

研究报告

一株嗜碱盐单胞菌 ZB109 的生长特性及四氢嘧啶发酵条件的优化

陶宇杰¹, 韩睿², 乔丽娟¹, 高翔¹, 邢江娃¹, 王嵘^{*1}, 朱德锐¹

1 青海大学 医学院 基础医学研究中心, 青海 西宁 810016

2 青海大学 农林科学院, 青海 西宁 810016

陶宇杰, 韩睿, 乔丽娟, 高翔, 邢江娃, 王嵘, 朱德锐. 一株嗜碱盐单胞菌 ZB109 的生长特性及四氢嘧啶发酵条件的优化[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 3939-3953.

TAO Yujie, HAN Rui, QIAO Lijuan, GAO Xiang, XING Jiangwa, WANG Rong, ZHU Derui. *Halomonas alkaliphila* ZB109: growth characterization and optimization of fermentation conditions for ectoine accumulation[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 3939-3953.

摘要:【背景】西藏扎布耶盐碱湖水体富含高浓度 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 和 Na^+ , 可能栖息具有潜在应用价值的盐单胞菌(*Halomonas* sp.)菌株。【目的】筛选积聚相容溶质四氢嘧啶的盐单胞菌菌株, 并分析四氢嘧啶积聚的影响因素和最优发酵条件。【方法】采用 Horikoshi-I 培养基分离扎布耶盐碱湖水样中嗜碱盐且能高效积聚四氢嘧啶的盐单胞菌株, 并明确生理生化特性和分类学地位。基于单因素条件、Plackett-Burman、Box-Behnken 试验和 HPLC 检测, 分析菌株胞内四氢嘧啶积聚量的关键影响因素并优化其发酵条件。【结果】筛选获得扎布耶盐碱湖盐单胞菌共计 10 株(分属 5 个种), 优势种是嗜碱盐单胞菌(*H. alkaliphila*, 4 株, 占 40%)。 *H. alkaliphila* ZB109 的最佳生长盐度范围为 0.5–2.5 mol/L, 最适生长 pH 值 8.0–10.0, 四氢嘧啶的初始积聚量为 303.62 mg/L。菌株 ZB109 的菌落圆形, 边缘光滑, 呈黄色, 革兰氏染色阴性, 显微形态呈短杆状、周身纤毛。NaCl、 Mg^{2+} 和底物 L-谷氨酸钠浓度是菌株 ZB109 积聚四氢嘧啶的关键影响因素。采用响应面法优化培养条件, 菌株 ZB109 单批次摇瓶发酵 48 h 的四氢嘧啶积聚量可达 696.313 mg/L。【结论】菌株 ZB109 兼具耐盐和耐碱的生长特性, 相较于其他分离盐单胞菌分离株, 四氢嘧啶的积聚潜力更大, 可为后续四氢嘧啶的大规模发酵生产提供良好的菌种种质资源。

关键词: 嗜碱盐单胞菌; 生长特性; 四氢嘧啶; 发酵条件

资助项目: 青海省基础应用研究计划(2022ZJ771)

This work was supported by the Basic and Applied Research Program of Qinghai Province (2022ZJ771).

*Corresponding author. E-mail: qhwr2007@163.com

Received: 2024-01-30; Accepted: 2024-03-12; Published online: 2024-04-16

Halomonas alkaliphila ZB109: growth characterization and optimization of fermentation conditions for ectoine accumulation

TAO Yujie¹, HAN Rui², QIAO Lijuan¹, GAO Xiang¹, XING Jiangwa¹, WANG Rong^{*1}, ZHU Derui¹

¹ Research Center of Basic Medical Sciences, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

² Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: [Background] Zabuye Salt Lake with high concentrations of CO_3^{2-} , HCO_3^- , and Na^+ may harbor *Halomonas* strains with potential applications. [Objective] To screen the *Halomonas* strains capable of accumulating the compatible solute ectoine, analyze the factors influencing ectoine accumulation, and optimize the fermentation conditions for ectoine accumulation in these strains. [Methods] The Horikoshi-I medium was used to isolate the strains with salinity tolerance and capable of efficiently accumulating ectoine from the water samples collected from Zabuye Salt Lake. The strains were then characterized in terms of biochemical properties and taxonomic status. Single factor tests, Plackett-Burman design, Box-Behnken design, and HPLC were employed to analyze the key factors influencing the intracellular ectoine accumulation and optimize the fermentation conditions. [Results] A total of 10 strains belonging to 5 species of *Halomonas* were isolated from Zabuye Salt Lake, and the dominant species was *H. alkaliphila* (4 strains, 40%). *H. alkaliphila* ZB109 presented good growth within the salt range of 0.5–2.5 mol/L and pH 8.0–10.0, with the initial ectoine accumulation of 303.62 mg/L. The colonies of ZB109 were round, yellow, with smooth edge. ZB109 was a Gram-negative bacterial strain with short rod cells growing cilia around. NaCl , Mg^{2+} , and the concentration of sodium L-glutamate (substrate) were the key factors influencing the accumulation of ectoine by strain ZB109. After the fermentation conditions were optimized by response surface methodology, strain ZB109 was able to accumulate ectoine up to 696.313 mg/L (48 h) in a single batch of shake flask fermentation. [Conclusion] Strain ZB109 with both salt and alkali tolerance demonstrates stronger potential in the accumulation of ectoine than other wild-type strains of *Halomonas*. It serves as an elite strain for the large-scale production of ectoine by fermentation.

Keywords: *Halomonas alkaliphila*; growth characterization; ectoine; fermentation conditions

盐单胞菌属(*Halomonas*)分类隶属于 γ -变形杆菌纲(*Gammaproteobacteria*)海洋螺菌目(*Oceanospirillales*)盐单胞菌科(*Halomonadaceae*), 是一类耐盐、好氧的革兰氏阴性细菌, 大多数呈杆状, 耐盐生长范围较为宽泛^[1]。截至2023年

12月, 模式微生物基因组数据库(List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, LPSN, <https://lpsn.dsmz.de/genus/halomonas>)共计收录盐单胞菌属菌株172个种, 典型代表如延长盐单胞菌(*H. elongata*)、樊氏盐单胞菌(*H. ventosae*)、

蓝晶盐单胞菌(*H. bluephagnesis*)和坎帕尼亚盐单胞菌(*H. campaniensis*)等。盐单胞菌是发酵生产生物塑料聚 β -羟基丁酸(poly- β -hydroxybutyric acid, PHB)和相容溶质(四氢嘧啶或羟基四氢嘧啶)的典型模式菌株^[2-3]。盐单胞菌广泛分布于海洋、盐湖、盐碱湖、盐碱地沙漠等特殊生境^[4-7]。Zhang 等^[8]曾从小柴旦盐湖分离获得盐单胞菌(*Halomonas* sp.) XH26, 四氢嘧啶(ectoine)的积聚量达到 456.82 mg/L; 朱德锐等^[9]从青海湖分离获得樊氏盐单胞菌(*H. ventosae*) QHL5, ectoine 积聚量为 379.6 mg/L; Quillaguamán 等^[10]从盐碱湖 Laguna Colorada 中分离获得玻利维亚盐单胞菌(*H. boliviensis*) LC1, ectoine 积聚量可达 740 mg/L。

盐碱湖为一类具有高矿化度和高碱性水化学特征的湖泊, 生境中常栖息耐盐、耐碱或兼性耐盐碱的野生型盐单胞菌株, 是盐单胞菌的主要分离来源地。Zhang 等^[11]从乌鲁木齐盐碱湖(矿化度 89.32 g/L, pH 8.3)分离获得一株耐盐碱的盐单胞菌新种 *H. urumqiensis* BZ-SZ-XJ27; Romano 等^[12]从盐碱湖 Campania Region (矿化度 58.5 g/L, pH 8.5)分离获得一株耐盐碱的盐单胞菌新种 *H. campaniensis* 5AG; Poli 等^[13]从南极盐碱湖 Cape Russell (矿化度 156.8 g/L, pH 9.0)分离获得一株嗜盐、嗜冷和耐碱的盐单胞菌新种 *H. alkaliantarctica* CRSS。扎布耶盐碱湖(E83°57'–84°15', N31°27'–31°34')位于西藏日喀则地区, 矿化度 243–396 g/L, pH 9.0–9.5, 水体富集扎布耶石、钾芒硝、氯碳钠镁石和天然碱等, 属于典型的碳酸盐型盐湖^[14]。陶宇杰等^[14]利用 Illumina 高通量测序分析扎布耶盐碱湖(南湖)的细菌多样性, 发现盐单胞菌具有较高的物种丰度(0.54%–8.75%)。若采用纯培养分离可能获得具有潜在应用价值的盐单胞菌。基于此, 本研究以扎布耶盐碱湖水样为研究对象,

