

靶向代谢组学分析菌-藻混合培养时四氢嘧啶的代谢通路变化

常晓妍¹, 赵帅康¹, 罗宁¹, 李昊鑫¹, 韩睿², 谢关顺³, 朱德锐^{1*}

¹ 青海大学 医学院, 基础医学研究中心, 青海 西宁

² 青海大学 农林科学院, 蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海 西宁

³ 青海大学 机械工程学院, 材料科学与工程教研室, 青海 西宁

常晓妍, 赵帅康, 罗宁, 李昊鑫, 韩睿, 谢关顺, 朱德锐. 靶向代谢组学分析菌-藻混合培养时四氢嘧啶的代谢通路变化[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3277-3290.

CHANG Xiaoyan, ZHAO Shuaikang, LUO Ning, LI Haoxin, HAN Rui, XIE Guanshun, ZHU Derui. Targeted metabolomics analysis of metabolic pathway changes of ectoine in bacterium-alga co-culture[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3277-3290.

摘要:【目的】为克服传统单菌发酵成本高、底物利用单一等局限, 基于资源互补原理的菌-藻共培养技术为四氢嘧啶(ectoine)生产提供了一条极具潜力的新途径。本研究通过探究伪盐生杜氏藻(*Dunaliella pseudosalina*) ZBY-1 与坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26 的混合培养条件与四氢嘧啶产量变化, 明确菌株 XH26 与藻株 ZBY-1 共培养后四氢嘧啶的代谢调控机制。【方法】采用不同接种比例(1:0, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20)进行菌株 XH26 与藻株 ZBY-1 共培养, 筛选四氢嘧啶产量最高的接种比例。设置混合培养实验组[H group (H)]、菌对照组[XH26 group (X)]和藻对照组[ZBY-1 group (D)]进行靶向代谢组学测序, 并分析显著差异代谢物。【结果】菌-藻比为 1:15 时, 菌株的四氢嘧啶产量最高, 而藻株各色素含量均低于其单独培养对照组。代谢组学分析共筛选出 15 个(H vs. D)、16 个(H vs. X)和 16 个(X vs. D)显著差异代谢物, 包括 L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-苯丙氨酸、苹果酸和丙酮酸等。KEGG 代谢通路富集分析表明, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 乙醛酸和二羧酸代谢, 精氨酸生物合成等途径发生了显著变化。【结论】混合培养体系呈现“菌体增殖、藻体受抑”的非对称模式。共培养体系显著激活了细菌的中心碳代谢网络, 胞内天冬氨酸和谷氨酸显著积累, 二者分别作为四氢嘧啶的直接碳骨架和氨基供体, 有效促进了四氢嘧啶的高效合成。

关键词: 四氢嘧啶; 坎帕尼亚盐单胞菌; 伪盐生杜氏藻; 靶向代谢组学; 能量代谢

资助项目: 国家自然科学基金(32260019); 青海中央引导地方科技发展资金(2024ZY015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32260019) and the Qinghai Central Government Guide Local Science and Technology Development Fund (2024ZY015).

*Corresponding author. E-mail: zhuderui2005@126.com

Received: 2026-01-11; Accepted: 2026-02-07; Published online: 2026-03-12

Targeted metabolomics analysis of metabolic pathway changes of ectoine in bacterium-alga co-culture

CHANG Xiaoyan¹, ZHAO Shuaikang¹, LUO Ning¹, LI Haoxin¹, HAN Rui², XIE Guanshun³, ZHU Derui^{1*}

1 Department of Basic Medical Sciences, Medical College, Qinghai University, Xining, Qinghai, China

2 Key Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology, Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai, China

3 Department of Materials Science and Engineering, School of Mechanical Engineering, Qinghai University, Xining, Qinghai, China

Abstract: [Objective] To overcome the limitations such as high costs and restricted substrate utilization of mono-culture fermentation, bacterium-alga co-culture based on resource complementarity offers a promising new avenue for ectoine production. This study investigated the co-culture conditions of *Dunaliella pseudosalina* ZBY-1 and *Halomonas campaniensis* XH26 and the variations in ectoine yield, aiming to elucidate the metabolic regulation mechanism of ectoine biosynthesis in the co-culture system. [Methods] Strains XH26 and ZBY-1 were co-cultured at different inoculation ratios (1/0, 1/5, 1/10, 1/15, and 1/20) to screen the ratio yielding the highest ectoine production. Targeted metabolomics analysis was performed on the co-culture group [H group (H)], the bacterial control group [XH26 group (X)], and the algal control group [ZBY-1 group (D)] to identify significant differential metabolites. [Results] The highest ectoine yield was achieved at a bacterium-to-alga ratio of 1:15, while the pigment content of the algal strain was lower than that of the control group. Metabolomics analysis identified 15 (H vs. D), 16 (H vs. X), and 16 (X vs. D) significant differential metabolites, including L-alanine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-phenylalanine, malic acid, and pyruvic acid. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis revealed that alanine, aspartate and glutamate metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, and arginine biosynthesis were the significantly altered metabolic pathways. [Conclusion] The co-culture system exhibited an asymmetric pattern characterized by bacterial proliferation and algal inhibition. The co-culture system significantly activated the central carbon metabolic network of the bacteria. Notably, aspartic acid and glutamic acid were significantly accumulated in cells, serving as the direct carbon skeleton and amino donor, respectively, to directly promote the efficient synthesis of ectoine.

Keywords: ectoine; *Halomonas campaniensis*; *Dunaliella pseudosalina*; targeted metabolomics; energy metabolism

四氢嘧啶(ectoine, Ect)作为一种优良的相容性溶质, 不仅能赋予微生物在高盐环境下的生存能力, 还在医药、化妆品及农业领域展现出巨大的应用潜力^[1-3]。传统单菌发酵模式通常存

在生长缓慢、代谢流向失调及产量偏低等问题, 严重制约了四氢嘧啶的规模化高效制备^[4]。为解决上述瓶颈, 研究发现菌-藻共培养体系可通过特异性物质交换形成代谢偶联关系, 这种相互

作用不仅能够重塑双方的代谢流向, 还能显著提升共培养体系的生理效能^[5-6]。Daly 等^[7]利用三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*) CCAP 1055/15 与假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas haloplanktis*) TAC 125 进行共培养, 发现藻类的生理活动直接影响细菌胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)的分泌代谢; Cooper 等^[8]研究奥斯特球藻(*Ostreococcus tauri*)与恒雄芝氏亚历山大藻玫瑰杆菌(*Dinoroseobacter shibae*)的共培养体系时发现, 藻类能够向细菌提供维生素 B₃ 及 B₇ 前体以换取细菌产生的维生素 B₁ 和 B₁₂, 使菌藻双方在共存条件下均获得了优于单培养的生长优势。然而, 在复杂的菌-藻共生微环境中, 微生物间的物质交换与碳氮代谢流如何在物种间进行分配与重定向, 亟需借助代谢组学技术进行系统解析。

菌-藻共培养体系通过种间作用影响微藻的生长效率与逆境适应性, 同时可提高代谢物产量并增强其环境胁迫耐受性^[9]。Paul 等^[10]采用非靶向代谢组学分析恒雄芝氏亚历山大藻玫瑰杆菌(*Dinoroseobacter shibae*)与假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)的共培养体系, 发现细菌对硅藻代谢的影响较大, 硅藻胞内氨基酸及其衍生物含量显著上调。坎帕尼亚盐单胞菌(*Halomonas campaniensis*) XH26 是一株耐盐性极强且高产四氢嘧啶的菌株, 其合成途径受高盐胁迫诱导^[11]; 伪盐生杜氏藻(*Dunaliella pseudosalina*) ZBY-1 不仅具备与 XH26 相匹配的耐盐环境适应力, 还能通过光合作用合成大量甘油等有机碳源^[12]。二者在高盐环境下良好的生理兼容性, 使其成为研究嗜盐微生物种间互动与四氢嘧啶合成调控的理想模型。逯心玥等^[13]利用靶向代谢组学技术发现, 在 XH26 的四氢嘧啶合成过程中, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢是最显著的富集通路; 与此同时, 本课题组郭敏等^[12]利用非靶向代谢组学分析发现, ZBY-1 在盐胁迫响应下同样显著富集了丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路。鉴于天冬氨酸是

