



细菌响应过量活性氧的存活策略及相关研究进展

张玲娜¹ 董丽² 廖红梅^{*1}

1 江南大学食品学院 江苏 无锡 214122

2 中国农业大学食品科学与营养工程学院 北京 100083

摘要: 活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)是指基态氧分子获取电子后形成的一类具有高反应活性的物质。有氧呼吸电子传递链产生的内源 ROS 能维持细菌正常生理活性, 而由消毒、抗生素和物理场等处理产生的外源 ROS 会随着处理时间和强度增加而累积产生。过量 ROS 会给细菌带来氧化压力, 导致氧化损伤, 甚至影响其活性。本文综述了过量 ROS 诱导细菌氧化应激反应并以非芽胞状态存活, 阐述过量 ROS 与特殊状态的形成、复苏或修复甚至死亡过程的关联性, 以期有效控制腐败菌和致病菌的技术创新提供理论基础。

关键词: 细菌, 活性氧, 氧化损伤, 存活策略

Survival strategies of bacteria in response to excessive reactive oxygen species: a review

ZHANG Lingna¹ DONG Li² LIAO Hongmei^{*1}

1 School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: Reactive oxygen species (ROS) refers to a category of highly reactive substances formed by ground-state oxygen molecules acquiring electrons. ROS can be generated by aerobic respiration electron transport chain that helps maintain normal physiological activity of bacteria. Lots of exogenous ROS are generated and accumulated during cleaning and disinfection, medical treatment, etc. Excessive ROS would bring oxidative stress, lead to oxidative damage, and even affect activities of bacteria. In this review, we analyze the oxidative stress response induced by excessive ROS, the correlation between excessive ROS and the formation, recovery or repair of special non-spore status of bacteria, and even leading to their death, to provide reference for the innovation of effective control of spoilage and pathogenic bacteria.

Keywords: bacteria, reactive oxygen species, oxidative stress, survival strategy

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31471714, 31101360)

***Corresponding authors:** Tel: 86-510-85912875; E-mail: hmeiliao@jiangnan.edu.cn

Received: 22-06-2020; **Accepted:** 21-08-2020; **Published online:** 09-11-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31471714, 31101360)

***通信作者:** Tel: 0510-85912875; E-mail: hmeiliao@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-06-22; **接受日期:** 2020-08-21; **网络首发日期:** 2020-11-09

活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)是基态氧分子获取电子形成的一类具有高反应活性的物质,包括氧自由基和部分非自由基物质。其中,氧自由基主要有超氧阴离子(O_2^-)、羟基自由基($\cdot OH$)、氢过氧自由基($HO_2\cdot$)等,非自由基类 ROS 有过氧化氢(H_2O_2)、单态氧(1O_2)、次氯酸($HOCl$)等^[1]。

ROS 对细菌的影响较复杂。细菌的抗氧化系统可应对少量 ROS,但过量外源 ROS 作用于细胞膜甚至进入胞内会影响其活性。正常生理过程会产生少量 ROS,是代谢、生理调节必不可少的^[1-2]。初期,少量 ROS 能在细菌中作为信息分子,通过氧化修饰、激活蛋白质与 DNA 结合以及基因的转录,增加细菌的抗逆能力或维持生长繁殖等生理活动,例如修饰氧化参与细胞分裂、转录调节功能的硫氧还蛋白^[3-4]。过量外源性 ROS 会带来氧化压力,造成氧化损伤,例如大肠埃希菌(*Escherichia coli*)胞内 H_2O_2 浓度始终保持在小于 100 nmol/L,但当其胞内浓度大于 1 $\mu mol/L$ 时则有毒性^[5-6]。细菌为了存活会产生氧化应激反应,可能会通过改变存在状态,进入休眠或半休眠状态存活,若仍无法应对则死亡。

本文主要围绕 ROS 对细菌产生的氧化压力及其影响,综述氧化应激反应与持留菌(Persister)、活的非可培养状态(Viable but Non-Culturable, VBNC)细菌、L 型(L Form)细菌和生物膜(Biofilm)等非芽孢特殊状态的形成、修复或复苏及死亡的相关性,以期对相关研究提供参考。

1 ROS 及其对细菌的氧化压力

1.1 ROS 来源及途径

细菌中 ROS 来源有 2 种:经有氧呼吸电子传递链产生的内源 ROS;由消毒、抗生素和物理场处理等产生的外源 ROS,如图 1 所示。内源 ROS 主要来源于有氧呼吸中电子传递链,形成途径为:氧气自由扩散进入胞内,由单个电子供体提供电子形成 O_2^- , O_2^- 在超氧化物歧化酶(SOD)等作用下形成 H_2O_2 ,随后与金属离子例如 Fe^{2+} 发生芬顿反应

形成 $\cdot OH$ ^[1]。外源 ROS 经消毒剂、抗生素和物理场处理产生,与医药处理、清洁消毒和食品杀菌等紧密关联,主要产生方式为:添加 H_2O_2 、次氯酸等氧化消毒剂,并通过芬顿反应形成 $\cdot OH$ ^[7-8];添加能诱导 ROS 形成的抗生素,例如妥布霉素^[9];超声波、电离辐射等物理场作用能裂解水产生 $\cdot OH$ 、 O_2^- 、 H_2O_2 和 $H\cdot$ ^[10-11]。

对细菌有影响的主要 ROS 有 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 。在大肠埃希菌中 O_2^- 平衡态浓度约为 0.1 nmol/L^[6]。中性条件下, O_2^- 难透过细胞膜;酸性条件下可形成 HO_2^- ,不带电荷且能透过细胞膜,其渗透系数为 9×10^{-4} cm/s,略低于水的渗透系数 3×10^{-3} cm/s,远高于阴离子渗透系数^[12]。 O_2^- 可迅速氧化脱氢酶家族中含铁硫簇的酶并使酶失活,例如在大肠埃希菌中 O_2^- 与含铁硫簇的酶的二级反应速率为 10^6-10^7 L/(mol·s),可将 $[4Fe-4S]^{2+}$ 降解为 $[3Fe-4S]^+$,并产生 H_2O_2 或水,该酶的失活会抑制三羧酸循环和氨基酸的生物合成^[11-12]。但 O_2^- 半衰期短,歧化反应速率约为 5×10^5 L/(mol·s),在 SOD 作用下,两分子 O_2^- 与一分子 H^+ 反应并立刻转化成 H_2O_2 和 O_2 ^[14]。

