

一株藻际耐盐碱菌的筛选与分离鉴定及耐盐碱基因分析

卢肖^{1*}, 郭琳珂¹, 赵越¹, 杨胜辉¹, 李宇晴¹, 张林林^{1,2#}

¹山东科技大学安全与环境工程学院, 山东 青岛

²山东科技大学黄河三角洲地表过程与生态完整性研究所, 山东 青岛

收稿日期: 2025年3月3日; 录用日期: 2025年4月3日; 发布日期: 2025年4月17日

摘要

本研究从球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)藻际环境中分离获得一株耐盐碱菌株 *Microbacterium paraoxydans* IGS-10, 通过生理生化特性分析、16S rRNA系统发育学鉴定及全基因组测序技术, 系统解析其耐盐碱分子机制。实验结果显示, IGS-10在NaCl浓度 $\leq 6\%$ (w/v)和pH 7-10范围内均能稳定生长, 表明该菌株对高盐碱环境具有显著适应性。基因组测序揭示其基因组大小约为3.84 Mb, GC含量70.35%, 并携带30余个与耐盐碱密切相关的功能基因, 包括离子转运系统基因以及相容性溶质(甜菜碱和海藻糖)合成基因。本研究不仅丰富了藻际微生物资源库, 还为解析极端环境微生物的适应性进化机制提供了关键分子证据, 对耐盐碱微生物资源的农业与工业应用具有潜在参考价值。

关键词

藻际细菌, 耐盐碱, 基因分析

Screening, Isolation, and Identification of a Haloalkaliphilic Bacterium from the Phycosphere: Genetic Characterization of Salt-Alkali Tolerance Mechanisms

Xiao Lu^{1*}, Linke Guo¹, Yue Zhao¹, Shenghui Yang¹, Yuqing Li¹, Linlin Zhang^{1,2#}

¹School of Safety and Environmental Engineering, Shandong University of Science and Technology, Qingdao Shandong

²Institute of Surface Processes and Ecological Integrity of the Yellow River Delta, Shandong University of Science and Technology, Qingdao Shandong

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 卢肖, 郭琳珂, 赵越, 杨胜辉, 李宇晴, 张林林. 一株藻际耐盐碱菌的筛选与分离鉴定及耐盐碱基因分析[J]. 环境保护前沿, 2025, 15(4): 477-487. DOI: 10.12677/aep.2025.154054

Abstract

In this study, a saline-tolerant strain *Microbacterium paraoxydans* IGS-10 has been isolated from *Isochrysis galbana* in the algal environment. Through physiological and biochemical analysis, 16S rRNA phylogenetic identification and whole genome sequencing technology, *Microbacterium Paraoxydans* IGS-10 has been obtained. The molecular mechanism of saline-alkali resistance was systematically analyzed. The experimental results showed that IGS-10 could grow stably in the range of NaCl concentration $\leq 6\%$ (w/v) and pH 7-10, indicating that the strain had remarkable adaptability to high saline-alkali environment. Genome sequencing revealed that its genome size was about 3.84 Mb, GC content was 70.35%, and it carried more than 30 functional genes closely related to saline-alkali tolerance, including ion transport system genes and compatible solutes (betaine and trehalose) synthesis genes. This study not only enriches the algal microbial resource pool, but also provides key molecular evidence for the analysis of the adaptive evolutionary mechanism of microorganisms in extreme environments, and has potential reference value for the agricultural and industrial application of saline-tolerant microbial resources.

Keywords

Algal Bacteria, Saline-Alkali Tolerance, Gene Analysis

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

耐盐碱微生物是极端微生物的重要类群，能在氯化钠浓度超 3%且 pH 值高于 8.5 的强碱性环境中正常代谢，在盐湖生态系统、人工盐田、盐渍化农田基质及碱性水体沉积物等典型高盐碱生境中形成稳定群落。如中国松嫩平原盐碱地(pH 8.5-10.5, 盐分 1%~5%)分离到多种耐盐碱芽孢杆菌[1]; 埃及 Wadi Natrun 湖(pH 10-11, 盐分 20%~30%)是嗜盐碱古菌的重要来源[2]; 美国大盐湖(盐分 15%~28%)分离到耐盐菌 *Halomonas* 和 *Salinibacter* [3]。在海洋生态系统中，藻类与细菌长期共生、协同进化[4]，微藻生长环境周边的藻际环境中存在着藻菌相互影响的微观区域，在此生长的细菌被称为藻际细菌[5]。藻类生长过程中会分泌氨基酸类、脂质、维生素及酶类等多种代谢产物[6]。本课题组成功从球等鞭金藻藻液中分离得到一株藻际细菌副氧化微杆菌(*Microbacterium paraoxydans*)。微细菌(*Microbacterium* spp.)是广泛存在于环境中的一种黄色棒状，革兰氏阳性杆菌[7]。副氧化微杆菌可从重金属污染土壤、植物和石油污染湖泊中分离出来，部分能通过表达 Cr(VI)还原酶降低有毒重金属六价铬，还能释放挥发性硫化物促进植物生长[8]。

全基因组测序(Whole Genome Sequencing)是通过高通量测序手段解析生物体全部遗传信息的生物技术，能够完整揭示物种的基因组特征和功能元件[9]。在微生物研究领域，基因组解析流程主要涵盖核酸提取与测序、序列拼接与组装、基因组序列补全、开放阅读框识别以及实施功能注释等核心步骤，最终通过比较基因组学揭示菌株间的进化关系[10]。这项技术可系统性阐明盐碱耐受微生物的遗传特征及其环境适应机理，为相关研究奠定重要数据基础。