分离筛选盐单胞菌菌种资源, 分析菌株生理生化与生长特性、胞内 ectoine 积聚量; 基于单因素试验与响应面法优化 ectoine 的发酵条件, 提高 ectoine 的积聚量, 为后续菌株的基因改造和代谢工程菌株研究提供良好的菌种资源。

1 材料与方 法

1.1 样品

2019 年 7 月中旬采集扎布耶盐碱湖的水泥混合物样本, 样本置于 4 °C 车载冰箱载回。

1.2 主要试剂和仪器

NaCl 和 L-谷氨酸钠(L-monosodium glutamate monohydrate, MSG)等分析纯, 天津市大茂化学试剂厂; 细菌全基因提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; 细菌生化鉴定试剂盒, 海博生物技术有限公司; 2×PCR Mix, 北京兰杰柯科技有限公司; Taq DNA 聚合酶, 赛默飞世尔科技公司; Ectoine 标准品, 上海阿达玛斯贝塔化学试剂有限公司。PCR 仪, 上海伯乐生命医学产品有限公司; HPLC, 安捷伦科技有限公司; 扫描电子显微镜, 电子株式会社; 光学显微镜, 奥林巴斯有限公司。

1.3 培养基及纯培养菌株的分离

Horikoshi-I 分离培养基(g/L)^[14]: 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 5.0, 酵母粉 5.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.2。Ectoine 发酵培养基(g/L)^[15]: KCl 55.9, MgSO₄·7H₂O 24.7, MSG 6.5, 柠檬酸钠 3.0, 酶水解酪素 7.5, 无水 CaCl₂ 0.2, 酵母浸出物 2.0, 115 °C 灭菌 15 min。使用 NaCl 溶液(6 mol/L)配制盐梯度, 用 Na₂CO₃ 溶液(1 mol/L)调节 pH 值, 固体培养基添加 16 g/L 琼脂粉。扎布耶盐碱湖水样(50 μ L)直接涂布 Horikoshi-I 固体培养基(盐梯度组: 0.0–3.0 mol/L, 间隔 0.5; pH 梯度组: 8.0–13.0, 间隔 1.0), 10–15 平板/梯度组, 37 °C 恒温箱培养 72 h。挑取不同形态的菌落

进行活化(Horikoshi-I培养基、37 °C、180 r/min 振荡培养 24 h), 划线纯化菌株 3-4 次。

1.4 菌株生长特性与胞内 ectoine 积聚量分析

将 1.3 分离获得的待测菌株接种于 Horikoshi-I 培养基 37 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 进行活化。设置不同 NaCl 浓度梯度组(0.0-3.0 mol/L, 间隔 0.5)和 pH 梯度组(8.0-13.0, 间隔 1.0)的 Horikoshi-I 培养基($n=3$ /组), 活化菌液接种量 1.0%, 37 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 检测光密度值 OD_{600} 。参考文献[14]进行嗜碱盐细菌分类。参考文献[15]提取纯培养菌株胞内 ectoine 并进行 HPLC 检测。流动相: 乙腈:水为 80:20; 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 210 nm; 进样量: 15 μ L。

1.5 形态学与生理生化鉴定

采用 Horikoshi-I 培养基活化纯化菌株, 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h; 采用 Horikoshi-I 固体培养基进行平板划线, 观察菌落形态。采用革兰氏染色法对菌体染色, 使用油镜观察菌体形态(1 000 \times); 采用戊二醛锇酸双重固定法固定菌体, 使用扫描电子显微镜观察菌体细胞显微形态(8 000 \times)。参考细菌生化鉴定试剂盒说明书进行碳氮源利用试验和生理生化鉴定^[16]。

1.6 分子生物学鉴定与系统发育树的构建

采用 Horikoshi-I 培养基活化菌株, 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h, 采用细菌全基因提取试剂盒提取基因组 DNA 并进行 16S rRNA 基因 PCR 扩增。引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCATG GCTCAG-3')和 1492R (5'-CTACGGTTACCTG TTACGAC-3')。PCR 反应体系(30 μ L): 2 \times PCR Mix 15 μ L, DNA 模板(10-20 ng/ μ L) 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, ddH₂O 10 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 5 min。PCR 纯化产物由生工生物工程(上海)股份有限公司完

成测序。使用 Lasergene v7.1 软件包对测序结果进行拼接整理, 通过 NCBI 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对分析已拼接的序列, 明确分离菌株的分类学地位。利用 MEGA v11.0 软件构建系统发育树, 采用 Neighbor-joining 法, bootstrap 为 1 000^[14]。

1.7 单因素试验与发酵条件优化

选择 ectoine 发酵培养基设置 6 个单因素分组试验, 即 NaCl 浓度梯度组(0.0-3.0 mol/L, 间隔 0.5)、Mg²⁺浓度梯度组(0.05-0.25 mol/L, 间隔 0.05)、Ca²⁺浓度梯度组(2.0-10.0 μ mol/L, 间隔 2.0)、MSG 浓度梯度组(0.02-0.10 mol/L, 间隔 0.02)、CaCO₃ 梯度组(5.0-25.0 g/L, 间隔 5.0)和 pH 梯度组(7.0-11.0, 间隔 1.0)。分批次检测待测菌株胞内的 ectoine 积聚量(180 r/min, 48 h, $n=3$), 取平均值绘制曲线图。基于单因素结果, 使用 Design-Expert v11.0 软件进行 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 多因素试验设计。通过 Plackett-Burman 设计确定关键变量(表 1), 以 NaCl 浓度(X_1)、Mg²⁺浓度(X_2)、Ca²⁺浓度(X_3)、MSG 浓度(X_4)、CaCO₃ 浓度(X_5)作为实验因素, 以 ectoine 积聚量为响应值。结合 Plackett-Burman 结果采用 Box-Behnken 法设计三因素三水平的响应面优化方案(表 1), 以 ectoine 积聚量为响应值, 优化菌株培养基组成比例并验证。

1.8 数据处理

建立 ectoine 检测标准曲线: $Y=(X-9.819 5)/249 12, R^2=0.99$, 式中 Y 为 ectoine 积聚量(g/L), X 为 HPLC 峰面积。采用 SPSS v26.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的生长特性和形态学特征

从扎布耶盐碱湖水样中分离获得盐单胞菌 10 株(表 2), 其菌落形态多呈圆形、淡黄色, 部

表 1 试验因素与水平

Table 1 Factor levels involved in the tests

Test	Factor	Variant	Level		
			-1	0	1
Plackett-Burman	Concentration of NaCl (mol/L)	X_1	0.00		3.00
	Concentration of Mg^{2+} (mol/L)	X_2	0.05		0.25
	Concentration of Ca^{2+} (μ mol/L)	X_3	2.00		10.00
	Concentration of MSG (mol/L)	X_4	0.02		0.10
	Concentration of $CaCO_3$ (g/L)	X_5	5.00		25.00
Box-Behnken	Concentration of NaCl (mol/L)	A	0.50	1.00	1.50
	Concentration of Mg^{2+} (mol/L)	B	0.05	0.10	0.15
	Concentration of MSG (mol/L)	C	0.06	0.08	1.00

表 2 分离菌株耐盐耐碱范围和 ectoine 积聚量

Table 2 Salt and alkali tolerance range and ectoine accumulation of isolated strains