四氢嘧啶合成的直接前体, 且该代谢通路在菌、藻双方的盐胁迫响应中均占据核心地位, 本研究以坎帕尼亚盐单胞菌 XH26 和伪盐生杜氏藻(*Dunaliella pseudosalina*) ZBY-1 为研究对象, 通过靶向代谢组学技术对比单培养与共培养模式下的差异代谢物谱, 揭示菌-藻互作共生时前体供应、能量代谢及产物合成途径的调控机制。

1 材料与方法

1.1 微藻和细菌的来源与培养基

伪盐生杜氏藻(*Dunaliella pseudosalina*) ZBY-1 分离自青藏高原扎布耶盐碱湖; 野生盐单胞菌 *H. campaniensis* sp. XH26 (CCTCC M2019776M) 分离自小柴旦盐湖。

DM 培养基成分^[12]: NaCl 100.00 g/L, CO(NH₂)₂ 0.84 g/L, NaH₂PO₄ 0.06 g/L, KCl 74.00 mg/L, MgSO₄ 1.23 g/L, CaCl₂ 44.00 mg/L, NaHCO₃ 1.26 g/L, 1% FeC₆H₅O₇ 0.50 mL, 1.00 mL 微量元素溶液[含 H₃BO₃ 2.86 g/L, MnCl₂·4H₂O 1.82 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.22 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.08 g/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39 g/L, CO(NO₃)₂·6H₂O 0.05 g/L]; MG 培养基成分(g/L)^[4]: L-谷氨酸钠 120.00, 葡萄糖 15.00, 蛋白胨 10.00, KH₂PO₄ 3.00, K₂HPO₄ 9.00, MgSO₄·7H₂O 0.40, FeSO₄·7H₂O 0.20, NaCl 6.00; OSM 培养基成分(g/L)^[13]: L-谷氨酸钠 5.61, 酶水解酪素 7.50, NaCl 87.50, MgSO₄·7H₂O 24.65, 柠檬酸钠 3.00, 无水 CaCl₂ 0.20, KCl 55.88, 酵母 2.00。

1.2 主要试剂和仪器

分析纯 NaCl、MgSO₄·7H₂O, 北京索莱宝科技有限公司; 分析纯 L-谷氨酸钠、葡萄糖, 天津市永大化学试剂有限公司; HPLC 级四氢嘧啶标准品、甲醇, ThermoFisher Scientific 公司。

光照培养箱, 上海堪鑫仪器设备有限公司; 紫外分光光度计, Cyvita 公司; 微孔过滤器, 天津毫津科技有限公司; 高效液相色谱仪、色谱

分析柱, Agilent 公司; 液相色谱柱, Waters 公司; 液相质谱联用仪, SCIEX 公司。

1.3 筛选培养基

采用 MG、OSM 和 DM 培养基培养菌-藻混合物(25 °C, 12:12 h, 光强 6 000 lx), 通过四氢嘧啶积累量筛选最适菌-藻混合生长的培养基。在此基础上进行 6 因素单因素试验($n=3$)优化培养基, 并分析四氢嘧啶产量和混合物干重。单因素条件设置如下: NaCl (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mol/L)、蛋白胨 (0、5、10、15、20 g/L)、L-谷氨酸钠(0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mol/L)、葡萄糖 (0、5、10、15、20 g/L)、FeSO₄·7H₂O (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L)、pH (6.5、7.0、7.5、8.0、8.5)。

1.4 杜氏藻与盐单胞菌共培养

将菌液和藻液分别培养至对数生长期后, 设置 4 种藻-菌共培养比例(体积比为 1:5、1:10、1:15、1:20)将 ZBY-1 藻株与坎帕尼亚盐单胞菌 XH26 共培养。控制微藻初始接种 $OD_{697}=0.15$, 活化菌种 XH26 (光密度值 $OD_{600}=1.2$, 培养约 12 h), 按比例接种于液体培养基进行共培养(100 mL, $n=3$ /组), 光照培养(25 °C, 12:12 h, 光强 6 000 lx)至 12 d。设置菌株 XH26 单培养作为对照组, 初始接种量控制为 1%。根据 1.4.1 节中的方法, 每 24 h 抽提四氢嘧啶并进行 HPLC 定量检测, 根据四氢嘧啶产量确定藻-菌共培养的最佳比例。

1.4.1 四氢嘧啶的抽提与检测条件

取 1 mL 培养液置于离心管中, 经 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 干浴锅预热至 100 °C 后将离心管放入并加热 15 min; 加入 1 mL 去离子水复溶, 充分涡旋振荡洗脱胞内物质; 12 000 r/min 离心 5 min 去除细胞碎片, 所得上清液经 0.22 μm 水系微孔滤膜过滤, 收集滤液作为色谱分析进样液。HPLC 检测条件: 流动相为甲醇/磷酸二氢钾溶液=5/95 (体积比), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 210 nm, 进样量 5 μL。

1.4.2 光合色素含量测定

设置藻株 ZBY-1 单培养作为对照组, 初始接种量控制为 10%, 按 4 种藻-菌共培养比例(体积比为 1:5、1:10、1:15、1:20)将 ZBY-1 藻株与坎帕尼亚盐单胞菌 XH26 共培养。取培养 12 d 的藻液 2.0 mL, 8 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 1 mL 水重悬洗涤 1 次, 8 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 后加入 2 mL 无水乙醇低频超声 30 min, 4 °C 冷藏过夜后再低频超声 30 min。8 000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 测定吸光度值 A_{665} 、 A_{649} 和 A_{470} , 并计算光合色素含量, 如公式(1)、(2)所示。

$$\text{总叶绿素(chlorophyll)}=21.21\times A_{649}+8.02\times A_{665} \quad (1)$$

$$C_a=13.95\times A_{665}-6.88\times A_{649}$$

$$C_b=24.96\times A_{649}-7.32\times A_{665}$$

$$C_{\text{carot}}=(1\,000\times A_{470}-2.05\times C_a-144.8\times C_b)/245 \quad (2)$$

式中: C_a 为叶绿素 a 质量浓度, C_b 为叶绿素 b 质量浓度, C_{carot} 为类胡萝卜素质量浓度(mg/L)。

1.4.3 干重测定

当共培养体系进行至 72 h 时, 采集 1 mL 均匀混合悬液置于预先称重的 1.5 mL 离心管中。样品经 8 000 r/min 离心 5 min 实现固液分离, 弃去上清液后, 将含有沉淀的离心管置于烘箱中干燥至恒重。最终伪盐生杜氏藻-盐单胞菌的混合干重(dry cell weight, DCW)根据公式(3)计算得出。

$$W=(W_b-W_a)/V_1 \quad (3)$$

式中: W 为藻菌样品干重(g/L); W_a 为离心管初始干重(mg); W_b 为离心管加藻菌总重(mg); V_1 为样品体积(mL)。

1.5 代谢物提取及样本制备

设置实验组菌-藻混合培养(H group)、对照组 XH26 培养组(X group)、对照组 ZBY-1 培养组(D group), 收集最佳培养条件下的藻株、菌株和菌-藻混合培养液($n=6$) 8 000 r/min 离心 15 min 弃上清, 以等浓度盐溶液洗涤 3 次, 再次离心取沉淀。称取 50 mg 样品, 加入 400 mL 提取液(甲醇:水=4:1, 体积比), 含 0.02 mg/mL 内标(L-

2-氯苯丙氨酸)进行代谢产物提取。样本于冷冻组织研磨仪中研磨 6 min ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 Hz)后, 低温超声提取 30 min ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 40 kHz)。将样品于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $13\ 000\times g$ 离心 15 min, 取上清液上机分析。