2. 耐盐碱微生物的核心适应机制

2.1. 渗透压调节

嗜盐碱菌类发展出精密的渗透压调控体系,主要通过 KCl 型(依赖胞内盐分积累机制)和有机渗透物型(基于相容性溶质合成机制)两种策略适应环境[11]。1972 年,澳大利亚学者确立“相容性溶质”概念,它是一类能维持细胞渗透压平衡且干扰细胞关键代谢进程,保护生物大分子结构与功能的有机小分子[12]。耐盐微生物构建以相容性溶质为核心的渗透调节系统,通过合成通路运输网络精准调控渗透保护因子,建立稳定胞内渗透微环境。面临渗透胁迫时,启动应激调控网络,触发水合屏障重构机制,稳定蛋白质折叠中间态,建立跨膜渗透压梯度补偿系统[13]。借助高效液相色谱分析手段或是凭借核磁共振检测技术,研究人员成功分离并鉴定出大量的相容性溶质,主要涵盖氨基酸类(如谷氨酸、谷氨酰胺)、氨基酸衍生品类(包含四氢嘧啶、甘氨酸甜菜碱、羟基四氢嘧啶)、多糖类(例如海藻糖)以及聚醇类(以甘油为典型代表)[14]。

2.2. 细胞膜与细胞壁修饰

细胞膜是抵御盐碱胁迫的第一道屏障,其脂质组成的变化直接影响膜的流动性和稳定性。耐盐碱微生物通过增加磷脂酰甘油(Phosphatidylglycerol, PG)和心磷脂(Cardiolipin)的比例,增强膜表面负电荷密度,排斥高盐环境中的 Na^+ ,减少钠离子内流。部分极端嗜盐碱古菌(如 *Halalkalicoccus*)通过合成醚脂(Ether lipids)和 GDGTs 替代传统酯脂,增强膜的热稳定性及抗离子渗透能力。一些微生物还可通过膜蛋白(如 NhaC 家族)主动排出胞内 Na^+ ,维持胞内低钠环境,嗜碱菌则通过增强膜上 H^+ -ATPase 的活性,维持胞内 pH 稳态。微生物会通过增加脂肪酸链长度和降低不饱和度,减少膜流动性,防止高盐环境下的过度渗透,盐胁迫诱导去饱和酶基因(如 *desA*)表达下调,抑制不饱和脂肪酸合成[15]。

细胞壁也会发生改变以适应盐碱环境。增厚肽聚糖层可增强机械强度,抵抗细胞脱水;分泌胞外多糖吸附 Na^+ 和缓冲 pH 变化,减轻盐碱胁迫对细胞壁的损伤[16]。部分耐盐碱菌合成特殊多糖(如硫酸化多糖)嵌入肽聚糖层,增强抗逆性[17]。

2.3. 无机盐离子的调节

离子键在耐盐碱细菌维持细胞壁结构稳固方面起着关键作用。一定浓度的 Na^+ 是保障细胞壁完整性、维持细胞正常生理功能不可或缺的元素,但胞内 Na^+ 浓度过高会产生负面效果,所以细胞必须建立 Na^+ 排出机制,维持细胞内环境稳定[18]。当细菌处于高盐环境,细胞水势下降,水分流失,无机离子涌入,菌体细胞积累无机盐离子,同时衍生出“盐排入”“盐排出”等适应性策略[19]。耐盐细菌能够借助能量依赖性机制,将胞内高浓度的 Na^+ 释放到细胞外,营造胞内低 Na^+ 浓度的环境。此外, K^+ 在耐盐菌应对盐胁迫的过程中也发挥着极为关键的作用。

此外,抗氧化系统中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽(GSH)协同清除因为盐碱胁迫造成的活性氧(ROS)。

3. 材料与方法

3.1. 实验菌株分离鉴定

实验菌株采用稀释涂布平板法从球等鞭金藻藻液中筛出,共筛选出 21 种藻际细菌,预实验得到一株能明显耐受盐碱的细菌并经过三次平板划线分离出纯菌,命名为 *Microbacterium paraoxydans* IGS-10 (IGS-10)。采用 16S rRNA 基因序列分析技术,经 NCBI 数据库 BLAST 工具完成同源性比对后,运用 MEGA

6.0 生物信息学软件基于邻接法(Neighbor-Joining)构建菌株系统发育树。采用甘油冷冻保护剂制备菌种保藏管,置于-80℃超低温生物储存箱中进行长期低温保藏。

3.2. 实验方式

3.2.1. 菌株的培养

从-80℃冰箱取出实验用菌 IGS-10,用破冰器取出适量菌液接种在 2216E 固体培养基上,全部操作均于无菌操作台中、酒精灯火焰旁开展。完成接种的平板随即放入已设定温度为 30℃的生化培养箱内,培养时长控制在 2 至 3 天。培养结束后,将平板转移至 4℃的冰箱里储存,留作后续实验备用。

3.2.2. IGS-10 在不同浓度盐碱下的生长量

从 4℃的冰箱内取出适量菌体,接种至装有 3~5 mL 2216E 液体培养基的试管中。紧接着,把完成接种的试管置于恒温摇床,在温度 30℃、转速 120 rpm 的条件下,培养 12 至 18 小时。待菌液的 OD 值达到 1.0 时,留存备用。以氢氧化钠与氯化钠为原料,配制 50 mL 体系、不同 pH 值和盐浓度的 2216E 液体培养基。往各培养基中加入 0.1 mL OD 值为 1.0 的上述菌液,随后将其放置在 30℃、120 rpm 的恒温摇床内培养。每间隔 12 小时,于无菌操作台中,从各培养基里分别取 5 mL 充分混匀的菌液,运用可见分光光度计,测定菌液在 600 nm 波长处的吸光度,以此表征细菌的生长态势。

