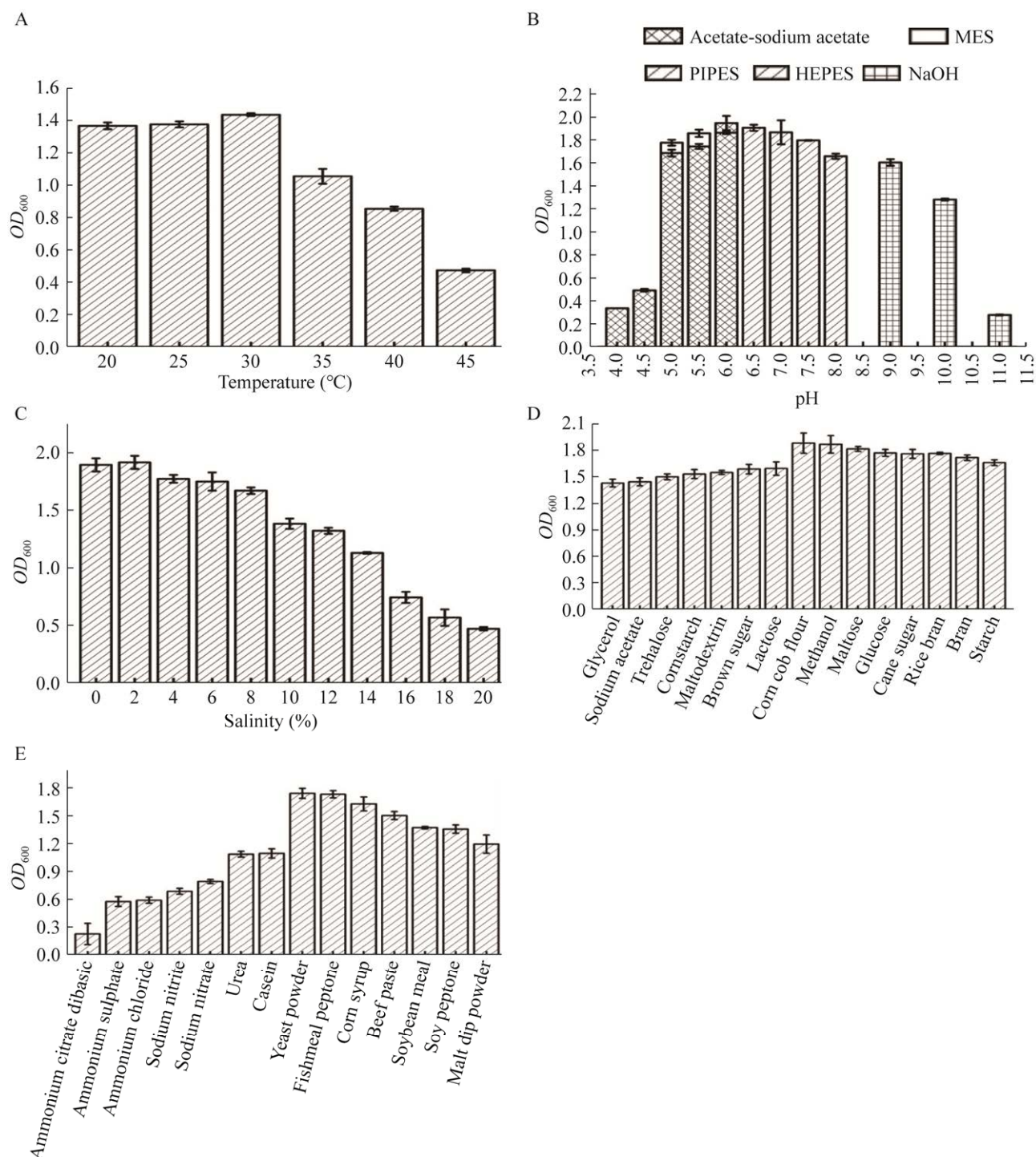


图 6 温度(A)、pH (B)、盐度(C)、碳源(D)和氮源(E)对菌株 YA16-1 生长的影响

Figure 6 Effects of temperature (A), pH (B), salinity (C), carbon source (D) and nitrogen source (E) on the growth of strain YA16-1.

