



研究报告

石油降解菌 HX-2 耐盐机制及甜菜碱转运蛋白基因的研究

邱凯旋 吴思 符悦悦 曹家畅 关志国 郭鹏 胡鑫 黄磊*

天津理工大学化学化工学院 天津 300384

摘要:【背景】修复石油烃污染的高盐水体及土壤是具有挑战性的,因此探究石油降解菌株的耐盐机制尤为重要。【目的】对石油降解菌 HX-2 的耐盐机制及与耐盐性相关的基因进行研究。【方法】通过 GC 分析菌株 HX-2 在不同石油加入量及高盐条件下的降解情况;利用电导率仪及原子吸收光谱对细胞内离子含量进行分析;比较外源添加甜菜碱前后对胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)及高盐土壤中石油降解情况的影响;最后对耐盐相关基因进行了 qPCR 分析研究。【结果】石油降解菌 *Rhodococcus* sp. HX-2 可以对 10 000–100 000 mg/L 的石油进行降解,3 d 降解率均达到 70% 以上,并可在 1%–10% NaCl 存在下降解石油,在 6% NaCl 浓度下仍有 43.8% 的降解率。对 HX-2 菌株耐盐机制的研究表明,细胞内阳离子浓度随着盐浓度的变化没有显著差异,而积累相容性物质甜菜碱并促进 EPS 的合成才是石油降解菌 HX-2 的耐盐机制。同时,扫描电镜结果表明,外源甜菜碱的添加通过刺激 EPS 的合成提高菌株的耐盐性。由 HX-2 菌株得到 4 种甜菜碱转运蛋白基因 *H0*、*H1*、*H3*、*H5* 和 1 种甜菜碱合成相关基因 *BetB*。对菌株 HX-2 的基因转录分析表明,NaCl、甜菜碱诱导 *H0*、*H1*、*H3* 和 *H5* 的表达;在甜菜碱与 NaCl 共存时,基因转录水平达到最大值。【结论】*Rhodococcus* sp. HX-2 具有在盐渍化环境中修复烃类污染物的应用潜力。

关键词:石油降解,耐盐机制,甜菜碱,耐盐基因

Salt tolerance mechanism and betaine transport genes of a petroleum-degrading strain HX-2

QIU Kai-Xuan WU Si FU Yue-Yue CAO Jia-Chang GUAN Zhi-Guo GUO Peng
HU Xin HUANG Lei*

School of Chemistry and Chemical Engineering, Tianjin University of Technology, Tianjin 300384, China

Abstract: [Background] It is challenging to remediate water and soil contaminated by petroleum hydrocarbons under high salt conditions. Therefore, it is important to explore the salt tolerance of petroleum hydrocarbon-degrading strains. [Objective] Salt tolerance and relevant genes of petroleum-degrading strain HX-2 were studied. [Methods] The hydrocarbon-degrading strain HX-2 under different petroleum amount

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21777113); Tianjin Natural Science Foundation (15JCQNJC08800); Tianjin National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship (201810060147, 201910060142)

*Corresponding author: E-mail: huanglei@tjut.edu.cn

Received: 05-09-2019; Accepted: 27-11-2019; Published online: 02-01-2020

基金项目:国家自然科学基金(21777113);天津市应用基础及前技术研究计划(15JCQNJC08800);天津市大学生创新创业训练计划(201810060147, 201910060142)

*通信作者: E-mail: huanglei@tjut.edu.cn

收稿日期: 2019-09-05; 接受日期: 2019-11-27; 网络首发日期: 2020-01-02

and high salinity conditions was analyzed by GC. The intracellular ion content was analyzed by conductivity meter and atomic absorption spectroscopy. The effects of exogenous betaine on extracellular polysaccharide and petroleum degradation in high salinity soils were compared before and after adding betaine; finally, the related genes for salt tolerance were analyzed by qPCR. **[Results]** The petroleum-degrading strain *Rhodococcus* sp. HX-2 degraded 10 000–100 000 mg/L of petroleum. After three days of cultivation, the degradation rate of petroleum reached more than 70%, and it degraded petroleum in the presence of 1%–10% NaCl. At 6% salt concentration, the degradation rate was still 43.8%. Studies on the salt tolerance mechanism showed that there was no significant difference in intracellular cation concentration with the change of salt concentration. Accumulating betaine compatible substances and promoting the synthesis of extracellular polysaccharide were the salt tolerance mechanisms of petroleum hydrocarbon-degrading strain HX-2. Meanwhile, the results of scanning electron microscopy showed that the addition of exogenous betaine could improve the salt tolerance of the strain by stimulating the synthesis of EPS. Four betaine transporter genes *H0*, *H1*, *H3*, *H5* and a betaine synthesis related gene *BetB* were obtained from HX-2 strain. The analysis of gene transcription showed that NaCl and betaine induced the expression of *H0*, *H1*, *H3* and *H5*. When betaine coexisted with NaCl, the level of gene transcription reached the maximum. **[Conclusion]** *Rhodococcus* sp. HX-2 has potential application in remediation of hydrocarbon pollutants in saline environment.

Keywords: Petroleum degradation, Salt tolerance mechanism, Betaine, Salt tolerance gene

石油是不同碳氢化合物和非碳氢化合物的复杂混合物，其是一类主要的能源物质，也是工业和日常生活的主要原料^[1]。石油烃的大规模使用以及运输过程中的泄漏会对环境造成严重破坏^[2]。因此，我们迫切需要去除环境中的石油污染^[3]。

在过去几十年中，研究人员提出了几种石油烃类化合物污染的土壤修复技术，其中包括污染物的机械加工处理、溶剂提取和土壤微生物降解(生物修复)^[4-8]。生物修复由于其处理成本低、无二次污染、方便快捷、公众接受程度高和处理效果好等优点而被认为是最有生命力、最具代表性和最有价值的一种高效、经济和绿色的清洁治理技术，具有非常广阔的发展潜力和应用前景^[9]。

高盐度条件下(3%–30% NaCl, 质量体积比)石油烃污染的土壤生物修复具有挑战性，因为微生物活动受到盐度的抑制，较高的盐度会降低氧气含量和烃类化合物的水溶性^[10]。在降解石油的过程中存在过高的盐分不仅会抑制异养细菌的代谢功能，还会降低修复过程的效率^[11]。将耐盐细菌分离后再富集用作处理含盐废水的方法已经十分常见^[12-14]。

细菌通常使用两种不同的策略来抵御外部环境中过量的盐分：第一种是在外部高盐条件下积累 K^+/Cl^- 离子以维持细胞内部的渗透平衡^[15]。这种适应在极端和厌氧嗜盐菌中很常见^[16-17]。然而，大多数耐盐和中度嗜盐细菌表现出第二种策略：积累相容性溶质^[18]。在细胞中，这些溶质通过高浓度积累来维持细胞内外渗透压平衡^[19]。

甜菜碱是一种生物碱，在维持细胞渗透压和减轻盐胁迫方面起着重要作用。甜菜碱具有无静电荷、高溶解度的优点，且高浓度甜菜碱不会影响酶和其他生物大分子的活性^[20]，并且可以减轻高浓度盐对酶活性的毒性，是原核生物中最常见和高效的渗透保护剂^[21]。

同时，很多海洋细菌产生胞外多糖(extracellular polysaccharide, EPS)作为生长策略，使其能够在不利条件下保持外部结构形态不被破坏。EPS在细胞外部形成一层保护膜，防止外界的高温或低温及盐度胁迫。胞外多糖对于生物膜的形成和养分吸收是必不可少的^[22-24]。

存在于微生物和植物中的脂质由胆碱和 2-羟乙基三甲基氯化铵组成，这两种物质在环境中普

遍存在^[25]。其在胆碱脱氢酶(BetA)或甘氨酸甜菜碱醛脱氢酶(BetB)的调控下吸收进入细胞, 并被甘氨酸甜菜碱醛氧化成甘氨酸甜菜碱供生命所用^[26-28]。据文献报道, 甜菜碱转运蛋白基因中最重要的是 BCCT 家族^[29]、ABC 转运蛋白^[30]和 MFS 家族(major facilitator superfamily)^[31]。BCCT 家族的转运蛋白普遍存在于细菌中, 其转运过程由钠离子或质子梯度驱动^[29]。ABC 转运蛋白基因家族是具有更大转运活性的家族之一, 其在所有生物中普遍存在^[32]。在二级转运蛋白中, MFS 家族代表了最大的转运蛋白^[33]。