3.2.3. 基因组测序组装分析

首先在 2216E 液体培养基中实施活化培养(30℃, 120 rpm, 24 h),离心收集菌体后采用 CTAB 法提取高质量基因组 DNA。使用超声破碎仪(Covaris)将 DNA 随机片段化至 350~500 bp,经末端修复、加尾处理后衔接 A/B 适配体构建 Illumina 文库。通过磁珠筛选排除适配体自连产物,利用 BluePippin 系统(2% Agarose Cassette)精确筛选含异源适配体的目标片段。经 0.1 M NaOH 溶液变性处理获得单链模板,通过桥式 PCR 扩增建立测序簇。经 Illumina NovaSeq 与 PacBio Sequel II 平台实施双维测序,原始数据经 FastQC 质控后采用 SPAdes v3.15 进行 denovo 组装,获得完成图级基因组。基因组测序交由上海美吉生物科技有限公司完成。

3.2.4. 耐盐碱基因分析

把获取到的基因数据与 NR 数据库进行比对。这里的 NR,即 Non-Redundant Protein Database (非冗余蛋白数据库),由 NCBI (National Center for Biotechnology Information, 美国国家生物技术信息中心)构建并持续维护。完成比对后, NR 注释的结果会通过表格呈现,针对每个样本里的各个基因,详细展示注释信息,涵盖基因的功能描述以及具体的比对详情。

4. 结果

4.1. 菌株分离与鉴定

如图 1 所示,分离得到的菌株,表面湿润,有一定的光泽度,黄色透明,颜色较为鲜艳且均匀,透明度较高,透过光线可以较为清晰地看到菌落内部结构。

如图 2 所示,16S rRNA 序列与 *Microbacterium paraoxydans* 相似度最高,系统发育树显示其归属于副氧化微杆菌属。

4.2. IGS-10 在不同浓度盐碱下的生长量

如图 3 所示,菌株 IGS-10 在 0%~4% NaCl 浓度范围内未表现出显著生长抑制效应。具体表现为:在低盐度(0%~2%)条件下,菌体于 24 h 内迅速进入对数生长期并达到最大生物量($OD_{600} \approx 2.0$),随后进入稳定期;而当盐度提升至 2%~4%时,菌株虽出现短暂的生长迟滞(延滞期延长至 12~18 h),但其仍能通过

代谢适应性调整, 在 48 h 内完成增殖过程($OD_{600} \approx 1.75$)。进一步实验表明, 该菌株对 NaCl 的耐受阈值可达 6%, 而 8% NaCl 则显著抑制其生长($OD_{600} < 0.5$), 表明其具备中高盐度环境适应能力。IGS-10 在 pH 7~10 范围内均能保持稳定的生长活性, 各处理组生长曲线斜率与生物量积累量(OD_{600} 终值 > 1.8)高度一致。值得注意的是, 即使在强碱性条件(pH 11)下, 菌株仍可维持缓慢但持续的生长趋势(48 h 内 OD_{600} 达 0.8~1.2), 表明其胞内 pH 稳态系统具有高效调控能力。

综上, IGS-10 在宽幅盐度(0%~6% NaCl)及碱性(pH 7~10)环境下的稳定生长特性, 充分证明该菌株具备显著的盐碱双重胁迫耐受机制, 为其在盐碱地生物修复或高盐废水处理中的应用提供了理论基础。

