

一株中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. NY-011 的耐盐特性及机理*

王魁荣 张树军 李少贺 桑小雪 白林含**

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610065)

摘要 对本实验室分离到的一株中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. NY-011 的耐盐特性和耐盐机理进行了初步研究. NY-011 在 LB 培养基中最大能耐受 260 g/L NaCl 浓度, 在 M63 培养基中能耐受大于 150 g/L NaCl 浓度. Cl⁻ 的缺少对 NY-011 的耐盐生长有明显抑制, K⁺ 较 Li⁺ 和 Mg²⁺ 更适合于为 NY-011 提供内部渗透压力. NY-011 通过在胞内积累 K⁺、游离氨基酸及其他相容性溶质对抗胞外渗透压力. NY-011 胞内相容性溶质组成随培养基 NaCl 浓度变化而变化, 四氢嘧啶是最主要的组成成分, 含量随培养基 NaCl 浓度增加而增加, 120 g/L NaCl 时浓度可达到 71.5 mg/g 干重. NY-011 还可吸收胞外的四氢嘧啶和甜菜碱以平衡外界高渗透压. 随着培养基中 NaCl 浓度的提高, NY-011 菌体蛋白的合成受到明显抑制. 图 5 表 2 参 24

关键词 盐单胞菌属; 中度嗜盐菌; 耐盐特性; 耐盐机理; 相容性溶质; 四氢嘧啶

CLC Q939.105

Osmotolerance Property and Mechanism of a Moderately Halophilic Bacterium *Halomonas* sp. NY-011*

WANG Kuirong, ZHANG Shujun, LI Shaohe, SANG Xiaoxue & BAI Linhan**

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract A moderately halophilic bacterium *Halomonas* sp. NY-11 was isolated from our laboratory, and its osmotolerance property and mechanism were studied. Strain NY-11 could maximally tolerate 260 g/L NaCl in LB medium and its tolerance to NaCl was over 150 g/L in M63. The absence of chloridion would obviously inhibit the growth of NY-11 under salt and potassium was more suitable to provide intracellular osmotic pressure than lithium and magnesium. NY-11 accumulated potassium, free amino acids and other compatible solutes to equilibrate extracellular osmotic pressure. The components of the intracellular compatible solutes of NY-11 varied with the changing of NaCl concentrations in medium, while ectoine, which was the most important component, increased with the increasing of NaCl concentration, reaching 71.5 mg/g by dry weight under 120 g/L NaCl. NY-11 could import extracellular ectoine and glycine betaine to improve osmotolerance, and the synthesis of protein was obviously depressed by the increased NaCl concentration in medium. Fig 5, Tab 2, Ref 24

Keywords *Halomonas*; moderately halophilic bacterium; osmotolerance property; osmotolerance mechanism; compatible solute; ectoine

CLC Q939.105

中度嗜盐菌能耐受含 0~320 g/L NaCl 的高盐环境^[1], 广泛分布于细菌域的各主要系统发育分枝上, 包括好氧化能异养菌、厌氧化能异养菌、光能自养菌、光能异养菌、化能无机营养细菌等多种营养类型的细菌. 目前, 已发现的中度嗜盐菌多数为盐单胞菌科 (*Halomonadaceae*) 的革兰氏阴性菌, 也有其他科的好氧或兼性厌氧革兰氏阴性菌、好氧革兰氏阳性菌、产甲烷古菌或严格厌氧细菌. 其中盐单胞菌科革兰氏阴性菌多数属于盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和色盐杆菌属 (*Chromohalobacter*) 两个属.

中度嗜盐菌在食品工业、酶制剂生产、基因工程、化妆品生产、多聚体生产、环境污染的生物修复等领域具有广泛的应用价值^[2~3]. 中度嗜盐菌的耐盐机理复杂多样, 已经被