菌株编号	分类学定位及相似度	耐盐范围	耐碱范围	四氢嘧啶积聚量
Strain code	Taxonomic localization and similarity (%)	Salt tolerance range (mol/L)	Alkali resistance range (pH)	Ectoine accumulation (mg/L)
ZB74	<i>Halomonas alkaliphile</i> /100.00	0.0–2.5	8.0–12.0	32.30±0.78
ZB36	<i>Halomonas chromatireducens</i> /99.85	0.0–3.0	8.0–11.0	44.31±4.12
ZB37	<i>Halomonas venusta</i> /99.15	0.0–2.5	8.0–13.0	ND
ZB48	<i>Halomonas venusta</i> /99.28	0.0–2.0	8.0–13.0	ND
ZB46	<i>Halomonas alkaliphile</i> /100.00	0.0–3.0	8.0–12.0	15.65±1.69
ZB86	<i>Halomonas alkaliphile</i> /99.93	0.0–2.5	8.0–12.0	8.96±0.26
ZB25	<i>Halomonas venusta</i> /99.26	0.0–2.5	8.0–13.0	ND
ZB19	<i>Halomonas hydrothermalis</i> /100.00	0.0–2.5	8.0–12.0	ND
ZB109	<i>Halomonas alkaliphile</i> /99.78	0.0–3.0	8.0–11.0	303.62±10.27
ZB4	<i>Halomonas campaniensis</i> /100.00	0.0–2.5	8.0–13.0	29.20±1.54

ND: 未检测到

ND: Not detected.

分菌株呈白色。参照文献[14]确定分离菌株均属于极端嗜碱盐菌(1.53 mol/L<盐度<5.53 mol/L, pH>10.0)。16S rRNA 基因序列分析显示: 盐单胞菌分属 5 个种, 其中嗜碱盐单胞菌(*H. alkaliphila*) 4 株, 占 40%, 樊氏盐单胞菌(*H. venusta*) 3 株, 占 30%, 铬还原盐单胞菌(*H. chromatireducens*) 1 株, 占 10%, 热液盐单胞菌(*H. hydrothermalis*) 1 株, 占 10%, 坎帕尼亚盐单胞菌(*H. campaniensis*) 1 株, 占 10%。初步检测 10 株盐单胞菌的胞内 ectoine, 显示积聚量为 0.00–303.62 mg/L。分离

株嗜碱盐单胞菌 *H. alkaliphila* ZB109 的耐盐碱能力良好, 生长盐度 0.0–3.0 mol/L, pH 8.0–11.0, ectoine 积聚量较高(303.62 mg/L)。菌株 ZB109 的菌落形态(图 1A)呈圆形, 淡黄色, 不透明, 中心隆起, 边缘光滑; 革兰氏染色阴性, 显微形态呈长杆状, 单个或成串排列(图 1B), 扫描电子显微镜形态(图 1C)呈长圆柱状, 长度约 10 μ m, 菌体轮廓清晰圆润, 部分发生粘连, 表面绒毛感颗粒状聚合物, 周身具有少量细短纤毛。

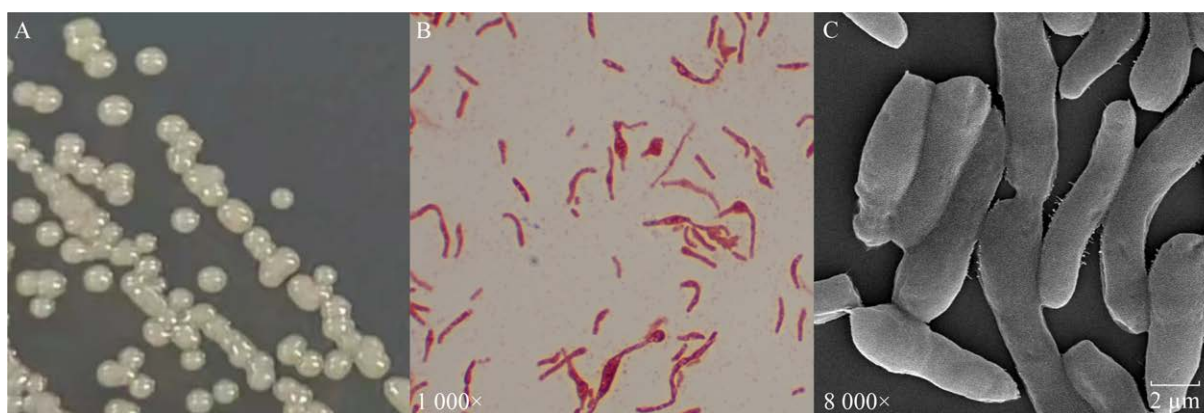


图1 菌株 ZB109 的菌落形态(A)、菌体形态(B)和细胞形态(C)

Figure 1 Colony morphology (A), body morphology (B) and cell morphology (C) of strain ZB109.

2.2 菌株 ZB109 的生理生化鉴定结果及系统发育树

参照《常见细菌系统鉴定手册》^[17]和《伯杰细菌鉴定手册》^[18]进行菌株 ZB109 的碳氮源利用与生理生化鉴定。结果显示：该菌株能利用精氨酸、赖氨酸、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 、 KNO_3 、葡萄糖、甘露醇、肌醇、山梨醇、鼠李糖、蔗糖、蜜二糖、苦杏仁甙、阿拉伯糖、柠檬酸、淀粉和麦芽糖作为唯一碳氮源生长，不能利用鸟氨酸和乳糖， β -半乳糖苷酶(ONPG)和脲酶试验为阳性，V-P 试验、产 H_2S 试验、吲哚试验和明胶液化试验均呈阴性，与盐单胞菌菌株 *H. ventosae* QHL5^[16]、*Halomonas* sp. QHL25^[19] 和 *Halomonas* sp. A20^[20] 的相关结果一致。16S rRNA 基因序列比对分析显示，菌株 ZB109 与 *H. alkaliphila* (KR140235.1) 的相似性最高(99.78%)。使用 MEGA v.11.0 软件构建系统发育树(图 2)，初步确定菌株 ZB109 (OR651760.1) 与盐单胞菌属菌株进化同源，分类隶属于变形菌门(*Proteobacteria*) γ -变形杆菌纲(*Gammaproteobacteria*) 海洋螺菌目(*Oceanospirillales*) 盐单胞菌科(*Holomonadaceae*) 盐单胞菌属(*Halomonas*) 嗜碱盐单胞菌(*H. alkaliphila*)。

2.3 菌株 ZB109 胞内 ectoine 积聚量的单因素试验

设置单因素浓度分组(NaCl 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、MSG、 CaCO_3 及 pH)，利用 ectoine 发酵培养基 37 °C、180 r/min 培养 48 h，检测菌株 ZB109 的生物量和胞内 ectoine 的积聚量(图 3)。综合分析显示：菌株 ZB109 积聚 ectoine 的最适 NaCl 浓度是 1.5 mol/L，积聚量为 558 mg/L(图 3A)；最适 Mg^{2+} 浓度是 0.1 mol/L，积聚量为 570 mg/L(图 3B)；最适 Ca^{2+} 浓度是 4.0 $\mu\text{mol/L}$ ，积聚量为 576 mg/L(图 3C)；最适 MSG 浓度是 0.08 mol/L，积聚量为 529 mg/L(图 3D)；最适 CaCO_3 浓度是 20 g/L，积聚量为 551 mg/L(图 3E)；最适 pH 值 10.0，积聚量为 236 mg/L(图 3F)。甄选 NaCl 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、MSG、 CaCO_3 的最适浓度，进行 Plackett-Burman 关键单因素的变量试验。

2.4 Ectoine 发酵条件优化结果

基于 Plackett-Burman 试验筛选影响菌株 ZB109 胞内 ectoine 积聚量的显著因素(表 3)。结果显示：模型方差 F 值为 10.31， $P < 0.05$ ，表明模型具有统计学意义。3 个关键因子的变化显著影响菌株 ZB109 的胞内 ectoine 积聚量($P < 0.05$)，影响强度依次为 NaCl (X_1) > Mg^{2+} (X_2) >