4.3. IGS-10 基因组概述

借助 Illumina 测序平台, 对菌株基因实施质控分析流程。经质控筛选出符合既定标准的 Clean data,

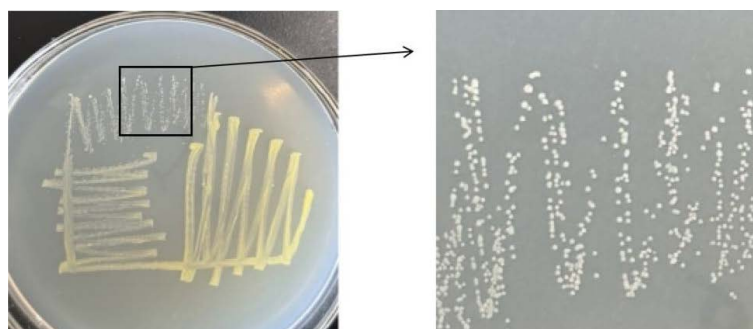


Figure 1. Morphology of strain IGS-10
图 1. 菌株 IGS-10 形貌

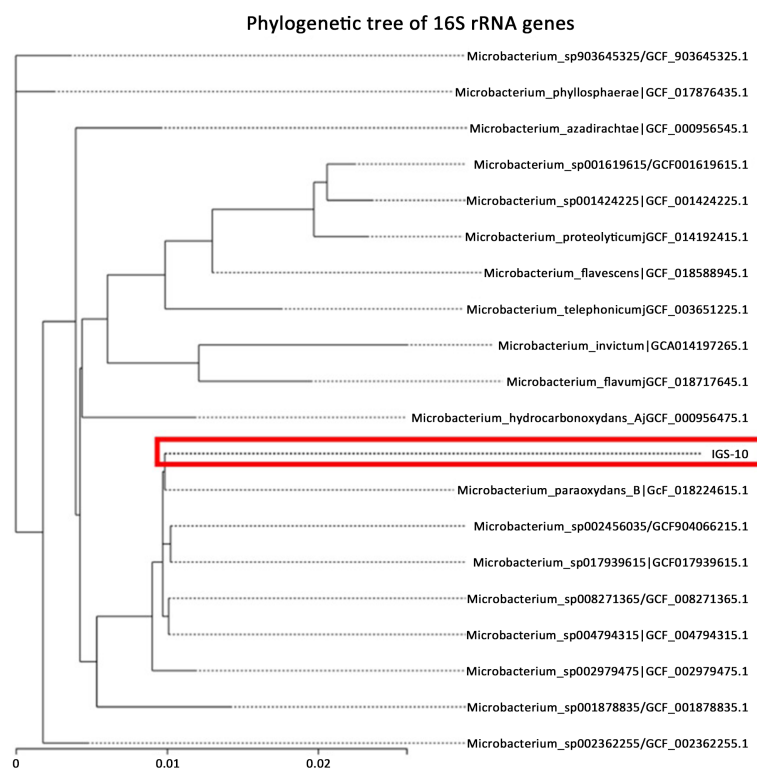


Figure 2. Evolutionary tree of experimental bacteria
图 2. 实验用菌的进化树

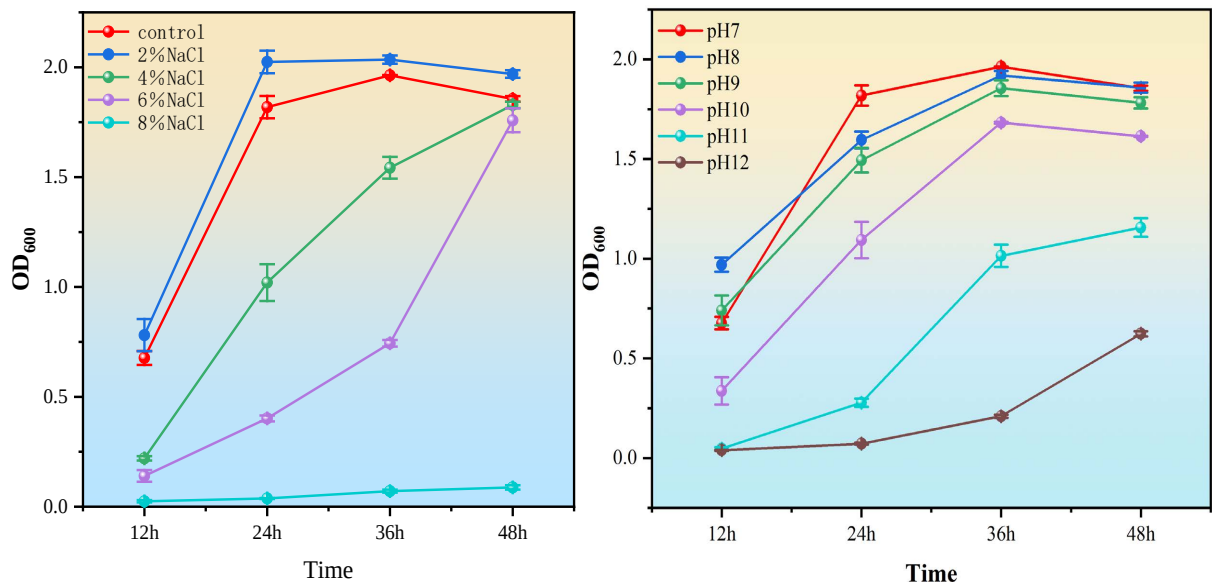


Figure 3. Growth amount of IGS-10 under different concentrations of NaCl and different pH

图 3. IGS-10 在不同浓度 NaCl 及不同 pH 下的生长量

随后运用从头组装技术，基于这些高质量数据构建出基因组序列。在获取基因组序列后，对其展开全面的基因特征预测工作。具体涵盖了对编码基因、tRNA、rRNA、持家基因、sRNA 以及串联/散在重复序列的预测分析，具体见表 1。

Table 1. IGS-10 genome profile statistics

表 1. IGS-10 基因组概况统计

Sample Name	Genome Size (bp)	Chrom No.	GC Content (%)	CDS No.	tRNA No.	rRNA No.	16S rRNA No.	sRNA No.	House-Keeping Gene No.
IGS-10	3837508	1	70.35	3666	47	6	2	13	31

4.4. IGS-10 耐盐碱基因

通过 NR 注释结果，我们分析得到以下和 IGS-10 耐盐碱相关的基因，主要包括离子转运系统、相容性溶质代谢(海藻糖合成、甜菜碱合成)等相关基因，具体见表 2。

Table 2. IGS-10 saline-alkali tolerance genes

表 2. IGS-10 耐盐碱基因

基因缩写 Gene abbreviation	基因编号 Gene ID	菌株 IGS-1010			功能描述 Function description
		起终位置 Starting and ending position	长度 Length (bp)		
mnhA/mrpA	gene0085	87979-90951	2973		Na ⁺ /H ⁺ 反转运子亚基 A
mnhC/mrpC	gene0086	90951-91538	588		Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ 反转运子亚基 C
mnhD/mrpD	gene0087	91535-93088	1554		Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ 反转运子亚基 D
mnhE/mrpE	gene0088	93085-93678	594		Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ 反转运子亚基 E
mnhF	gene0089	93675-93944	270		单价阳离子/H ⁺ 反转运复合物亚基 F