阐述的有相容性溶质的积累, 细胞膜、壁的稳定构造, 细胞容积的调节, 质膜、色素及 H⁺ 泵作用, 排盐作用等^[4]. 相容性溶质不仅能为细胞提供渗透保护, 还能通过“优先排除模式”^[5]和热力学效应^[6]等对细胞内的生物大分子起抗热、抗旱、抗冻和抗变性等稳定作用, 在酶工程、分子生物学、基因工程和化妆品工业中被广泛应用^[7]. 已经被发现的相容性溶质包括糖类和糖苷类 (海藻糖、葡萄糖苷等)、氨基酸类 (谷氨酸、脯氨酸和谷氨酰胺等)、甜菜碱类 (甘氨酸甜菜碱、脯氨酸甜菜碱等)、四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶以及乙酰二氨基酸 (乙酰鸟氨酸、乙酰赖氨酸等)^[8]. 四氢嘧啶类物质是目前发现的在细菌界分布最广泛的相容性溶质, 它不仅是一种重要的渗透压调节剂, 而且有渗透压基因诱导^[9]、抗逆保护^[10]、分子伴侣^[11]、防辐射和保湿等作用, 在农业和生物医学领域有着广阔的应用前景.

NY-011 是从盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 培养物内筛选到的一株具有广泛 NaCl (0~260 g/L) 耐受范围的嗜碱耐盐

收稿日期: 2009-09-19 接受日期: 2009-11-10

*国家自然科学基金项目 (Nos. 30500006, 30970043) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30500006, 30970043)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: bailinhan@scu.edu.cn)

菌,是典型的中度嗜盐菌,且在本属内耐盐能力相对较高。细胞形态电镜观察、生理生化分析以及16S rDNA序列比对显示该菌属于盐单胞菌属(*Halomonas*),但与本属已经报道的最接近的种*Halomonas pantelleriensis*仍存在差异^[12],可能为本属新种。因此,本研究对其耐盐特性及耐盐机理进行了探讨,具有潜在的理论研究及实际应用价值。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株 NY-011为本实验室从盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)培养物内筛选得到,初步鉴定为盐单胞菌属(*Halomonas* sp.)。

1.1.2 试剂与仪器 LB培养基:10 g胰化蛋白胨,0.5 g酵母提取物,NaCl视需要加入,加水至1 L, pH=7.5(以KOH调节)。

M63基础培养基:KH₂PO₄ 13.6 g, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.5 mg, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, 葡萄糖10 g, NaCl视需要加入,加水至1 L, pH=7.5(以KOH调节)。

1.2 NY-011的耐盐特性研究

1.2.1 不同培养基对NY-011耐盐生长的影响 接种NY-011于系列NaCl浓度的LB培养基和M63基础培养基中,于30℃、200 r/min培养18 h,紫外-可见分光光度计(岛津UV2100)测定600 nm下OD值,比较其生长情况。

1.2.2 不同种类的阴、阳离子对NY-011耐盐生长的影响 在无NaCl的M63培养基中,控制Na⁺的浓度为0.34 mol/L,然后按需要分别加入NaNO₃、Na₂SO₃、Na₂SO₄、NaF;控制Cl⁻的浓度为0.34 mol/L,然后按需要加入NaCl、KCl、MgCl₂、LiCl;接种NY-011于30℃、200 r/min培养18 h,测定600 nm下OD值,比较其生长情况。

1.2.3 不同渗透冲击对NY-011耐盐生长的影响 分别将培养于20 g/L、100 g/L NaCl浓度的处于对数生长期的NY-011接种到不同NaCl浓度的M63培养基中,于30℃、200 r/min培养18 h,测定600 nm下OD值,比较其生长情况。

1.2.4 不同接种量对NY-011耐盐生长的影响 分别按照1%、2%和5%接种量接种NY-011到不同NaCl浓度的M63培养基中,于30℃、200 r/min培养18 h,测定600 nm下OD值,比较其生长情况。

1.2.5 外加相容性溶质对NY-011耐盐生长的影响 分别将谷氨酸、甘氨酸甜菜碱和四氢嘧啶加入不同NaCl浓度的M63培养基中至终浓度为1 mmol/L,接种NY-011于30℃、200 r/min培养18 h,测定600 nm下OD值,比较其生长情况。

1.3 NY-011的耐盐机理研究

于系列NaCl浓度下培养NY-011至对数生长期,离心收集菌体。

参照Olga C. Nunes等的方法^[13]提取NY-011胞内相容性溶质,600 MHz ¹³C NMR (Bruker AV II-600 MHz)确定相容性溶质种类。

