

中度嗜盐菌相容性溶质机制的研究进展

赵百锁^{1,2} 杨礼富³ 王 磊² 卢伟东² 杨苏声^{2*}

(¹ 清华大学环境科学与工程系 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室 北京 100084)

(² 中国农业大学微生物学与免疫学系 农业部农业微生物资源与应用重点实验室 北京 100094)

(³ 中国热带农业科学院橡胶研究所 农业部热带作物栽培生理学重点开放实验室 儋州 571737)

摘 要 生活在高盐环境中的中度嗜盐菌不仅能抗衡外界的高渗透压胁迫,而且还能迅速适应短时间内的渗透冲击。为适应该环境,中度嗜盐菌依赖于一种被称为相容性溶质的物质,以执行渗透保护功能。这类物质属于极性的、易溶的和低分子量的有机化合物,其中包括糖类、氨基酸类、甜菜碱类和四氢嘧啶类等。中度嗜盐菌主要采用相容性溶质机制来适应盐环境。在此,就中度嗜盐菌的盐适应机理、相容性溶质的种类和特点,以及其作用的分子机制进行了阐述和讨论。

关键词: 中度嗜盐菌 相容性溶质 盐适应

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)05-0937-05

中度嗜盐菌是指一类能够在 3%~15% NaCl 生长良好、并能适应很宽盐浓度范围的细菌,但其耐盐范围会随着周围温度和营养状况等环境条件改变^[1,2]。中度嗜盐菌广泛栖息于海洋、盐(碱)湖、海洋、盐碱地、盐池和盐渍食品。由于中度嗜盐菌不仅能抵抗外界高浓度的盐环境,而且能适应大范围的盐度波动。因此,这类微生物的盐适应机制越来越受到科学家们的重视。目前,我国微生物学者对中度嗜盐菌盐适应机理的研究尚少。

1 相容性溶质机制

当水中 NaCl 等盐类溶质的浓度越高,溶液的水势就会越低。所以,在高盐条件下,中度嗜盐菌必须保持细胞内低水势。否则,细胞内的自由水就会从高水势的细胞内流向低水势的细胞外,造成细胞脱水^[3]。同时,水势降低也使高盐环境中的水分活度减小和渗透压增加。这样,中度嗜盐菌为了在高盐环境下求得生存,需要依赖于一种被称为相容性溶质机制的策略(“compatible-solutes” strategy),来抗衡外界盐环境形成的负面影响。这种适应机制需要遗传基因改变,称为基因简易。该变化对中度嗜盐菌适应外界环境中的高盐度或盐度波动具有很高的灵活性^[4]。

1972 年, Brown 和 Simpson^[5]首次提出相容性溶质概念,指与细胞内体系相容而不影响其它生物大分子功能的溶质。一般而言,这类物质在生理 pH 范围内不带电荷、极性和易溶的小分子有机物质。在高渗条件下,中度嗜盐菌能积累很高浓度的相容性溶质来执行渗透保护功能。反之,在低渗条件下,相容性溶质能很快泄漏到周围环境中,或被分解代谢,防止外界水分渗入细胞内过多而造成损害。同时,当受到盐

渗透冲击(水分蒸发或盐类物质增加)时,中度嗜盐菌细胞内 K^+ 和谷氨酸根离子浓度很快升高。这种现象在早期也被归于中度嗜盐菌盐适应机制范畴,但随着科学的发展,很多学者认为,至少在中度嗜盐菌内,它应该被排除在盐适应机制外。其原因如下^[6]:(1) K^+ 的作用仅仅是暂时恢复细胞的形态和膨压;(2) K^+ 是酶活性和调节基因表达的细胞信使;(3) K^+ 作为质子电化学梯度成分,直接影响细胞质膜的质子梯度周期;(4) K^+ 在细胞受到渗透冲击时支持细胞呼吸作用。总之, K^+ 浓度增加仅仅是一个短期效应。随着时间的延长,中度嗜盐菌就会从外界吸收或合成相容性溶质作为渗透保护物质。所以,中度嗜盐菌的盐适应机制是利用相容性溶质机制来抵抗外界的盐环境^[1,2,4,6,7]。