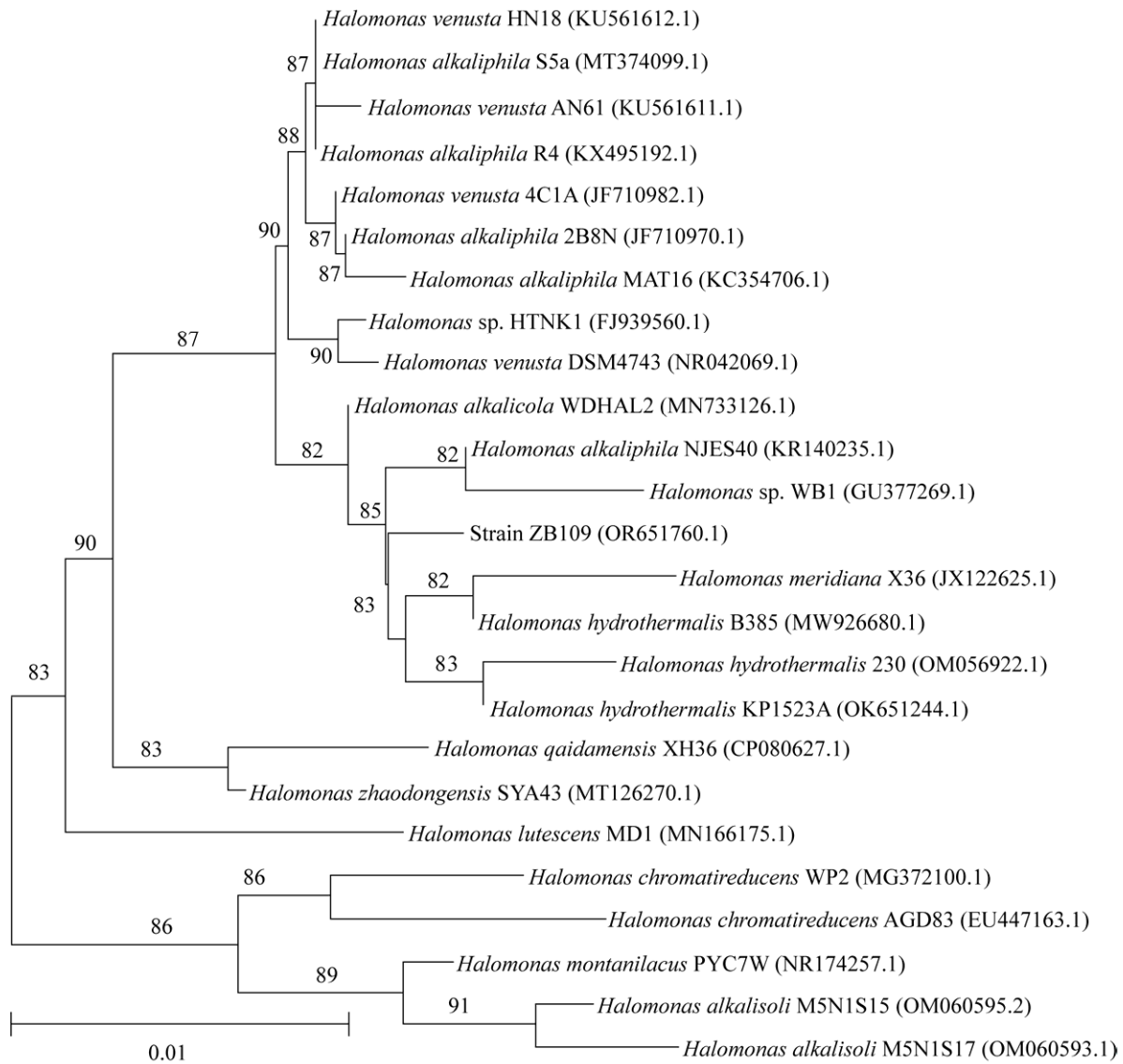


图 2 菌株 ZB109 及其近源属种的系统发育分析 分支数字是自展值；距离标尺数字是相对进化长度；括号中数字是菌株的 GenBank 登录号

Figure 2 Phylogenetic analysis of strain ZB109 and its near-genus species. Branch numbers are self-expansion values. Distance scale numbers are relative evolutionary lengths. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers for strains.

MSG 浓度(X_4), 而 Ca^{2+} (X_3)与 CaCO_3 浓度(X_5)的变化无显著影响($P>0.05$)。使用 Design-Expert v.11.0 软件拟合实验模型, 建立线性回归方程: $Y=232.10-143.31X_1-71.08X_2-0.6194X_3+66.59X_4-34.09X_5$, 式中 Y 为 ectoine 积聚量, 因素 X_1-X_5 分别为 NaCl 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、MSG 和 CaCO_3 浓

度。回归决定系数 $R^2=0.8375$, 模型拟合程度较好; 修正决定系数 $R_{(\text{Adj})}^2=0.7563$, 表明 75.63% 的响应值变化可以通过拟合模型进行解释。

优选 NaCl 、 Mg^{2+} 和 MSG 浓度进行 Box-Behnken 试验设计, 使用软件 Design-Expert v.11.0 进行多元线性回归拟合分析(表 4)。以 ectoine 积聚