本文探究了红球菌株 HX-2 的甜菜碱合成相关基因 *BetB* 以及转运蛋白基因 *H0*、*H1*、*H3* 和 *H5* 在高盐条件下的表达, 同时分析了红球菌株 HX-2 的耐盐机制, 并对其在高盐环境下对石油的降解情况进行了探究。对其耐盐机制的分析表明, 菌株主要依靠细胞内相容性物质(甜菜碱)的积累抵御外界高盐环境; 外源添加甜菜碱提高了 EPS 产量以及在高盐土壤中石油的降解率。实验结果将为盐渍化烃类污染的水体以及土壤生物修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

供试石油为克拉玛依油田七中区原油, 其组成成分为: 饱和烷烃 65.75%, 芳香烃 7.67%, 非烃类物质 10.85%, 沥青质 15.72%。经 VARIO EL Cube 元素分析仪测定, 利用热导检测器以及可选择红外检测器对石油成分进行测试, 其质量分数组成为: N 0.41%, C 83.71%, H 12.981%, S 0.411%, O 0.426%, 碳氮比为 205.421 4, 碳氧比为 6.448 4。

RNAprep 细胞/细菌试剂盒、TOYOBO qPCR 试剂盒(内含 IQTM SYBR[®] Green Supermix), 天根生化科技(北京)有限公司。其他化学试剂均为国产分析纯。

Qubit 分光光度计, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 罗氏实时荧光定量 PCR 仪, 北京龙跃生物

科技发展有限公司; 气相色谱仪, Agilent 公司。

1.2 菌株和培养基

菌株 HX-2 筛选自新疆克拉玛依油田, 经多相分析鉴定, 菌株 HX-2 为革兰氏阳性菌, 不运动, 短杆状, 无芽孢, 具有典型的八字型排列特征, 属于红球菌属^[18]。

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0-7.2。

无机盐培养基(g/L): Na₂HPO₄ 1.50, KH₂PO₄ 3.48, (NH₄)₂SO₄ 4.00, MgSO₄ 0.70, 酵母粉 0.01, pH 7.2。无机盐培养基加入 20.00 g/L 石油即为石油降解培养基。

所有培养基均在 2.049 MPa 高压蒸汽灭菌 30 min。

1.3 石油降解实验

1.3.1 石油加入量对降解率的影响

通过稀释涂布的方法确定菌体的菌落形成单位; 对石油降解率的测定采用 GC 检测方法^[34]: 用正己烷萃取培养基中剩余的石油, 萃取后的有机相经 Na₂SO₄ 干燥后使用气相色谱仪测定石油降解率, 使用色谱柱为安捷伦 HP-5 毛细管柱 (30 m×320 μm×0.25 μm), 检测器为 FID 检测器。参数设置为: 进样口温度为 280 °C, 检测器温度为 280 °C。程序升温为初始温度 80 °C, 恒温 1 min, 15 °C/min 升至 260 °C, 恒温 3 min; 载气 N₂ 流速为 10 mL/min, H₂ 为 30 mL/min, 空气为 300 mL/min; 分流比为 1:50, 进样量为 10 μL。石油降解率计算公式:

$$\alpha = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

式中: α 为石油降解率, %; C_0 和 C_1 分别为降解前、后的石油浓度, g/L, C_0 由空白对照测得。

在不同石油浓度(10-100 g/L)的石油降解培养基中按 2% 接种量接种, 25 °C、200 r/min 下培养 5 d 后观察石油降解能力和菌株生长情况。

1.3.2 耐盐性实验

耐盐性实验检测方法同 1.3.1, 通过在石油降

解培养基(50 g/L)中加入不同浓度 NaCl (0%–10%) 考察菌株的耐盐性能, 通过 25 °C、200 r/min 培养 5 d 后, 考察菌株的生长及降解能力。

1.4 HX-2 耐盐机制探究

1.4.1 HX-2 细胞内 K^+/Cl^- 的积累

采用电导率测定的方法比较了 HX-2 与盐敏感的大肠杆菌(DH5 α)的膜渗透率^[35]。使用电导率仪测量在 100 °C 加热 20 min 前后 HX-2 和大肠杆菌(DH5 α)的膜渗透率。

阳离子对维持细胞渗透平衡至关重要^[36]。为进一步探究耐盐机制, 采用原子吸收光谱法测定含有和不含有 6% NaCl 的 LB 培养基中 HX-2 细胞内 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的浓度。

1.4.2 不同盐度下 HX-2 胞外多糖(EPS)的积累

在含有 0%、2%、4%、6%、8%、10% NaCl 的 LB 培养基中接种 HX-2, 25 °C、200 r/min 培养 3 d 后提取 EPS。根据文献^[37]所述, 对提取 EPS 的程序稍作修改。提取步骤为: 4 °C、10 000 \times g 离心 10 min 收集菌体和上清液; 将 3 倍体积预冷无水乙醇加入到 250 mL 上清液中, 沉淀过夜, 用减压抽滤的方法收集沉淀物。将多糖沉淀物与 250 mL 超纯水在 30–40 °C 溶解, 加入 250 mL 10%三氯乙酸, 4 °C 搅拌 12 h, 4 °C、10 000 \times g 离心 40 min 收集上清液, 向上清液中加入 3 倍体积预冷无水乙醇, 沉淀过夜, 4 °C、10 000 \times g 离心 20 min 收集多糖沉淀, 再将多糖溶解于超纯水中, 置于透析袋中(截留分子量 14 000 Da), 在 4 °C 超纯水中透析 2 d, 每 8 h 换一次水, 将透析后得到的 EPS 用冷冻干燥机冷冻干燥 24 h, 得到粗品。

1.4.3 不同盐浓度下相容性溶质的测定

根据本实验室先前研究结果, HX-2 积累的相容性物质主要为甜菜碱, 相关物质的测定参考文献^[18]。

1.5 外源添加甜菜碱对胞外多糖产量及土壤石油污染降解的影响

1.5.1 外源添加甜菜碱对胞外多糖产量及细胞形态影响

为进一步探究外源添加甜菜碱对 EPS 产量的

影响, 在含有 0%、2%、4%、6%、8%、10% NaCl 的 LB 培养基中外源添加 150 mg/L 的甜菜碱并接种, 25 °C、200 r/min 培养 3 d, 4 °C、10 000 \times g 离心 10 min 收集菌体, EPS 收集方法参照 1.4.2。

在 6% NaCl 浓度的石油降解培养基(石油浓度为 5%)中按 2%接种量接种, 添加 150 mg/L 甜菜碱在 25 °C、200 r/min 培养 4 d 后, 4 °C、8 000 \times g 离心 10 min 并收集菌体, 用去离子水洗涤菌体 3 次, 菌体细胞通过戊二醛固定, 之后先后用 70%、90%和 100%的乙醇梯度脱水, 干燥后经喷金等操作后, 利用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察菌体表面形态的变化。选取空白石油降解培养基及 6% NaCl 浓度的石油降解培养基(未添加甜菜碱)作为对照。

1.5.2 外源添加甜菜碱对土壤石油降解的影响

待测土壤来自天津理工大学花坛, 理化性质为 pH 7.2–7.4, 含水量 12.35%–15.28%, 有机质含量 102–122 g/kg, 总氮含量 12–20 g/kg, 有效磷含量 10.0–19.6 g/kg。在进行实验之前, 先从土壤中除去植物残渣和砾石, 使其通过 3 mm 筛, 自然风干 7 d。加入石油的正己烷溶液使测试土壤中石油含量达到 5% (体积/重量)。静置 3 d 使正己烷挥发, 将 10%种子液(体积/重量, 10^8 CFU/mL)加入土壤中。将实验土壤置于 25 °C 恒温培养箱中培养, 定期取样。通过在分液漏斗中将 5 g 土壤样品与 50 mL 正己烷混合, 从土壤中提取石油用于 GC 分析(将收集的土壤在 50 °C 下干燥 48 h 并研磨以确保其均匀性)。将有机相通过 Na_2SO_4 浓缩至 0.2 mL。每组平行 3 个样品考察石油降解情况。另向土壤中加入 2%、4%及 6%的 NaCl (不同质量的 NaCl 溶解在 50 mL 无菌水中并加入到土壤中。待自然条件下干燥 7 d 后用于实验中)。实验组向上述土壤中加入 150 mg/g 甜菜碱。在实验期间每 3 d 将无机盐培养基加入土壤中以确保营养充足。

