

# 沙雷氏菌(*Serratia* sp.) AXJ-M 响应高温胁迫的生理适应性

汪流伟<sup>#</sup>, 王燕林<sup>#</sup>, 惠淑雨, 冯齐齐, 程宓丽菡, 冯瑞, 罗文怡, 李亚婷, 陈瑶瑶, 安雪姣<sup>\*</sup>

江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045

汪流伟, 王燕林, 惠淑雨, 冯齐齐, 程宓丽菡, 冯瑞, 罗文怡, 李亚婷, 陈瑶瑶, 安雪姣. 沙雷氏菌(*Serratia* sp.) AXJ-M 响应高温胁迫的生理适应性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3148-3164.

WANG Liuwei, WANG Yanlin, HUI Shuyu, FENG Qiqi, CHENG Milihan, FENG Rui, LUO Wenyi, LI Yating, CHEN Yaoyao, AN Xuejiao. Physiological adaptation of *Serratia* sp. AXJ-M to high temperature stress[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3148-3164.

**摘要:**【背景】利用微生物法治理造纸废水或被其污染的环境具有重要的现实意义,但是关于微生物在造纸废水高温环境胁迫下的生理补偿适应机制尚缺乏探讨。【目的】以实验室保藏的一株嗜热木质素降解菌 *Serratia* sp. AXJ-M 为对象,开展其对热胁迫的生理响应机制研究。【方法】设计温度胁迫培养实验,采集不同温度下的菌体,测定菌体形态、细胞膜流动性与渗透性、细胞海藻糖含量及抗氧化酶的活性变化。基于 Illumina HiSeq 2000 平台对菌株 AXJ-M 进行 *de novo* 测序分析,用 gene ontology (GO)、clusters of orthologous groups of proteins (COG)、Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)及 non-redundant database (NR)进行基因组基本功能注释。【结果】热胁迫实验表明,菌株 AXJ-M 能够在 50–80 °C 的热胁迫环境中生存,其中 50 °C 是最适生长温度,在高于 70 °C 的热胁迫环境下其生长会被明显抑制。相较于最适温度(50 °C),菌株 AXJ-M 经热胁迫培养后细胞表面粗糙程度增加、细胞膜流动性降低、膜通透性提高、海藻糖含量提高。高温胁迫(80 °C)下与氧化应激有关的一些酶活性显著增加,过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性随着培养时间的延长分别提高 50%–80%、30%–47%、24%–31%。将基因组测序结果与数据库比对并检索,菌株 AXJ-M 含有参与响应热胁迫的相关基因。【结论】热胁迫培养可诱导菌株 AXJ-M 产生耐热性并使菌体形态发生改变,海藻糖含量和抗氧化

资助项目: 江西省主要学科学术和技术带头人培养计划(20212BCJ23010); 江西省自然科学基金(20232BAB205006); 国家自然科学基金(32360030, 42007220)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the Academic and Technical Leader Training Program of Jiangxi Province (20212BCJ23010), the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20232BAB205006) and the National Natural Science Foundation of China (32360030, 42007220).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: axj\_net@163.com

Received: 2023-11-10; Accepted: 2024-01-09; Published online: 2024-02-28

酶活性的升高保护细胞抵抗外界不良环境。菌株全基因组的初步解析, 对研究嗜热菌在高温环境中的分子反应机制奠定了基础。

**关键词:** 嗜热木质素降解菌; 热胁迫; 生理响应; 基因组分析

## Physiological adaptation of *Serratia* sp. AXJ-M to high temperature stress

WANG Liuwei<sup>#</sup>, WANG Yanlin<sup>#</sup>, HUI Shuyu, FENG Qiqi, CHENG Milihan, FENG Rui, LUO Wenyi, LI Yating, CHEN Yaoyao, AN Xuejiao<sup>\*</sup>