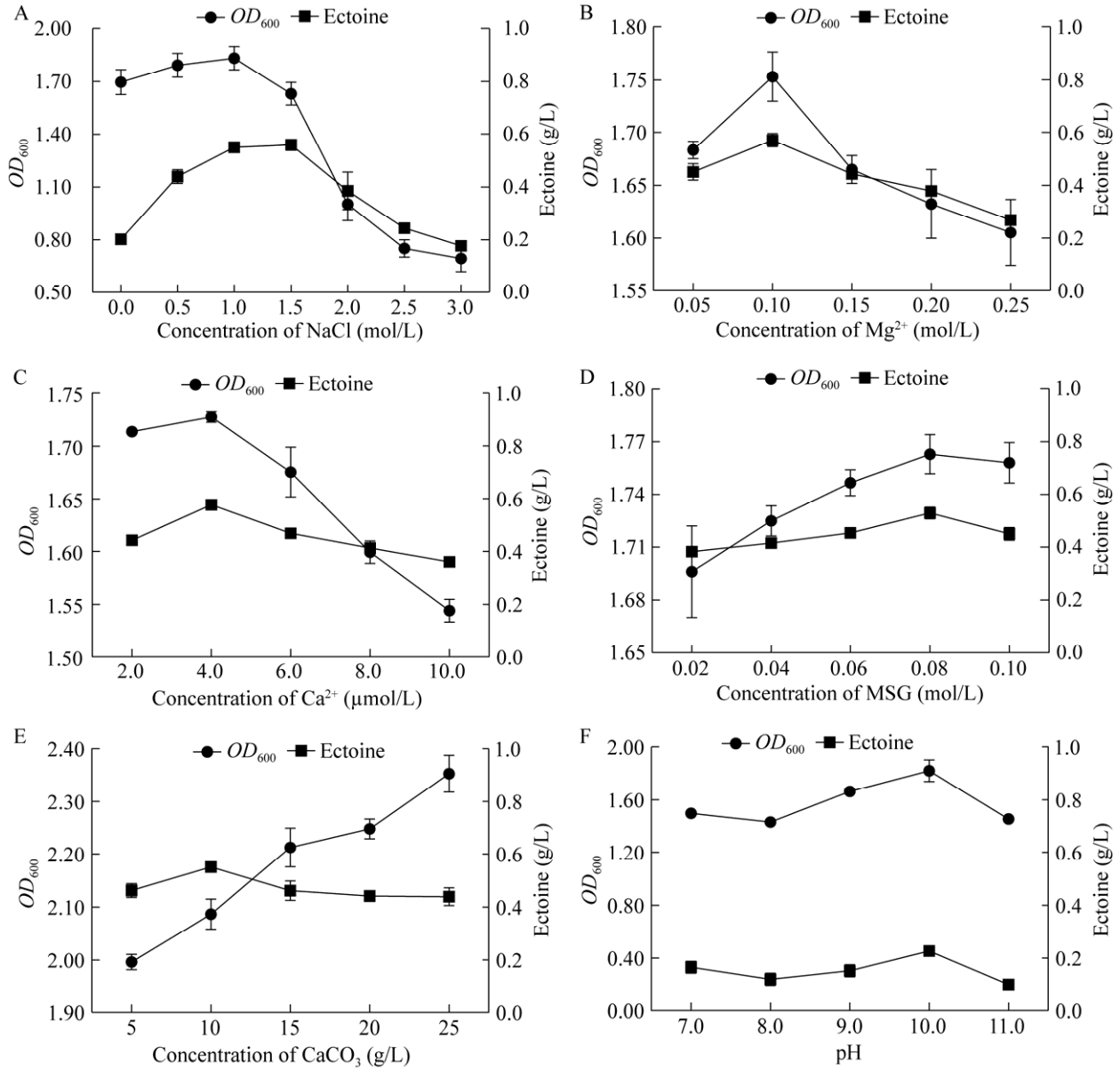


图3 不同单因素条件下菌株 ZB109 的生长量(OD_{600})和 ectoine 积聚量 A: NaCl 浓度; B: Mg^{2+} 浓度; C: Ca^{2+} 浓度; D: MSG 浓度; E: $CaCO_3$ 浓度; F: pH

Figure 3 Growth (OD_{600}) and ectoine accumulation of strain ZB109 under different one-factor conditions. A: concentration of NaCl; B: concentration of Mg^{2+} ; C: concentration of Ca^{2+} ; D: concentration of MSG; E: concentration of $CaCO_3$; F: pH.

量(Y)为响应值, 建立 NaCl(A)、 Mg^{2+} (B)和 MSG 浓度(C)的响应面模型: $Y=680.02-23.84A-17.25B-15.52C-1.91AB-19.13AC+4.16BC-40.88A^2-32.34B^2-69.38C^2$ 。方差分析显示(表 5): 该模型显著

($P<0.05$), 失拟项不显著($P>0.05$), $R^2=0.9745$, $F=29.77$, 模型拟合程度较好, 修正决定系数 $R_{(Adj)}^2=0.9418$, 表明 94.18% 的响应值变化可以通过拟合模型进行解释, 并分析和预测 ectoine

表 3 Plackett-Burman 法方差分析结果

Table 3 Results of Plackett-Burman squared difference analysis

Source	Sum of square	DF	Mean square	F	P	Significant
Model	374 200.00	5	74 845.66	10.310 0	0.001 1	*
X ₁	246 400.00	1	246 400.00	33.950 0	0.000 2	*
X ₂	60 622.32	1	60 622.32	8.350 0	0.016 1	*
X ₃	4.60	1	4.60	0.000 6	0.980 4	
X ₄	53 218.50	1	53 218.50	7.330 0	0.022 0	*
X ₅	13 944.74	1	13 944.74	1.920 0	0.195 9	
Pure Error	23 953.27	4	5 988.32			
Cor Total	1 037 000.00	16				

$R^2=0.837 5$; $R_{(Adj)}^2=0.756 3$; *: $P<0.05$.

表 4 Box-Behnken 试验设计及响应值

Table 4 Box-Behnken design and response

Experiment No.	NaCl (mol/L)	Mg ²⁺ (mol/L)	MSG (mol/L)	Ectoine (mg/L)
1	0.50	0.05	0.08	638.137
2	1.50	0.05	0.08	604.971
3	0.50	0.15	0.08	612.458
4	1.50	0.15	0.08	571.633
5	0.50	0.10	0.06	586.234
6	1.50	0.10	0.06	566.113
7	0.50	0.10	0.10	611.682
8	1.50	0.10	0.10	515.036
9	1.00	0.05	0.06	626.833
10	1.00	0.15	0.06	579.039
11	1.00	0.05	0.10	569.247
12	1.00	0.15	0.10	538.080
13	1.00	0.10	0.08	670.112
14	1.00	0.10	0.08	690.230
15	1.00	0.10	0.08	679.598
16	1.00	0.10	0.08	684.439
17	1.00	0.10	0.08	675.722

的积聚量。由各因素 P 值可知, NaCl 浓度(A)、Mg²⁺浓度(B)和 MSG 浓度(C)为显著影响因素, 其中 NaCl 浓度影响程度最大, 其次是 Mg²⁺浓度和 MSG 浓度。此外, A 和 C 之间的交互作用显著; A 和 B、B 和 C 之间的交互作用最不显著; A²、B² 和 C² 曲面效应均显著。

2.5 多因素交互分析结果

使用 Design-Expert v.11.0 绘制 3D Surface

响应面模型图, 分析不同因素的交互作用影响 ectoine 积聚量(图 4)。综合分析显示, 不同两因素交互作用条件下, ectoine 的积聚量均呈先升高后降低的变化趋势, 峰值不同。NaCl 和 Mg²⁺交互作用分析表明(图 4A): 当 0.08 mol/L MSG 浓度时, 最高峰值条件为 1.0 mol/L NaCl 和 0.1 mol/L Mg²⁺。NaCl 和 MSG 交互作用分析表明(图 4B): 当 0.1 mol/L Mg²⁺浓度时, 最高峰值条件为 0.08 mol/L MSG 和 1.0 mol/L NaCl。Mg²⁺和 MSG 交互作用分析表明(图 4C): 当 1.0 mol/L NaCl 浓度时, 最高峰值条件为 0.1 mol/L Mg²⁺和 0.08 mol/L MSG。使用最优发酵条件组合(NaCl 1.25 mol/L, Mg²⁺ 0.09 mol/L, MSG 0.08 mol/L)进行 3 次重复实验, 检测 ectoine 积聚量(均值 696.313 mg/L), 与预测值(701.436 mg/L)非常接近, 相对误差小于 5%, 说明该验证模型有效可行。

2.6 培养基优化前后的发酵效果比较

优化 ectoine 发酵培养基与初始培养基相比, NaCl 和 MSG 的浓度分别提高为 72.5 g/L 和 15.4 g/L, Mg²⁺浓度降低为 22.2 g/L; 优化后菌株 ZB109 胞内 ectoine 的积聚量提高了 392.693 mg/L (129.34%), 差异极显著($P<0.01$)。由此表明, 优化培养条件致使菌株 ZB109 ectoine 的积聚量显著提高。

表 5 响应面模型的方差分析

Table 5 Variance analysis for the response surface model

Source	Sum of square	DF	Mean square	F	P	Significance
Model	45 308.76	9	5 034.31	29.770 0	0.000 1	*
A	4 548.58	1	4 548.58	26.900 0	0.001 3	*
B	2 379.74	1	2 379.74	14.070 0	0.007 2	*
C	1 927.40	1	1 927.4	11.400 0	0.011 8	*
AB	14.67	1	14.67	0.086 7	0.776 9	
AC	1 464.02	1	1 464.02	8.660 0	0.021 6	*
BC	69.11	1	69.11	0.408 7	0.543 0	
A ²	7 035.48	1	7 035.48	41.610 0	0.000 4	*
B ²	4 404.63	1	4 404.63	26.050 0	0.001 4	*
C ²	20 265.96	1	20 265.96	119.850 0	0.000 1	*
Residual	1 183.63	7	169.09			
Lack of Fit	943.04	3	314.35	5.230 0	0.072 0	
Pure Error	240.59	4	60.15			
Cor Total	46 492.39	16				

$R^2=0.974 5$; $R_{(Adj)}^2=0.941 8$; *: $P<0.05$.