1.6 耐盐基因分析

1.6.1 甜菜碱合成相关基因及转运蛋白基因

相容性溶质包括甘氨酸甜菜碱、四氢嘧啶、

海藻糖、游离氨基酸等, 其通过生物合成或特定转运蛋白转运而积累^[38-39]。从周围环境中摄取相容性溶质是一种在细菌中常见的策略, 并且比生物合成消耗更少的细胞能量^[29,40]。本实验室之前的工作已经证明了 HX-2 可以自身产生并从周围环境中摄取相容性溶质(甜菜碱), 所以进一步探究甜菜碱产生及转运蛋白基因。根据文献[28]报道, 甜菜碱是通过胆碱脱氢酶(BetA)和甜菜碱醛脱氢酶(BetB)的活性合成的。甜菜碱的转运蛋白基因有很多种, 其中最为主要的是 BCCT 家族^[29]、ABC 转运蛋白^[30]以及 MFS 家族^[31]。依据 GenBank 上已报道的一株 *Rhodococcus erythropolis* CCM2595 中相关基因设计引物(表 1), 验证 HX-2 中的甜菜碱相关基因。

1.6.2 RNA 分离及荧光定量 PCR (qPCR)

对 HX-2 进行 RNA 提取并对甜菜碱合成相关

表 1 引物设计

Table 1 Primer design

目的基因	引物名称	序列
Target gene	Primer	Sequence (5'→3')
<i>BetA</i> (1 485 bp)	BetA-upper BetA-lower	ATGAACACCCGCGAGGAATGG ACTTCGTCGACGTGAATTTGT
<i>BetB</i> (1 500 bp)	BetB-upper BetB-lower	ATGACGGCAGTAGCCGAACAC CCTTGGTCTGGGTGTAGAGAT
<i>BCCT</i> (1 834 bp)	BCCT-upper BCCT-lower	TCAGTCCGTACTGGCGGCTTG GTGGCGTGAACACTACGGAAACC
<i>H1</i> (1 423 bp)	H1-upper H1-lower	ATGACTACACCAGAGAACTCG CCTTCATTCTTTGCGGCGAA
<i>H2</i> (919 bp)	H2-upper H2-lower	ATGCGCACCTCACGATTTTCGT GGCCCTGCGCCGTACCCACG
<i>H3</i> (1 126 bp)	H3-upper H3-lower	GTGATCACATTCGAGGGCGTC TGAAGGCGACTCGGTTGCGTT
<i>H4</i> (664 bp)	H4-upper H4-lower	ATGCGCTGGCTCATCGACAAT CAGCCACGACGGCGGGACCT
<i>H5</i> (670 bp)	H5-upper H5-lower	ATGAGCATCTTACCCGAGCC GTGTTCCGGCGCAGCCTGCCGG
<i>H6</i> (1 615 bp)	H6-upper H6-lower	TTACTCTGTCGGCTTACCGAC ATCCGAACAAGATTCGGGGGC
<i>H7</i> (400 bp)	H7-upper H7-lower	CTACAAGCGATCATCTCCGG GCTCGAGAAGTCTGCTTCGT
<i>H8</i> (627 bp)	H8-upper H8-lower	TGGGCGCCCTATGGGATTTTG TAGTGAGACGACCGATGACGA
<i>H9</i> (1 191 bp)	H9-upper H9-lower	ATGACTGAAACCATTCCGTCT GTCTGGCTCTTCGTCGTGGTC
<i>H10</i> (799 bp)	H10-upper H10-lower	ATGACTGCCACGACAGAGGAG CGAGATAAGTTTCGGCGAGCG
<i>H11</i> (976 bp)	H11-upper H11-lower	ATGACCAAGACTTCGATCACC CTTCCGAGACCAGCCAGTCGC

基因 *BetB* 及 4 种甜菜碱合成蛋白基因 *H0*、*H1*、*H3*、*H5* 的转录水平进行分析, 基因对应的 GenBank 登录号分别为 MN567073、MN567074、MN567075、MN567076、MN567077。HX-2 在不同条件下生长(LB 培养基中额外添加 0%、2%、4%、6%、8%、10% NaCl 和 150 mg/L 甜菜碱), 根据文献[41]的方法对 RNA 进行提取和 qPCR 的测定。在对数生长期收集菌体, 并根据 RNAprep 细胞/细菌试剂盒说明书提取总 RNA。通过使用 Qubit 分光光度计测量分离物质的总 RNA 浓度。利用 TOYOBO qPCR 试剂盒, 使用 500 ng RNA 作为模板进行第一链 cDNA 的合成并建立 20 μL 反应体系。通过 qPCR 仪进行转运蛋白基因的转录分析, 每种转运蛋白基因的特异性引物列见表 2。qPCR 反应体系: IQTM SYBR[®] Green Supermix 10 μL, cDNA 2.0 μL, 引物 F 和引物 R (10 μmol/L)各 0.4 μL, 加

表 2 各种转运蛋白基因的特异性引物

Table 2 Specific primers for various transporter genes

目的基因	引物	序列
Target gene	Primer	Sequence (5'→3')
PCR		
<i>BetB</i>	BetB-F (<i>Xma</i> I)	ATG <u>ACGGC</u> AGTAGCCGAACAC
	BetB-R (<i>Xba</i> I)	CCT <u>TGGTCT</u> GGGTGTAGAGAT
<i>H0</i>	H0-F (<i>Xma</i> I)	TCAG <u>TCCGT</u> ACTGGCGGCTTG
	H0-R (<i>Xba</i> I)	GTG <u>GCGTGA</u> ACTACGGAAACC
<i>H1</i>	H1-F (<i>Xma</i> I)	ATG <u>ACTAC</u> ACCAGAGAACTCG
	H1-R (<i>Xba</i> I)	CCT <u>TCATTCT</u> TTGCGGCGAA
<i>H3</i>	H3-F (<i>Xma</i> I)	GTG <u>ATCAC</u> ATTCGAGGGCGTC
	H3-R (<i>Xba</i> I)	TGA <u>AGGCGA</u> CTCGGTTGCGTT
<i>H5</i>	H5-F (<i>Xma</i> I)	ATG <u>AGCAT</u> CTTACCCGAGCC
	H5-R (<i>Xba</i> I)	GTG <u>TTCGGC</u> GCAGCCTGCCGG
qPCR		
<i>BetB</i>	BetB-F	AGCGTAACCTTCTTCAGATTG
	BetB-R	CGGAGTCGTCAACATCGTTC
<i>H0</i>	H0-F	TGGTTGGTCATCACCATCATC
	H0-R	CCCAGAATCAGGACGAACAG
<i>H1</i>	H1-F	TGGTACTCCTACGCCTACTG
	H1-R	GCCACATATCCTGCCAGAG
<i>H3</i>	H3-F	GTGGTCACGGACAACGGAAC
	H3-R	CGAGTGCTTGGCGGAGATC
<i>H5</i>	H5-F	CATCACTCCCAGACCCATGAG
	H5-R	CGGTGCCCATCGGATTACTC
16S	16S-F	CTCTTTCAGCAGGGACGAAG
	16S-R	AACCGCCTACGAACCTTTTAC

注: 下划线表示限制性内切酶位点。

Note: Underlining indicates restriction enzyme sites.