## 2.4 菌株产渗透压补偿溶质(四氢嘧啶)能力

选择 15%盐度的四氢嘧啶诱导培养基诱导菌株 YA16-1 合成四氢嘧啶,采用改良乙醇抽提法抽提细菌胞内四氢嘧啶,然后使用高效液相色谱检测四氢嘧啶产量,结果如图 7 所示,四氢嘧啶出峰时间在 4 min 左右,最高测量值可达 0.89 mg/mL。Onraedt 等<sup>[36]</sup>研究发现在可耐受盐度范围内表皮短杆菌四氢嘧啶产量与盐度呈正相关关系。耐盐菌可通过积累 KCl、Na 输出或合成相容性物质来维持细胞内外渗透压平衡<sup>[37]</sup>。在 15%盐度下菌株 YA16-1 可通过在细胞内累积四氢嘧啶来抵御高盐环境胁迫。韦娜<sup>[38]</sup>筛选到一株盐单胞菌 *Halmonaselogata elongata* N4,同样采取乙醇抽提法,在盐度为 5%时测得四氢嘧啶产生量为 0.447 g/L;洪煜等<sup>[39]</sup>在 10%盐度下诱导菌株 *Extereme halophilic* JG5 合成四氢嘧啶,测得产量为 80.35 mg/L,相比之下本试验菌株四氢嘧啶产量较高。Xu 等<sup>[40]</sup>从

酱油残留物中分离所得芽孢杆菌(*Bacillus*),研究发现这些菌株通过合成四氢嘧啶来抵御外界高渗透压环境;王慧敏等<sup>[41]</sup>研究盐单胞菌 Y (*Halomonas* sp.)发现该菌株在耐受反复的渗透压冲击时可合成与释放四氢嘧啶以抵御环境胁迫。菌株 YA16-1 通过合成四氢嘧啶协助抵御盐胁迫,可使本菌株较好地应用于耐盐环境。

## 3 结论

从连云港海岸土壤样品中筛选获得了一株对硝态氮进行反硝化作用强的菌株 YA16-1,经形态学、生理生化和 16S rRNA 基因序列鉴定为表皮短杆菌(*B. epidermidis*)。该菌株能在盐度为 2%–15%的培养基内生长良好,菌株最适盐度为 2% NaCl,最适生长碳氮、源为玉米芯粉和酵母粉,最适生长温度和 pH 值为 30 °C 和 6.0。在盐度为 3%的反硝化培养基中,18 h 内对硝氮转化率达到 97%;初始硝态氮浓度为

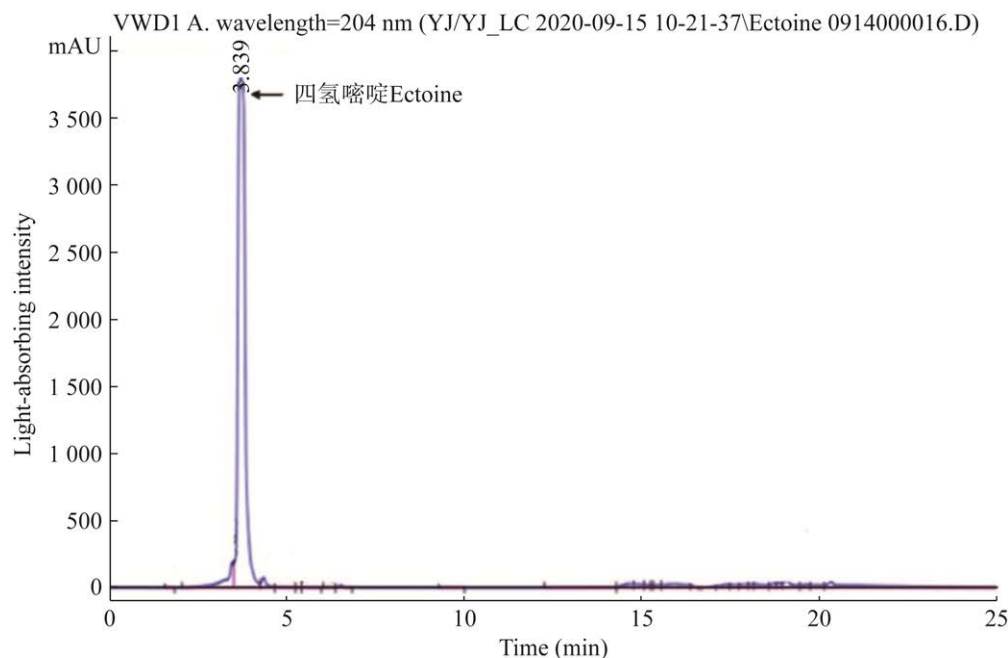


图 7 菌株 YA16-1 产四氢嘧啶液相色谱结果

Figure 7 Liquid chromatography results of ectoine-producing strain YA16-1.