3 讨论

3.1 嗜碱盐单胞菌的生长特性与应用潜力

嗜碱盐单胞菌(*H. alkaliphila*)适宜栖息于高盐碱生境(pH 7.5–13.0, 10%–20% NaCl), 可利用葡萄糖、甘露醇和蔗糖等碳源的嗜碱、耐盐革兰阴性细菌^[21], 广泛分布于盐碱湖和海洋生境。嗜碱盐单胞菌被广泛应用于生产次级代谢物和进化污染源, 具有良好的应用研究前景^[21]。如 Romano 等^[21]从意大利盐碱湖 Campania Region 中分离一株嗜碱耐盐菌株 *H. alkaliphila* 18bAG, 该菌株可合成 PHB 和胞外多聚物 (extracellular polymeric substances, EPS); Berlanga 等^[22]从盐碱湖 Ebro Delta 中分离到一株 *H. alkaliphila* MAT16, 该菌株可以合成聚羟基脂肪酸酯 (poly-hydroxyalkanoates, PHA); Ren 等^[23]从海水中分离获得一株嗜碱耐盐菌株 *H. alkaliphila* HRL-9, 该菌株具有脱氮反硝化能力。本研究共计分离 10 株 5 种盐单胞菌, 如 *H. alkaliphila*、*H. venusta*、*H. chromatireducens*、

H. hydrothermalis 和 *H. campaniensis*, 其中 *H. alkaliphila* 占比最高(4 株, 丰度占比 40%)。分离获得的 *H. alkaliphila* 菌株大多数具有较强的耐盐碱特性, 耐受盐度 0.0–3.0 mol/L, pH 8.0–13.0, 这可能由于扎布耶湖湖水碳酸盐浓度饱和且 pH 高所致。此外, 相较于其他菌株, *H. alkaliphila* ZB109 胞内 ectoine 积聚量较高(优化前 303.62 mg/L), 发酵条件优化后可达 696.313 mg/L, 可能成为 ectoine 生物合成的资源菌种, 具有潜在的应用价值。

3.2 影响盐单胞菌胞内 ectoine 积聚量的因素分析

盐单胞菌通过胞内积累具有高度水溶性的有机化合物(ectoine 或羟基四氢嘧啶)以应对极端盐碱环境胁迫, 表现为菌株生长量(OD_{600})和 ectoine 积聚量先增加后降低^[24-25]。如周月慧等^[26]对菌株 *H. venusta* SL21 研究发现, 当培养基中 NaCl 浓度为 2.0 mol/L 时, ectoine 合成量最高为 272.8 mg/L, 当 NaCl 浓度超过 2.5 mol/L 时, ectoine 合成量减少;王慧敏等^[27]对菌株 *Halomonas*

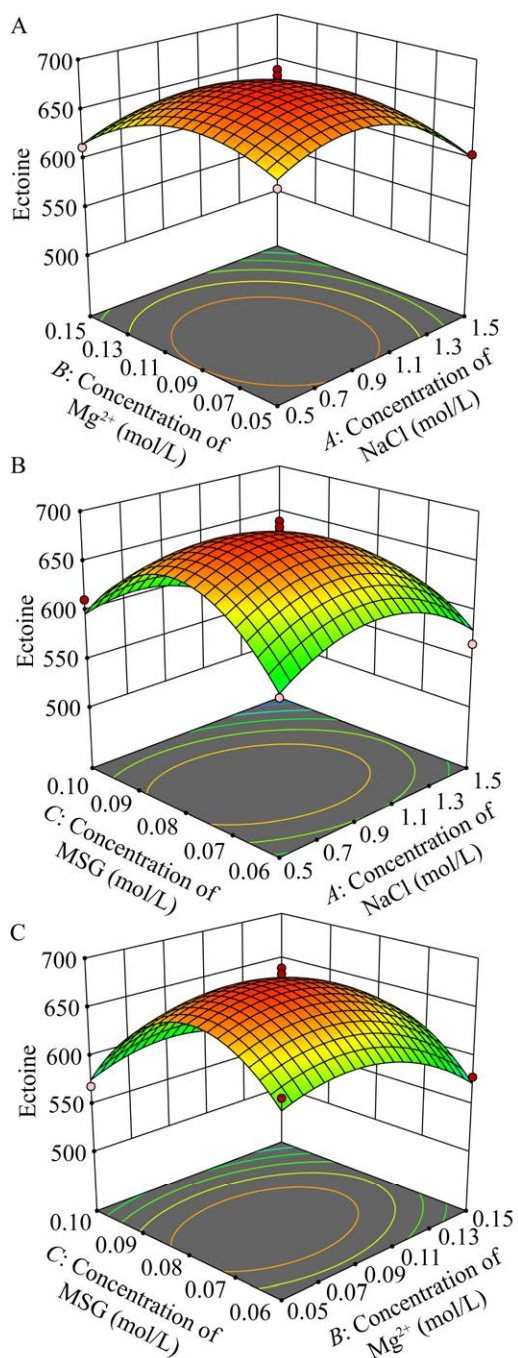


图4 NaCl浓度、 Mg^{2+} 浓度和MSG浓度交互作用
 A: NaCl和 Mg^{2+} 交互作用分析; B: NaCl和MSG交互作用分析; C: Mg^{2+} 和MSG交互作用分析
 Figure 4 Interaction of NaCl, Mg^{2+} and MSG concentration. A: Analysis of NaCl and Mg^{2+} interactions; B: Analysis of NaCl and MSG interactions; C: Analysis of Mg^{2+} and MSG interactions.

sp. Y 研究发现,随着培养基中 NaCl 浓度增加,菌株胞内合成 ectoine 的积聚量先增后减,最佳 NaCl 浓度为 150 g/L, ectoine 合成量可达 246.6 mg/L; 王魁荣等^[28]对菌株 *Halomonas* sp. NY-011 研究发现,当 NaCl 浓度达到 120 g/L 时,菌株胞内 ectoine 的积聚量可达 71.5 mg/g, 当 NaCl 浓度大于 150 g/L 时,菌株 NY-011 基本停止生长。这些报道与本研究的结果相似,即菌株 ZB109 的生长量与胞内 ectoine 积聚量随着盐度的增加,呈现先增后降的趋势。这可能由于盐胁迫促进菌株 ZB109 胞内 ectoine 合成相关基因表达量增加,而盐浓度较高时,菌株 ZB109 菌体生长受抑制。此外, Plackett-Burman 和 Box-Behnken 试验显示, NaCl 浓度是影响菌株 ZB109 胞内 ectoine 积聚量的最主要因素(P 值分别为 0.000 2 和 0.003 5)。

为提高菌株胞内 ectoine 的积聚量,通常在盐单胞菌发酵过程中添加天冬氨酸和谷氨酸等中间代谢物或前体底物。如沈国平等^[29]对菌株 *H. campaniensis* XH26 研究发现,随着培养基中 MSG 浓度增加,菌株胞内合成 ectoine 的积聚量先增后减,当 MSG 浓度为 30 mmol/L 时,ectoine 的积聚量达到最大值 321.83 mg/L; 刘静^[30]对菌株 *Halomonas* sp. X26 研究发现,培养基中 MSG 为 0.035 mol/L 时,胞内 ectoine 积聚量为 491.19 mg/L。本研究 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 试验显示,MSG 是影响菌株 ZB109 胞内 ectoine 积聚量的次要因素(P 值分别为 0.022 0 和 0.025 4)。通过单因素试验发现,随着 MSG 浓度的增加,菌株 ZB109 的生长量(OD_{600})与胞内 ectoine 积聚量呈现先增后降的趋势,这可能由于 MSG 浓度升高的同时,增加了培养基中 Na^+ 浓度,从而抑制菌株 ZB109 的生长。此外,文献综合显示 pH 值也是影响盐单胞菌胞内 ectoine 的积聚量的因素之一。如

朱德锐等^[9]对菌株 *H. ventosae* QHL5 研究发现, 当 pH 8.0 时, 菌株 ectoine 干重比最大, 当 pH>9.5 后, 菌株生长量明显下降。本研究中菌株 ZB109 在 pH 10.0 时生长量最大, 但是单因素试验显示, pH 对菌株 ZB109 胞内 ectoine 积聚量影响的规律性不显著, 这可能由于 ectoine 发酵培养基中存在大量 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} , 高 pH 条件下, Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 被消耗所致。后续研究将基于转录组学和蛋白组学深入探究 NaCl、MSG 浓度和 pH 影响菌株 ZB109 的胞内 ectoine 积聚量的机制, 为进一步提高盐单胞菌 ectoine 积聚量提供一定的理论依据。