入 DEPC 水至 20 μL 。qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 61 $^{\circ}\text{C}$ 20 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 74 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 43 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 20 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。使用 16S rRNA 基因标准化作为内部参考对照, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[42]分析实验数据。

2 结果与分析

2.1 石油加入量对菌株降解的影响

由图 1 可见, 菌株 HX-2 在 2% 接种量, 石油浓度在 20 000–100 000 mg/L 以内降解率均在 90% 以上。在石油浓度为 50 000 mg/L 时, 培养 3 d 石油降解率最高达到 97.6%。之后实验中石油浓度均选择 50 000 mg/L。

2.2 不同盐度对 HX-2 石油降解率的影响

盐度是影响微生物生长的一个重要的环境因素。在一定的盐度范围内, 微生物通过各种渗透调节机制平衡细胞内渗透压并保护细胞中的原生质体, 同时调节其代谢以适应盐度变化。过高的盐浓度可能会限制天然微生物种群对烃类化合物的生物降解效率^[43]。如图 2 所示, 菌株 HX-2 能在 NaCl 浓度为 0%–10% 的范围内生长, 在 0%–3% 范围内降解率保持在 80% 以上, 6% 以上的 NaCl 浓度会明显抑制菌株对石油的降解效率, 这表明 HX-2 属于中度耐盐菌, 可以应用于中等盐渍化烃类污染的生物修复。

2.3 HX-2 耐盐机制研究

2.3.1 细胞膜通透性及细胞内阳离子积累

比较了菌株 HX-2 与大肠杆菌(DH5 α)的细胞膜通透性, 以探索 HX-2 的耐盐机制。如图 3A 所示, HX-2 的膜通透性随 NaCl 浓度的增加而显著增加, 这主要是因为高盐浓度下细胞被破坏导致排出到培养基中的额外离子增多以致电导率急剧上升。大肠杆菌(DH5 α)是一种对盐敏感细菌, 因此也表现出相似的反应。相反, 一些嗜盐菌株的膜通透性不会随着盐浓度的增加而急剧增加^[44]。

阳离子对维持细胞渗透平衡至关重要^[36], 为

了进一步研究 HX-2 的耐盐机制, 检测了细胞内离子的积累情况。在添加与不添加 6% NaCl 的 LB 培养基中研究了 HX-2 细胞内不同阳离子的浓度。图 3B 显示了 LB 和 LB+6.0% NaCl 培养基的 HX-2 细胞中 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 和 Na^{+} 积累量的差别, 说明在高盐环境中, 没有过量阳离子在细胞内积累以维持细胞膜的渗透压平衡。据文献^[44]报道, 耐盐烃降解菌株 MU-1 在高盐浓度下迅速积累 K^{+} 以应对高盐环境。由此可以看出, 细胞内离子的积累不是 HX-2 的耐盐机制。

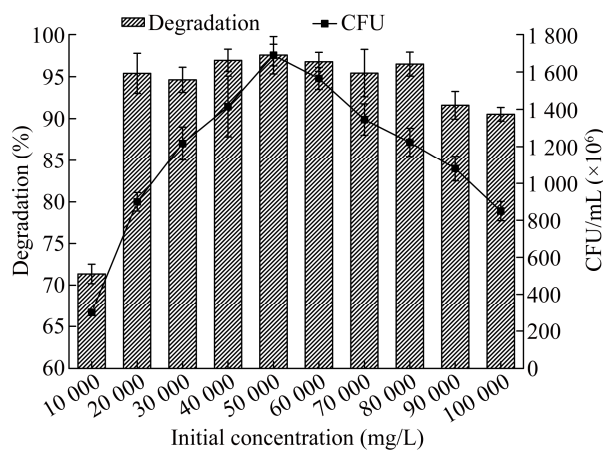


图 1 石油加入量对菌株降解的影响

Figure 1 Effect of initial concentration on degradation of petroleum by strain HX-2

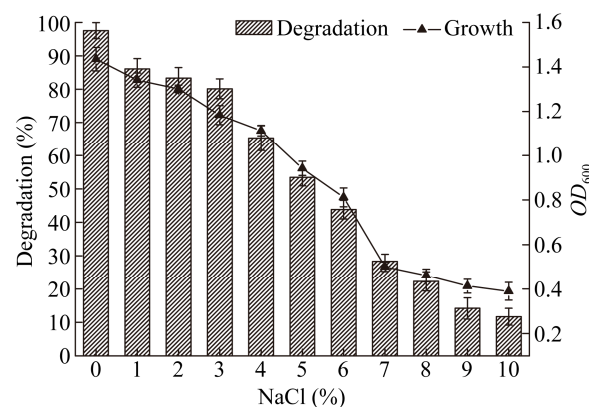


图 2 NaCl 浓度对降解率的影响

Figure 2 Effect of NaCl concentration on degradation of petroleum by strain HX-2

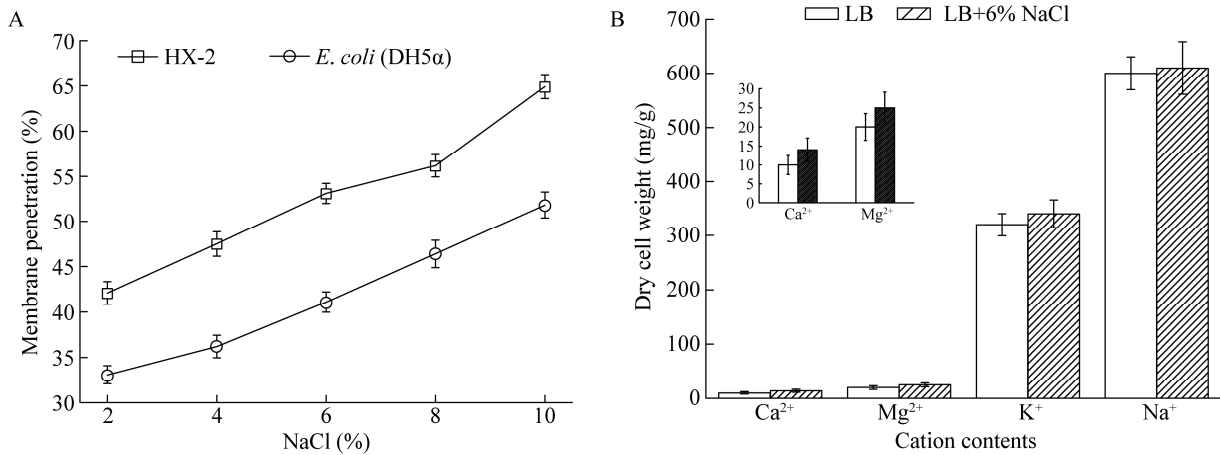


图3 细胞膜通透性及细胞内阳离子积累情况

Figure 3 Cell membrane permeability and accumulation of intracellular cations

注: A: 不同 NaCl 浓度下 HX-2 和大肠杆菌的细胞膜渗透性; B: 培养基中 HX-2 的阳离子含量。

Note: A: Cell membrane Permeability of HX-2 and *Escherichia coli* at different NaCl concentrations; B: Cation contents of HX-2 in culture media.

2.3.2 HX-2 胞外多糖(EPS)的积累

作为活性污泥絮凝物的重要组成部分, EPS 在污染物的吸附、微生物聚集体的维持与形成以及保护微生物免受外部恶劣环境的影响等方面发挥着重要作用^[45]。很多耐盐细菌产生 EPS 是一种生长策略, 可以在逆境条件下在细胞周围形成一层膜结构保护细胞免受外部环境的影响^[46]。

本实验研究了 EPS 在 HX-2 耐盐性中的潜在作用。图 4 显示 HX-2 在不同盐度下分泌 EPS 的量。EPS 产量在 0%–6% NaCl 范围内与盐浓度呈现正相关性, 在 6% NaCl 时达到最大值(222.67 mg/g)。在更高的 NaCl 浓度下(8%–10%), EPS 产量逐渐下降。Kumari 等观测到随着盐浓度的增加, EPS 产量也呈现相同的生长趋势^[47]。微生物在高盐浓度下更多地分泌 EPS 来保护细胞免受外部影响并保持高聚合物稳定性^[45]。有文献报道, 菌株在 5 L 生物反应器中培养 120 h 后获得最高浓度的 EPS (70.64 g/L)^[48]。Hua 等报道了在高盐条件下(LB+9% NaCl), 突变菌株的 EPS 产量从 1 350 mg/g 干细胞重量增加到 1 825 mg/g^[44]。在本研究中, 当盐度超过 6% 时, 细菌无法承受高盐环境, 导致细胞死亡和 EPS 合成减少。高盐条件下 EPS 的产量明显低