1.6 代谢组学分析流程

利用 LC-ESI-MS/MS 技术平台对样品中的目标代谢物进行定性和定量分析。液相色谱分离在 ExionLC AD 系统中完成, 柱温恒定为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样体积为 $2\text{ }\mu\text{L}$; 流动相体系由 0.1% 甲酸水溶液(A 相)和 0.1% 甲酸甲醇溶液(B 相)组成。质谱检测使用 SCIEX QTRAP 6500+仪, 在正离子模式下运行。关键源参数设置如下: 气帘气(CUR) 35, 碰撞气(CAD) Medium, 离子喷雾电压(IS) $+5\ 000\text{ V}$, 温度(TEM) $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, 雾化气(GS1)与辅助气(GS2)均为 60。数据采集结束后, 将原始 LC-MS 文件导入 Progenesis Q1 软件(Waters Corporation, Milford 公司)进行预处理, 包括基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正及峰对齐, 最终生成包含保留时间、质荷比及峰强度的三维数据矩阵。随后, 利用 R 软件(v.4.6.0)的 ropls 包对数据矩阵进行多变量统计分析, 构建主成分分析(principal components analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)模型, 并通过 7 次循环交互验证评估模型可靠性。差异代谢物的筛选标准设定为 OPLS-DA 模型中的变量投影重要度(variable importance in the projection, VIP) >1 且 Student's t 检验 $P<0.05$ 。最后, 基于 KEGG 数据库对差异代谢物进行通路注释, 并利用 Python (v.3.11.3) scipy.stats 包执行 Fisher 精确检验, 以富集显著相关的生物学通路。

1.7 数据处理

利用 Origin 软件(v.8.6)和 Adobe Illustrator (v.29.3.1)绘制实验图形, 利用 SPSS (v.27.0)软件进行方差分析(analysis of variance, ANOVA)计算

组间差异(显著性水平 $\alpha=0.05$)。原始代谢数据经偏差过滤、缺失值填补和归一化等处理后, 再利用 MetaboAnalyst (v.6.0)对不同组样品间的代谢物进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 筛选和优化培养基

为筛选出最佳培养条件, 本研究系统评估了菌-藻混合培养体系在 DM、MG 与 OSM 培养基中的四氢嘧啶合成能力(图 1)。结果显示, 3 种培养基条件下菌-藻混合物的四氢嘧啶产量存在显著差异, 其中 MG 培养基条件下混合培养的四氢嘧啶产量最高(1.1 g/L); OSM 培养基条件下的最高产量可达 0.59 g/L ; DM 培养基条件下产量最低(0.07 g/L)。

基于 MG 培养基, 重点考察 NaCl、蛋白胨、L-谷氨酸钠、葡萄糖、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 pH 共 6 种因素对四氢嘧啶积累量和菌-藻混合物生物量的影响。结果表明, 各因素的最适浓度及相应积累量分别为 NaCl 1.0 mol/L (1.18 g/L)、pH 7.5 (1.15 g/L)、L-谷氨酸钠 0.7 mol/L (1.18 g/L)、葡萄糖 10 g/L (1.1 g/L)、蛋白胨 15 g/L (1.17 g/L)和 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.40 mmol/L (0.85 g/L , 图 2A–2F)。

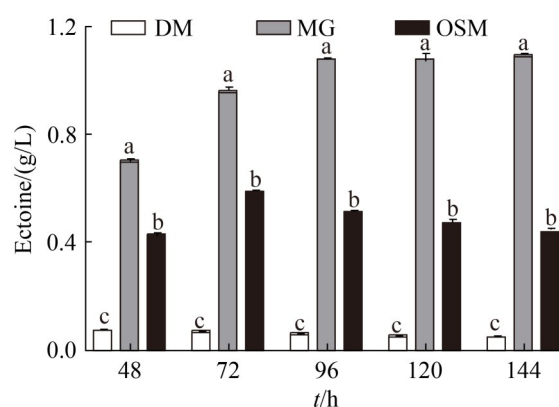


图1 不同培养基对菌-藻混合物合成四氢嘧啶的影响
Figure 1 The influence of different culture media on ectoine synthesis in bacterial-algal mixtures. Different lowercase letters in the superscript indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

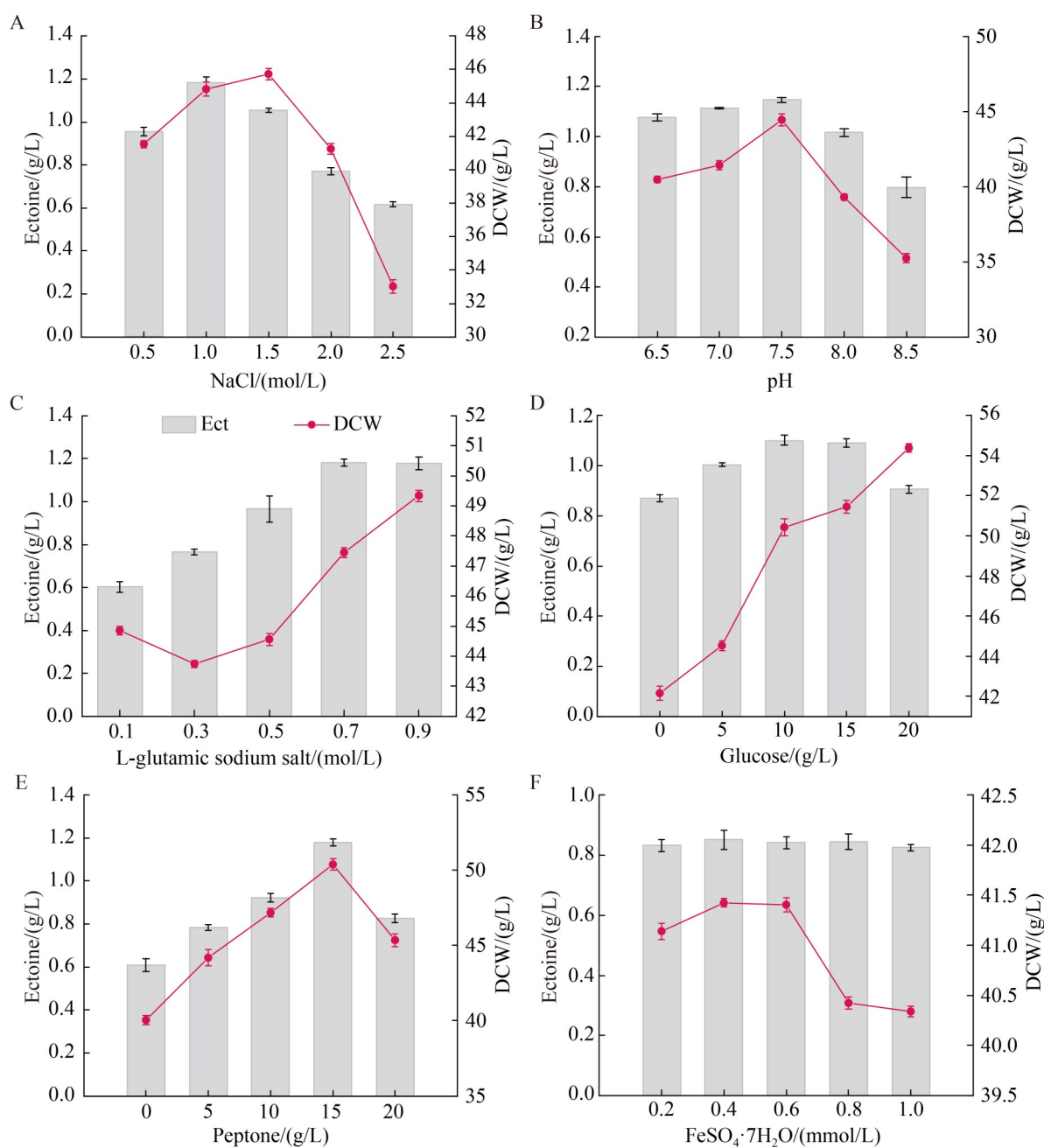


图2 不同单因素条件下菌-藻混合物的干重(DWC)和四氢嘧啶积累量

Figure 2 Dry weight content (DWC) of the bacterial-algal mixture and ectoine accumulation under different single-factor conditions. A: NaCl; B: pH; C: L-glutamic sodium salt; D: Glucose; E: Peptone; F: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

混合培养物干重与四氢嘧啶含量的变化趋势总体一致，不同之处在于菌-藻混合培养物的干重随葡萄糖浓度升高而增加，但四氢嘧啶产量并未进一步升高。

2.2 不同体积比菌-藻混合培养后四氢嘧啶产量和生物量

为探索混合培养体系中菌-藻的最佳体积比，按 1.4 节中的比例进行混合培养。不同比例混合

培养结果显示(图 3A), 四氢嘧啶产量随培养时间延长呈先增后减趋势, 且均高于单独培养。当菌-藻混合体积比为 1:15 并培养至 7 d 时四氢嘧啶产量最高, 达 1.25 g/L, 此时 XH26 单独培养的四氢嘧啶产量为 0.77 g/L。细菌干重结果显示(图 3B), 混合培养干重高于单独培养, 7 d 后干重呈下降趋势。光合色素含量结果显示(图 3C), 混合培养下杜氏藻的光合色素含量均低于单独培养。上述结果表明, 混合培养能促进细菌的生物量积累和四氢嘧啶产量, 但对藻的生