College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China

**Abstract:** [Background] The microbial treatment of paper wastewater or the polluted environment is of great practical value. However, studies remain to be carried out regarding the physiological adaption mechanisms of microorganisms to the high temperatures of paper wastewater. [Objective] To investigate the physiological response of *Serratia* sp. AXJ-M, a thermophilic lignin-degrading bacterial strain preserved in our laboratory, to high temperature stress. [Methods] The bacterial cells were cultured at different temperatures, and the bacterial cell morphology, cell membrane fluidity and permeability, trehalose content, and activities of antioxidant enzymes were observed and measured. Illumina HiSeq 2000 was used for the de novo sequencing of AXJ-M, and then GO, COG, KEGG, and NR were employed to annotate the functional genes in the genome. [Results] Strain AXJ-M can survive in a thermal stress environment of 50 to 80 °C, of which 50 °C is the optimal growth temperature. However, its growth was significantly hindered when the temperature was rises above 70 °C. Strain AXJ-M exhibited marked morphological differences and augmented surface roughness at high temperature stress. Strain AXJ-M cultured at 80 °C experienced a decline in cell membrane fluidity, an upsurge in membrane permeability, and a rise in trehalose content. Moreover, the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD) associated with oxidative stress increased by 50%–80%, 30%–47%, and 24%–31%, respectively, as the culture time was extended. By genomic analysis, strain AXJ-M contained the genes associated with the response to high temperature stress. [Conclusion] The culture at high temperatures can induce strain AXJ-M to develop heat tolerance and modify the cell morphology. Additionally, the increased trehalose content and antioxidant enzyme activities can protect the cells from external stress conditions. Moreover, a comprehensive analysis of the strain genome provides a basis for exploring the molecular response mechanism of thermophilic bacteria in high-temperature environments.

**Keywords:** thermophilic lignin-degrading bacterium; high temperature stress; physiological response; genome analysis

制浆造纸产生的废水是污染环境的重要污染源之一,而减少其对环境造成污染的关键在于对黑液进行彻底、有效的治理<sup>[1-2]</sup>。木质素作为黑液中主要的难降解有机污染物,是导致造纸黑液难以高效处理的主要原因<sup>[3]</sup>。利用生物法处理造纸黑液中的木质素已受到越来越多的关注<sup>[4]</sup>。事实上,在实际造纸废水处理中添加的木质素降解微生物经常受恶劣环境的胁迫,如高温(造纸废水环境温度高达 40–50 °C)、高盐、高 pH<sup>[3,5]</sup>。这些不良环境通常会损害微生物的细胞膜结构、使其蛋白质变性进而导致酶活性丧失等,从而导致降解微生物功能降低<sup>[3]</sup>。在逆境中,微生物会借助本身的代谢补偿机制,经过生理和代谢活动而作出应激反应,如调节微生物细胞膜的通透性和流动性、添加额外的可调节渗透压的物质来产生并提高抗氧化酶的活性等,使细胞进入防御状态,适应不良环境并生存下来<sup>[6-7]</sup>。目前,关于高温胁迫下造纸黑液木质素降解微生物响应高温胁迫的补偿适应机制研究较少。

本研究以实验室前期筛选的嗜热木质素降解菌沙雷氏菌(*Serratia* sp.) AXJ-M<sup>[8]</sup>为研究对象,探讨了高温(80 °C)胁迫下菌株形态变化、细胞膜的流动性、通透性、海藻糖含量及其抗氧化酶活性,并通过全基因组初步分析从分子水平上研究菌株 AXJ-M 在高温(80 °C)胁迫下的补偿效应,旨在为利用基因工程技术提高生物的胁迫抗性,开发对造纸废水处理中主要胁迫因素有较强耐受性的降解菌株奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

沙雷氏菌(*Serratia* sp.) AXJ-M 分离保存于江西农业大学生物降解与转化实验室,并交于中国典型培养物保藏中心保藏,编号为:

CCTCC M2020273<sup>[8]</sup>。

#### 1.1.2 培养基

MSM 培养基<sup>[3]</sup> (g/L): 木质素 1.500 0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.400 0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.500 0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.000 0, CaCl<sub>2</sub> 0.300 0, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005 0, MnSO<sub>4</sub> 0.001 6, ZnCl<sub>2</sub> 0.001 7, CoCl<sub>2</sub> 0.001 7, 调节 pH 值为 7.0。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