续表

mnhG	gene0090	93941-94330	390	单价阳离子/H ⁽⁺⁾ 反转运子亚基 G
nhaA	gene1196	1232201-1233376	1176	Na ⁺ /H ⁺ 反向转运子 NhaA
	gene1486	1542897-1541611	1287	Na ⁺ /H ⁺ 反向转运子 NhaA
nhaK	gene2517	2603975-2602209	1767	Na ⁺ /H ⁺ 逆向转运
	gene3111	3210316-3208586	1731	阳离子: 质子转运体
chaA	gene0045	53010-51862	1149	钙: 质子转运体
kdpA	gene0362	390398-388719	1680	钾转运 ATP 酶亚基 KdpA
kdpB	gene0361	388717-386582	2136	钾转运 ATP 酶亚基 KdpB
kdpC	gene0360	386558-385953	606	钾转运 ATP 酶亚基 KdpC
kdpD	gene0359	385956-383404	2553	DUF4118 结构域蛋白
kdpE	gene0358	383407-382736	672	响应监管机构
betB	gene0495	537631-539010	1380	含 FHA 结构域的蛋白
	gene2804	2909984-2908413	1572	APC 家族渗透酶
glyA	gene1076	1096851-1098125	1275	丝氨酸羟甲基转移酶
betI	gene0533	585220-584591	630	TetR/AcrR 家族转录调控因子
	gene1152	1184103-1183501	603	TetR/AcrR 家族转录调控因子
	gene1124	1154900-1154289	612	TetR/AcrR 家族转录调控因子
	gene1166	1198446-1199033	588	TetR/AcrR 家族转录调控因子
opuA	gene0122	127632-128492	861	ATP 结合盒结构域蛋白
opuBD	gene0124	129178-129903	726	ABC 转运蛋白渗透酶亚基
	gene0123	128489-129181	693	ABC 转运蛋白渗透酶亚基
opuC	gene0125	129949-130866	918	ABC 转运蛋白底物结合蛋白
opuD	gene0271	287893-289857	1965	BCCT 家族转运体
otsA	gene1622	1682746-1684206	1461	海藻糖-6-磷酸合成酶
otsB	gene1623	1684268-1685068	801	海藻糖磷酸酶
treY	gene3690	3799109-3801457	2349	麦芽糖低聚海藻糖合成酶
treZ	gene3691	3801471-3803225	1755	麦芽糖低聚海藻糖海藻水解酶

离子转运系统主要包括 Mrp、Nha、Cha、Kdp 转运蛋白的基因: mnh 基因编码的膜转运蛋白属于阳离子/质子反转运蛋白家族, 这些反转运蛋白由七个疏水性膜结合蛋白亚基组成, 对细菌在高盐环境中生存和生物被膜形成等生理功能有重要作用。这种蛋白通过调节细胞内的 Na⁺和 H⁺稳态, 帮助细菌维持细胞内外的离子平衡, 从而适应高盐、高碱等极端环境。nhaA 基因表达产物 NhaA 蛋白系典型的 pH 依赖性 Na⁺/H⁺逆向转运膜蛋白, 其通过电化学梯度驱动的跨膜逆向转运机制, 催化胞内 Na⁺外排与 H⁺内流的耦合交换反应。该转运体在细胞碱胁迫应答及离子平衡调节中发挥关键作用, 其构象转换过程严格受跨膜质子动力势调控。nhaK 基因编码 NhaK 蛋白能够利用 ATP 水解产生的能量逆浓度梯度运输钠离子, 从而维持细胞内低钠离子浓度。细菌的 kdpA、kdpB 和 kdpC 基因编码的蛋白质共同构成了 KdpFABC 膜复合物, 该复合物在细菌的钾离子运输和稳态维持中发挥着关键作用。

TCDDB function classification: IGS-10

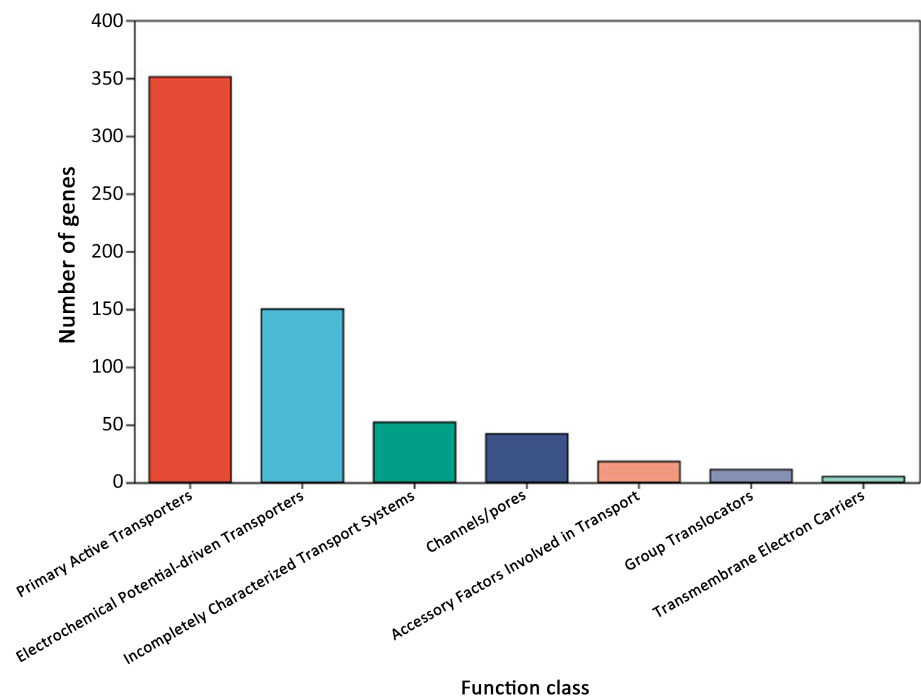


Figure 4. Prediction and classification of IGS-10 transporters
图 4. IGS-10 转运蛋白预测分类