长无促进作用。

2.3 代谢组样本多元统计分析

为系统揭示菌-藻混合培养下代谢物的整体变化趋势与样本间差异, 基于多元统计分析对代谢物进行模式识别(图 4), 以进一步验证组间代谢差异的显著性与系统性特征。PCA 模型分析显示(图 4A), 第一主成了解释了 18.098% 的代谢物信息, 第二主成了解释了 81.121% 的代谢物信息, 对照组与实验组在空间分布上相对独立。PLS-DA 模型分析显示(图 4B), 模型主要

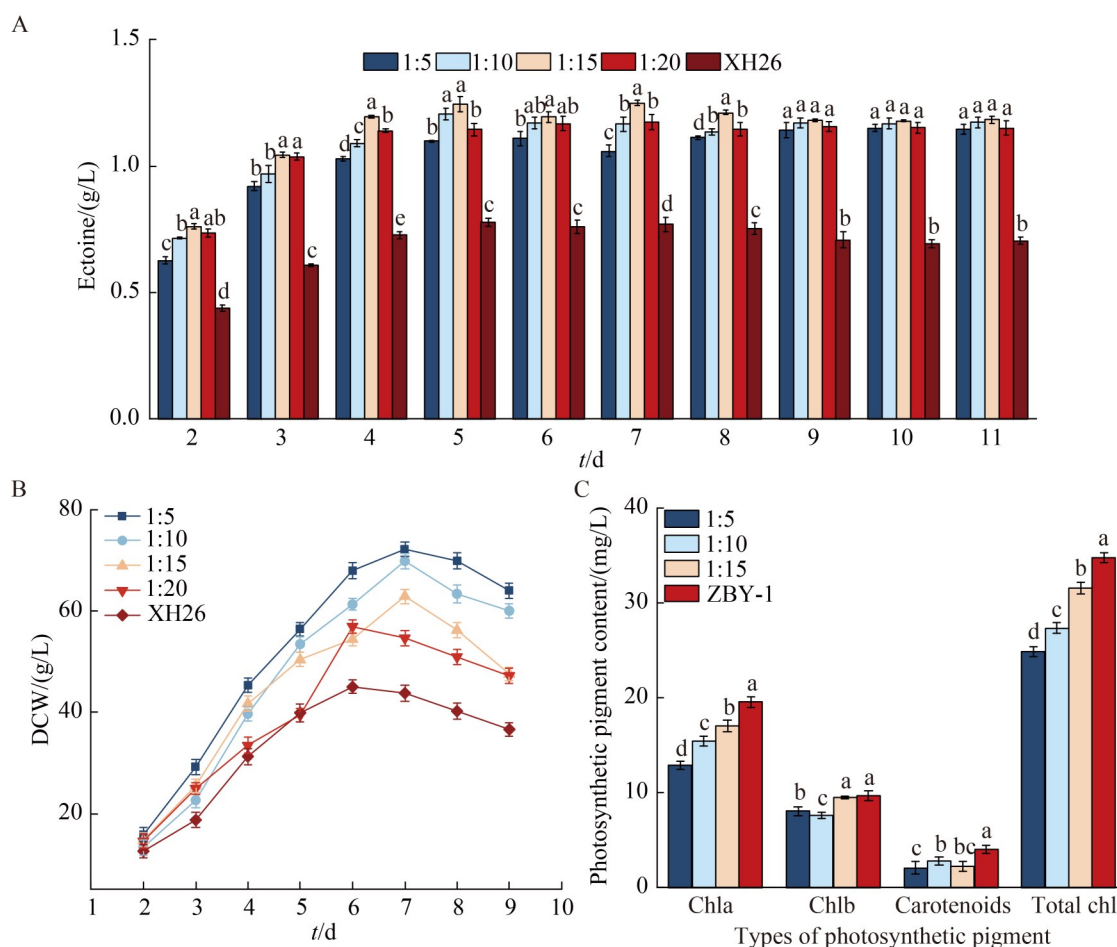


图3 不同体积比混合培养后ectoine、混合物干重及光合色素含量分析

Figure 3 Analysis of ectoine content, dry weight of the mixture, and photosynthetic pigment content after mixing at different volumes. A: Ectoine yield after mixing at different volumes; B: Dry weight of the bacterial-algal mixture after mixing at different volumes; C: Photosynthetic pigment content after mixing at different volumes. Different lowercase letters (e. g. a vs. b) in the superscript indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

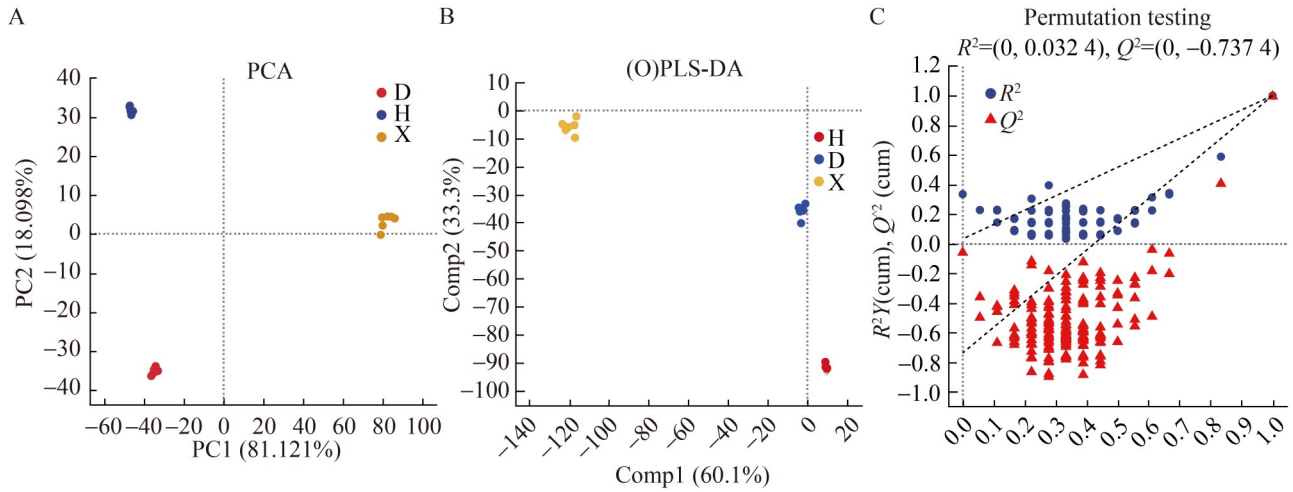


图4 代谢组学样本PCA得分图、PLS-DA得分图和置换检验结果

Figure 4 Metabolomics sample PCA score plot, PLS-DA score plot and permutation test results. A: Metabolomics sample PCA score plot; B: PLS-DA score plot; C: Permutation test results.