牛肉膏、蛋白胨和酵母浸粉,上海阿拉丁试剂有限公司;SOD 活性检测试剂盒、POD 活性检测试剂盒及 CAT 活性检测试剂盒,北京雷根生物技术有限公司。电导率仪,上海谱美仪器科技有限公司;紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;恒温培养箱,上海铂温仪器有限公司;荧光分光光度计,日立高新技术公司;扫描电镜,北京欧波同光学技术有限公司;镀金仪,思耐达精密仪器(上海)有限公司。

## 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株 AXJ-M 的活化

将前期保藏的菌株 AXJ-M 在 MSM 固体培养基中划线活化,将单菌落接种到 MSM 液体培养基中活化,50 °C、170 r/min 培养 24–48 h。

#### 1.2.2 不同培养温度条件下菌株 AXJ-M 生长曲线的测定

将活化后的菌株 AXJ-M 以 3% 的接种量接种到 MSM 液体培养基中,分别在 10、20、30、40、50、60、70 和 80 °C 培养。间隔 24 h 取样,测定菌悬液的 OD<sub>600</sub> 值,在不同培养温度下绘制菌株 AXJ-M 的生长曲线。

#### 1.2.3 高温胁迫下菌株 AXJ-M 形态的观察

参照胡春辉等<sup>[9]</sup>方法并进行略微修改,具体步骤如下,将 1.2.1 中活化的菌株 AXJ-M 按照 3% 的接种量接种到 MSM 液体培养基中,分别于 50 °C、170 r/min 和 80 °C、170 r/min 培养 7 d 后于 4 °C、5 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用灭菌的 0.85% 生理盐水冲洗菌体;再加 2.5%

戊二醛振荡 3–5 min 至完全混匀, 在室温下固定 3 h 后将菌液于 4 °C、5 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 向菌体中加入 pH 7.2 的磷酸缓冲液, 振荡 3–5 min 后在 4 °C、5 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 重复 3 次; 随后利用不同浓度梯度 (30%、50%、70%、80%、90%、95% 及 100%) 的乙醇去除多余的水分, 25 °C、5 000 r/min 离心 15 min, 弃上清; 在恒温的干燥箱中将样品干燥, 再将样品在镀金仪内真空喷金 90 s, 随后用扫描电镜观察。

#### 1.2.4 细胞膜流动性的测定

参照郭茹鑫等<sup>[10]</sup>介绍的 8-苯氨基-1-萘磺酸(ammonium 8-anilino-1-naphthalenesulfonate, ANS)荧光探针法并进行略微修改, 具体步骤如下, 将菌株 AXJ-M 种子液按 3% 的接种量接种于 100 mL MSM 液体培养基中, 分别于 50 °C、170 r/min 和 80 °C、170 r/min 摇床振荡培养, 培养的第 5、6、7 天取样, 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 保留菌体备用。用灭菌的去离子水清洗菌体并重悬, 制备成终浓度  $OD_{600}$  为 1.0 的菌悬液。加入新配制的 100  $\mu$ mol/L 的 DPH 四氢呋喃溶液 5  $\mu$ L, 室温避光染色细菌 10 min, 得到 DPH 标记的细菌。在 360 nm 激发和 450 nm 处发射, 利用带有偏振装置的荧光分光光度计测量稳态荧光各向异性。

#### 1.2.5 海藻糖含量的测定

取一定量的 1.2.4 保存的菌体用磷酸缓冲盐溶液清洗 2 次, 加入 5 mL 10% 三氯乙酸, 冰水浴 1 h 后 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min。取稀释至合适倍数的上清液(1 mL)进行海藻糖含量的测定。将菌体沉淀置于 105 °C 干燥以评估菌体生物量。对照标准曲线计算海藻糖含量, 单位为 mg/g。

#### 1.2.6 细胞膜透性的测定

取一定量 1.2.4 保存的菌体放入烧杯中, 加

5 mL 去离子水, 常温静置 10 h。用玻璃棒轻轻搅拌均匀, 恒温下用电导率仪测定溶液电导率。再将烧杯放入 100 °C 沸水中恒温水浴 15 min, 待其冷却至室温时, 恒温测定煮沸液的电导率<sup>[11]</sup>。