2 相容性溶质的种类及其特点

某些中度嗜盐菌积累的相容性溶质种类常常有选择性,是在不同生长时期和营养条件下发生变化的混合物。例如,以色列盐单胞菌(*Halomonas israelensis*) 在低于 3.5% 盐度条件下培养时,积累的主要物质是海藻糖。而在高盐条件下培养时,积累的主要物质则是四氢嘧啶^[8]。目前,在中度嗜盐菌中发现的相容性溶质主要包括(表 1): 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)。

2.1 糖类和糖苷类

在中度嗜盐菌中,蔗糖和海藻糖作为细胞内相容性溶质“鸡尾酒”中的一部分而普遍存在^[9]。此外,在一些中度嗜盐

基金项目: 国家“863 计划”(2003AA241150)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62732674; E-mail: yangssh@cau.edu.cn

作者简介: 赵百锁(1974-),男,山西人,博士,研究方向为极端环境微生物

收稿日期: 2007-01-17; 接受日期: 2007-05-14; 修回日期: 2007-06-29

的蓝细菌中发现了葡萄糖苷^[10]。然而,这些物质对中度嗜盐菌执行渗透保护功能的作用有限,仅依赖糖类和糖苷类物质还不足以抗衡细胞外界的高盐环境。因此,该条件下中度嗜盐菌还需要其它一些相容性溶质来施行渗透保护功能。

2.2 氨基酸类

脯氨酸是玫瑰色盐球菌(*Salinicoccus roseus*)和西班牙盐球菌(*Salinicoccus hispanicus*)细胞内主要的相容性溶质^[9,11],而在嗜盐嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus haloalkaliphilus*)中,脯氨酸对渗透平衡作用就相对较小^[12]。在一些中度嗜盐菌中,谷氨酸和谷氨酰胺对低盐环境的最终反应而普遍存在。例如,Vreeland发现,伸长盐单胞菌(*Halomonas elongata*)细胞内总游离氨基酸量随着外界盐度的提高而增加。当NaCl浓度为19.8%时,细胞内总游离氨基酸浓度为358mmol/L,其中谷氨酸浓度最高,其次是谷氨酰胺和丙氨酸^[13]。洪青等^[14]的研究结果表明,当NaCl浓度低于5.85%时,盐单胞菌BYS-

1细胞内总游离氨基酸含量增加幅度大,而当NaCl浓度高于5.85%时,细胞内的总游离氨基酸含量增加幅度小。此外,他们还发现,不论在低盐还是在高盐条件下,谷氨酸都占总氨基酸约50%,而天门冬氨酸的含量却比谷氨酸低得多。最近,Saum等^[15]从基因、酶学和调控方面对喜盐喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus halophilus*)中谷氨酸和谷氨酰胺的变化做了研究。结果表明,在5.8%~8.8%NaCl条件下,其细胞内谷氨酸和谷氨酰胺是主要的相容性溶质。还发现谷氨酰胺合成酶是该菌合成谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸和四氢嘧啶途径中的一个关键酶,并严格依赖于NaCl。该酶由*glnA2*基因编码,在14.6%~17.5%NaCl条件下酶活性达到最大。该研究首次证明了在一些严格依赖于氯离子的中度嗜盐菌中,氯离子对合成相容性溶质有调控功能。当培养基中缺乏氯离子时,该菌就不能合成这些相容性溶质。