3.3 响应面法提高菌株胞内 ectoine 积聚量的应用前景

响应面法基于综合试验设计和数学建模, 是目前优化培养基的主流实验方法之一^[31]。文献综合显示, 响应面法广泛应用于提高菌株胞内 ectoine 积聚量, 是分析影响 ectoine 积聚量关键因素的重要手段。如 Kushwaha 等^[32]通过 Box-Behnken 和响应面法优化培养基成分, 当培养基盐度达到 15% 时, 菌株 *Halomonas* sp. SBS10 胞内 ectoine 积聚量可达 617 g/g; Omara 等^[33]通过 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 优化培养基成分, 结果表明在最适组合下(培养时间 78 h、pH 7.5 和盐度 8%), *Vibrio* sp. CS1 和 *Salinivibrio costicola* SH3 胞内 ectoine 积聚量分别可达 477 mg/L 和 215 mg/L; 汪明香等^[15]通过 Plackett-Burman 和 Box-Behnken 优化培养基成分, 结果表明在最适组合下(0.05 g/L 磁性纳米金属颗粒 Fe_3O_4 NPs、1.53 mol/L NaCl 和 0.03 mol/L MSG), *H. campaniensis* XH26 胞内 ectoine 积聚量可达 640.28 mg/L。本研究以 NaCl 浓度、 Mg^{2+} 浓度、 Ca^{2+} 浓度、MSG 浓度和 $CaCO_3$ 浓度为单因素, 菌株 ZB109 胞内 ectoine 积聚量为响应值, 通过 Plackett-Burman 筛选出关键因素是 NaCl 浓

度、 Mg^{2+} 浓度和 MSG 浓度, 并通过 Box-Behnken 明确最优培养基组分(NaCl 1.25 mol/L; Mg^{2+} 0.09 mol/L, MSG 0.08 mol/L)。使用优化培养基 37 °C、180 r/min 振荡培养 48 h 后, 菌株 ZB109 胞内 ectoine 积聚量可达 696.313 mg/L, 较优化前(303.62 mg/L)提高了 392.693 mg/L (129.34%)。综上, 在提高菌株胞内四氢嘧啶积聚量方面, 响应面法具有良好的方法学应用前景, 后续研究将甄选不同类型的碳氮源分析菌株 ZB109 胞内 ectoine 积聚量的变化, 为进一步优化菌株 ZB109 发酵培养基提供一定的参考依据。

4 结论

利用 Horikoshi-I 培养基分离获得盐单胞菌合计 10 株, 分属 6 个种, 优势种是嗜碱盐单胞菌(4 株, 丰度占比 40%), 分离菌株均属于极端嗜碱盐菌。生理生化试验显示, 菌株 ZB109 可利用的碳氮源宽泛(如 KNO_3 、葡萄糖和蔗糖等), 盐碱耐受范围较大(最佳生长盐度范围 0.5–2.5 mol/L, 最佳生长 pH 8.0–10.0), 胞内 ectoine 积聚量较高(优化前 303.62 mg/L), 具有生产四氢嘧啶类化合物的潜力。通过 Plackett-Burman、Box-Behnken 试验和响应面法, 明确 NaCl、 Mg^{2+} 和 MSG 是影响菌株 ZB109 胞内 ectoine 积聚量的关键因素。在此基础上对 ectoine 发酵培养基进行优化, 优化后培养基的 NaCl 和 MSG 的浓度分别提高至 72.5 和 15.4 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度降低至 22.2 g/L, 胞内 ectoine 积聚量可达 696.313 mg/L, 提高了 392.693 mg/L, 为 ectoine 的生物合成积累了潜在菌种资源。

REFERENCES

- [1] 徐德强, 黄静娟, 张纪忠, 范钦, 刘东来. 盐单胞菌属一新种: 黄海盐单胞菌[J]. 微生物学报, 1995, 35(5): 315-321.
XU DQ, HUANG JJ, ZHANG JZ, FAN Q, LIU DL. A

- new species of *Halomonas*: *Halomonas huanghaiensis* sp. nov.[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1995, 35(5): 315-321 (in Chinese).
- [2] 潘媛媛, 黄海鹏, 孟婧, 肖鸿禹, 李成, 孟琳, 洪闪, 刘贺男, 王雪枫, 姜巨全. 松嫩平原盐碱地中耐(嗜)盐菌的生物多样性[J]. *微生物学报*, 2012, 52(10): 1187-1194.
PAN YY, HUANG HP, MENG J, XIAO HY, LI C, MENG L, HONG S, LIU HN, WANG XF, JIANG JQ. Biodiversity of culturable halotolerant and halophilic bacteria isolated from saline-alkaline soils in Songnen Plain[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(10): 1187-1194 (in Chinese).
- [3] 姜蔚宇, 陈荣忠. 四氢嘧啶类物质的生物合成与转运途径及其生物学功能[J]. *生命的化学*, 2007, 27(4): 323-326.
JIANG YY, CHEN RZ. Biosynthesis and transport pathways of tetrahydropyrimidines and their biological functions[J]. *Chemistry of Life*, 2007, 27(4): 323-326 (in Chinese).
- [4] 艾雪, 王艺霖, 张威, 李师翁. 柴达木沙漠结皮中耐盐碱细菌的分离及其固沙作用研究[J]. *干旱区资源与环境*, 2015, 29(10): 145-151.
AI X, WANG YL, ZHANG W, LI SW. Screening of halotolerant and alkalitolerant bacteria from the desert crust in the Qaidam and their effects of sand aggregation[J]. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2015, 29(10): 145-151 (in Chinese).
- [5] 张瑞, 罗亮, 王世会, 郭坤, 徐伟, 赵志刚. 东北碳酸盐型盐碱池塘耐(嗜)碱微生物的筛选及功能分析[J]. *水产学杂志*, 2022, 35(6): 75-81.
ZHANG R, LUO L, WANG SH, GUO K, XU W, ZHAO ZG. Screening and functional analysis of alkalitolerant microorganisms in carbonate-type saline-alkali ponds in Northeast China[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2022, 35(6): 75-81 (in Chinese).
- [6] 刘艳, 黄晓航, 何培青, 彭亚林, 林学政, 安利国. 印度洋深海热液区可培养细菌的分子鉴定与系统发育分析[J]. *海洋科学进展*, 2009, 27(2): 193-200.
LIU Y, HUANG XH, HE PQ, PENG YL, LIN XZ, AN LG. Molecular identification and phylogenetic analysis of cultivable bacteria from India Ocean hydrothermal vents[J]. *Advances in Marine Science*, 2009, 27(2): 193-200 (in Chinese).
- [7] 张广志, 周红姿, 杨合同, 赵晓燕. 盐碱土壤中耐盐细菌的分离与鉴定[J]. *山东农业科学*, 2008, 40(9): 49-50, 54.
ZHANG GZ, ZHOU HZ, YANG HT, ZHAO XY. Isolation and identification of halotolerant bacteria from salt-soda soil[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2008, 40(9): 49-50, 54 (in Chinese).
- [8] ZHANG TT, ZHANG X, LI YZ, YANG N, QIAO LJ, MIAO ZQ, XING JW, ZHU DR. Study of osmoadaptation mechanisms of halophilic *Halomonas alkaliphila* XH26 under salt stress by transcriptome and ectoine analysis[J]. *Extremophiles*, 2022, 26(1): 14.
- [9] 朱德锐, 龙启福, 沈国平, 李丹丹, 刘德立. 青海湖樊氏盐单胞菌 QHL5 四氢嘧啶合成影响因素分析[J]. *环境化学*, 2015, 34(1): 111-116.
ZHU DR, LONG QF, SHEN GP, LI DD, LIU DL. Accumulation and influential factors of ectoine synthesis in *Halomonas ventosae* QHL5 isolated from Qinghai Lake[J]. *Environmental Chemistry*, 2015, 34(1): 111-116 (in Chinese).
- [10] QUILLAGUAMÁN J, HATTI-KAUL R, MATTIASSON B, ALVAREZ MT, DELGADO O. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(Pt 3): 721-725.
- [11] ZHANG SS, PAN J, LU WD, YAN YC, WANG HS, WIEGEL J, ZHAO BS. *Halomonas urumqiensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline-alkaline lake[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(5): 1962-1969.
- [12] ROMANO I, GIORDANO A, LAMA L, NICOLAUS B, GAMBACORTA A. *Halomonas campaniensis* sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2005, 28(7): 610-618.
- [13] POLI A, ESPOSITO E, ORLANDO P, LAMA L, GIORDANO A, de APPOLONIA F, NICOLAUS B, GAMBACORTA A. *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov., isolated from saline Lake Cape Russell in Antarctica, an alkaliphilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(1): 31-38.
- [14] 陶宇杰, 舒志万, 郭敏, 高翔, 王嵘, 沈国平, 韩睿, 朱德锐. 西藏扎布耶盐碱湖细菌的多样性与分离菌株的生长特性[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(12): 5286-5299.
TAO YJ, SHU ZW, GUO M, GAO X, WANG R, SHEN GP, HAN R, ZHU DR. Bacterial diversity and