H_2O_2 渗透系数为 1.6×10^{-3} cm/s,近似于水,能自由扩散进入胞内^[12]。胞内 H_2O_2 浓度高于一定程度后, H_2O_2 会氧化能接触到的铁硫簇,例如脱氢酶,将 $[4Fe-4S]^{2+}$ 降解为 $[3Fe-4S]^+$,不产生游离 $\cdot OH$,在大肠埃希菌中反应速率约为 10^3 L/(mol·s); H_2O_2 能氧化单核亚铁酶的亚铁离子,使酶失活,影响其参与的代谢途径如戊糖磷酸途径^[11,15-16]。此外, H_2O_2 可通过芬顿反应形成高活性 $\cdot OH$ 。

$\cdot OH$ 几乎能与胞内所有分子反应,反应速率快,可达 10^8-10^{10} L/(mol·s),其化学反应时间小于 1 s,生化反应时间为 1-10 s^[17]。 $\cdot OH$ 与细胞膜上饱和脂肪酸反应引起脂质过氧化,使细胞膜性质发生改变;其氧化产物如醛类物质会损伤蛋白质和 DNA,与 DNA 形成环外 DNA 加合物,例如与脱氧鸟苷缩合形成 α -羟基丙氨酸脱氧鸟苷和 γ -羟基

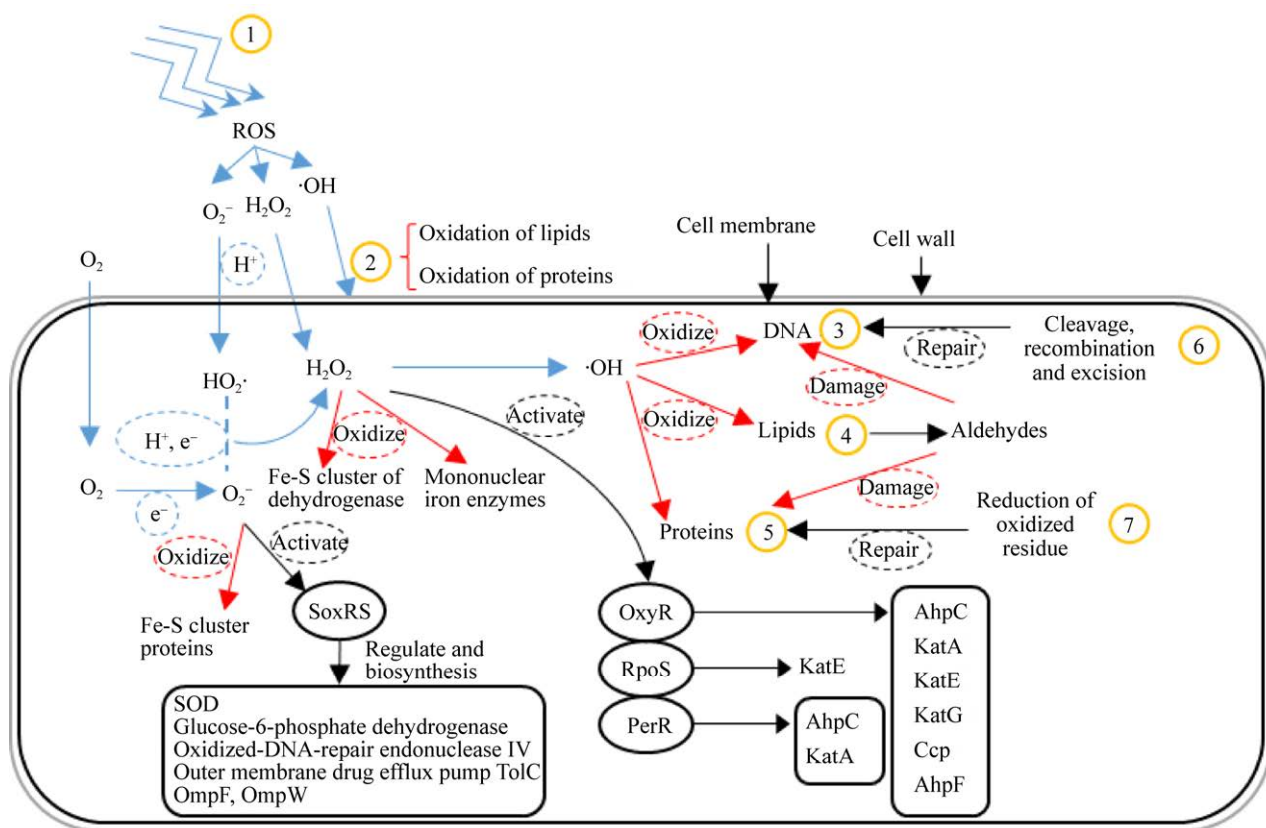


图 1 细菌中主要 ROS 的来源、分布、转化途径、危害以及激活的氧化应激反应

Figure 1 The source, distribution, transformation pathway, harm induced by ROS in bacteria and their oxidative stress response

注: ① 食品加工、医药消毒和处理等措施能产生外源 ROS; ② $\cdot\text{OH}$ 不能透过细胞膜, 但能氧化细胞膜和外膜的脂质和蛋白质; ③ 胞内 H_2O_2 通过芬顿反应形成 $\cdot\text{OH}$, 氧化 DNA; ④ 氧化脂质, 主要氧化不饱和脂肪酸形成醛类物质; ⑤ 氧化蛋白质, 主要氧化含硫、半胱和蛋氨酸; ⑥ ROS 氧化碱基, 造成 DNA 链交联以及断裂。细菌通过切割、剪切重组的方式进行修复, 主要修复酶有甲酰胺基 DNA 糖基化酶、核酸内切酶 IV 和内切核酸酶 VIII; ⑦ ROS 氧化蛋白质。细菌通过硫氧还蛋白、谷氧还蛋白和甲硫氨酸亚砷还原酶还原被氧化氨基酸