得分解释度为 60.1%，正交得分解释度为 33.3%。对照组与实验组样本组内分布较为聚集，组间总体分布趋势相对独立，代谢物差异明显。 R^2 和 Q^2 的值超过 0.4 通常被视为可接受的阈值，靶向代谢物模型(图 4C)的 Q^2 值和 R^2Y 均大于 0.4， Q^2 的回归线截距为 $-0.7374 < 0$ ；表明该模型无过拟合现象，具有较好的可预测性和拟合度，能够准确描述数据。

2.4 筛选差异代谢物与聚类分析

为筛选与四氢嘧啶积累密切相关的关键代谢物，基于 OPLS-DA 模型筛选显著差异代谢物，并通过聚类分析比较不同组间代谢物的表达模式。结果显示，3 个比较组中分别筛选出 15 个(H vs. D)、16 个(H vs. X)和 16 个(X vs. D)显著差异代谢物(VIP>1, $P<0.05$ ，表 1)。三组中共同差异代谢物是 L-丝氨酸、L-赖氨酸、L-谷氨酸和 D-葡萄糖。在 H vs. D 比较组中，L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-苯丙氨酸、苹果酸和丙酮酸等上调；在 H vs. X 比较组中，L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、L-丝氨酸、L-赖氨酸等上调；在 X vs. D 比较组中，L-苏氨酸、L-亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-色氨酸等上调。

利用 Origin 软件对 3 个比较组菌-藻混合物、

表1 不同比较组的差异代谢物

Table 1 Differential metabolites in different comparison groups

Metabolites	VIP			P-value
	H vs. D	H vs. X	X vs. D	
L-alanine	2.364 08	—	1.372 20	<0.05
L-serine	1.180 85	2.018 34	1.923 26	<0.05
L-asparagine	1.452 89	—	—	<0.05
L-aspartate	1.109 85	—	—	<0.05
L-lysine	1.264 81	1.640 20	1.438 33	<0.05
L-glutamate	1.510 26	1.723 47	1.386 44	<0.05
L-phenylalanine	1.903 74	—	1.346 21	<0.05
L-arginine	1.320 57	1.051 72	—	<0.05
L-tyrosine	1.060 49	1.021 97	—	<0.05
Lactic acid	2.893 33	—	2.200 13	<0.05
Pyruvic acid	1.525 93	—	—	<0.05
D-glucose	1.810 27	1.837 51	1.382 40	<0.05
Succinate	2.072 56	—	1.248 52	<0.05
Malic acid	1.171 03	—	—	<0.05
D-erythrose-4-phosphate	2.686 36	2.060 38	—	<0.05
L-valine	—	2.144 66	2.123 34	<0.05
L-threonine	—	3.039 98	3.151 49	<0.05
L-isoleucine	—	1.522 90	1.426 61	<0.05
L-leucine	—	1.571 63	1.604 83	<0.05
L-glutamine	—	1.064 08	—	<0.05
L-methionine	—	1.532 69	1.547 68	<0.05
L-tryptophan	—	1.486 35	1.523 81	<0.05
Glucose-6-phosphate	—	1.068 95	1.303 75	<0.05
D-ribose-5-phosphate	—	1.619 71	1.684 86	<0.05

菌株 XH26 和藻株 ZBY-1 (H、D、X) 的代谢物进行层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA), 其中蓝色表示上调, 红色表示下调 (图 5)。结果显示, H 组中 D-葡萄糖、同型半胱氨酸、L-天冬氨酸、L-鸟氨酸及苹果酸等显著上调; D 组中 L-磺基丙氨酸、环磷酸鸟苷、鸟苷、3-脲基丙酸及甘油酸等显著上调; 在 X 组中, 己二酸、1,6-果糖二磷酸、L-甘氨酸、L-丝氨酸及 L-谷氨酰胺等显著上调。整体而言, H 组与 D 组、X 组在代

谢物变化上呈现出明显的相反趋势, 具体表现为: 在 D 组与 X 组中显著下调的代谢物 (图 5 红色区域), 在 H 组中则显著上调 (图 5 蓝色区域)。

2.5 KEGG 富集分析差异代谢物

为进一步解析差异代谢物在代谢网络中的生物学功能, 利用 MetaboAnalyst 平台对差异代谢物进行 KEGG 通路的富集分析, 确定主要受影响的代谢途径, 并绘制各比较组的气泡图 (前 25 个, 图 6)。结果显示, 在 H vs. D 比较组中,

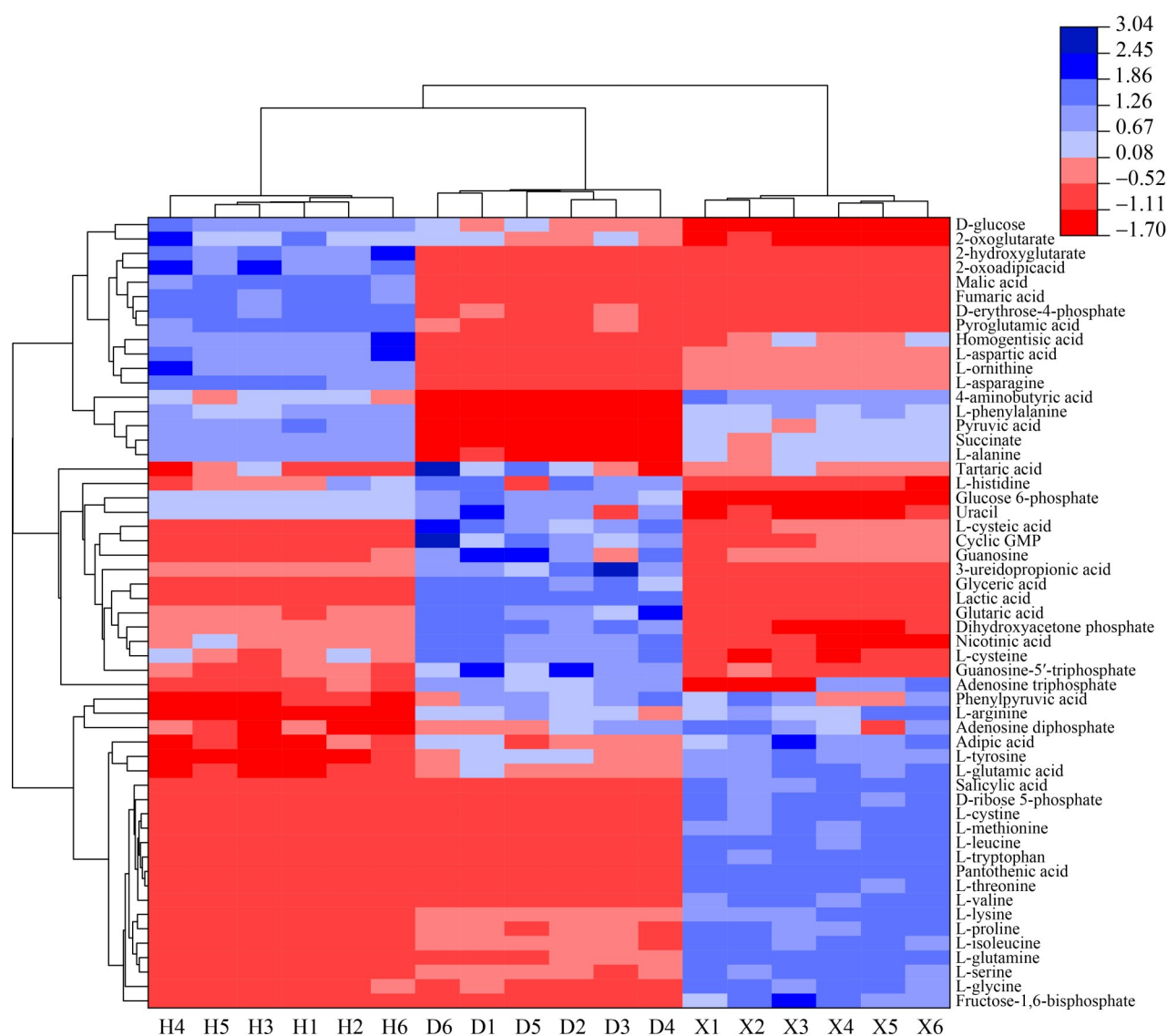


图5 比较组差异代谢物的聚类分析

Figure 5 Cluster analysis of differential metabolites of comparison groups.