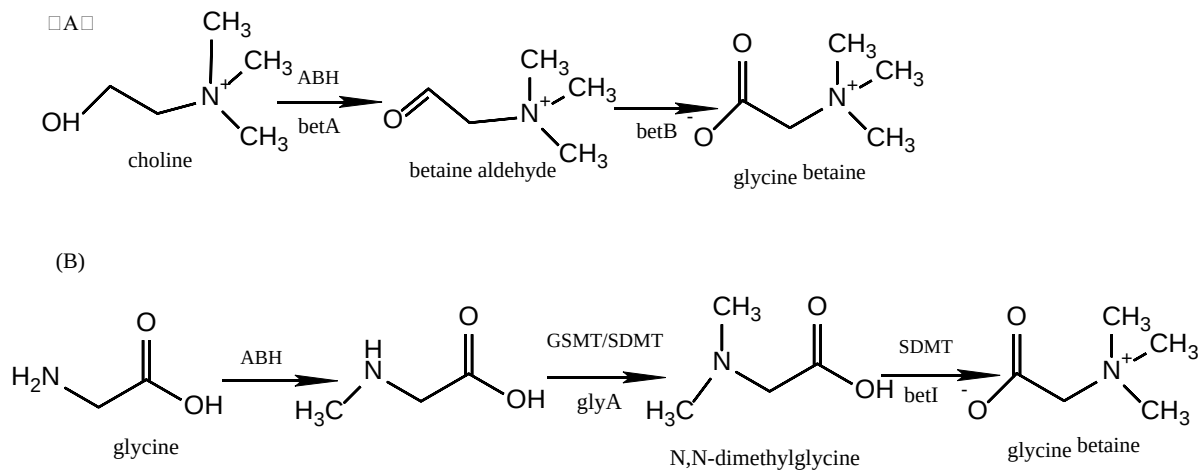


Figure 5. Betaine synthesis
图 5. 甜菜碱合成

转运蛋白(transport proteins)是膜蛋白的一大类,介导生物膜内外的化学物质以及信号交换。如图 4 所示,IGS-10 中和主要主动转运蛋白相关的基因有 351 个,和电化学电位驱动的转运体相关的基因有 150 个,运输系统相关的基因有 52 个。这些蛋白能够识别并转运特定的离子(如 Na^+ 、 K^+ 等),以维持细胞膜两侧的电位差、pH 值和细胞内外的离子平衡,从而保护细胞免受损害,确保细胞的正常生理功能。

IGS-10 在相容性物质合成相关的基因主要包括甜菜碱和海藻糖。嗜盐菌中甘氨酸甜菜碱的生物合成存在两条代谢通路:胆碱代谢途径与甘氨酸连续甲基化途径[20]。(A)胆碱转化通路以胆碱为起始物质,

通过胆碱脱氢酶(BetA)与甜菜碱乙醛脱氢酶(BetB)的连续催化,经两次氧化反应将胆碱转化为甜菜碱;(B)甘氨酸甲基化通路则通过甘氨酸肌醇甲基转移酶(GSMT)与肌氨酸二甲基甘氨酸甲基转移酶(SDMT)的三步 N-甲基化作用,逐步修饰甘氨酸生成甜菜碱。值得注意的是,IGS-10 菌株中 betA、betB 基因分别调控胆碱脱氢酶与甜菜碱乙醛脱氢酶的表达,而 glyA 和 betI 基因则分别对应甘氨酸肌醇甲基转移酶、肌氨酸二甲基甘氨酸甲基转移酶的编码基因。 α/β 水解酶(Alpha/Beta Hydrolase, 简称 ABH)是一个包含多种酶的超家族。具体合成途径见图 5。

opuD 基因负责编码一种甘氨酸甜菜碱转运蛋白,该蛋白在结构上与大肠杆菌 BetT 胆碱转运体及 CaiT 肉碱载体存在显著序列保守性。其核心作用在于协助微生物从外部环境中吸收甘氨酸甜菜碱,这类渗透调节物质通过稳定细胞膜结构显著增强微生物在高渗透压等极端环境中的抗逆能力。opuA 基因则表达 ATP 结合盒(ABC)转运超家族成员,该转运系统依赖底物结合蛋白完成渗透调节物质的跨膜运输过程。

opuBD 基因产物属于外膜蛋白中的 OpuB 亚类,这类跨膜蛋白不仅参与维持细胞膜稳态,还在微生物应对环境胁迫及耐药机制中扮演重要调控角色。opuC 基因编码的相容性溶质转运复合体由三个关键亚基构成:具有底物识别功能的 OpuCC 结合蛋白,以及形成跨膜通道的 OpuCB/OpuCD 异源二聚体。该 ABC 型转运系统通过 ATP 水解供能,能够在渗透压剧烈波动时选择性摄取多种相容性溶质分子,从而维持细胞内外的渗透平衡。