表1 部分中度嗜盐菌合成的相容性溶质

Table 1 Compatible solutes synthesized in some moderately halophilic bacteria

Species	Salt concentration for optimum growth (% ,W/V)	Salt concentration for growth (% ,W/V)	Glycine betaine	Hydroxy-ectoine	Ectoine	Others
Photosynthetic , oxygenic						
Cyanobacteria-moderately	3-4	1.6-14	++			Glucosylglycerol
Photosynthetic , anoxygenic						
<i>Ectothiorhodospira marismortui</i>	3-8	1-20	++			Sucrose
<i>Halochromatium salexigens</i>	8-11	4-20	++			N-acetylglutaminyl-glutamineamide Sucrose
Heterotrophic , aerobic						
<i>Nesterenkonia halobia</i>	10	3-25	+	+	++	Glucose
<i>Halobacillus halophilus</i>	10	2-20			++	N-acetylysine Glutamate , Proline Glutamine
<i>Salibacillus salexigens</i>	10	7-20	++		++	
<i>Salinicoccus roseus</i> *	10	9-25	+			Proline
<i>Bacillus haloalkaliphilus</i>	3-8	0-25	+		++	N-acetylmethionine
<i>Halomonas halophila</i>	7.5	2-30		+	++	
<i>Halomonas variabilis</i> *	10	7-28	++	++	++	Trehalose
<i>Halomonas eurihalina</i>	7.5	5-20				
<i>Halomonas elongata</i>	3.5-8	3.5-20		+	++	Glucose
<i>Chromohalobacter marismortui</i> *	10	1-30		++	+	
<i>Marinococcus albus</i>	10	2-25		+	++	Alanine
<i>Marinococcus halophilus</i>	10	2-25		++	++	Glucose
Heterotrophic , anaerobic						
<i>Desulfovibrio halophilus</i>	6-7	3-18	++			Trehalose

++ present in high concentrations ; + present in minor amounts ; * yeast extract was present in the medium.

2.3 甜菜碱类

甘氨酸甜菜碱是最重要的一种相容性溶质,还有脯氨酸甜菜碱和谷氨酸甜菜碱等,这些物质都属于氨基酸甲基化衍生物。甘氨酸甜菜碱不但作为相容性溶质,还能作为碳源和能源物质。然而,在这两个条件下,细菌的耐盐能力存在差异。例如,伸长盐单胞菌在前者条件下耐盐度可达19%,而后者只能达到12%。这是因为高盐条件能抑制分解甘氨酸甜菜碱代谢酶,从而导致该物质不能作为碳源和能源,只能作为渗透保护物质^[16]。在含酵母粉的培养基中,甘氨酸甜菜碱总是被优先转运到中度嗜盐菌细胞内,而其它相容性溶

质的合成途径也会受到甘氨酸甜菜碱的抑制。Vermeulen和Kuntz^[17]从嗜盐海球菌(*Marinococcus halophilus*)中克隆了甘氨酸甜菜碱转运基因*betM*,该基因编码的蛋白与甜菜碱-肉碱-胆碱家族转运(BCCTs)家族具有高度的同源性。研究还发现,甘氨酸甜菜碱缺陷型大肠杆菌(*E. coli*)MKH13菌株携带*betM*时,其细胞内的甘氨酸甜菜碱含量随细胞外盐度升高而增加,说明*betM*基因编码的蛋白具有渗透调节功能。本实验室也从楚氏喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus trueperi*)中克隆了甘氨酸甜菜碱转运蛋白基因*betH*。将该基因及其启动子克隆到pUC18载体上,转入大肠杆菌MKH13中,发现该菌

能够积累甘氨酸甜菜碱^[18]。Roeler 和 Muler^[19]首次发现,喜盐喜盐芽孢杆菌中甘氨酸甜菜碱的转运严格依赖于氯离子。然而,氯离子并不伴随甘氨酸甜菜碱转运到细胞内,推测它是转运激活因子。由于甘氨酸甜菜碱广泛分布在自然界中,所以中度嗜盐菌在受到高盐冲击时,能利用甘氨酸甜菜碱转运基因从外界环境中快速地摄入甘氨酸甜菜碱执行渗透保护功能。另外,该过程还能够节约中度嗜盐菌积累相容性溶质所消耗的能量,从而最大程度地在逆境中生存繁殖。

虽然甘氨酸甜菜碱在中度嗜盐菌中是一类很重要的相容性溶质,但是还没有报道提及中度嗜盐菌能从简单的碳源(如葡萄糖)合成甘氨酸甜菜碱。通常,大多数中度嗜盐菌都以胆碱为前体物质,经过两步氧化反应生成甘氨酸甜菜碱。在 NaCl 浓度为 12% 时,需盐色盐杆菌(*Chromohalobacter salexigens*)从胆碱合成甘氨酸甜菜碱的速率随着 NaCl 浓度的升高而增加。利用功能互补法,从该菌中克隆了 *betBA* 基因簇。它们分别编码 DNA 结合调节蛋白、甜菜碱乙醛脱氢酶和胆碱脱氢酶^[20-22]。通过转基因技术,可使不能积累甘氨酸甜菜碱的植物产生这种物质,从而提高农作物的抗旱和抗盐能力。目前,大肠杆菌的胆碱脱氢酶和甜菜碱乙醛脱氢酶基因被转入到烟草中,且提高了其耐盐能力^[23]。然而,在中度嗜盐菌中,至今还没有这方面的报道。