参照Shinichi Nagata等的方法^[14]提取NY-011胞内K⁺和Na⁺,原子吸收光谱仪(VARIAN SpectraAA 220Z)确定胞内K⁺、Na⁺浓度;提取NY-011胞内游离氨基酸,氨基酸自动分析仪(日立8800)确定胞内游离氨基酸的浓度。

参照洪青等的方法^[15]提取NY-011菌体总蛋白,Bradford

法测定菌体总蛋白。

参照Valentina N. Khmelenina等^[16]和Shinichi Nagata等^[17]的方法分别提取NY-011胞内总相容性溶质和低渗条件下胞外释放相容性溶质,600 MHz ¹H NMR (Bruker AV II-600 MHz)测定四氢嘧啶的浓度。

2 结果与讨论

2.1 NY-011的耐盐特性

2.1.1 不同培养基对NY-011耐盐生长的影响 从图1中可以看出,NY-011在LB培养基和M63培养基中均有较广的耐盐范围,在LB中生长明显较M63中旺盛。菌株在LB中的最佳生长NaCl浓度为100 g/L,而在M63中为20 g/L。当M63培养基中NaCl浓度大于150 g/L后,NY-011基本停止生长。

培养基营养的丰富程度对NY-011耐盐生长影响较大,LB培养基中含有复杂的营养组成,某些组分可能会被其回收利用或者对其产生某种生理作用,从而提高其耐盐能力。

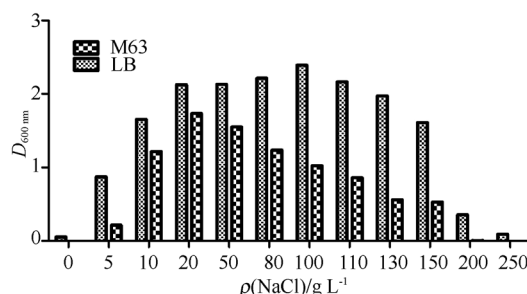


图1 不同培养基对NY-011耐盐生长的影响
Fig. 1 Effect of different media on salt-tolerant growth of NY-011

2.1.2 不同种类的阴、阳离子对NY-011耐盐生长的影响 从图2-A中可以看出,NY-011在含有4种不同钠盐的培养基上生长受到明显抑制,这说明Cl⁻对其耐盐生长是必需的。在3种不同盐酸盐中,NY-011只在KCl中生长良好,在与Na⁺同族的Li⁺以及二价的Mg²⁺中生长均受到明显抑制。

Markus Roebler等认为,嗜盐菌胞内某些用于适应高渗透环境的生理行为有Cl⁻依赖性,Cl⁻的缺失会严重影响嗜盐菌对高渗透环境的适应^[18-19]。中度嗜盐菌生长对盐的需求有两个方面,一方面要一定量的Na⁺来维持跨膜的Na⁺梯度,另一方面是为了保持细胞内外渗透压平衡。从图2-A中可以看出,K⁺在提供胞内渗透压方面要比Li⁺以及Mg²⁺更有效。

2.1.3 不同渗透冲击对NY-011耐盐生长的影响 从图2-B中可以看出,渗透冲击对NY-011的耐盐生长有显著影响。在100 g/L NaCl浓度下生长的接种物在20~150 g/L NaCl浓度范围内均较20 g/L NaCl浓度下生长的接种物有生长优势,且前者在170 g/L NaCl浓度时仍有明显生长,而后者在150 g/L NaCl浓度时已基本停止生长。

这主要是因为NY-011在较高NaCl浓度下,胞内适应高渗透环境的生理状态可以直接在接种到新鲜培养基后发挥作用,不用度过相对较长的适应期而直接进入对数生长期,从而达到较大的菌体产量。细菌表面的渗透感应系统也会直接以工作状态进入新鲜培养基而省去受渗透正调控过程^[20]。