250 mg/L 时, 菌株 24 h 内硝态氮转化率达到 100%。与其他耐盐反硝化细菌相比, 菌株 YA16-1 具有更好的耐盐性、更高的硝态氮转化速率及更高的四氢嘧啶产量。该菌株在 15% 盐度环境下, 四氢嘧啶的产量可达到 0.89 mg/mL。反硝化菌株在污水处理中具有广阔的应用前景。研究结果为反硝化细菌应用于含盐污水处理提供了依据, 也为进一步优化四氢嘧啶的产量以及相关基因的挖掘打下了基础。

## REFERENCES

- [1] VINOTHKUMAR R, DAR JY, BHARTI VS, SINGH A, VENNILA A, BHAT IA, PANDEY PK. Heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacteria: characterization and comparison of shrimp pond and effluent discharge channel in aspects of composition and function[J]. *Aquaculture*, 2021, 539: 736659.
- [2] LIU X, LI X, PENG Y, ZHANG Q, JIANG H, JI J. Synergistic partial denitrification, anammox and *in situ* fermentation (SPDAF) process for treating domestic and nitrate wastewater: response of nitrogen removal performance to decreasing temperature[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 125865.
- [3] 中华人民共和国生态环境部, 2022 中国生态环境状况公报[R]. 2022, [www.mee.gov.cn/hjzl/sthjzk/](http://www.mee.gov.cn/hjzl/sthjzk/). Ministry of Ecology and Environment of the People's Republic of China, 2022 China Ecological Environment Status Bulletin[R]. 2022, [www.mee.gov.cn/hjzl/sthjzk/](http://www.mee.gov.cn/hjzl/sthjzk/) (in Chinese).
- [4] 刘刚. 生活饮用水中的氨氮污染问题探讨[J]. *中国高新技术企业*, 2011(18): 146-148.  
LIU G. Discussion on ammonia nitrogen pollution in drinking water[J]. *China High Technology Enterprises*, 2011(18): 146-148 (in Chinese).
- [5] WANG LS, FU WZ, ZHUGE YP, WANG J, YAO FF, ZHONG WZ, GE XH. Synthesis of polyoxometalates (POM)/TiO<sub>2</sub>/Cu and removal of nitrate nitrogen in water by photocatalysis[J]. *Chemosphere*, 2021, 278: 130298.
- [6] ZHAO XY, ZHAO K, QUAN X, CHEN S, YU HT, ZHANG ZH, NIU JF, ZHANG SS. Efficient electrochemical nitrate removal on Cu and nitrogen doped carbon[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 415: 128958.
- [7] CHEN H, LIU K, YANG E, CHEN J, GU Y, WU S, YANG M, WANG H, WANG D, LI H. A critical review on microbial ecology in the novel biological nitrogen removal process: dynamic balance of complex functional microbes for nitrogen removal[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 857: 159462.
- [8] MENG S, LING Y, YANG MY, ZHAO XG, OSMAN AI, AL-MUHTASEB AH, ROONEY DW, YAP PS. Recent research progress of electrocatalytic reduction technology for nitrate wastewater: a review[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2023, 11(2): 109418.
- [9] SUI MR, LI Y, JIANG YY, WANG LF, ZHANG WL, SATHISHKUMAR K, ZAKARIA H. Sediment-based biochar facilitates highly efficient nitrate removal: Physicochemical properties, biological responses and potential mechanism[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 405: 126645.
- [10] LIU H, OUYANG F, CHEN Z, CHEN Z, LICHTFOUSE E. Weak electricity stimulates biological nitrate removal of wastewater: hypothesis and first evidences[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 757: 143764.
- [11] 姚晓丽, 梁运祥. 一株反硝化细菌在景观水净化处理中的应用[J]. *环境科学与技术*, 2006, 29(11): 62-64, 118.  
YAO XL, LIANG YX. Field study of landscape water purification using a strain of denitrification bacteria[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 29(11): 62-64, 118 (in Chinese).
- [12] KERN C, BOOPATHY R. Use of sequencing batch reactor in the treatment of shrimp aquaculture wastewater[J]. *Journal of Water Sustainability*, 2012, 2(4): 221-232.
- [13] 王凤, 叶正芳. 固定化微生物滤池去除地下水中硝酸盐的研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(23): 11121-11123.  
WANG F, YE ZF. Study on the removal of nitrate from groundwater with immobilized biofilter[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(23): 11121-11123 (in Chinese).
- [14] XU A, YU D, QIU Y, CHEN G, TIAN Y, WANG Y. A novel process of salt tolerance partial denitrification and anammox (ST-PDA) for treating saline wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 345: 126472.
- [15] BECKER J, WITTMANN C. Microbial production of extremolytes—high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being[J]. *Current*