2.4 四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶

在中度嗜盐菌中,四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶是普遍存在的重要相容性溶质。Vermeulen 和 Kuntz^[17]从嗜盐海球菌中克隆了四氢嘧啶转运基因 *ectM*,该基因编码的蛋白属于 BCCTs 转运蛋白家族。在大肠杆菌中,对四氢嘧啶的亲合力为 $K_s = 1.6 \mu\text{mol/L}$ 。Grammam^[24]等在伸长盐单胞菌中发现了不同于以往任何渗透调节的 TeaABC 系统,包括 *teaA*、*teaB* 和 *teaC* 共 3 个基因,对四氢嘧啶的亲合力很高 ($K_s = 21.7 \mu\text{mol/L}$)。在中度嗜盐菌生长的环境中,如果没有甘氨酸甜菜碱及其前体物胆碱等存在,四氢嘧啶就被大量合成。目前,科学家已经在嗜盐海球菌、巴斯德氏盐芽孢杆菌(*Halobacillus pasteurii*)和需盐色盐杆菌中,从分子水平阐明了四氢嘧啶的合成途径。该过程由天冬氨酸- β -半醛开始,形成的产物依次是二氨基丁酸、乙酰二氨基丁酸和四氢嘧啶。依次由二氨基丁酸氨基转移酶(EctB)、二氨基丁酸乙酰转移酶(EctA)和四氢嘧啶合成酶(EctC)催化完成。且 *ectA*、*ectB* 和 *ectC* 基因组成一个操纵子,受共同的启动子调控^[20,25,26]。2006 年,本实验室也从一株革兰氏阳性中度嗜盐菌达坂喜盐芽孢杆菌(*Halobacillus dabanensis*)D-8^T中克隆了四氢嘧啶合成基因 *ectABC*。研究发现,该基因簇在结构上比其它物种更加紧凑。其中,*ectA* 和 *ectB* 基因在核糖体结合位点处重叠,*ectB* 终止密码子与 *ectC* 起始密码子也存在重叠。通过构建 pMXB10*ectABC* 质粒,在 T7 启动子作用下,*ectABC* 基因在大肠杆菌 ER2566 中表达,生成四氢嘧啶。但是,D-8 菌株中的 *ectABC* 启动区却没有发现 δ^B ^[27]。该因子普遍存在于革兰氏阳性菌,对全细胞的抗逆压力起调控作用。同样现象也存在于巴斯德氏盐芽孢杆菌、伸长盐单胞菌和需盐色盐杆菌中。从这些缺乏 δ^B 因子的菌株中克隆的 *ectABC* 基因,都不能使大肠杆菌 XL1-blue 在 M63 培养基中提高耐盐性。由于

嗜盐海球菌 *ectABC* 启动区某些序列与 δ^B 具有很大的相似性,因而可以提高大肠杆菌的耐盐性。可见 δ^B 因子的调控作用很大。至于 D-8 菌株中 *ectABC* 基因表达如何被调控,有待进一步研究。

羟基四氢嘧啶作为渗透保护剂比四氢嘧啶具有更大的优点。Prabhl 等报道,从金羊毛链霉菌(*Streptomyces chrysomallus*)中克隆的 *thdD* 基因能够在伸长盐单胞菌的 *ectABC* 启动子作用下进行异源表达。该基因编码的四氢嘧啶羟化酶能调控和催化四氢嘧啶生成羟基四氢嘧啶^[28]。最近,Estepa 从需盐色盐杆菌中克隆了羟基四氢嘧啶合成酶基因 *ectD*,该基因编码的蛋白属于 AraC-XylS 转录激活剂。研究发现,在 45℃ 时,该菌积累的羟基四氢嘧啶量大于 37℃ 时积累的四氢嘧啶量。温度敏感型突变株实验证明,羟基四氢嘧啶负责该菌的热保护功能^[29]。