Note: ① Exogenous ROS produced by food processing, medical disinfection and treatment, etc.; ② $\cdot\text{OH}$ cannot penetrate membrane, but would oxidize lipids and proteins on inner/outer membrane; ③ Intracellular H_2O_2 translates into $\cdot\text{OH}$ by Fenton reaction, which oxidizes DNA; ④ $\cdot\text{OH}$ oxidizes lipids, mainly oxidizes unsaturated fatty acids to form aldehydes; ⑤ $\cdot\text{OH}$ oxidizes proteins, including sulfur-containing, cysteine and methionine. ⑥ ROS oxidizes nucleobases causing DNA chain crosslinking and breaking. Bacteria repairs them by cutting and recombination with repair enzymes such as foramide DNA glycosylase, endonuclease IV and endonuclease VIII etc.; ⑦ ROS oxidizes proteins. Bacteria repairs oxidized amino acids mainly by thioredoxin, glutaredoxin and methionine sulfoxide reductase

丙氨酸脱氧鸟苷, 前者能阻断 DNA 复制, 并可能导致碱基 G 突变成 A 或 T, 后者会造成 DNA 链内和链间交联^[18-19]。需注意, 胞外的 $\cdot\text{OH}$ 和 O_2^- 由于带电荷而难以进入胞内^[20]。

1.2 ROS 对细菌的氧化压力

ROS 过量或抗氧化能力降低, 超过了细菌调

节能力, 导致氧化还原失衡, 会形成氧化压力^[1,21]。ROS 氧化含巯基的氨基酸例如硫氨基酸半胱氨酸和蛋氨酸, 以及造成不可逆的蛋白质的羰基化^[22-24]。ROS 氧化不饱和脂肪酸形成丙二醛等醛基化合物, 损伤蛋白质以及 DNA^[18-19]。ROS 氧化碱基例如氧化鸟嘌呤形成 8-氧-7-氢脱氧鸟嘌呤,

插入到 DNA 链中,变为与腺嘌呤配对,·OH 能高度氧化 DNA,造成 DNA 链的断裂、DNA 位点突变和双链畸变^[25]。

细菌主动采取多种氧化应激措施应对氧化压力,例如激活调节子上调抗氧化酶合成和去掉受损生物大分子等^[26]。DNA、脂质和蛋白质损伤,细菌有不同的修复方法:启动核苷酸切除、错配修复和 DNA 双链断裂等机制,保护基因组稳定性^[23,27];通过各种氧化还原酶例如硫氧还蛋白(Trxs)和谷氧还蛋白(Grxs)等修复巯基的氧化^[22-24]。但目前未找到脂质过氧化相关修复机制。

1.3 氧化应激反应相关调节子

参与氧化应激反应的调节子主要有 OxyR、SoxRS、RpoS 和 PerR 等(图 1)。OxyR 氧化应激方式为:直接清除 H₂O₂ 和过氧化物等,相关基因有 *katG*、*ahpC*、*ahpF*、*yhjA* 及 *hemF*;调控并稳定胞内氧化还原电位,相关基因有 *grx*、*gor*、*trxC* 及 *dsbG*^[28]。胞内 H₂O₂ 浓度达到 200 nmol/L 时就能激活 OxyR^[5]。OxyR 能感知 H₂O₂ 和有机过氧化物,激活转录,控制烷基过氧化氢还原酶(AhpCF)、过氧化氢酶 G 和周质细胞色素 c 过氧化物酶(无氧分子可用时利用 H₂O₂ 支持呼吸作用)的合成^[29-30]。PerR 能调节 H₂O₂ 造成的氧化压力,在 H₂O₂ 作用或铁、锰离子缺乏时,PerR 会上调抗氧化酶如过氧化氢酶 A 和 AhpCF,清除 H₂O₂ 和烷基氢过氧化物^[31]。SoxRS 主要调节 O₂⁻造成的氧化压力,调节过程由 SoxR 和 SoxS 两个调节子介导,SoxR 能激活全局调节子 SoxS 的转录以及目标基因如多药外排泵、转运蛋白、单氧酶和氧化还原酶的表达;SoxS 激活多种基因的转录,调节含锰 SOD、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、DNA 修复核酸内切酶 IV、药物外排泵、外膜蛋白 F 和外膜蛋白 W 等基因的表达^[32-33]。

此外,细菌中还存在着一些应激因子,可以调控氧化应激反应。例如,压力应激因子 RpoS 是 RNA 聚合酶的一种 σ 因子,其能识别转录起始位

置,使 RNA 聚合酶结合在启动子上,启动转录,再延伸 RNA 链^[34]。稳定期细菌通过 RpoS 应对营养不足、活性氧、极端温度和 pH 等压力^[35]。在环境压力下,RpoS 被激活,调控基因 *katE* 和 *xthA* (合成核酸外切酶 III)的表达^[36]。IscR 是一种铁硫簇传感器,能感知氧化压力和铁硫簇情况^[37]。

1.4 细菌氧化损伤严重死亡

若氧化应激反应无法解决外源过量 ROS,则 ROS 会与细菌内的脂质、DNA 和蛋白质等反应,造成脂质过氧化、酶金属中心氧化和基因突变等氧化损伤,严重时甚至会导致细菌死亡^[22]。