海藻糖属于非还原性二糖,由两个葡萄糖分子经由 α, α -1, 1-糖苷键相互连接构成。作为细胞相容性溶质的类别之一,在盐胁迫环境下,海藻糖能够对细菌体内的蛋白质、酶以及细胞膜等生物大分子起到保护作用,使其结构与功能得以稳定维持。就 IGS-10 细菌而言,其编码产生海藻糖的相关基因涵盖 otsA、otsB 以及 treY-treZ 等。其中,otsA 是编码海藻糖合成关键酶的重要基因之一,它与 otsB 共同构成一个操纵子,在海藻糖的合成进程中承担关键作用。treY 基因编码麦芽寡糖基海藻糖合酶(MTSase),treZ 基因编码麦芽寡糖基海藻糖水解酶(MTHase),这两种酶在海藻糖的生物合成路径中均有参与。具体来说,TreY 蛋白负责催化麦芽寡糖与海藻糖之间的连接反应,从而生成麦芽寡糖基海藻糖;而 TreZ 蛋白则对该中间产物进一步催化水解,最终促使海藻糖生成。

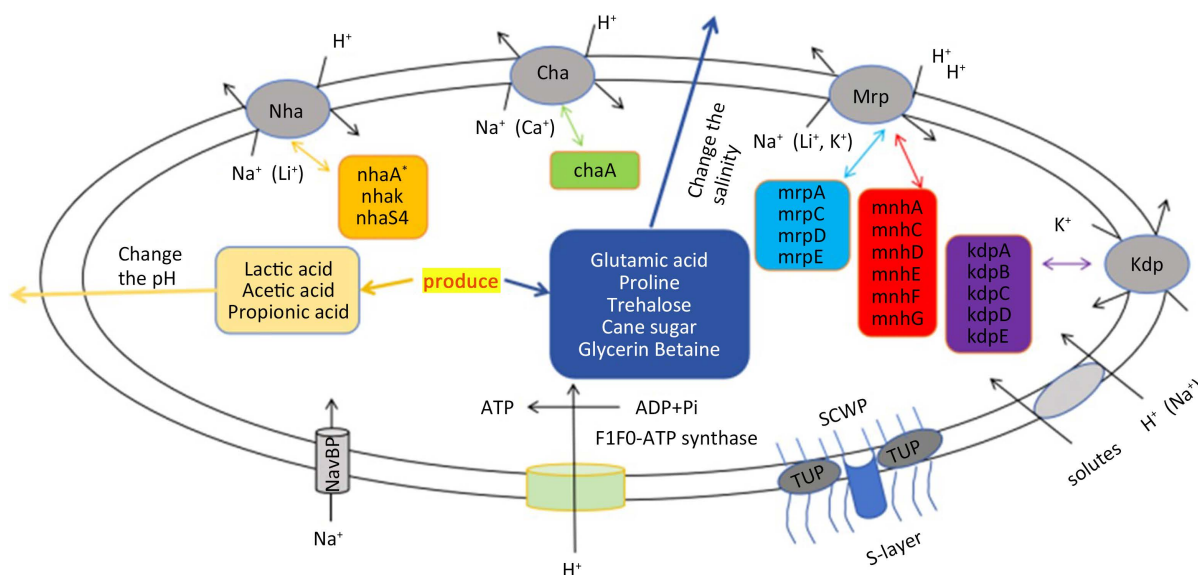


Figure 6. IGS-10 saline-alkali resistance mechanism

图 6. IGS-10 耐盐碱机理

4.5. IGS-10 耐盐碱机制分析

IGS-10 面对碱性环境时, 其通过三重策略协同调控胞内 pH: 首先激活 H^+ 主动转运系统或强化胞内 H^+ 滞留能力, 直接中和碱性环境对质子梯度的破坏; 其次启动有机酸合成通路(如乳酸、乙酸、丙酸), 通过酸性代谢产物的分泌与胞内碱性物质发生中和反应; 同时将部分碱性物质经生物转化修饰为中性化合物(如脱氨反应), 降低其化学活性。此外, 通过动态调整细胞膜脂质组成与膜蛋白分布, 增强膜结构致密性, 形成针对碱性离子的选择性屏障, 有效减少外源碱性物质渗透对 DNA、酶系统等生物大分子的损伤。

IGS-10 在高盐胁迫应对方面, 细菌通过合成相容性溶质建立渗透保护体系: 1) 氨基酸类(谷氨酸、脯氨酸)通过可逆性浓度调节参与渗透压平衡, 兼具代谢中间体功能; 2) 糖类衍生物(海藻糖、蔗糖)凭借羟基网络形成结构化水合层, 协同调节渗透压与能量储备; 3) 甜菜碱类利用两性离子特性在不干扰酶活性的前提下调节离子平衡。这些溶质通过浓度梯度驱动实现胞内外渗透压动态平衡, 同时通过分子伴侣功能稳定蛋白质三级结构, 保障关键酶活性及代谢通路运行。