2.5 其它

在中度嗜盐菌中,除上述几种重要的相容性溶质外,还发现了乙酰鸟氨酸和乙酰赖氨酸。它们主要存在于盐球菌属、芽孢杆菌属和喜盐芽孢杆菌属等低 G+C 含量革兰氏阳性菌。例如,在喜盐喜盐芽孢杆菌和柠檬色动性球菌中,积累的乙酰鸟氨酸和乙酰赖氨酸都与盐渗透相关^[9,30]。然而,目前还没有对这两种溶质合成途径以及调控机理的报道。

3 相容性溶质作用的分子机制

相容性溶质能够和新陈代谢相容,并能稳定生物大分子结构,原因如下:(1)相容性溶质是坚固水结构的创造者,能够稳定蛋白酶以及其它细胞质内结构元件的水化层;(2)与细胞内蛋白酶等弱作用决定了它们之间具有相容性。这样,中度嗜盐菌细胞内的蛋白质就能优先水化,最大程度把相容性溶质从蛋白质水化层排除,使蛋白结构更紧密,防止其伸展导致表面区域扩大而变性。这种相容性溶质从蛋白质和其它大分子表面排除的现象称为“优先排除模式”^[31,32]。利用“差示扫描量热法”测定,发现 3mol/L 羟基四氢嘧啶在室温下能使牛核糖核酸酶的溶解温度至少提高 12°K,进而使蛋白稳定性增加 10.6KJ/mol,就是“优先排除模式”理论一个很好的模型^[33]。另外,热力学效应(焓值的减小,疏水效果的加强)使相容性溶质对蛋白质或其它大分子具有稳定效应,防止它们伸展变性^[34]。因此,相容性溶质的作用不仅仅是平衡细胞内外的渗透压力,还对细胞内的蛋白酶和其它大分子物质起着抗热、抗旱、抗冻和抗变性等稳定作用^[1,31,35]。

4 结束语

近年来,相容性溶质的渗透保护功能在分子生物学、基因工程以及化妆品等领域的应用越来越受到重视。Schnoo 等发现,甜菜碱和四氢嘧啶能降低 DNA 的 T_m 值。以高 G+C 含量 DNA 为模板,进行 PCR 扩增时,向反应体系中加入甜菜碱和四氢嘧啶,能促进 PCR 反应进行^[36]。另外,四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶能够作为稳定剂,保护蛋白酶、DNA 和细胞膜等生物大分子抗高盐、抗干燥和抗冷冻等,并且能稳定

些大分子结构,以及防止其发生热变性等^[37]。最近,德国墨克公司推出一套新兴化妆品。其中,四氢嘧啶及羟基四氢嘧啶作为化妆品的保湿剂,防止皮肤干燥和衰老,还能减少皮肤因紫外线形成的晒斑。相信不久的将来,利用中度嗜盐菌产生的相容性溶质必将在各个领域得到广泛的应用^[38]。

此外,中度嗜盐菌的盐适应是一个极其复杂的过程,它包括相容性溶质的积累和识别、信号和离子流的控制,以及蛋白表达变化等。虽然相容性溶质的种类已经从很多中度嗜盐菌中得到鉴别,但对大多数相容性溶质的积累,及其生理生化的过程却没有得到详细的研究。同时,中度嗜盐菌合成的相容性溶质为何不止一种,以及它们在盐适应环境中如何保护大分子结构,需要更加深入的研究。另外,由于许多中度嗜盐菌的遗传背景还不清楚,而且缺乏有效的分子遗传工具或成熟的遗传转化技术,对其分子机制的研究带来障碍。尽管我们了解了一些微生物的盐适应过程,然而,在分子水平上对相容性溶质的功能仍然知之甚少。