光敏剂介导的光动力技术处理大肠埃希菌产生大量 ROS,而且脂质过氧化、SOD、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽和谷胱甘肽巯基转移酶水平显著升高,膜损伤严重,最终导致细菌死亡^[38]。有研究表明抗生素杀菌会产生 ROS,处理大肠埃希菌时会引起铁硫簇失稳,通过芬顿反应形成·OH 来杀菌^[39]。超声波或与其与热、高压等联合处理杀菌机制是超声波处理产生空穴效应,进而产生自由基(·OH 和 H·等)达到杀菌目的^[10]。含氯消毒剂如 HOCl 通过损伤 DNA 达到消毒目的^[8]。紫外线如波长为 320–400 nm 的 UVA 通过诱导氧化应激,导致蛋白质损伤、生长延迟和能量代谢减少来破坏细胞^[40]。需要注意的是,这些报道中的研究对象为革兰氏阴性菌,因此外膜的存在与否可能与 ROS 杀菌作用有关。

然而也有学者提出卡那霉素或氨基青霉素等抗生素对大肠埃希菌的杀菌与 ROS 无关,因为处理中 H₂O₂ 和胞内游离铁并未增加^[41]。有或无氧条件下用诺氟沙星处理大肠埃希菌其存活率无差异,表明死亡率与 ROS 水平不相关^[42]。

总之,细菌体内 ROS 主要是经有氧呼吸电子传递链产生和医药处理、清洁消毒和食品杀菌等处理引入,内源 ROS 能参与代谢和生理调节,过量的外源 ROS 会带来氧化压力,造成氧化损伤,严重时甚至会使细菌死亡。为了应对氧化压力,细菌

主动采取了多种氧化应激措施,激活氧化应激调节子, 去除 ROS 并修复氧化损伤。

2 细菌氧化应激反应及其所处状态

部分革兰氏阳性菌能通过形成芽胞抵御外界不良条件, 但在一些情况下细菌(以革兰氏阴性细菌为主)也会通过形成非芽胞方式存活^[43-44]。如图 2 所示,在氧化压力作用下细菌能以不同状态存活, 主要包括 VBNC 态、持留菌、L 型细菌和生物膜。

2.1 ROS 与持留菌的形成和复苏

持留菌是一类高度耐受抗生素的细菌,可在含致死剂量抗生素的环境下存活,但停止抗生素处理后能恢复生长繁殖^[45]。有研究表明持留菌的形成与氧化压力有关。例如,胆汁处理鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)后会诱导持留菌的形成,

该处理产生 ROS^[46]。此外, 研究报道水杨酸处理产生的 ROS 诱导大肠埃希菌持留菌形成, 该过程与膜电位降低和代谢水平减弱有关^[45]。

ROS 诱导持留菌形成的机制研究已有进展。研究表明氧化压力可能导致大肠埃希菌 DNA 损伤, 细菌启动 SOS 机制修复 DNA 损伤, 同时激活毒素和抗毒素机制, 从而诱导持留菌形成^[47-48]。ROS 激活 SoxRS, 上调多种药物耐药外排泵的表达, 药物外排泵能降低抗生素浓度, 使大肠埃希菌呈现耐受性的表型^[32,48]。饥饿诱导铜绿假单胞菌形成持留菌, 因为饥饿信号(p)ppGpp 激活 RpoS 应激因子, 从而增加抗氧化酶的产生, 抵御氧化压力, 因此持留菌的形成与 RpoS 应激因子有关^[49]。以上表明, ROS 损伤 DNA, 但可通过启动 SOS 反应和激活 SoxRS 和 RpoS 来维持细胞活性, 以持留菌的形态存活。

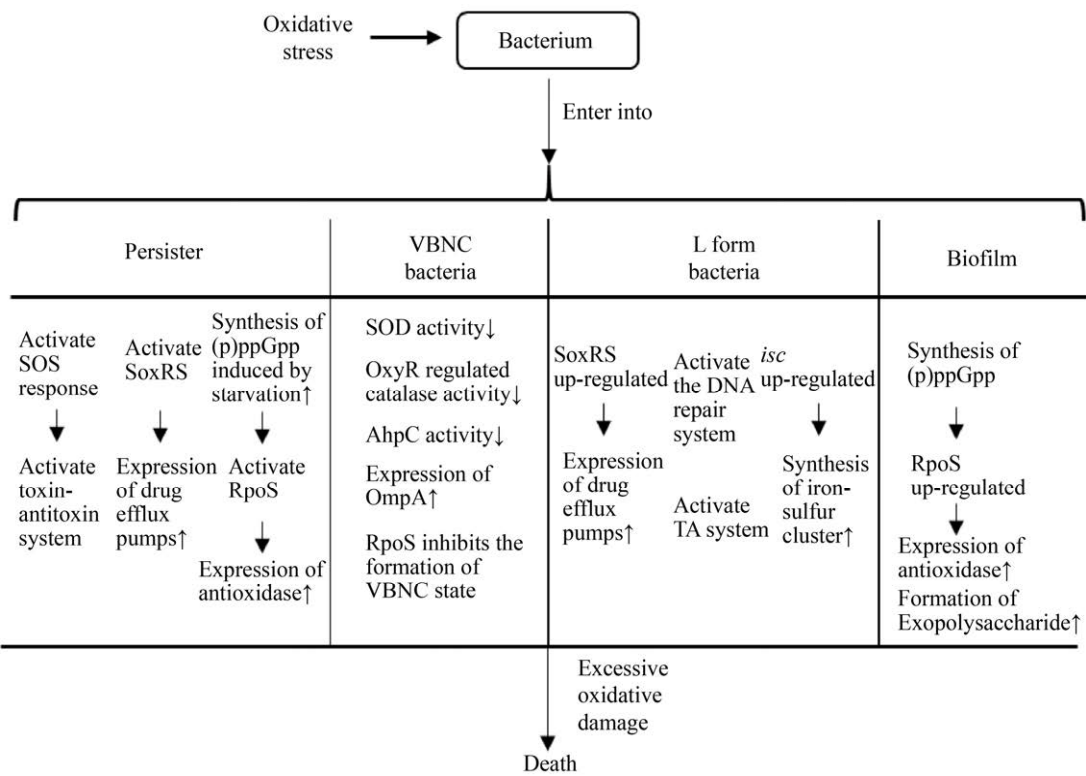


图 2 细菌的不同存在状态与氧化应激反应之间的关系
Figure 2 Relationship between different states of bacteria and oxidative stress response