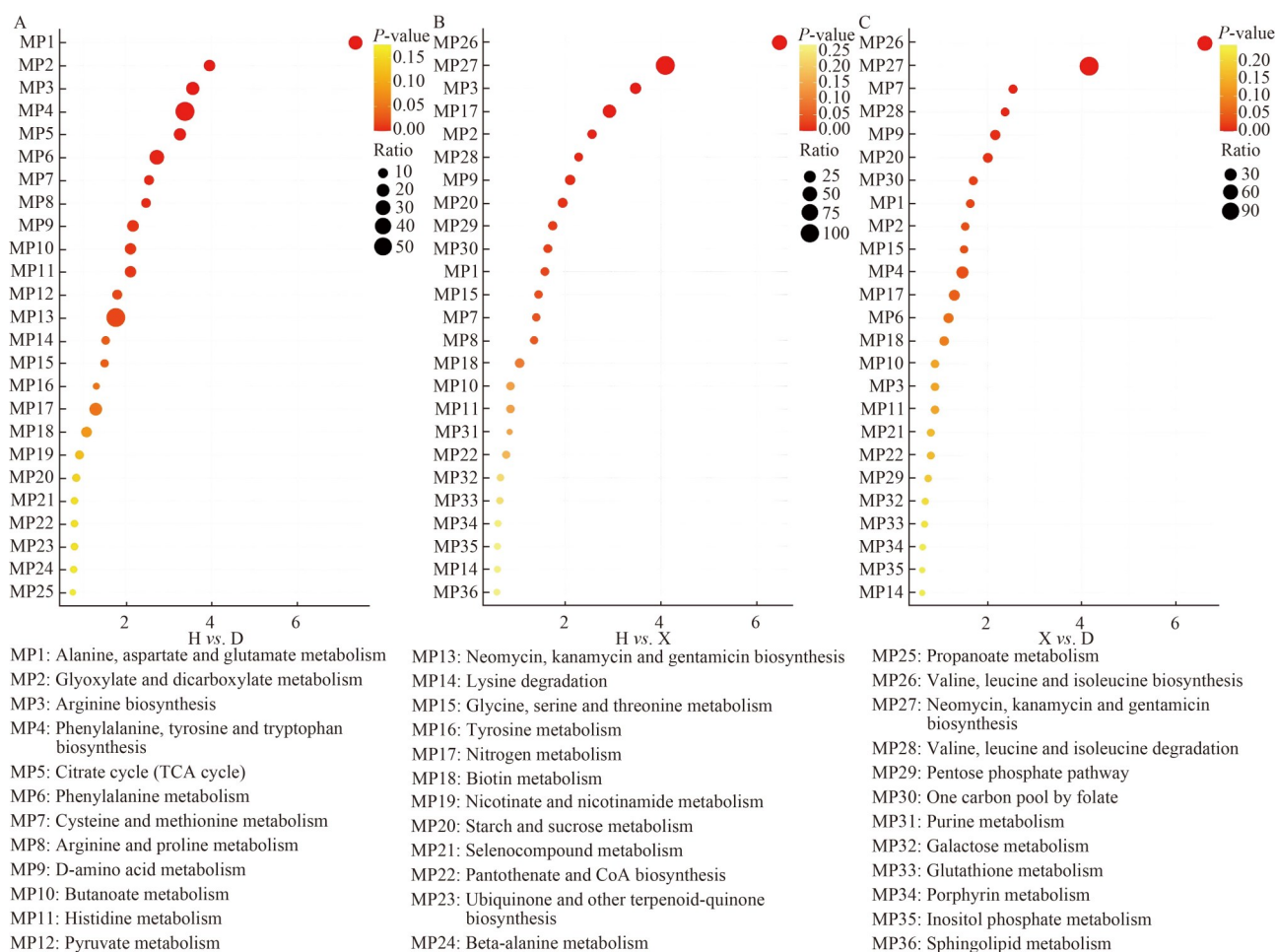


图6 不同比较组的KEGG富集分析

Figure 6 KEGG enrichment analysis of different comparison groups. A: Comparison groups of H vs. D; B: Groups of H vs. S; C: Groups of X vs. D.

与菌-藻混合物胞内代谢相关的代谢物主要富集于丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(alanine, aspartate and glutamate metabolism), 乙醛酸和二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism), 精氨酸生物合成(arginine biosynthesis), 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成(phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis)及三羧酸循环(TCA cycle)等通路(图 6A)。在 H vs. X 比较组中主要富集于缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸的生物合成(valine, leucine and isoleucine biosynthesis), 新霉素、卡那霉素与庆大霉素的生物合成(neomycin, kanamycin

and gentamicin biosynthesis), 精氨酸的生物合成(arginine biosynthesis), 氮代谢(nitrogen metabolism)及乙醛酸和二羧酸代谢(glyoxylate and dicarboxylate metabolism)等通路(图 6B)。在 X vs. D 比较组中主要富集于缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸的生物合成(valine, leucine and isoleucine biosynthesis), 新霉素、卡那霉素与庆大霉素的生物合成(neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis), 半胱氨酸与甲硫氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism), 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解(valine, leucine and isoleucine degradation)及 D-氨基酸代谢(D-

amino acid metabolism)等通路(图 6C)。

3 讨论与结论

3.1 共培养体系中菌-藻之间的相互影响

在复杂的生态系统中, 细菌与藻类经过长期的相互作用可能存在 4 种关系, 即共生、共栖、竞争或寄生^[14]。在常见的共生互利关系中, 细菌和微藻通过交换彼此的代谢物来促进双方生长^[15]。Croft 等^[16]研究发现, 藻类通过光合作用固定二氧化碳为细菌提供碳源, 而细菌则向微藻提供维生素 B₁₂ 以促进藻的生长。然而, 藻-菌间的相互作用并非总是表现为互利共生, 二者之间也会因争夺限制性营养元素而产生种间竞争。Løvdaal 等^[17]研究发现, 在共培养体系中细菌比赫氏圆石藻(*Emiliania huxleyi*)更容易从有机化合物中获取氮, 导致芽孢杆菌快速增殖并抑制了藻的生长。本研究通过探究菌-藻混合培养体系对四氢嘧啶产量、混合物干重及光合色素含量的影响, 揭示了混合培养对微生物代谢与生长行为的调控作用。结果表明, 当菌-藻体积比为 1/15、培养至 7 d 时, 四氢嘧啶产量达到最高值 1.25 g/L, 且在所有实验组中均显著高于单独培养, 说明适宜的混合比例与培养时间能够有效促进代谢物的生物合成^[18]。此外, 混合培养下菌-藻混合物干重均高于单独培养, 进一步证实了混合体系对菌株 XH26 的生长具有促进作用。

与菌株 XH26 的生长相反, 混合培养对藻株 ZBY-1 的生长呈现抑制作用。结果显示(图 3C), 混合培养体系中藻细胞的光合色素含量均显著低于单独培养组, 这一现象打破了常见的“互利共生”模式, 揭示了该共培养体系中存在非对称的种间相互作用, 即细菌对微藻构成了竞争压力或抑制效应^[19-20]。原因主要涉及 3 个方面: (1) 营养竞争, 细菌通常具有比藻类更快的生长速率和更强的营养吸收能力, 尤其是对氮、磷等关键营养元素的摄取^[19], 导致藻细胞因营养

匮乏而色素合成受阻; (2) 遮光效应, 随着细菌生物量的快速增加, 培养液浊度上升, 降低了光在培养基中的穿透深度, 限制了微藻对光能的捕获效率, 导致光合色素合成水平下调^[21]; (3) 化感作用, 细菌可分泌特定的胞外酶(如蛋白酶)或次级代谢产物(如抗生素类物质), 诱导藻细胞裂解或增加其细胞膜通透性^[22-24]。裂解后的藻细胞释放出富含氨基酸、多肽及核苷酸的胞内物质, 不仅为细菌提供了额外的有机碳氮源, 更可能作为前体物质直接被细菌摄取利用。综上所述, 微生物之间并不都是相互促进的, 也存在“藻供菌用”的竞争模式。

3.2 菌-藻共培养通过强化前体供应与中心碳代谢调控驱动四氢嘧啶合成

菌-藻共培养体系通过种间相互作用(如物质交换)显著影响双方的代谢网络^[25]。Villa 等^[26]研究发现, 瓦恩兰德固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)可以为富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)提供无机氮以促进绿藻生长。本研究发现, 与单培养组相比, H 组中四氢嘧啶合成的关键前体 L-天冬氨酸、L-谷氨酸及相关代谢物 L-丙氨酸均显著上调(表 1)。KEGG 富集分析也显示“丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢”是受影响最显著的通路之一(图 6A)。鉴于天冬氨酸是四氢嘧啶合成的碳骨架, 而谷氨酸是主要的氨基供体^[27], 这些前体物质的积累表明共培养环境通过增加底物供应流向四氢嘧啶合成途径, 从而有利于四氢嘧啶的积累(图 7)。此外, 中心碳代谢的活跃程度也发生了变化。代谢组学数据显示, 糖酵解(Embden-Meyerhof-Parnas pathway, EMP)途径的末端产物丙酮酸以及三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)中间体苹果酸在 H 组中显著上调(图 5), 且 TCA 循环通路显著富集(图 6A)。EMP 途径和 TCA 循环的活跃通常伴随能量(ATP)和还原力(NADH/NADPH)的生成^[28], 可为四氢嘧啶等次级代谢产物的合成提供必要的能量支持。值得注意的是, 磷酸戊糖途径