参 考 文 献

- [1] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Bio Rev*, 1998, **62** :504 – 544.
- [2] 任培根,周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展. *微生物学报*. 2003, **43** (3) :427 – 430.
- [3] Kunte HJ, Tr per H, Stan-Lotter H. Halophilic microorganisms. In: Homeck G, *et al.* ed. *Astrobiology. The quest for the conditions of life*. Berlin: Springer Verlag, 2002.
- [4] Sleator RD, Hill C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, **26** (1):49 – 71.
- [5] Brown AD, Simpson JR. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol*, 1972, **72** :589 – 591.
- [6] Calderón MI, Carmen V, Fernando R, *et al.* Complex regulation of the synthesis of the compatible solute ectoine in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043^T. *Microbiology*, 2004, **150** :3051 – 3063.
- [7] 卢伟东,赵百锁,冯德芹,等. 喜盐芽孢杆菌 D-8 基因文库的构建及甘氨酸甜菜碱转运蛋白 *betH* 基因的筛选. *微生物学报* 2005, **45** : (3) :451 – 454.
- [8] Regev R, Peri I, Gilboa H, *et al.* ¹³C NMR study of the interrelation between synthesis and uptake of compatible solutes in two moderately halophilic eubacteria. *Arch Biochem Biophys*, 1990, **278** :106 – 112.
- [9] Severin J, Wohlfarth A, Galinski EA. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol*, 1992, **138** :1629 – 1638.
- [10] Macky MA, Norton RS, Browitzka LJ. Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. *J Gen Microbiol*, 1984, **130** :2177 – 2191.
- [11] Galinski EA, Trüper HG. Microbial behaviour in salts-tressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, **15** :95 – 108.
- [12] Weisser J, Trüper HG. Osmoregulation in a new haloalkaliphilic *Bacillus* from the Wadi Natrun (Egypt). *Syst Appl Microbiol*, 1985, **6** :7 – 11.
- [13] Vreeland RH, Mierau BD, Litchfield CD, *et al.* Relationship of the internal solute composition to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. *Can J Microbiol*, 1983, **29** :407 – 414.
- [14] 洪青,张国顺,张忠辉,等. 中度嗜盐菌 *Halomonas* sp. BY5-1 的渗透调节. *微生物学通报* 2004, **31** (5) :71 – 74.
- [15] Saum SH, Sydow JF, Peter Friedhelm P, *et al.* Biochemical and molecular characterization of the biosynthesis of glutamine and glutamate, two major compatible solutes in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*. *J Bacteriol*, 2006, **188** (19) :6808 – 6815.
- [16] Cummings SP, Gilmour DJ. The effect of NaCl on the growth of a *Halomonas* species: accumulation and utilization of compatible solutes. *Microbiology UK*, 1995, **141** :1413 – 1418.
- [17] Vermeulen V, Kunte HJ. *Marinococcus halophilus* DSM 20408^T encodes two transporters for compatible solutes belonging to the betaine-carnitine-choline transporter family: identification and characterization of ectoine transporter EctM and glycine betaine transporter BetM. *Extremophiles* 2004, **8** (3) :175 – 184.
- [18] Lu W, Zhao B, Feng D, *et al.* Cloning and characterization of the *Halobacillus trueperi betH* gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine. *FEMS Microbiology Letters* 2004, **235** :393 – 399.
- [19] Roeler M, Muler V. Chloride dependence of glycine betaine transport in *Halobacillus halophilus*. *FEBS Lett*, 2001, **489** :125 – 128.
- [20] Canovas D, Vargas C, Calderon MI, *et al.* Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol*, 1998, **21** :487 – 497.
- [21] Canovas D, Vargas C, Kneip S, *et al.* 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.
- [22] Gadda G, Elizabeth E, Wilkins M, Cloning, expression, and purification of choline dehydrogenase from the moderate halophile *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69** :2126 – 2132.
- [23] Huang J, Rozina H, Luc A, *et al.* Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations I. *Plant Physiol*, 2000, **122** :747 – 756.
- [24] Grammann K, Volke A, Kunte HJ. New type of osmoregulated solute transporter identified in halophilic members of the Bacteria domain: TRAP- transporter TeaABC mediates uptake of ectoine and hydroxyectoine in *Halomonas elongata* DSM 2581^T. *J Bacteriol*, 2002, **184** :3078 – 3085.
- [25] Lous P, Galinski EA. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1997, **143** :1141 – 1149.
- [26] Kuhlmann AU, Bremer E. Osmotically regulated synthesis of compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. . *Appl Environ Microbiol* 2002, **68** (2) :772 – 783.
- [27] Zhao BS, Lu WD, Yang LF, *et al.* Cloning and characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8^T. *Curr Microbiol* 2006, **53** :831 – 834.