除停止抗生素作用外,持留菌也可在其他特定条件下复苏。已有研究表明抗氧化酶 AhpF 和外膜蛋白 F 可促进持留菌复苏: DNA 损伤后激活 SOS 反应能产生膜去极化毒素(TisB),该毒素能诱导大肠埃希菌进入持留状态,而 AhpF 和外膜蛋白 F 能特异性地促进该持留菌的复苏^[50]。表明持留菌的复苏也与氧化应激水平有关联。

然而过量积累 ROS 会导致持留菌死亡。研究发现谷氨酸钠和抗生素如利福平的协同会加速三羧酸循环,增加 ROS 的产生,从而降低细菌对抗生素的耐受性^[51]。此外,等离子体预处理能恢复持留菌的敏感性,可以推测预处理产生的 ROS 对细菌耐药性有影响^[52]。

综上所述,氧化应激反应中的 SoxRS 系统、DNA 损伤引起的 SOS 反应和 RpoS 应激因子参与诱导持留菌的形成,AhpF 可促进持留菌复苏,但氧化压力超过耐受程度会使细菌进入更深层的休眠状态甚至死亡。

2.2 ROS 与细菌 VBNC 状态的形成和复苏

2.2.1 VBNC 态细菌的形成以及与氧化应激的关系

VBNC 状态是指微生物在不利环境中失去繁殖能力,但合适条件下可复苏并恢复可培养性的一种特殊休眠状态^[53]。细菌处于 VBNC 状态时会发生体积缩小、杆状变成球状等现象,细胞壁和细胞膜组成也发生改变,而且该状态下细菌细胞指数期细胞具有极低的代谢活性^[54-55]。有研究认为 VBNC 态是处于较持留菌更深的休眠状态,但二者并非同一状态^[56]。

多种方式都能诱导细菌进入 VBNC 态,大多数都与氧化压力相关,包括氧浓度波动、重金属、食品防腐剂和紫外线处理等^[57-58]。前期研究发现,热辅助超声波处理会导致沙门菌部分进入 VBNC 态;经检测在热辅助超声波处理中主要产生·OH、烷基自由基和氢质子等自由基,进一步分析发现自由基强度与沙门菌 VBNC 态形成率高度相关并遵循特定规律;此外,加入常见自由基清除剂丙酮酸钠可降低 VBNC 态形成率,因而从正反两方面证

明 ROS 与 VBNC 态形成相关联^[10,59]。这也是在本领域首次将外部环境产生 ROS 与细菌 VBNC 态形成之间建立定量关系。此外,本课题组发现经 H₂O₂ 处理后诱导沙门菌进入 VBNC 态,其 CAT、SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶完全被钝化,而且 H₂O₂ 处理中自由基强度与 VBNC 态形成率呈正相关^[60]。以上结果表明 VBNC 态的形成与 ROS 施加的氧化压力有关。

氧化压力是细菌形成 VBNC 状态的一个重要因素。VBNC 态细菌的形成机制与氧化压力、RpoS 调节因子以及外膜蛋白相关,细菌可培养性的丧失可能与氧化压力下蛋白羰基化和抗氧化酶表达下降有关^[56-57]。研究表明低温抑制 OxyR 介导的 CAT 酶活会导致 VBNC 态形成^[61-62],并且 CAT 和 SOD 缺乏都会导致金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)进入 VBNC 态^[63]。烷基氢过氧化物还原酶亚基 C (AhpC)具有抗氧化作用,而且与细菌可培养性相关^[64]。能调控抗氧化酶合成的 RpoS 抑制细菌 VBNC 态的诱导^[65],但研究发现,处于 VBNC 状态的阪崎肠杆菌中 *rpoS*、*ompA* 和 *hfq* 基因表达量增多^[66]。因此 RpoS 抑制 VBNC 态形成,但 VBNC 态菌可能在保持活性时仍需要 RpoS 的存在。

2.2.2 VBNC 态细菌的复苏与氧化应激的关系

在适当条件下,VBNC 态菌会复苏且恢复繁殖能力。多项研究表明 CAT 或其他 ROS 清除剂如丙酮酸钠可提高大肠埃希菌和创伤弧菌的可培养性^[67-68]。例如,研究表明 H₂O₂ 诱导的 VBNC 态沙门菌在含丙酮酸钠的培养基中能复苏^[69];通过添加过氧化氢酶也能使 VBNC 态短乳杆菌复苏^[70],表明降低或消除氧化压力会促进 VBNC 态细菌复苏。

2.3 ROS 对 L 型细菌形成的影响

L 型细菌是指无肽聚糖层和缺失细胞壁的特殊状态,是细菌在像抗生素、抗菌因子以及某些理化条件如等离子体处理等不利条件下形成的一种生存状态^[71]。

已有研究表明 L 型细菌的形成与 ROS 有关。

例如, L 型枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)的形成受到 ROS 的影响, 而且 ROS 清除剂可促进 L 型枯草芽胞杆菌和大肠埃希菌生长^[72]; 等离子体处理大肠埃希菌会产生 ROS, 同时诱导形成 L 型^[73], L 型细菌会调节氧化应激反应得以生存, 包括 DNA 修复途径、毒素-抗毒素模块、药物外排系统以及 *isc* 基因, 其中, *isc* 基因控制铁硫簇合成, 抑制芬顿反应^[74]; 此外, 部分 L 型细菌的形成可逆, 当去除应激后 L 型细菌能重新合成细胞壁并恢复正常, 而且革兰氏阴性菌可能更易发生 L 型逆转^[75]。可见外源性过量 ROS 会引起氧化应激反应, 细菌则形成 L 型从而存活, 去除应激条件后能恢复正常形态, 但依然需要更多的证据来佐证 ROS 参与诱导 L 型的机制。