- Opinion in Biotechnology, 2020, 65: 118-128.
- [16] 孙晓康, 张艳艳, 张晓元, 刘飞. 四氢嘧啶生物合成与应用研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2022, 53(6): 976-983.
- SUN XK, ZHANG YY, ZHANG XY, LIU F. Research progress in biosynthesis and application of ectoine[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition), 2022, 53(6): 976-983 (in Chinese).
- [17] GUO S, YU B, AHMED A, CONG H, SHEN Y. Synthesis of polyacrylonitrile/polytetrahydropyrimidine (PAN/PTHP) nanofibers with enhanced antibacterial and anti-viral activities for personal protective equipment[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 424: 127602.
- [18] THANIGAIMALAI P, LEE KC, BANG SC, LEE JH, YUN CY, ROH E, HWANG BY, KIM Y, JUNG SH. Inhibitory effect of novel tetrahydropyrimidine-2(1H)-thiones on melanogenesis[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010, 18(3): 1135-1142.
- [19] BARI A, PARVEZ MK, ALI KHAN A, ALANAZI AM, ALI SYED S, AL-DOSARI MS, ALOBAID AM. A facile one-pot synthesis and anticancer evaluation of novel substituted 1,2-dihydropyridine and 1,2,3,4-tetrahydropyrimidine analogues[J]. Journal of Heterocyclic Chemistry, 2016, 53(2): 377-382.
- [20] ELUMALAI K, ALI M A, ELUMALAI M, ELURI K, SRINIVASAN S. Acetylcholinesterase enzyme inhibitor activity of some novel pyrazinamide condensed 1,2,3,4-tetrahydropyrimidines[J]. Biotechnology Reports, 2015, 5: 1-6.
- [21] 刘恺, 密玲煜, 刘玲玲, 李洋. 不同扫描电镜制样方法观察棉花叶片气孔[J]. 生命科学研究, 2020, 24(4): 293-300.
- LIU K, MI LY, LIU LL, LI Y. Different SEM sample preparation methods to observe the stomata of cotton leaves[J]. Life Science Research, 2020, 24(4): 293-300 (in Chinese).
- [22] WANG QH, YU LJ, LIU Y, LIN L, LU RG, ZHU JP, HE L, LU ZL. Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: a review[J]. Talanta, 2017, 165: 709-720.
- [23] WANG XY, ZHU H, SHUTES B, FU BR, YAN BX, YU XF, WEN HY, CHEN X. Identification and denitrification characteristics of a salt-tolerant denitrifying bacterium *Pannonibacter phragmitetus* F<sub>1</sub>[J]. AMB Express, 2019, 9: 193.
- [24] CHENG R, WANG XY, ZHU H, YAN BX, SHUTES B, XU YY, FU BR, WEN HY. Isolation and characterization of a salt-tolerant denitrifying bacterium *Alishewanella* sp. F<sub>2</sub> from seawall muddy water[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 10002.
- [25] 赵丹, 于德爽, 李津, 汪晓晨. 菌株 ZD8 的分离鉴定及其异养硝化和缺氧/好氧反硝化特性研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(11): 3007-3016.
- ZHAO D, YU DS, LI J, WANG XC. Isolation and identification of a bacterial strain ZD8 and its characteristics of heterotrophic nitrification and anoxic/oxic denitrification[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(11): 3007-3016 (in Chinese).
- [26] 唐婧, 肖亚男, 屈姗姗, 傅金祥, 孙艺齐, 吴瑞, 高慧. 一株耐盐好氧反硝化细菌的分离鉴定及其脱氮特性[J]. 环境工程学报, 2014, 8(12): 5499-5506.
- TANG J, XIAO YN, QU SS, FU JX, SUN YQ, WU R, GAO H. Identification and denitrification characteristics of a strain of halophilic denitrifying bacteria[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8(12): 5499-5506 (in Chinese).
- [27] 张成龙, 李冰, 侯诒然, 封功成, 陶冶, 朱健. 复合垂直直流人工湿地中硝化和反硝化细菌的筛选及其特性分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(4): 736-744.
- ZHANG CL, LI B, HOU YR, FENG GC, TAO Y, ZHU J. Screening and characterization of nitrifying bacteria and denitrifying bacteria in integrated vertical subsurface flow constructed wetlands[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(4): 736-744 (in Chinese).
- [28] 周钱刚, 李林宝. A/O-MBR 工艺低温下缺氧段反硝化效果影响因素研究[J]. 中国资源综合利用, 2008, 26(10): 10-12.
- ZHOU QG, LI LB. Affecting factors of denitrification in anoxic-oxic MBR process at low temperature[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2008, 26(10): 10-12 (in Chinese).
- [29] 司圆圆, 陈兴汉, 许开航, 余祥勇. 耐盐好氧反硝化细菌 X12 的分离及反硝化特性[J]. 农业工程, 2017, 7(2): 68-71.
- SI YY, CHEN XH, XU KH, YU XY. Isolation and denitrification characteristics of salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain X12[J]. Agricultural Engineering, 2017, 7(2): 68-71 (in Chinese).
- [30] 蔡茜. 铁与铜离子对 *Arthrobacter nicotianae* D51 异养硝化和好氧反硝化作用的影响[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2019.
- CAI X. Effect of iron and copper ions on heterotrophic nitrification and aerobic denitrification of *Arthrobacter nicotianae* D51[D]. Chongqing: Master's Thesis of