- growth characteristics of isolates from Zabuye Lake, Xizang[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(12): 5286-5299 (in Chinese).
- [15] 汪明香, 郭敏, 高翔, 李永臻, 韩睿, 朱德锐, 沈国平. 磁性纳米金属对盐单胞菌生长特性及胞内 Ectoine 的积聚影响[J]. *中国生物工程杂志*, 2023, 43(5): 45-54.
WANG MX, GUO M, GAO X, LI YZ, HAN R, ZHU DR, SHEN GP. Effects of magnetic nano-metals on growth characteristics and intracellular ectoine accumulation of *Halomonas* sp. XH26[J]. *China Biotechnology*, 2023, 43(5): 45-54 (in Chinese).
- [16] 朱德锐, 刘建, 刘静静, 沈国平, 龙启福, 高翔, 刘德立. 青海湖嗜盐菌的分离与优势菌株 QHL5 的特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(5): 797-803.
ZHU DR, LIU J, LIU JJ, SHEN GP, LONG QF, GAO X, LIU DL. Isolation of halophiles from Qinghai Lake and growth characteristics of dominant strain QHL5[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2012, 18(5): 797-803 (in Chinese).
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG XZ, CAI MY. *Handbook of Identification of Common Bacterial Systems*[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [18] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
Buchanan RE, Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [19] 刘建, 李丹丹, 杨芳, 芮昊晨, 沈国平, 刘德立, 朱德锐. 一株积聚四氢嘧啶的青海湖盐单胞菌的分离及特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(6): 1049-1055.
LIU J, LI DD, YANG F, RUI HC, SHEN GP, LIU DL, ZHU DR. Isolation and characteristics of a *Halomonas* sp. accumulating ectoine from Qinghai Lake[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2012, 18(6): 1049-1055 (in Chinese).
- [20] 周佳, 陈研, 屈建航, 王宇坤, 李培龙, 徐伟龙, 黄英杰, 买文宁. 一株耐盐菌 *Halomonas* sp. A20 的分离及降解糖精钠废水的特性[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(3): 942-955.
ZHOU J, CHEN Y, QU JH, WANG YK, LI PL, XU WL, HUANG YJ, MAI WN. Isolation of the salt-tolerant bacterium *Halomonas* sp. A20 and its degradation of saccharin sodium wastewater[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(3): 942-955 (in Chinese).
- [21] ROMANO I, LAMA L, NICOLAUS B, POLI A, GAMBACORTA A, GIORDANO A. *Halomonas alkaliphila* sp. nov., a novel halotolerant alkaliphilic bacterium isolated from a salt pool in Campania (Italy)[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2006, 52(6): 339-348.
- [22] BERLANGA M, MIÑANA-GALBIS D, DOMÈNECH O, GUERRERO R. Enhanced polyhydroxyalkanoates accumulation by *Halomonas* spp. in artificial biofilms of alginate beads[J]. *International Microbiology*, 2012, 15(4): 191-199.
- [23] REN JL, WEI CZ, MA HJ, DAI MY, FAN JZ, LIU Y, WU YH, HAN R. The nitrogen-removal efficiency of a novel high-efficiency salt-tolerant aerobic denitrifier, *Halomonas alkaliphile* HRL-9, isolated from a seawater biofilter[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 16(22): 4451.
- [24] VANDRICH J, PFEIFFER F, ALFARO-ESPINOZA G, KUNTE HJ. Contribution of mechanosensitive channels to osmoadaptation and ectoine excretion in *Halomonas elongata*[J]. *Extremophiles*, 2020, 24(3): 421-432.
- [25] CZECH L, BREMER E. With a pinch of extra salt-Did predatory protists steal genes from their food?[J]. *PLoS Biology*, 2018, 16(2): e2005163.
- [26] 周月慧, 张苓花, 王飞, 永田进一, 王运吉. 一株中度嗜盐菌 SL21 合成 Ectoine 的研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2006, 27(2): 81-85.
ZHOU YH, ZHANG LH, WANG F, SHINICHI N, WANG YJ. Study on the ectoine synthesis with moderately halobacterium-SL21[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2006, 27(2): 81-85 (in Chinese).
- [27] 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).
- [28] 王魁荣, 张树军, 李少贺, 桑小雪, 白林含. 一株中度

- 嗜盐菌 *Halomonas* sp. NY-011 的耐盐特性及机理[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(2): 256-260.
- WANG KR, ZHANG SJ, LI SH, SANG XX, BAI LH. Osmotolerance property and mechanism of a moderately halophilic bacterium *Halomonas* sp. NY-011[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2010, 16(2): 256-260 (in Chinese).
- [29] 沈国平, 张鑫, 王智博, 舒志万, 崔金子, 衡珊, 汪明香, 朱德锐, 王嵘. 不同浓度 L-谷氨酸钠高效促进盐单胞菌 XH26 胞内合成 Ectoine 及相关代谢途径与 Ectoine 合成通路的关联性[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2023, 44(4): 277-284.
- SHEN GP, ZHANG X, WANG ZB, SHU ZW, CUI JZ, HENG S, WANG MX, ZHU DR, WANG R. Different concentrations of L-sodium glutamate effectively promoted the biosynthesis of ectoine and the correlation between related metabolic pathways and ectoine synthesis pathway of *Halomonas* sp. XH26[J]. Journal of Chinese High Altitude Medicine and Biology, 2023, 44(4): 277-284 (in Chinese).
- [30] 刘静. 青海小柴旦盐湖嗜盐微生物资源挖掘与 Ectoine 积聚发酵条件优化[D]. 西宁: 青海大学硕士学位论文, 2018.
- LIU J. The exploitation of halophilic microorganism resources in Xiaochaidan salt lake of Qinghai and the optimization of ectoine fermentation conditions[D]. Xining: Master's Thesis of Qinghai University, 2018 (in Chinese).
- [31] 李莉, 张赛, 何强, 胡学斌. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.
- LI L, ZHANG S, HE Q, HU XB. Application of response surface methodology in experiment design and optimization[J]. Research and Exploration in Laboratory, 2015, 34(8): 41-45 (in Chinese).
- [32] KUSHWAHA B, JADHAV I, VERMA HN, GEETHADEVI A, PARASHAR D, JADHAV K. Betaine accumulation suppresses the de-novo synthesis of ectoine at a low osmotic concentration in *Halomonas* sp. SBS 10, a bacterium with broad salinity tolerance[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(5): 4779-4786.
- [33] OMARA AMA, SHARAF AEM M, EL-HELA AA, SHAHIN AAM, EL-BIALY HAA, EL-FOULY MZ. Optimizing ectoine biosynthesis using response surface methodology and osmoprotectant applications[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(6): 1003-1017.