- [28] Prabhu J, Schauwecker F, Gramme N, *et al.* Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (*thpD*) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata*. *Appl Environ Microbiol* 2004, **75** : 3130 – 3132.
- [29] Estepa RG, Montserrat A, Mercedes RB, *et al.* The *ectD* Gene, Which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J Bacteriol* 2006, **188** : 3774 – 3784.
- [30] Wohlfarth A, Severin J, Galinski A. Identification of N^{β} -acetyornithine as a novel osmolyte in some gram-positive halophilic eubacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 1993, **39** : 568 – 573.
- [31] Galinski EA. Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* 1995, **37** : 273 – 328.
- [32] Bolen DW, Baskaov IV. The osmophobic effect : natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Mol Biol* 2001, **310** : 955 – 963.
- [33] Knapp S, Ladenstein R, Galinski EA. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles* 1999, **3** (3) : 191 – 198.
- [34] Oren A, Larimer F, Richardson P, *et al.* How to be moderately halophilic with broad salt tolerance : clues from the genome of *Chromohalobacter salexigens*. *Extremophiles* 2005, **9** : 275 – 279.
- [35] 何健, 黄星, 顾立锋, 等. 盐单胞菌属 BYS-1 四氢嘧啶合成基因 *ectABC* 克隆及其盐激表达. *微生物学报* 2006, **46** (1) : 28 – 32.
- [36] Schnoor M, Voss P, Cullen P, *et al.* Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **322** (3) : 867 – 872.
- [37] Roberts MF. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* 2005, **1** : 5.
- [38] 赵百锁, 杨礼富, 宋蕾, 等. 中度嗜盐菌在生物技术中的应用. *微生物学通报* 2007, **34** (2) : 359 – 362.

Study progress on compatible solutes in moderately halophilic bacteria

ZHAO Bai-suo^{1,2}, YANG Li-fu³, WANG Lei², LU Wei-dong², YANG Su-sheng^{2*}

(¹ Department of Environmental Science and Engineering, State Key Joint Laboratory on Environmental Simulation and Pollution Control, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(² Department of Microbiology and Immunology, College of Biological Sciences, China Agricultural University and Key Laboratory of Agro-Microbial Resource and Application, Ministry of Agriculture, Beijing 100094, China)

(³ Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, and Key Laboratory of Physiology for Tropical Crops of Ministry of Agriculture, Hainan Yanzhou 571737, China)

Abstract : Moderately halophilic bacteria which grow best in media with 3% to 15% salt constitute a heterogeneous group of microorganisms which belong to different genera. These bacteria can inhabit the salt or soda lakes, coastal lagoons or man-made salterns. Moderately halophilic bacteria living in higher saline environments can not only cope with high osmotic stress but also adapt osmotic shock in short time. To adapt to these environments, all the species make an osmoprotection by the accumulation of a restricted range of low molecular mass molecules, small, organic compatible solutes, such as sugars, amino acids, betaines and ectoines. Therefore, the osmoadaptation of moderately halophilic bacteria is regulated by the so-called “compatible solute” strategy. Compatible solutes are operationally defined as organic osmolytes that can be amassed by the cell in exceedingly high concentrations without disturbing vital cellular functions and the correct folding of proteins. As a result, compatible solutes can make important contributions to the restoration of the turgor under conditions of low water activity by counteracting the efflux of water from the cell. In addition, they have a stabilizing effect, both in vivo and in vitro, on the native structure of proteins and cell components. This mechanism has a minimal requirement for genetic change and a high degree of flexibility in allowing moderate halophiles to adapt to saline environment. In this review, the adaptation to saline environments, the variety and characteristics of compatible solutes, and the functional mechanism of moderately halophilic bacteria are reviewed and discussed.

Keywords : moderately halophilic bacteria ; compatible solute ; salt adaptation

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2003AA241150)

* Corresponding author. Tel : 86-10-62732674 ; E-mail : yangssh@cau.edu.cn

Received : 17 February 2007 / Accepted : 14 May 2007 / Revised : 29 June 2007