2.1.4 不同接种量对NY-011耐盐生长的影响 从图2-C中可以看出,较大的接种量可以有效地促进NY-011的耐盐生长。以

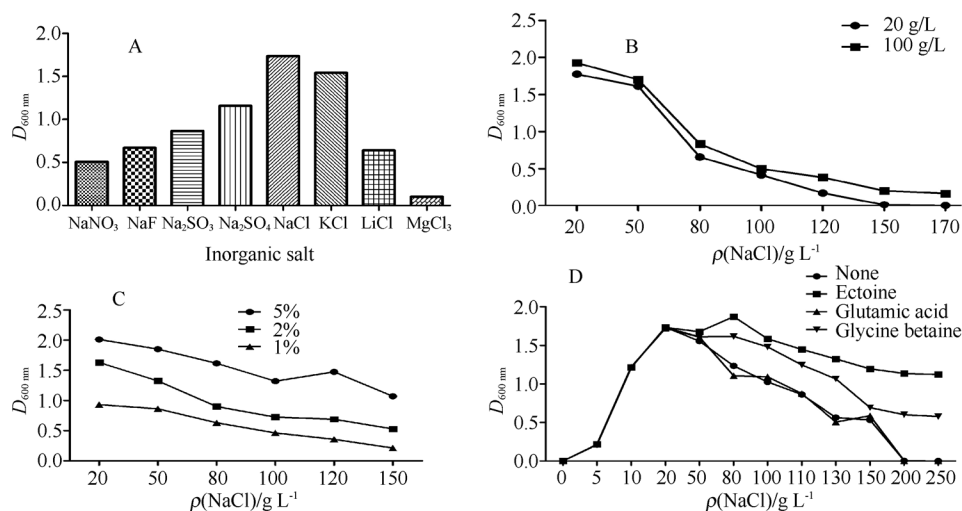


图2 无机离子、渗透冲击幅度、接种量和外加相容性溶质对NY-011耐盐生长的影响

Fig. 2 Effects of inorganic ions, osmotic shock intensity, inoculum size and extraneously additional compatible solutes on salt-tolerant growth of NY-011

5%浓度接种后在150 g/L NaCl浓度下的菌体产量是以1%浓度接种后在20 g/L NaCl浓度下菌体产量的1.15倍。

这可能有三方面的原因。一方面,较大的本底细胞浓度经过对数期生长后会产生较大的菌体产量;第二,嗜盐菌会在胞内积累相容性溶质的同时向胞外少量释放,从而对周围环境中的细胞产生渗透保护作用;第三,生物界普遍存在相同物种在面临恶劣环境下的协同作用,嗜盐菌也不例外。

2.1.5 外加相容性溶质对NY-011耐盐生长的影响 从图2-D可以看出,在低渗条件(0~50 g/L NaCl)下外加相容性溶质对NY-011的耐盐生长影响不大,而在高渗条件下(80~250 g/L NaCl)外加1 mmol/L四氢嘧啶和甜菜碱可以显著增强NY-011的耐盐生长,外加谷氨酸对其耐盐生长影响不明显。四氢嘧啶的增强作用最为显著,在外加1 mmol/L四氢嘧啶情况下,NY-011在200 g/L NaCl浓度下的生长状况几乎与没有外加任何相容性溶质情况下其在80 g/L NaCl浓度下的生长状况持平。

嗜盐菌除了自身合成相容性溶质以抵抗外界渗透压力外,也会通过细胞膜上的转运系统从周围环境中吸收相容性溶质以节省从头合成所需的能量^[21]。已被证实的相容性溶质大都存在独有或共有的转运系统。从图2-D可知,NY-011细胞膜可能存在相应的转运系统得以将外加的四氢嘧啶和甜菜碱吸收,从而更好地抵抗高渗透环境。外加谷氨酸对NY-011的耐盐生长没有明显影响,可能有两方面原因:一方面其细胞膜表面没有相对应的转运系统,另一方面可能M63的组成成分对谷氨酸转运系统有某种抑制或失活作用。

2.2 NY-011的耐盐机理

2.2.1 NY-011胞内相容性溶质的提取和测定 从表1可以看出,

表1 NY-011胞内相容性溶质
Table 1 Intracellular compatible solutes of NY-011

Medium	$\rho(\text{NaCl})/\text{g L}^{-1}$				
	20	60	100	150	220
LB	G+B+E	G+B+E	G+B+E	G+B+E+H	B+E+H
M63	G+E	G+E	G+E+H		