2.4 ROS 对生物膜形成的影响

逆境下细菌会附着于环境表面, 通过分泌蛋白、脂多糖以及核酸等物质形成生物膜^[76]。生物膜是细菌生存的一种普遍状态, 能保护细菌免受外来刺激, 赋予细菌抗性, 而且大部分生物膜中含有较大比例的滞留菌^[9]。

已有研究表明生物膜的形成与 ROS 有关, 但形成生物膜能抵御氧化压力。有研究表明, 烟气中所含 ROS 或用 H_2O_2 处理细菌会导致金黄色葡萄球菌形成生物膜, 烟气和 H_2O_2 会导致生物膜形成的相关基因在转录水平表达上调, 而且清除 ROS 不利于生物膜形成^[77]。然而也有研究表明 ROS 不利于形成生物膜, 将单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)的 *sod* 基因敲除后, 发现生物膜形成受到阻碍, 而且形成了更多的 ROS, 表明 SOD 作为一种抗氧化酶有助于生物膜的形成^[78]。还有研究表明 ROS 是单增李斯特菌生物膜形成中的潜在信号分子, 通过使用氧化酶抑制剂和 ROS 清除剂抑制 ROS, 发现 ROS 的减少促进了生物膜形成^[79]。此外, 外源性 ROS 过量也会导致表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)生物膜失去活性, 而添加抗氧化剂能起保护作用^[80]。因此, 外源氧

化压力有助于生物膜形成, 但清除正常菌株内源性 ROS 或敲除抗氧化基因会抑制生物膜的形成, 可能与内源性 ROS 参与正常细菌生理活动有关, 但 ROS 过量也不利于形成生物膜。

另外, RpoS 也与细菌生物膜的形成有关。RpoS 能调控氧化应激反应, 并且有助于胞外多糖 *psl* 基因的表达, 而胞外多糖是生物膜组成成分之一^[36,80]。

3 结论与展望

ROS 可作为信号分子参与细菌生理活性的调节, 但过量 ROS 会带来氧化压力甚至氧化损伤, 迫使细菌形成滞留菌、VBNC 状态、L 型和生物膜等得以存活, 该过程中细菌调动氧化应激反应进行调节, 如启动 SoxRS、OxyR 和 RpoS 等调节子。当氧化压力超过氧化应激水平时则可导致细菌死亡。在医药处理、清洗消杀、加工处理等过程中不可避免会产生 ROS, 从控制有害细菌的角度来看其存在是一把“双刃剑”: 一方面可利用其氧化压力甚至氧化损伤达到有效控制/杀灭有害细菌的目的; 另一方面使得细菌以特殊休眠体等状态得以存活并“巧妙”规避检测, 这不利于确保医药处理的有效性和食品安全。

目前, 一般是通过检测菌落形成情况来判断致病菌或腐败菌的存在, 这并不适合一些特殊休眠状态, 因而需要快速、有效、直接的定量检测方法。此外, 无论从科研角度还是从医药消杀、食品安全的监管层面, 对细菌特殊生存状态的重视程度较低, 而且其深层次形成机理的研究较少, 今后应充分考虑和检测细菌特殊生存状态的存在及其影响, 深入研究相关形成机制, 系统分析处理中产生的 ROS 并进行安全评估, 以达到有效控制有害细菌, 尤其是控制/杀灭致病菌和腐败菌的目的。

REFERENCES

- [1] Wang JB. Ohr protects *Corynebacterium glutamicum* against organic hydroperoxide induced oxidative stress[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2015 (in Chinese)

- 王建波. 谷氨酸棒状杆菌中 Ohr 抗有机氧化物胁迫的功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2015
- [2] Zheng M, Åslund F, Storz G. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation[J]. *Science*, 1998, 279(5357): 1718-1722
- [3] Kumar JK, Tabor S, Richardson CC. Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(11): 3759-3764
- [4] D'Autr aux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(10): 813-824
- [5] Seaver LC, Imlay JA. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(24): 7182-7189
- [6] Imlay JA, Fridovich I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(11): 6957-6965
- [7] Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, 51(4): 271-276
- [8] Dukan S, Touati D. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(21): 6145-6150
- [9] Van Acker H, Sass A, Bazzini S, De Roy K, Udine C, Messiaen T, Riccardi G, Boon N, Nelis HJ, Mahenthiralingam E, et al. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58943
- [10] Liao HM, Zhang RR, Zhong K, Ma Y, Nie XY, Liu YF. Induction of a viable but non-culturable state in *Salmonella* Typhimurium is correlated with free radicals generated by thermosonication[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 286: 90-97
- [11] Qi HZ, Wang WZ, He JY, Ma Y, Xiao FZ, He SY. Antioxidative system of *Deinococcus radiodurans*[J]. *Research in Microbiology*, 2020, 171(2): 45-54
- [12] Korshunov SS, Imlay JA. A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(1): 95-106
- [13] Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(30): 22369-22376
- [14] Pereira AS, Tavares P, Folgosa F, Almeida RM, Moura I, Moura JGG. Superoxide reductases[J]. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2007, 2007(18): 2569-2581
- [15] Anjem A, Imlay JA. Mononuclear iron enzymes are primary targets of hydrogen peroxide stress[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(19): 15544-15556
- [16] Jang S, Imlay JA. Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(2): 929-937
- [17] Xue XH. Study on managing the invasive spread of oceanic organism by advanced oxidation technology[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian Maritime University, 2006 (in Chinese)
薛晓红. 先进氧化技术防治海洋生物入侵性传播的研究[D]. 大连: 大连海事大学硕士学位论文, 2006
- [18] Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 97: 55-74
- [19] Singh V, Fedeles BI, Li DY, Delaney JC, Kozekov ID, Kozekova A, Marnett LJ, Rizzo CJ, Essigmann JM. Mechanism of repair of acrolein- and malondialdehyde-derived exocyclic guanine adducts by the α -ketoglutarate/Fe(II) dioxygenase AlkB[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2014, 27(9): 1619-1631
- [20] Ravichandran K, Snega S, Begum NJ, Swaminathan K, Sakthivel B, Christena LR, Chandramohan G, Ochiai S. Enhancement in the antibacterial efficiency of ZnO nanopowders by tuning the shape of the nanograins through fluorine doping[J]. *Superlattices and Microstructures*, 2014, 69: 17-28
- [21] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39(1): 44-84
- [22] Ezraty B, Gennaris A, Barras F, Collet JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(7): 385-396
- [23] Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(7): 443-454
- [24] Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence[J]. *The EMBO Journal*, 2005, 24(7): 1311-1317
- [25] Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1998, 400(1/2): 99-115
- [26] Fu HH, Yuan J, Gao HC. Microbial oxidative stress response: novel insights from environmental facultative