于文献报道。我们怀疑 EPS 保护机制可能不是菌体细胞抵抗高盐环境的唯一机制。

2.3.3 不同盐浓度下相容性溶质的测定

前期工作已证明甜菜碱积累是 HX-2 的主要耐盐机制, 并且选择甜菜碱用于后续的外源添加实验^[18]。

2.4 外源添加甜菜碱对胞外多糖产量及细胞形态影响

图 5A 中显示在石油降解培养基中 HX-2 菌株

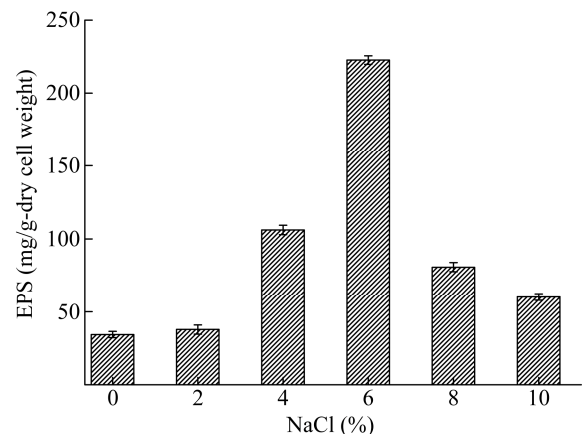


图4 HX-2 在不同盐度下分泌胞外多糖(EPS)量

Figure 4 Secretion content of exopolysaccharide (EPS) by HX-2 at different NaCl concentration

细胞表面粗糙。图 5B 说明在石油和 6% NaCl 的双重压力下生长的细胞形态发生了很大变化：细胞变长，且分裂过程中存在短缺现象。外源加入甜菜碱后，细胞表面出现膜状物质(图 5C)。尽管细胞的整体形态与图 5B 相似，但细胞表面被明显的膜结构覆盖，这有助于细菌抵抗高盐环境。我们推测这种膜状物质是由细胞分泌的 EPS。由于细胞在高盐环境中无法承受外部的高渗条件因而产生的 EPS 量很低，但在外源添加甜菜碱后 EPS 产量增加，从而更好地包裹细胞避免其暴露于高渗环境。本实验测定了外源添加甜菜碱后 EPS 产量的

变化，如图 6 所示。在不同 NaCl 浓度下添加 150 mg/L 甜菜碱考察 EPS 产量的变化，6% NaCl 浓度及以上 EPS 产量均有所增加，6% NaCl 浓度时 EPS 产量增加最高，达到 445 mg/g (增加接近一倍)。该数据表明甜菜碱可通过改变 HX-2 细胞表面形态来抵御外界高盐环境。

2.5 外源添加甜菜碱对土壤石油降解效率的影响

向含 NaCl (2%–6%) 的石油土壤中添加 150 mg/g 甜菜碱，并设置不添加甜菜碱作为对照，研究盐渍土壤中石油降解情况。如图 7 所示，土壤中盐浓度

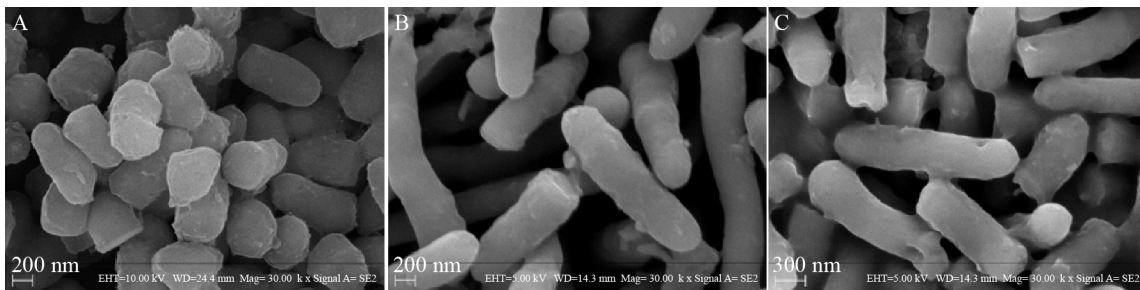


图 5 HX-2 扫描电子显微照片

Figure 5 Scanning electron micrographs of cells of HX-2

注：A：在石油降解培养基(5%石油)中生长的细胞；B：在含有 6% NaCl 的石油降解培养基(5%石油)中生长的细胞；C：在含有 6% NaCl 的石油降解培养基(5%石油)加入 150 mg/L 甜菜碱生长的细胞。

Note: A: Cells grown in basal medium containing 5% petroleum; B: Cells grown in basal medium containing 5% petroleum and 6% NaCl; C: Cells grown in basal medium containing 5% petroleum and 6% NaCl with addition of 150 mg/L betaine.

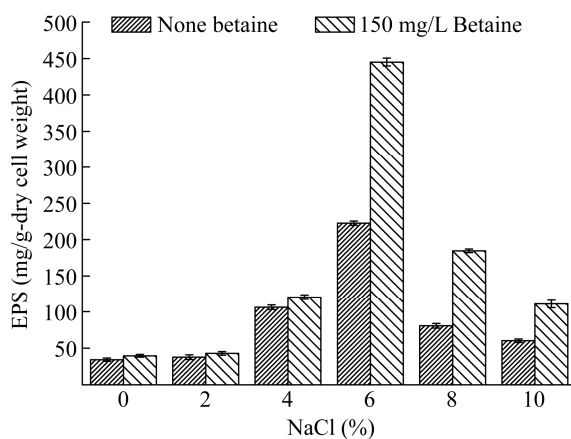


图 6 外源添加甜菜碱前后 HX-2 分泌的胞外多糖(EPS)含量

Figure 6 Extracellular polysaccharide (EPS) secreted by HX-2 before and after exogenous addition of betaine

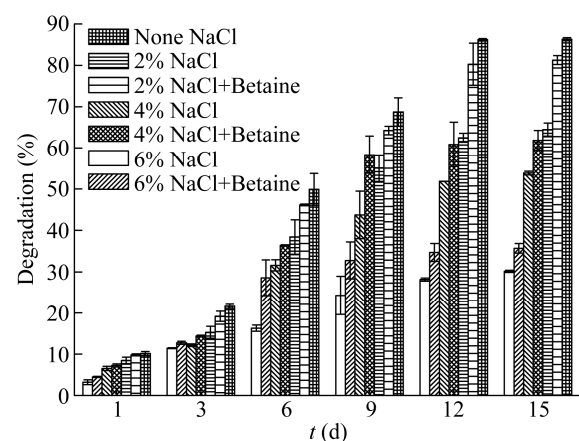


图 7 外源添加甜菜碱对不同盐度土壤中石油降解率的影响

Figure 7 Effect of exogenous addition of betaine on the degradation rate of diesel oil in soil at different salinities

会对石油降解有显著影响。外源添加 150 mg/g 甜菜碱可以促进 2% NaCl 浓度下石油降解(降解率在 15 d 内增加 16.8%)。在实验早期阶段, 外源添加甜菜碱显著提高了含 NaCl 土壤中石油的降解率(降解率在第 7 天增加 10.39%)。然而, 向含有 4%和 6% NaCl 的土壤中加入 150 mg/g 的甜菜碱后对降解率的影响并不显著。与没有添加甜菜碱的对照组相比, 石油的降解率分别增加 8%和 5.5%。甜菜碱的加入增加了细菌的耐盐性, 使其能够更快地适应盐渍化土壤环境和更好地降解石油(9 d)。无外源添加甜菜碱, HX-2 降解盐渍化土壤中的石油则需要更长的周期。在土壤中观察到的石油降解情况显著低于液体培养基降解情况, 这可能是由于土壤中细菌分散的不够均匀无法与石油充分接触, 从而抑制了降解^[48-49]。

2.6 耐盐基因分析

2.6.1 甜菜碱合成相关基因及转运蛋白基因

通过与 GenBank 数据库比较, 在 HX-2 中鉴定的 4 种转运系统中的 *H0*、*H1* 分别属于 BCCT 家族、MFS 家族, *H3* 和 *H5* 均属于 ABC 转运蛋白 ATP 家族。甘氨酸甜菜碱醛脱氢酶(*BetB*)的表达量决定了甜菜碱的产量^[26]。*BetB*、*H0*、*H1*、*H3* 和 *H5* 的 PCR 产物片段大小分别为 1 500、1 834、1 423、1 126、和 670 bp。为了研究不同盐度下 *BetB*、*H0*、*H1*、*H3* 和 *H5* 基因的转录水平, 将 HX-2 在含有不同浓度 NaCl (0%–10%)的 LB 培养基中进行培养。qPCR 用于分析菌株从对数生长期分离的 RNA。如图 8A 所示, *BetB* 的转录水平随着盐度而增加, 在 10% NaCl 下达到最大值(30.42 倍)。*H0*、*H1* 的转录水平随着盐度的增加而增加(2%–6% NaCl), 在 6%