G: 谷氨酸; B: 甜菜碱; E: 四氢嘧啶; H: 羟基四氢嘧啶

G: Glutamate; B: Glycine betaine; E: Ectoine; H: Hydroxyectoine

不同NaCl浓度和不同营养成分的培养基均对NY-011胞内相容性溶质种类产生影响。在LB培养基中,当NaCl浓度达到150 g/L后,羟基四氢嘧啶开始被合成,当NaCl浓度达到220 g/L时谷氨酸不再被合成。在M63培养基中,当NaCl浓度达到100 g/L后,羟基四氢嘧啶开始被合成,在各NaCl浓度下均没有甜菜碱合成。两种培养基的不同NaCl浓度下四氢嘧啶始终作为主要相容性溶质被合成。

产生这种现象的原因是合成四氢嘧啶所需要的前体物质可以通过简单碳源从头合成^[22],而合成甜菜碱所需的前体物质需要通过相对复杂的碳源从头合成^[23],LB培养基成分复杂营养丰富极有可能含有合成甜菜碱所需的前体物质。

2.2.2 NY-011胞内 K^+ 、 Na^+ 的提取和测定 从图3中可以看出,NY-011胞内的 K^+ 浓度随着培养基NaCl浓度的提高而迅速增加,而胞内的 Na^+ 浓度并没有明显变化趋势。

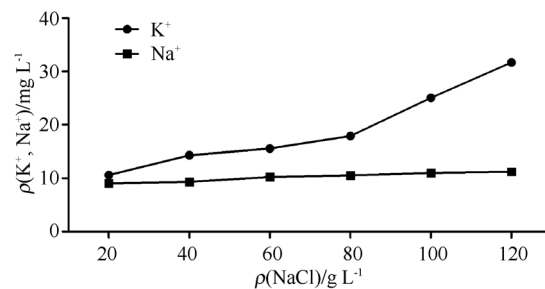
图3 NY-011胞内 K^+ 和 Na^+ 浓度变化

Fig. 3 Changes in intracellular K^+ and Na^+ concentrations of NY-011

K^+ 最早被认为是无机相容性溶质的一员,在调节细菌胞内外渗透平衡以及维持胞内某些生理活动的稳定中有重要作用,但越来越多的证据表明,嗜盐菌胞内 K^+ 的积累只是一个短期或暂时的过程,持续培养后 K^+ 的积累将逐渐被有机相容性溶质取代^[24]。

2.2.3 NY-011胞内游离氨基酸的提取和测定 从表2中可以看出,随着培养基NaCl浓度的提高,NY-011胞内氨基酸总量有明显增加,谷氨酸在3个NaCl浓度下均被大量合成。天冬氨酸、丙氨酸、缬氨酸和赖氨酸有明显的NaCl浓度正调控趋势。

氨基酸作为相容性溶质已经被大量证实,且除谷氨酸、谷氨酰胺和脯氨酸外多为不参与蛋白质合成的 β -氨基酸.天冬氨酸、缬氨酸和赖氨酸在体系中总量有限,故不认为其作为相容性氨基酸存在,赖氨酸和缬氨酸受渗透压力调控还未见文献报道,相关渗透调控机理有待进一步研究.

表2 NY-011胞内游离氨基酸变化

Table 2 Changes in intracellular free amino acids of NY-011

氨基酸 (w/mg g ⁻¹)	Amino acids (w/mg g ⁻¹)	NaCl (ρ /g L ⁻¹)		
		20	80	120
Asp	Asp	1.6004	3.5964	5.3786
Thr	Thr	0.0914	0.0833	0.0923
Ser	Ser	0.1189	0.0733	0.0693
Glu	Glu	7.9561	6.9764	7.9409
Gly	Gly	0.4801	0.1565	0.1962
Ala	Ala	0.3658	0.4329	1.108
Cys	Cys	0.2743	0.1665	0.1847
Val	Val	0.1326	0.1082	0.3924
Met	Met	0.0914	0.0882	0.0785
Leu	Leu	0.096	0.2997	0.1801
Tyr	Tyr	0.2743	0.9324	0.6694
Phe	Phe	0.096	0.1665	0.0762
Lys	Lys	0.1029	3.663	3.6473
Arg	Arg	0.9374	0.0932	0.0923
总氨基酸	Total amino acids	12.7115	16.8165	20.0831

2.2.4 NY-011菌体总蛋白的提取和测定 从图4可以看出,随着NaCl浓度的提高,NY-011菌体总蛋白含量明显减少,160 g/L NaCl浓度下其菌体总蛋白浓度已经少于20 g/L NaCl浓度下的1/3.

可能有两方面的原因导致此种情况发生:一方面,由于很多游离氨基酸具有相容性溶质作用,在处于高渗透环境下细胞更倾向于将氨基酸保持游离状态或转变成 β -氨基酸,从而使蛋白质合成缺少原料,另一方面,可能由于高渗透压力下合成蛋白质的过程受到破坏或抑制,从而使蛋白质合成受阻.