IGS-10 主要通过四种转运蛋白和产生相容性物质以及一些有机酸来面对盐碱的胁迫, 具体机制见图 6。

5. 结论

本研究成功从球等鞭金藻藻际环境中筛选并鉴定出一株耐盐碱菌 *Microbacterium paraoxydans* IGS-10, 通过生理学、基因组学及功能基因分析揭示了其适应盐碱胁迫的分子机制。IGS-10 在 NaCl 浓度 0%~6% 和 pH 7-10 条件下均能高效增殖, 其耐受阈值显著高于多数嗜盐微生物, 表明其具备应对高盐碱环境的独特生理策略。全基因组分析显示, IGS-10 携带多个耐盐碱相关基因簇: 1) *mnh*、*nhaA*、*chaA* 及 *kdp* 基因家族编码的离子转运蛋白通过调控 Na^+/H^+ 交换、 K^+ 吸收及 ATP 依赖的离子外排系统维持胞内离子动态平衡; 2) *otsA/B* 和 *treY/Z* 基因驱动的海藻糖合成途径与 *betA*、*betB*、*glyA*、*betI*、*opu* 家族基因介导的甜菜碱合成摄取系统协同作用, 积累相容性溶质以缓冲渗透压。在高盐环境中, IGS-10 通过“盐排出”策略与“溶质积累”策略(如海藻糖和甜菜碱的合成)共同作用, 有效平衡细胞内外渗透压; 在碱性条件下, 相容性溶质的缓冲效应维持胞内 pH 稳态。本研究首次从藻际环境分离获得具有双耐性(耐盐、耐碱)的副氧化微杆菌, 其基因组中鉴定的功能基因为解析微生物极端环境适应机制提供了新靶点, 在环境修复(盐碱地改良)领域具有重要应用潜力。

参考文献

- [1] 潘媛媛, 黄海鹏, 孟婧, 等. 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.
- [2] Mesbah, N.M. and Wiegel, J. (2012) Life under Multiple Extreme Conditions: Diversity and Physiology of the Halophilic Alkalithermophiles. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 4074-4082. <https://doi.org/10.1128/aem.00050-12>
- [3] Vavourakis, C.D., Ghai, R., Rodriguez-Valera, F., Sorokin, D.Y., Tringe, S.G., Hugenholtz, P., et al. (2016) Metagenomic Insights into the Uncultured Diversity and Physiology of Microbes in Four Hypersaline Soda Lake Brines. *Frontiers in Microbiology*, **7**, Article No. 211. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00211>
- [4] 费聪. 两种微藻与其藻际细菌的相互作用机制[D]: [博士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- [5] Bell, W. and Mitchell, R. (1972) Chemotactic and Growth Responses of Marine Bacteria to Algal Extracellular Products. *The Biological Bulletin*, **143**, 265-277. <https://doi.org/10.2307/1540052>
- [6] 高亚辉. 海洋微藻分类生态及生物活性物质研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001(2): 566-573.
- [7] Lam, P.W., Naimark, D.M. and Leis, J.A. (2018) *Microbacterium* Peritonitis in Peritoneal Dialysis: A Case Report and Review. *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, **38**, 9-13. <https://doi.org/10.3747/pdi.2017.00121>
- [8] Enoch, D.A., Richardson, M.P., Hill, R.L.R., Scorer, P.M. and Sismey, A. (2010) Central Venous Catheter-Related Bacteraemia Due to *Microbacterium paraoxydans* in a Patient with No Significant Immunodeficiency: Table 1. *Journal of Clinical Pathology*, **64**, 179-180. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.084210>

-
- [9] Wa, B.Z., Wu, B., *et al.* (2024) Whole-Genome Sequencing Reveals Autooctoploidy in Chinese Sturgeon and Its Evolutionary Trajectories. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, **22**, 51-65.
- [10] 谷美, 刘慧敏, 孟璐, 等. 全基因组测序技术在细菌耐药性检测中的研究进展[J]. 中国乳品工业, 2019, 47(5): 26-31.
- [11] 宋易洋. 茶卡盐湖一株耐盐菌耐盐应答相关转录组和转录因子 DAP-seq 研究[D]: [硕士学位论文]. 烟台: 烟台大学, 2020.
- [12] Brown, A.D. and Simpson, J.R. (1972) Water Relations of Sugar-Tolerant Yeasts: The Role of Intracellular Polyols. *Journal of General Microbiology*, **72**, 589-591. <https://doi.org/10.1099/00221287-72-3-589>
- [13] Danese, P.N. and Silhavy, T.J. (1998) Cpxp, a Stress-Combative Member of the Cpx Regulon. *Journal of Bacteriology*, **180**, 831-839. <https://doi.org/10.1128/jb.180.4.831-839.1998>
- [14] Tao, P., Li, H., Yu, Y., Gu, J. and Liu, Y. (2016) Ectoine and 5-Hydroxyectoine Accumulation in the Halophile *Virgibacillus Halodenitrificans* PDB-F2 in Response to Salt Stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**, 6779-6789. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7549-x>
- [15] Koller, M. (2019) Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis at the Edge of Water Activity-Haloarchaea as Biopolyester Factories. *Bioengineering*, **6**, Article No. 34. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6020034>
- [16] Purohit, M.K., Raval, V.H. and Singh, S.P. (2013) Haloalkaliphilic Bacteria: Molecular Diversity and Biotechnological Applications. In: Parmar, N. and Singh, A., Eds., *Geomicrobiology and Biogeochemistry*, Springer, 61-79. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41837-2_4
- [17] Gan, L., Huang, X., He, Z. and He, T. (2024) Exopolysaccharide Production by Salt-Tolerant Bacteria: Recent Advances, Current Challenges, and Future Prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, **264**, Article ID: 130731. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130731>
- [18] 熊晶晶. 中度嗜(耐)盐菌的筛选鉴定及对三苯甲烷染料的降解[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽大学, 2020.
- [19] Bader, M., Moll, H., Steudtner, R., Lösch, H., Drobot, B., Stumpf, T., *et al.* (2019) Association of Eu(III) and Cm(III) onto an Extremely Halophilic Archaeon. *Environmental Science and Pollution Research*, **26**, 9352-9364. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04165-7>
- [20] 张英杰, 廖子亚, 赵百锁. 嗜盐菌中甘氨酸甜菜碱的合成途径及其生物学功能[J]. 微生物学报, 2020, 60(6): 1074-1089.