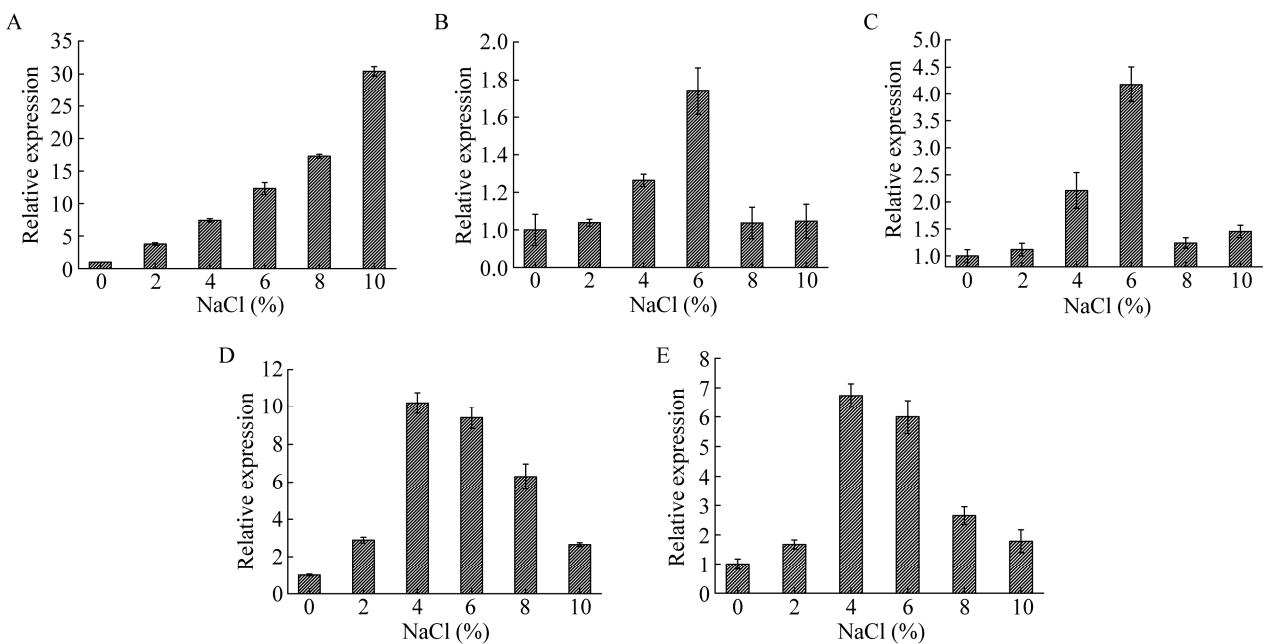


图 8 不同 NaCl 浓度(0%–10%)下 5 种基因转录分析

Figure 8 Transcription analysis of five genes at different NaCl concentration (0%–10%)

注:A:不同 NaCl 浓度(0%–10%)下 *BetB* 基因转录分析;B:不同 NaCl 浓度(0%–10%)下 *H0* 基因转录分析;C:不同 NaCl 浓度(0%–10%)下 *H1* 基因转录分析;D:不同 NaCl 浓度(0–10%)下 *H3* 基因转录分析;E:不同 NaCl 浓度(0%–10%)下 *H5* 基因转录分析。

Note: A: Transcription analysis of *BetB* genes at different NaCl concentration (0%–10%); B: Transcription analysis of *H0* genes at different NaCl concentration (0%–10%); C: Transcription analysis of *H1* genes at different NaCl concentration (0–10%); D: Transcription analysis of *H3* genes at different NaCl concentration (0%–10%); E: Transcription analysis of *H5* genes at different NaCl concentration (0%–10%).

NaCl 时达到最大值, 分别为不含 NaCl 时表达量的 1.74 倍和 4.18 倍, 然后在 8% NaCl 时开始下降(图 8B、C)。H3 和 H5 的转录水平随着盐度的增加而增加(2%–4% NaCl), 在 4% NaCl 时达到最大值, 分别为不含 NaCl 时表达量的 10.21 倍和 6.73 倍, 然后在 6% NaCl 时开始下降(图 8D、E)。无外源添加甜菜碱时, 转运蛋白基因具有较低的转录水平, 并且体内甜菜碱的积累依赖于 *BetB* 的大量表达。

2.6.2 甜菜碱或 NaCl 浓度对 4 种转运蛋白基因 *H0*、*H1*、*H3* 和 *H5* 转录水平的影响

为了研究红球菌 HX-2 中 4 种转运蛋白基因

H0、*H1*、*H3* 和 *H5* 转录水平与甜菜碱或 NaCl 浓度之间的关系。首先在含有 2% NaCl 的 LB 培养基中将 HX-2 培养至对数生长期, 将细胞接种到含有 150 mg/L 甜菜碱、6% NaCl 的 LB 培养基中, 并不添加甜菜碱作为对照。如图 9 所示, 与不含 NaCl 和甜菜碱条件下 LB 中生长的 HX-2 相比, 在甜菜碱和 NaCl 存在下, *H0*、*H1*、*H3* 和 *H5* 基因的转录水平急剧上升, 分别提高 2.92、22.36、37.14 和 25.73 倍。这些数据证明了 *H0*、*H1*、*H3* 和 *H5* 基因转录水平的最大表达取决于盐浓度及甜菜碱的加入量。

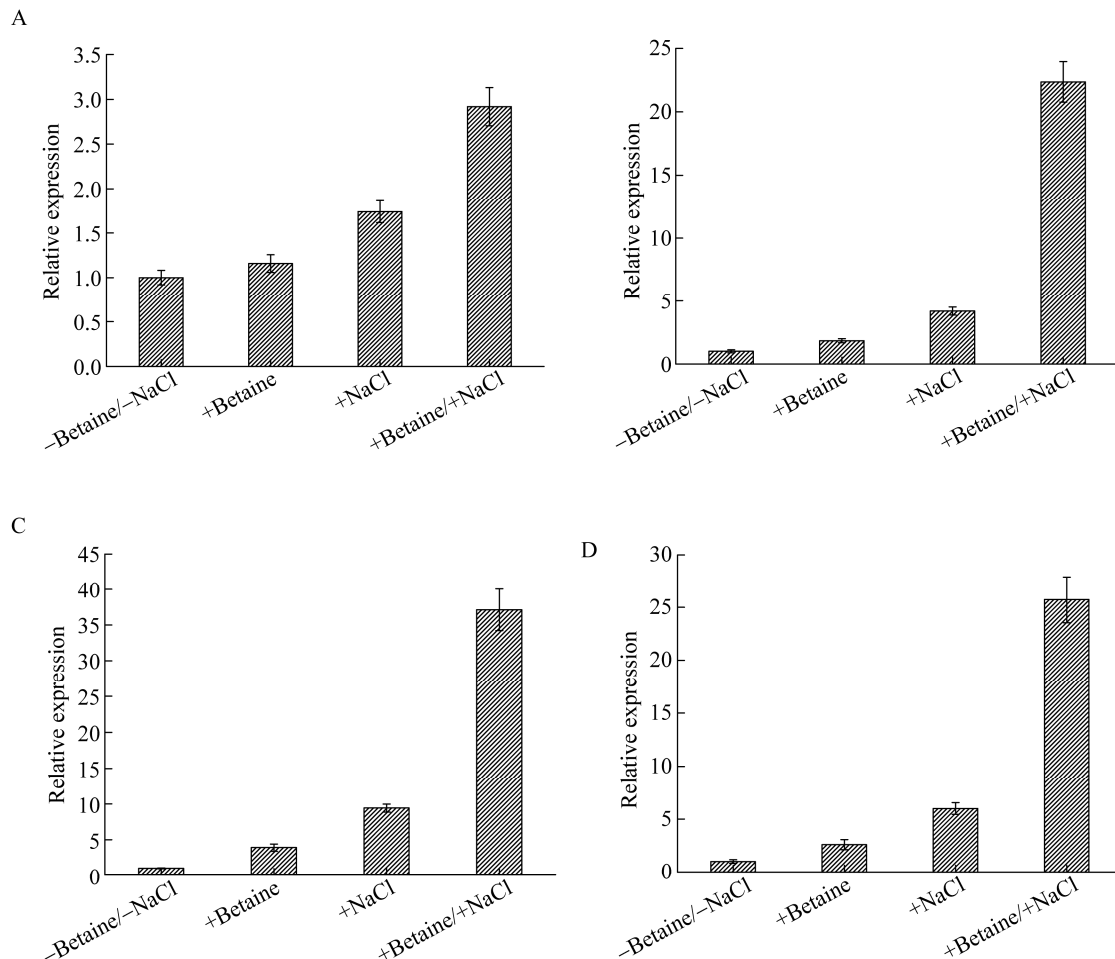


图 9 HX-2 中 *H0* (A)、*H1* (B)、*H3* (C) 和 *H5* (D) 的转录水平

Figure 9 Transcriptional level of *H0* (A), *H1* (B), *H3* (C) and *H5* (D) of HX-2