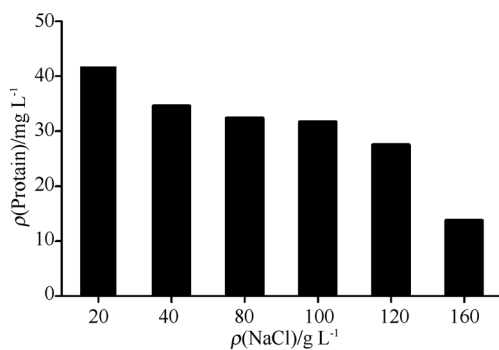


图4 NY-011菌体总蛋白浓度变化

Fig. 4 Change in total cellular proteins of NY-011

2.2.5 NY-011胞内四氢嘧啶的提取和测定 从图5中可以看出,随着NaCl浓度的提高,NY-011胞内合成四氢嘧啶的总量以及用低渗(不含NaCl的蒸馏水)冲击后向胞外的释放量均明显增加,释放量占合成总量的比例也随之有所提高.

由¹³C-NMR结果可知,四氢嘧啶在各渗透压力下始终作为最主要的相容性溶质存在.虽然谷氨酸持续被大量合成,且当NaCl浓度达到100 g/L后羟基四氢嘧啶开始出现,但这

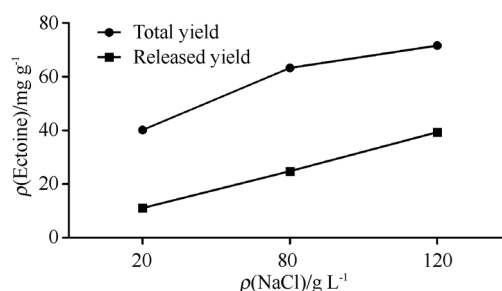


图5 NY-011胞内四氢嘧啶浓度变化

Fig. 5 Change in intracellular ectoine concentrations of NY-011

些仍不足以抵抗外界的渗透压力,NY-011仍需要合成大量的四氢嘧啶(120 g/L NaCl浓度下可合成71.53 mg/g干重)来弥补谷氨酸和羟基四氢嘧啶的不足.虽然NY-011可在胞内积累大量四氢嘧啶,但低渗冲击下其向胞外释放率不高,会对“细菌挤奶”工艺生产四氢嘧啶产生阻碍,相关解决方案需进一步研究优化.

3 结论

中度嗜盐菌*Halomonas* sp. NY-001在LB培养基和M63培养基中均有较高耐盐性,在胞内积累丰富的氨基酸和相容性溶质,有潜在的工业利用价值.NY-001可以从环境中吸收相容性溶质以对抗高盐环境,存在潜在的转运体系,与相容性溶质合成体系共同构成了以相容性溶质为媒介的抗盐系统,其相关基因资源有巨大的研究和利用价值.

NY-001抗盐机理与已经报道的抗盐机理基本吻合,说明这些机理在嗜盐菌中广泛存在.嗜盐菌的抗盐机理相当复杂,有许多假设还未得到验证,需要进行更多更深层次的研究.