- anaerobic bacteria[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2015, 584: 28-35
- [27] Demple B, Johnson A, Fung D. Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(20): 7731-7735
- [28] Wang BW, Shi QS, Ouyang YS, Chen YB. Progress in *oxyR* regulon-the bacterial antioxidant defense system: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(11): 1556-1561 (in Chinese)
汪保卫, 施庆珊, 欧阳友生, 陈仪本. 细菌抗氧化系统-*oxyR* 调节子研究进展[J]. 微生物学报, 2008, 48(11): 1556-1561
- [29] Michán C, Manchado M, Dorado G, Pueyo C. *In vivo* transcription of the *Escherichia coli oxyR* regulon as a function of growth phase and in response to oxidative stress[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(9): 2759-2764
- [30] Khademian M, Imlay JA. *Escherichia coli* cytochrome c peroxidase is a respiratory oxidase that enables the use of hydrogen peroxide as a terminal electron acceptor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(33): E6922-E6931
- [31] Bsat N, Chen L, Helmann JD. Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(22): 6579-6586
- [32] Kobayashi K. Sensing mechanisms in the redox-regulated, [2Fe-2S] cluster-containing, bacterial transcriptional factor SoxR[J]. Accounts of Chemical Research, 2017, 50(7): 1672-1678
- [33] Palma M, Zurita J, Ferreras JA, Worgall S, Larone DH, Shi L, Campagne F, Quadri LEN. *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(5): 2958-2966
- [34] Wang SX, Wei JT, Li TB, Yang XS. Research on regulation of protein RpoS expression and its function in bacteria[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(10): 24-31 (in Chinese)
王淑娴, 魏鉴腾, 李天保, 杨秀生. 细菌中 RpoS 蛋白的表达调控及其功能的研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(10): 24-31
- [35] Robinson T, Smith P, Alberts ER, Colussi-Pelaez M, Schuster M. Cooperation and cheating through a secreted aminopeptidase in the *Pseudomonas aeruginosa* RpoS response[J]. mBio, 2020, 11(2): e03090-19
- [36] Barth E, Gora KV, Gebendorfer KM, Settele F, Jakob U, Winter J. Interplay of cellular cAMP levels, σ^S activity and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*[J]. Microbiology, 2009, 155(5): 1680-1689
- [37] Vergnes A, Viala JPM, Ouadah-Tsabet R, Pocachard B, Loiseau L, Méresse S, Barras F, Aussel L. The iron-sulfur cluster sensor IscR is a negative regulator of Spi1 type III secretion system in *Salmonella enterica*[J]. Cellular Microbiology, 2017, 19(4): e12680
- [38] Khan S, Rayis M, Rizvi A, Alam MM, Rizvi M, Naseem I. ROS mediated antibacterial activity of photoilluminated riboflavin: a photodynamic mechanism against nosocomial infections[J]. Toxicology Reports, 2019, 6: 136-142
- [39] Ezraty B, Vergnes A, Banzhaf M, Duverger Y, Huguenot A, Brochado AR, Su SY, Espinosa L, Loiseau L, Py B, et al. Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway[J]. Science, 2013, 340(6140): 1583-1587
- [40] Probst-Rüd S, McNeill K, Ackermann M. Thiouridine residues in tRNAs are responsible for a synergistic effect of UVA and UVB light in photoinactivation of *Escherichia coli*[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(2): 434-442
- [41] Liu YY, Imlay JA. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species[J]. Science, 2013, 339(6124): 1210-1213
- [42] Keren I, Wu YX, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species[J]. Science, 2013, 339(6124): 1213-1216
- [43] Gray DA, Dugar G, Gamba P, Strahl H, Jonker MJ, Hamoen LW. Extreme slow growth as alternative strategy to survive deep starvation in bacteria[J]. Nature Communications, 2019, 10: 890
- [44] Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria[J]. Journal of Microbiology, 2005, 43: 93-100
- [45] Wang TB, El Meouche I, Dunlop MJ. Bacterial persistence induced by salicylate via reactive oxygen species[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 43839
- [46] Walawalkar YD, Vaidya Y, Nayak V. Response of *Salmonella typhi* to bile-generated oxidative stress: implication of quorum sensing and persister cell populations[J]. Pathogens and Disease, 2016, 74(8): ftw090
- [47] Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*[J]. PLoS Biology, 2010, 8(2): e1000317
- [48] Wu YX, Vulić M, Keren I, Lewis K. Role of oxidative stress in persister tolerance[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(9): 4922-4926
- [49] Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS, Folsom JP, Boegli L, James GA. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(7): 3838-3847
- [50] Spanka DT, Konzer A, Edelmann D, Berghoff BA. High-throughput proteomics identifies proteins with