3 讨论与结论

近年来, 有关微生物处理石油污染的研究很多: 赤红球菌 XS-2 在石油质量浓度为 5 g/L 时, 7 d 降解率可达 65%^[50]; 菌株 *Lysinibacillus fusiformis* 23-1 在以 2% 石油为唯一碳源的 MM 基中对石油总降解率为 57%^[51]; 菌株 L2 (*Ochrobactrum ciceri* sp.) 及 L3 (*Serratia marcescens* sp.) 在石油烃浓度为 4 000 mg/L 时, 30 °C 下振荡培养 6 d 后, 石油烃降解率分别高达 97.37% 和 98.98%^[52]。菌株 HX-2 与以上文献报道的菌株相比, 具有更高的降解率及可耐受更高的石油加入量, 表明其可以应用于较高浓度石油污染的生物修复。在石油降解菌株耐盐性方面国内报道较少, 付瑞敏等鉴定出的粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens* sp.) 虽然对石油烃降解率达到 64%, 但其只在 NaCl 浓度为 50 g/L (5%) 的培养基中生长^[53]; 杨乐分离出菌株 XD-1 (*Bacillus* sp.) 有较高的耐盐能力, 可以在 NaCl 浓度 0–70.0 g/L 范围内生长^[54]。本文研究的 *Rhodococcus* sp. HX-2 能在 NaCl 浓度 0%–10% 的范围内生长, 在 0%–3% 范围内降解率保持在 80% 以上, 表明其可以应用于盐渍化烃类污染的生物修复。

胞外多糖可以在逆境条件下保护细胞免受外界损伤, 所以对其在高盐条件下含量的探究也尤为关键。本研究表明甜菜碱的加入导致 EPS 产量的增加, 在细胞外产生膜结构, 这种膜状结构有助于细菌抵抗高盐环境。目前, 盐渍化石油烃污染的土壤修复也是环境修复的一个主要难题, 据文献报道, *Serratia* sp. BF40 可以降低土壤溶液的表面张力, 促进 0.22%–1.20% 盐度土壤中原油的去除^[55]; 菌株 D1 (*Bacillus cereus* sp.) 在两周内能够从烃类污染土壤中去掉 88% 柴油(584±7 mg/L) 和 63% 多环芳烃^[56]。本实验中 HX-2 不仅可以有效地降解土壤中的石油, 还可以应用于盐渍化石油污染的土壤修复, 外源添加甜菜碱可以促进其在含盐土壤中的石油降解效率, 为盐渍化土壤中的石油污

染修复提供了可靠的理论支持。

本文首次对红球菌的耐盐机制进行了探究。对 HX-2 耐盐机制的分析表明, 在高盐浓度下甜菜碱的积累是菌株主要的耐盐机制。本文也探究了菌株的甜菜碱合成相关基因(*BetB*)及转运蛋白基因(*H0*、*H1*、*H3*、*H5*)及其在高盐条件下的转录水平, 分析显示甜菜碱转运蛋白基因的转录表达水平与盐浓度及甜菜碱加入量成正相关性。有文献报道在不同 NaCl 浓度下 *Virgibacillus halodenitrificans* 甜菜碱转运蛋白基因的最高转录水平是由高盐加谷氨酸甜菜碱(GB)引起的^[57], 这与我们的实验结果相一致。但未曾有人报道红球菌中的甜菜碱相关转运蛋白基因在高盐和甜菜碱存在下的表达情况, 本研究为红球菌耐盐机制的探讨打下了基础。

REFERENCES

- [1] Baoune H, El Hadj-Khelil AO, Pucci G, et al. Petroleum degradation by endophytic *Streptomyces* spp. isolated from plants grown in contaminated soil of southern Algeria[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 147: 602-609
- [2] Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview[J]. *Biotechnology Research International*, 2011, 2011: 941810
- [3] Dwivedi A, Chitranshi S, Gupta A, et al. Assessment of the petroleum oil degradation capacity of indigenous bacterial species isolated from petroleum oil-contaminated soil[J]. *International Journal of Environmental Research*, 2019, 13(4): 735-746
- [4] Piñón-Castillo HA, Gutiérrez DL, de la Serna FJZD, et al. Laboratory-Scale Biodegradation of Fuel Oil No.6 in Contaminated Soils by Autochthonous Bacteria[A]//Shiomi N. *Advances in Bioremediation and Phytoremediation*[M]. Rijeka, Croatia: Intech Open, 2017
- [5] Cruz-Paredes C, Wallander H, Kjoller R, et al. Using community trait-distributions to assign microbial responses to pH changes and Cd in forest soils treated with wood ash[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 112: 153-164
- [6] Singh A, Parmar N, Kuhad RC, et al. Bioaugmentation, biostimulation, and biocontrol in soil biology[A]//Singh A, Parmar N, Kuhad RC. *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011: 1-23
- [7] Chiu HY, Hong A, Lin SL, et al. Application of natural

- attenuation for the control of petroleum hydrocarbon plume: mechanisms and effectiveness evaluation[J]. *Journal of hydrology*, 2013, 505: 126-137
- [8] Vásquez-Murrieta MS, Hernández-Hernández OJ, Cruz-Maya JA, et al. Approaches for removal of PAHs in soils: Bioaugmentation, biostimulation and bioattenuation[A]//Larramendy M. *Soil Contamination-Current Consequences and Further Solutions[M]*. Rijeka, Croatia: InTechOpen, 2016: 329-342
- [9] Headl M. Bioremediation: towards acredible technology[J]. *Microbiology*, 1998, 144: 599-608.
- [10] Fathepure BZ. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 173
- [11] Ahmadi M, Jorfi S, Kujlu R, et al. A novel salt-tolerant bacterial consortium for biodegradation of saline and recalcitrant petrochemical wastewater[J]. *Journal of Environmental Management*, 2017, 191: 198-208
- [12] Duan JM, Fang HD, Su B, et al. Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 421-428
- [13] Kalantary RR, Mohseni-Bandpi A, Esrafil A, et al. Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil[J]. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2014, 12(1): 143
- [14] Jorfi S, Soltani RDC, Ahmadi M, et al. Sono-assisted adsorption of a textile dye on milk vetch-derived charcoal supported by silica nanopowder[J]. *Journal of Environmental Management*, 2017, 187: 111-121
- [15] Hänelt I, Müller V. Molecular mechanisms of adaptation of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus* to its environment[J]. *Life*, 2013, 3(1): 234-243
- [16] Oren A. Bioenergetic aspects of halophilism[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(2): 334-348
- [17] Oren A. Adaptation of halophilic archaea to life at high salt concentrations[A]//Läuchli A, Lüttge U. *Salinity: Environment-Plants-Molecules[M]*. Dordrecht: Springer, 2002: 81-96
- [18] Hu X, Li DH, Huang JY, et al. Isolation, identification and salinity tolerance of a novel hydrocarbon-degrading strain, *Rhodococcus* sp. HX-2[J]. *Science Technology and Engineering*, 2019, 19(25): 364-373 (in Chinese)
胡鑫, 李大卉, 黄锦玉, 等. 一株烃降解菌的分离鉴定及耐盐机制[J]. *科学技术与工程*, 2019, 19(25): 364-373
- [19] Zeidler S, Hubloher J, König P, et al. Salt induction and activation of MtlD, the key enzyme in the synthesis of the compatible solute mannitol in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Microbiology Open*, 2018, 7(6): e00614
- [20] Yu DS, Wu GD, Li J, et al. Enhanced nitrogen removal of ANAMMOX treating saline wastewater with betaine addition[J]. *Environmental Science*, 2018, 39(4): 1688-1696 (in Chinese)
于德爽, 吴国栋, 李津, 等. 外源甜菜碱投加增强高盐废水厌氧氨氧化脱氮性能[J]. *环境科学*, 2018, 39(4): 1688-1696
- [21] Farooq M, Hussain M, Wakeel A, et al. Salt stress in maize: effects, resistance mechanisms, and management. a review[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2015, 35(2): 461-481
- [22] Sutherland IW. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria[J]. *International Dairy Journal*, 2001, 11(9): 663-674
- [23] Alldredge AL. Interstitial dissolved organic carbon (DOC) concentrations within sinking marine aggregates and their potential contribution to carbon flux[J]. *Limnology and Oceanography*, 2000, 45(6): 1245-1253
- [24] Nichols CAM, Guezennec J, Bowman JP. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review[J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(4): 253-271
- [25] Breisch J, Waclawska I, Averhoff B. Identification and characterization of a carnitine transporter in *Acinetobacter baumannii*[J]. *MicrobiologyOpen*, 2019, 8(6): e00752
- [26] Sand M, Stahl J, Waclawska I, et al. Identification of an osmo-dependent and an osmo-independent choline transporter in *Acinetobacter baylyi*: implications in osmostress protection and metabolic adaptation[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(6): 1490-1502
- [27] Scholz A, Stahl J, de Berardinis V, et al. Osmotic stress response in *Acinetobacter baylyi*: identification of a glycine-betaine biosynthesis pathway and regulation of osmoadaptive choline uptake and glycine-betaine synthesis through a choline-responsive Beti repressor[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2016, 8(2): 316-322
- [28] Wargo MJ, Szwegold BS, Hogan DA. Identification of two gene clusters and a transcriptional regulator required for *Pseudomonas aeruginosa* glycine betaine catabolism[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(8): 2690-2699
- [29] Ziegler C, Bremer E, Krämer R. The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 78(1): 13-34
- [30] Lang SH, Cressatti M, Mendoza KE, et al. YehZYXW of *Escherichia coli* is a low-affinity, non-osmoregulatory