References

- Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**: 504~544
- Zhao BS (赵百锁), Yang LF (杨礼富), Song L (宋蕾), Wang H (王慧). Biotechnology applications in moderately halophilic eubacteria. *Microbiology* (微生物学通报), 2007, **34** (2): 359~362
- Hong Q (洪青), Xu JH (徐剑宏), Wang YD (王云端), Wu J (武俊), Zhang XZ (张晓舟), Li SP (李顺鹏). Cloning of a salt-tolerance related DNA fragment of a moderate halophilic bacterium *Halomonas* sp. BYS-1. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2006, **12** (3): 375~378
- Liu AM (刘爱民). Study advanced on the halophile. *J Anhui Norm Univ Nat Sci* (安徽师范大学学报自然科学版), 2002, **25** (2): 181~184
- Bolen DW, Baskaov IV. The osmophobic effect: Natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Mol Biol*, 2001, **310**: 955~963
- Oren A, Latimer F, Richardson P, Lapidus A, Csonka LN. How to be moderately halophilic with broad salt tolerance: Clues from the genome of *Chromohalobacter salexigens*. *Extremophile*, 2005, **9**: 275~279
- Zhao BS (赵百锁), Yang LF (杨礼富), Wang L (王磊), Lu WD (卢伟东), Yang SS (杨苏声). Study progress on compatible solutes in moderately halophilic bacteria. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2007, **47** (5): 937~941

- 8 Empadinhas N, da Costa MS. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: Distribution of compatible solutes. *Intern Microbiol*, 2008, **11**: 151~161
- 9 Jebbar M, Sohn-Bösser L, Bremer E, Bernard T, Bianco C. Ectoine-induced proteins in *Sinorhizobium meliloti* include an ectoine ABC-Type transporter involved in osmoprotection and ectoine catabolism. *J Bacteriol*, 2005, **187**: 1293~1304
- 10 Schnoor M, Voss P, Cullen P, Böking T, Galla HJ, Galinski EA, Lorkowski S. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem & Biophys Res Commun*, 2004, **322** (3): 867~872
- 11 Furusho K, Yoshizawa T, Shoji S. Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol Dis*, 2005, **20**: 170~178
- 12 Xiong Y (熊焰), Wu P (吴鹏), You FF (尤芳芳), Ruan K (阮琨), Cao Y (曹毅), Qiao DR (乔代蓉), Bai LH (白林含). Isolation and characterization of a moderately halophilic bacterium *Halomonas* sp NY-011. *J Sichuan Univ Nat Sci* (四川大学学报自然科学版), 2008, **45** (5): 1239~1244
- 13 Nunes OC, Manaia CM, Da Costa MS, Santos H. Compatible solutes in the thermophilic bacteria *Rhodothermus marinus* and “*Thermus thermophilus*”. *Appl & Environ Microbiol*, 1995, **61** (6): 2351~2357
- 14 Nagata S, Sasaki H, Oshima A, Takeda S, Hashimoto Y, Ishida A. Effect of proline and K⁺ on the stimulation of cellular activities in *Escherichia coli* K-12 under high salinity. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, **69** (4): 740~746
- 15 Hong Q (洪青), Zhang GS (张国顺), Zhang ZH (张忠辉), He J (何健), Li SP (李顺鹏). Osmoregulation of a halophilic bacteria strain *Halomonas* sp. BYS-1. *Microbiology* (微生物学通报), 2004, **31** (5): 72
- 16 Khmelenina VN, Kalvuzhnaya MG, Sakharovsky VG. Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs. *Arch Microbiol*, 1999, **172**: 321~329
- 17 Nagata S, Wang YB. Accumulation of ectoine in the Halotolerant *Brevibacterium* sp. JCM 6894. *J Biosci & Bioengin*, 2001, **91** (3): 288~293
- 18 Roebler M, Muller VV. Quantitative and physiological analyses of chloride dependence of growth of *Halobacillus halophilus*. *Appl & Environ Microbiol*, 1998, **64** (10): 3813~3817
- 19 Roessler M, Sewald X, Müller V. Chloride dependence of growth in bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **225**: 131~165
- 20 Rübénhagen R, Rönsch H, Jung H, Krämer R, Morbach S. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J Biol Chem*, 2000, **275** (2): 735~741
- 21 Pflüger K, Müller V. Transport of compatible solutes in extremophiles. *J Bioenergetics & Biomembranes*, 2004, **36** (1): 17~23.
- 22 Peters P, Galinski A, Truper G. The biosynthesis of ectoine. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, **71**: 157~162
- 23 Cánovas D, Vargas C, Kneip S, Morón MJ, Ventosa A, Bremer E, Nieto JJ. Genes for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Microbiology*, 2000, **146**: 455~463
- 24 Calderón MI, Carmen V, Foio F, Iglesias-Guerra F, Csonka LN, Ventosa A, Nieto JJ. Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T. *Microbiology*, 2004, **150**: 3051~3063