- importance to postantibiotic recovery in depolarized persister cells[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 378
- [51] Huang X, Duan XK, Li J, Niu JJ, Yuan SQ, Wang XY, Lambert N, Li X, Xu JQ, Gong Z, et al. The synergistic effect of exogenous glutamine and rifampicin against *Mycobacterium* persisters[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1625
- [52] Guo L, Xu RB, Zhao YM, Liu DX, Liu ZJ, Wang XH, Chen HL, Kong MG. Gas plasma pre-treatment increases antibiotic sensitivity and persister eradication in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 537
- [53] Pinto D, Santos MA, Chambel L. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2015, 41(1): 61-76
- [54] Kaprelyants AS, Kell DB. Rapid assessment of bacterial viability and vitality by rhodamine 123 and flow cytometry[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, 72(5): 410-422
- [55] Gao H, Zhao Y, Liu CC. VBNC state of pathogenic microorganisms induced by environmental stresses and its potential challenge to food safety assessment[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(1): 169-177 (in Chinese)
高鹤, 赵勇, 刘承初. 致病微生物应对环境胁迫形成的 VBNC 状态及其对风险评估的潜在影响[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(1): 169-177
- [56] Ayrapetyan M, Williams T, Oliver JD. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(20): e00249-18
- [57] Di CC, Hu P, Hu ZL, Chen HR. Research progress of viable but non-culturable state of aquatic bacteria[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2014, 20(6): 1124-1131 (in Chinese)
邸聪聪, 胡平, 胡章立, 陈辉蓉. 细菌活的非可培养 (VBNC) 状态及其机理研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(6): 1124-1131
- [58] Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 258
- [59] Liao HM, Jiang LF, Zhang RR. Induction of a viable but non-culturable state in *Salmonella* Typhimurium by thermosonication and factors affecting resuscitation[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2018, 365(2): fnx249
- [60] Nie XY, Liao HM, Liu YF. Exploration of the formation and mechanism of VBNC state of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during hydrogen peroxide disinfection[J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(7): 67-73 (in Chinese)
聂新颖, 廖红梅, 刘元法. 过氧化氢处理中鼠伤寒沙门氏菌 VBNC 态形成及其机制解析[J]. *食品与机械*, 2019, 35(7): 67-73
- [61] Kong IS, Bates TC, Hülsmann A, Hassan H, Smith BE, Oliver JD. Role of catalase and *oxyR* in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 50(3): 133-142
- [62] Noor R, Murata M, Yamada M. Oxidative Stress as a trigger for growth phase-specific σ^E -dependent cell lysis in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 17(4): 177-187
- [63] Masmoudi S, Denis M, Maalej S. Inactivation of the gene *katA* or *sodA* affects the transient entry into the viable but non-culturable response of *Staphylococcus aureus* in natural seawater at low temperature[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2010, 60(12): 2209-2214
- [64] Wang HW, Chung CH, Ma TY, Wong HC. Roles of alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(12): 3734-3743
- [65] Jameelah M, Dewanti-Hariyadi R, Nurjanah S. Expression of *rpoS*, *ompA* and *hfq* genes of *Cronobacter sakazakii* strain Yrt2a during stress and viable but nonculturable state[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2018, 27(3): 915-920
- [66] Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2012, 56(4): 228-237
- [67] Mizunoe Y, Wai SN, Takade A, Yoshida SI. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H_2O_2 -degrading compounds[J]. *Archives of Microbiology*, 1999, 172(1): 63-67
- [68] Bogosian G, Aardema ND, Bourneuf EV, Morris PJ, O'Neil JP. Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(18): 5070-5075
- [69] Nwoguh CE, Harwood CR, Barer MR. Detection of induced β -galactosidase activity in individual non-culturable cells of pathogenic bacteria by quantitative cytological assay[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 17(3): 545-554
- [70] Liu JY, Deng Y, Soteyome T, Li YY, Su JY, Li L, Li B, Shirliff ME, Xu ZB, Peters BM. Induction and recovery of the viable but nonculturable state of hop-resistance *Lactobacillus brevis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2076
- [71] Andryukov BG, Somova LM, Matosova EV, Lyapun IN. Phenotypic plasticity as a strategy of bacterial resistance and an object of advanced antimicrobial technologies (review)[J]. *Sovremennye Tehnologii v Medicine*, 2019, 11(2): 164-182
- [72] Kawai Y, Mercier R, Wu LJ, Domínguez-Cuevas P, Oshima

- T, Errington J. Cell growth of wall-free L-form bacteria is limited by oxidative damage[J]. *Current Biology*, 2015, 25(12): 1613-1618
- [73] Jiang Y, Qin KQ, Zhang SD, Song WM. Plasma induces formation of bacterial L-forms and change of metabolism[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2007, 24(3): 205-207 (in Chinese)
姜玉, 秦克勤, 张善端, 宋伟民. 等离子体诱导 L 型细菌形成和代谢改变的观察[J]. *中国消毒学杂志*, 2007, 24(3): 205-207
- [74] Glover WA, Yang YQ, Zhang Y. Insights into the molecular basis of L-form formation and survival in *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2009, 4(10): e7316
- [75] Billings G, Ouzounov N, Ursell T, Desmarais SM, Shaevitz J, Gitai Z, Huang KC. *De novo* morphogenesis in L-forms via geometric control of cell growth[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 93(5): 883-896
- [76] Guo L, Zhang C, Chen GW, Wu M, Liu WK, Ding CC, Dong QL, Fan EG, Liu Q. Reactive oxygen species inhibit biofilm formation of *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 127: 183-189
- [77] Kulkarni R, Antala S, Wang A, Amaral FE, Rampersaud R, LaRussa SJ, Planet PJ, Ratner AJ. Cigarette smoke increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation via oxidative stress[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(11): 3804-3811
- [78] Suo YJ, Huang YY, Liu YH, Shi CL, Shi XM. The expression of superoxide dismutase (SOD) and a putative ABC transporter permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e48467
- [79] Brinkman CL, Schmidt-Malan SM, Karau MJ, Greenwood-Quaintance K, Hassett DJ, Mandrekar JN, Patel R. Exposure of bacterial biofilms to electrical current leads to cell death mediated in part by reactive oxygen species[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168595
- [80] Irie Y, Starkey M, Edwards AN, Wozniak DJ, Romeo T, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 78(1): 158-172