- Southwestern University, 2019 (in Chinese).
- [31] 朱云, 龚望宝, 谢骏, 王广军, 余德光, 李志斐, 张凯, 田晶晶. 好氧反硝化细菌的鉴定及其脱氮特性研究[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 895-903.
- ZHU Y, GONG WB, XIE J, WANG GJ, YU DG, LI ZF, ZHANG K, TIAN JJ. Identification and denitrification characteristics of the aerobic denitrifying bacteria *Pseudomonas furukawaii* zs1[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(4): 895-903 (in Chinese).
- [32] YANG J, FENG L, PI S, CUI D, MA F, ZHAO HP, LI A. A critical review of aerobic denitrification: insights into the intracellular electron transfer[J]. Science of the Total Environment, 2020, 731: 139080.
- [33] 薛晶晶, 雷振, 王俊, 陈荣. 一段式短程反硝化耦合厌氧氨氧化工艺处理厌氧膜生物反应器出水[J]. 环境工程学报, 2022, 16(3): 788-797.
- XUE JJ, LEI Z, WANG J, CHEN R. Treatment of effluent from anaerobic membrane bioreactor by one-stage partial denitrification coupled with anammox[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2022, 16(3): 788-797 (in Chinese).
- [34] DU R, PENG YZ, CAO SB, LI BK, WANG SY, NIU M. Mechanisms and microbial structure of partial denitrification with high nitrite accumulation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(4): 2011-2021.
- [35] ZHANG Z, ZHANG C, YANG Y, ZHANG Z, TANG Y, SU P, LIN Z. A review of sulfate-reducing bacteria: metabolism, influencing factors and application in wastewater treatment[J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 376: 134109.
- [36] ONRAEDT A, de MUYNCK C, WALCARIUS B, SOETAERT W, VANDAMME E. Ectoine accumulation in *Brevibacterium epidermis*[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(19): 1481-1485.
- [37] YU F, ZHAO C, LI K, SU L, ZHANG S, YUE Q, ZHAO L. Salt-tolerant mechanism and application of salt-tolerant bacteria[P]. 2022 International Conference on Green Environmental Materials and Food Engineering, 2022: 111-116.
- [38] 韦娜. 嗜盐菌的分离鉴定及其应用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2012.
- WEI N. Isolation, identification and application of halophilic bacteria[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 (in Chinese).
- [39] 洪煜, 高波, 严冬, 安晓英, 颜华, 贾良辉. 吉兰泰盐湖土壤嗜盐菌的分离及其产四氢嘧啶的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(6): 115-123, 131.
- HONG Y, GAO B, YAN D, AN XY, YAN H, JIA LH. Isolation and ectoine-producing characteristics of halophiles from soil of Jilantai Saline Lake[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2019, 47(6): 115-123, 131 (in Chinese).
- [40] XU ZB, BAO XR, JI LL, DUAN JJ, JIN HP, DENG Y, LI L, LI B. Studies on salt tolerance of *Bacillus* isolated from the industrial soy sauce residue[P]. Proceedings of the 2016 International Conference on Biomedical and Biological Engineering, 2016: 437-441.
- [41] 王慧敏, 姚倩倩, 李月月, 蔡溯林, 孙明珠, 顾向阳. 渗透压冲击下中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. Y 四氢嘧啶类相容性溶质的合成与释放[J]. 微生物学通报, 2018, 45(4): 744-752.
- WANG HM, YAO QQ, LI YY, CAI SL, SUN MZ, GU XY. Synthesis and release of ectoines in a moderate halophile *Halomonas* sp. Y subjected to osmotic shocks[J]. Microbiology China, 2018, 45(4): 744-752 (in Chinese).