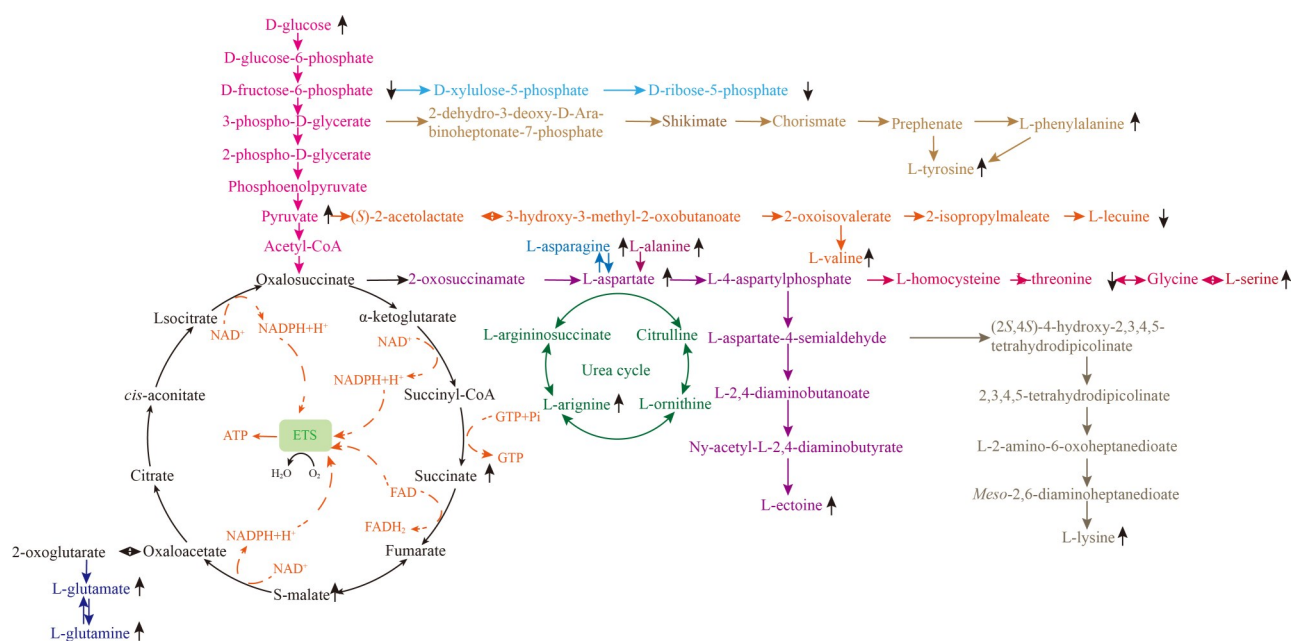


图7 四氢嘧啶合成通路

Figure 7 Ectoine synthesis pathway. Arrows indicate the upregulation and downregulation of metabolites.

(pentose phosphate pathway, PPP)中的代谢物(D-ribose-5-P)呈现下调趋势。Chen 等^[29]通过转录组学分析发现,盐胁迫下 *Halomonas cupida* J9 将碳通量更多地分配至 EMP 途径,通过草酰乙酸回补生成天冬氨酸,而非流向以核苷酸合成为主的 PPP 途径,从而保证了四氢嘧啶合成前体的供应。基于此,本研究表明共培养环境促使盐单胞菌将更多碳源通过 EMP 途径流向四氢嘧啶合成,限制流向 PPP 途径的非必要碳通量,最终实现了产量的提升。这种碳代谢流的重定向,结合胞内 L-丝氨酸、L-赖氨酸等其他相容性溶质的同步积累,表明共培养体系可能通过协同扩充氨基酸库并优化碳源分配以应对环境胁迫并维持细胞稳态^[30]。

3.3 共培养体系中关键营养因子对四氢嘧啶合成网络的重塑作用

碳、氮源的协同供给不仅决定了细胞的能量状态,更是驱动代谢流向特定次级代谢产物汇聚的关键动力^[31]。本研究通过优化 MG 培养基的营养组合条件(NaCl 1.0 mol/L, L-谷氨酸钠

0.7 mol/L, 葡萄糖 10 g/L, 蛋白胨 15 g/L)揭示了特定碳氮比对四氢嘧啶合成通量的驱动机制。经计算,该优化体系下的总碳氮物质的量比(C/N ratio)约为 5:1。这一特定的碳氮物质的量比通过调控代谢流分配发挥关键作用:相对较低的 C/N 比有效抑制了碳骨架向脂质或聚羟基脂肪酸酯等储能物质的分流,促使更多代谢通量进入四氢嘧啶这一富氮化合物的合成路径^[32]。首先,高浓度的 L-谷氨酸钠(0.7 mol/L)在混合体系中扮演了双重角色,既作为氮源维持菌-藻混合物生长,更作为关键的氨基供体,通过转氨作用直接驱动前体 L-2,4-二氨基丁酸(DABA)的生成^[33]。这一结论与代谢组学结果相呼应,在 H vs. X 比较中, L-谷氨酰胺(L-glutamine)和 L-谷氨酸(L-glutamic acid)显著上调,表明充足的胞内谷氨酸是促进四氢嘧啶合成的关键;同时,精氨酸生物合成(arginine biosynthesis)和氮代谢(nitrogen metabolism)通路的富集(图 6A、6B)揭示了共培养体系中氮素利用效率的提升。其次,适量葡萄糖(10 g/L)的添加为细胞提供了必要的

ATP 和 NADPH, 并通过增强糖酵解途径为 TCA 循环提供乙酰辅酶 A^[34]。然而, 本研究发现葡萄糖浓度过高会导致生物量与四氢嘧啶合成出现“解偶联”现象(图 2D), 这可能是由于过量碳源导致碳元素更多地流向细胞壁合成或储备物质而非四氢嘧啶途径^[35]。结合本研究代谢组学数据, 在最佳条件下, TCA 循环中的苹果酸和丙酮酸显著上调, 说明优化后的碳源供给成功引导代谢流进入 TCA 循环, 从而保证了四氢嘧啶合成骨架, 即草酰乙酸的持续供应; 此外, 15 g/L 蛋白胨提供了丰富的肽和生长因子, 维持了微生物的基础代谢活性^[36]; 而 1.0 mol/L NaCl 构建的高渗环境则是这一代谢网络的“总开关”, 通过渗透胁迫信号激活四氢嘧啶合成基因簇(ectABC)的转录表达, 使细胞将摄入的碳氮源转化为相容性溶质^[37]。需要指出的是, 本阶段研究尚未全面探究各因子间的交互作用, 响应面分析法(response surface methodology, RSM)将是未来进行工业化放大研究时的重点工作。综上所述, 菌-藻共培养体系并非简单叠加, 而是通过重塑代谢网络, 即强化中心碳代谢、扩充氨基酸前体库并优化氮素利用, 从而构建了一个有利于四氢嘧啶积累的人工微生态系统。