- betaine-specific ABC transporter[J]. *Biochemistry*, 2015, 54(37): 5735-5747
- [31] Vishwakarma P, Banerjee A, Pasrija R, et al. Phylogenetic and conservation analyses of MFS transporters[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(11): 462
- [32] Lopez-Ortiz C, Dutta SK, Natarajan P, et al. Genome-wide identification and gene expression pattern of ABC transporter gene family in *Capsicum* spp.[J]. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0215901
- [33] Saier Jr MH, Reddy VS, Tamang DG, et al. The transporter classification database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 42(D1): D251-D258
- [34] Ren HF, Jiang TX, Cheng Y, et al. Isolation and characterization of a low temperature hydrocarbon-degrading bacterial strain[J]. *Letters in Biotechnology*, 2019, 30(1): 68-72 (in Chinese)
任华峰, 姜天翔, 成玉, 等. 一株耐低温石油烃降解菌的分离鉴定及其降解特性[J]. *生物技术通讯*, 2019, 30(1): 68-72
- [35] Wang XY, Gu S. Studies on variation of electrical conductivity and dissolution characteristics of 4 kinds of ions during Pak Choy senescence[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(7): 209-214 (in Chinese)
王向阳, 顾双. 不同衰老程度青菜电导率和 4 种主要离子溶出特性研究[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(7): 209-214
- [36] Das S, Bose A, Ghosh B. Effect of salt stress on polyamine metabolism in *Brassica campestris*[J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(2): 283-285
- [37] Zhang P, Guo JS, Shen Y, et al. Microbial communities, extracellular proteomics and polysaccharides: a comparative investigation on biofilm and suspended sludge[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 190: 21-28
- [38] Saiz-Jimenez C, Laiz L. Occurrence of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2000, 46(4): 319-326
- [39] Huang ZZ, Wang P, Li H, et al. Community analysis and metabolic pathway of halophilic bacteria for phenol degradation in saline environment[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 94: 115-120
- [40] Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity[J]. *Saline Systems*, 2008, 4(1): 2
- [41] Tao P, Li H, Yu YJ, et al. Ectoine and 5-hydroxyectoine accumulation in the halophile *Virgibacillus halodenitrificans* PDB-F2 in response to salt stress[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(15): 6779-6789
- [42] An XL, Su JQ, Li B, et al. Tracking antibiotic resistome during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR[J]. *Environment International*, 2018, 117: 146-153
- [43] Longang A, Buck C, Kirkwood KM. Halotolerance and effect of salt on hydrophobicity in hydrocarbon-degrading bacteria[J]. *Environmental Technology*, 2016, 37(9): 1133-1140
- [44] Hua XF, Wang J, Wu ZJ, et al. A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum-and salt-contaminated soil[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 49(2): 201-206
- [45] Zeng J, Gao JM, Chen YP, et al. Composition and aggregation of extracellular polymeric substances (EPS) in hyperhaline and municipal wastewater treatment plants[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 26721
- [46] Poli A, Anzelmo G, Nicolaus B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities[J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(6): 1779-1802
- [47] Kumari P, Khanna V. ACC-deaminase and EPS production by salt tolerant rhizobacteria augment growth in chickpea under salinity stress[J]. *International Journal of Bio-Resource & Stress Management*, 2015, 6(5): 558-565
- [48] Gu D, Jiao YC, Wu JN, et al. Optimization of EPS production and characterization by a halophilic bacterium, *Kocuria rosea* ZJUQH from Chaka Salt Lake with response surface methodology[J]. *Molecules*, 2017, 22(5): 814
- [49] Beblo-Vranesevic K, Galinski EA, Rachel R, et al. Influence of osmotic stress on desiccation and irradiation tolerance of (hyper)-thermophilic microorganisms[J]. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(1): 17-28
- [50] Xing QC, Xi YH, Shan SD, et al. Screening and biodegradability of a highly efficient petroleum-degrading bacterial strain[J]. *Journal of Zhejiang University of Science and Technology*, 2019, 31(3): 224-230 (in Chinese)
邢清朝, 刁彦花, 单胜道, 等. 一株高效石油降解菌的筛选及降解性能研究[J]. *浙江科技学院学报*, 2019, 31(3): 224-230
- [51] Li GL, Zeng XY, Zhai LX, et al. Screening, identification and characteristics of *Lysinibacillus fusiformis* 23-1 for petroleum degradation[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(7): 1229-1236 (in Chinese)
李国丽, 曾小英, 翟立翔, 等. 一株石油降解菌 *Lysinibacillus fusiformis* 23-1 的筛选鉴定及原油降解特性[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(7): 1229-1236

- [52] Liu H, Gao PF, Cong WY, et al. Identification and degradation effect of two oil degrading bacteria screened from oily wastewater[J]. Journal of Jilin Institute of Chemical Technology, 2018, 35(7): 21-25 (in Chinese)
刘虹, 高鹏飞, 丛唯一, 等. 含油废水中筛选的两种石油降解菌的鉴定及降解效果[J]. 吉林化工学院学报, 2018, 35(7): 21-25
- [53] Fu RM, Li B, Xue TT, et al. Identification of halo-tolerant petroleum-degrading bacteria and its mutation by Low Energy N^+ implantation[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 39(4): 41-46 (in Chinese)
付瑞敏, 李彬, 薛婷婷, 等. 一株耐盐石油降解菌的鉴定及低能 N^+ 注入诱变[J]. 环境科学与技术, 2016, 39(4): 41-46
- [54] Yang L. Screening of two oil-degrading bacteria and their growth characteristics[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(2): 333-336 (in Chinese).
杨乐. 两株石油降解菌的筛选及其生长特性[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(2): 333-336
- [55] Wu T, Xie WJ, Yi YL, et al. Surface activity of salt-tolerant *Serratia* spp. and crude oil biodegradation in saline soil[J]. Plant, Soil and Environment, 2012, 58(9): 412-416
- [56] Al-Kaabi N, Al-Ghouti MA, Oualha M, et al. A MALDI-TOF study of bio-remediation in highly weathered oil contaminated soils[J]. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2018, 168: 569-576
- [57] Qian CJ, Li W, Li H, et al. Responses of genes for the uptake of glycine betaine in *Virgibacillus halodenitrificans* PDB-F2 under NaCl stress[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2018, 132: 192-199

征 稿 简 则

1 刊物简介与刊登内容

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。本刊为月刊, 中文核心期刊, 中国科技核心期刊, CSCD 核心期刊, 曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今, 本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选 300 种“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA、ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”“表达”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.1708)