作者贡献声明

常晓妍: 数据收集及分析、验证、撰写文章等; 赵帅康、罗宁: 数据收集; 李昊鑫: 数据收集和分析; 韩睿: 提供监督管理; 谢关顺: 审阅; 朱德锐: 提出概念、执行调研、获取基金提供资源和审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Pastor JM, Salvador M, Argandoña M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka LN, Iborra JL, Vargas C, Nieto JJ, Cánovas M. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 782-801.
- [2] Kunte H, Lentzen G, Galinski E. Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products[J]. *Current Biotechnology*, 2014, 3(1): 10-25.
- [3] Wang K, Cui BY, Wang Y. Microbial production of ectoine: a review[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2025, 14(2): 332-342.
- [4] 李昊鑫, 何珊珊, 张宗豪, 李永臻, 王嵘, 韩睿, 朱德锐. 代谢工程耦合响应面法优化盐单胞菌合成四氢嘧啶的关键技术[J/OL]. *微生物学报*, 2025: 1-19. (2025-12-05). <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20250711>.
Li HX, He SS, Zhang ZH, Li YZ, Wang R, Han R, Zhu DR. Metabolic engineering coupled with response surface methodology for optimization of ectoine synthesis in *Halomonas*[J/OL]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025: 1-19. (2025-12-05). <https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20250711> (in Chinese).
- [5] Yao S, Lyu S, An Y, Lu J, Gjermansen C, Schramm A. Microalgae-bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(2): 359-368.
- [6] Gao H, Manishimwe C, Yang L, Wang HX, Jiang YJ, Jiang WK, Zhang WM, Xin FX, Jiang M. Applications of synthetic light-driven microbial consortia for biochemicals production[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 351: 126954.
- [7] Daly G, Decorosi F, Viti C, Adessi A. Shaping the phycosphere: analysis of the EPS in diatom-bacterial co-cultures[J]. *Journal of Phycology*, 2023, 59(4): 791-797.
- [8] Cooper MB, Sayer A, Wheeler GL, Smith AG. Cross-exchange of B-vitamins underpins a mutualistic interaction between *Ostreococcus tauri* and *Dinoroseobacter shibae*[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(2): 334-345.
- [9] Tong CY, Honda K, Derek CJC. A review on microalgal-bacterial co-culture: the multifaceted role of beneficial bacteria towards enhancement of microalgal metabolite production[J]. *Environmental Research*, 2023, 228: 115872.
- [10] Paul C, Mausz MA, Pohnert G. A co-culturing/metabolomics approach to investigate chemically mediated interactions of planktonic organisms reveals influence of bacteria on diatom metabolism[J]. *Metabolomics*, 2013, 9(2): 349-359.
- [11] 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: 14.
- [12] 郭敏, 韩睿, 陶宇杰, 高翔, 邢江娃, 王嵘, 朱德锐. 一株扎布耶盐碱湖伪盐生杜氏藻的分离鉴定及生长影响因素分析[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(11): 4502-4516.
Guo M, Han R, Tao YJ, Gao X, Xing JW, Wang R, Zhu DR. Isolation, identification, and analysis of growth influencing factors of a *Dunaliella pseudosalina* strain from Zabuye Salt Lake[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(11): 4502-4516 (in Chinese).
- [13] 逯心玥, 李昊鑫, 张培霞, 师博涵, 李永臻, 王嵘, 朱德锐, 韩睿. 靶向代谢组学分析添加天冬氨酸培养盐单胞菌时四氢嘧啶的代谢通路变化[J]. *微生物学报*, 2025, 65(10): 4621-4636.

- Lu XY, Li HX, Zhang PX, Shi BH, Li YZ, Wang R, Zhu DR, Han R. Targeted metabolomics reveals changes in metabolic pathways related to ectoine in *Halomonas* cultured with aspartate[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(10): 4621-4636 (in Chinese).
- [14] Ramanan R, Kim BH, Cho DH, Oh HM, Kim HS. Algae-bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(1): 14-29.
- [15] Leung TLF, Poulin R. Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses[J]. *Vie et Milieu: Periodique D'Ecologie Generale*, 2008, 58(2): 107-115.
- [16] Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren MJ, Smith AG. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria[J]. *Nature*, 2005, 438(7064): 90-93.
- [17] Løvdaal T, Eichner C, Grossart HP, Carbone V, Chou L, Martin-Jézéquel V, Thingstad TF. Competition for inorganic and organic forms of nitrogen and phosphorus between phytoplankton and bacteria during an *Emiliania huxleyi* spring bloom[J]. *Biogeosciences*, 2008, 5(2): 371-383.
- [18] 田雪, 董梦瑶, 秦蕊, 龙启福, 韩睿, 朱德锐, 李永臻. 基于混合培养和条件优化促进嗜盐菌中四氢嘧啶的合成及转化[J]. *微生物学报*, 2025, 65(12): 5524-5539.
- Tian X, Dong MY, Qin R, Long QF, Han R, Zhu DR, Li YZ. Mixed culture and condition optimization promote ectoine synthesis and transformation in halophilic bacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(12): 5524-5539 (in Chinese).
- [19] Krohn-Molt I, Wemheuer B, Alawi M, Poehlein A, Güllert S, Schmeisser C, Pommerening-Röser A, Grundhoff A, Daniel R, Hanelt D, Streit WR. Metagenome survey of a multispecies and alga-associated biofilm revealed key elements of bacterial-algal interactions in photobioreactors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(20): 6196-6206.
- [20] 连子如. 不同浓度碳源下海洋异养细菌和微藻对磷酸盐的竞争吸收研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- Lian ZR. Competition and uptake between heterotrophic bacteria and algae for phosphate[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009 (in Chinese).
- [21] Zeng WD, Ma SY, Huang Y, Xia A, Zhu XQ, Zhu X, Liao Q. Bifunctional lighting/supporting substrate for microalgal photosynthetic biofilm to bio-remove ammonia nitrogen from high turbidity wastewater[J]. *Water Research*, 2022, 223: 119041.
- [22] Koksharova OA, Safronov NA. The effects of secondary bacterial metabolites on photosynthesis in microalgal cells[J]. *Biophysical Reviews*, 2022, 14(4): 843-856.
- [23] Yang QC, Chen LN, Hu XL, Zhao L, Yin PH, Li Q. Toxic effect of a marine bacterium on aquatic organisms and its algicidal substances against *Phaeocystis globosa*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0114933.
- [24] Lee SO, Kato J, Takiguchi N, Kuroda A, Ikeda T, Mitsutani A, Ohtake H. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(10): 4334-4339.
- [25] Zhang B, Li W, Guo Y, Zhang ZQ, Shi WX, Cui FY, Lens PNL, Tay JH. Microalgal-bacterial consortia: from interspecies interactions to biotechnological applications[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2020, 118: 109563.
- [26] Villa JA, Ray EE, Barney BM. *Azotobacter vinelandii* siderophore can provide nitrogen to support the culture of the green algae *Neochloris oleoabundans* and *Scenedesmus* sp. BA032[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 351(1): 70-77.
- [27] Ono H, Sawada K, Khunajakr N, Tao T, Yamamoto M, Hiramoto M, Shinmyo A, Takano M, Murooka Y. Characterization of biosynthetic enzymes for ectoine as a compatible solute in a moderately halophilic *Eubacterium*, *Halomonas elongata*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 91-99.
- [28] Becker J, Wittmann C. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Metabolic Engineering: Concepts and Applications*, 2021, 13: 403-468.
- [29] Chen YP, Liu YJ, Meng Y, Jiang YT, Xiong WN, Wang SF, Yang C, Liu RH. Elucidating the salt-tolerant mechanism of *Halomonas cupida* J9 and unsterile ectoine production from lignocellulosic biomass[J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23: 237.
- [30] Johnson SM, Cummins I, Lim FL, Slabas AR, Knight MR. Transcriptomic analysis comparing stay-green and senescent *Sorghum bicolor* lines identifies a role for proline biosynthesis in the stay-green trait[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(22): 7061-7073.
- [31] Krysenko S, Wohlleben W. Role of carbon, nitrogen, phosphate and sulfur metabolism in secondary metabolism precursor supply in *Streptomyces* spp.[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(8): 1571.
- [32] Guzmán H, van Thuoc D, Martín J, Hatti Kaul R, Quillaguamán J. A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(6): 1069-1077.
- [33] Shu ZW, Zhang X, Wang R, Xing JW, Li YZ, Zhu DR, Shen GP. Metabolic engineering of *Halomonas campaniensis* strain XH26 to remove competing pathways to enhance ectoine production[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 9732.
- [34] Yu JX, Wang ZJ, Wang J, Mohsin A, Liu H, Zhang Y, Zhuang YP, Guo MJ. Physiological metabolic topology analysis of *Halomonas elongata* DSM 2581^T in response to sodium chloride stress[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(12): 3509-3525.
- [35] Dawes EA. Carbon Metabolism[M]. Boca Raton: CRC Press, 2017: 1-38.
- [36] Bridson EY, Brecker A. Chapter III design and formulation of microbial culture media[M]//Methods in Microbiology. Amsterdam: Elsevier, 1970: 229-295.
- [37] Calderón MI, Vargas C, Rojo 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[J]. *Microbiology*, 2004, 150(9): 3051-3063.