根据公式(1)计算电导率:

$$\text{电导率}(\%) = 100 \times (\text{处理液电导率值} / \text{煮沸液电导率值}) \quad (1)$$

#### 1.2.7 高温胁迫下菌株 AXJ-M 抗氧化酶活性测定

取一定量的 1.2.4 保存的菌体用 pH 7.2 的磷酸缓冲液清洗 2–3 次, 再用 10 mL 磷酸缓冲液将菌体重悬, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 上清用于测定 SOD、POD 和 CAT 酶活。SOD 活性检测试剂盒测定 SOD 的原理是蓝四唑比色法。POD 活性检测试剂盒测定 POD 的原理是在过氧化氢存在下, POD 可以氧化愈创木酚生成茶褐色物质, 通过测定该物质的生成量来测定 POD 的活性。CAT 活性检测试剂盒测定 CAT 的原理是通过测定过氧化氢消耗的速率来测定 CAT 的活性<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.8 基因组组装及测序

从 MSM 固体培养基(木质素 1.5 g/L)挑取活化的单菌落至 LB 培养基中, 50 °C、170 r/min 培养 24 h, 然后取 1 mL 菌液接种到新鲜 LB 培养基中扩大培养, 50 °C、170 r/min 培养至  $OD_{600}$  值达到 1.0 左右, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 液氮速冻后迅速放入干冰, 送上海派森诺生物科技有限公司进行细菌基因组测序。将菌株 AXJ-M 的全基因组序列上传至 NCBI 数据库, 登录号为 CP059394 (染色体)和 CP059395 (质粒)。基于 Diamond (<https://github.com/bbuchfink/diamond>)、Blast2go (<https://www.blast2go.com/>)和 Hmmer3 (<http://www.hmmer.org/>)等软件对多种数据库注释,  $E$ -value 设为  $<1e-5$ , 选取搜索到最佳的结果作为该基因最终的注释

结果,同时对预测出的基因进行 non-redundant database (NR)、clusters of orthologous groups of proteins (COG)、gene ontology (GO)及 Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)功能注释分析。

### 1.2.9 数据处理

利用 SPSS 25.0 软件进行显著性分析,用 Origin 2021 软件制作图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养温度下菌株 AXJ-M 的生长曲线

培养温度对菌株 AXJ-M 生长的影响如图 1 所示,菌株 AXJ-M 在不同培养温度下生长趋势相同。其中 50 °C 是菌株 AXJ-M 的最适生长温度,培养 7 d 后菌株 AXJ-M 开始进入稳定期,  $OD_{600}$  值最大为  $1.812 \pm 0.012$ 。当培养温度提升至 80 °C 时,菌株 AXJ-M 在培养 6 d 开始进入稳定期,  $OD_{600}$  值为  $0.807 \pm 0.018$ ,相较于 50 °C 培养,高温明显抑制了菌株 AXJ-M 的生长。在外界胁迫的耐受性上,菌株 AXJ-M 在对数生长后期明显比对数生长前期和对数生长中期更强。为探究

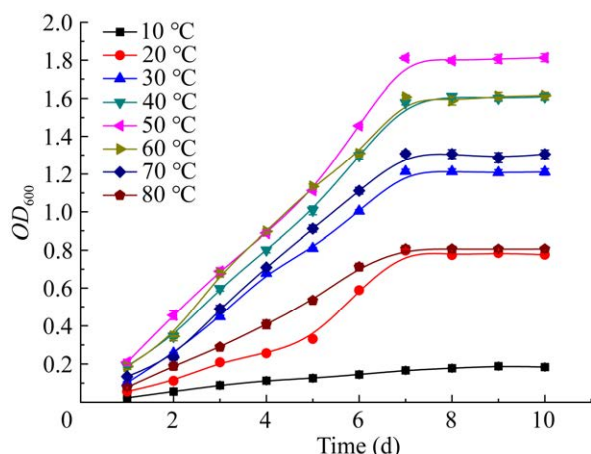


图 1 不同培养温度下菌株 AXJ-M 的生长曲线  
Figure 1 Growth curves of strain AXJ-M at different culture temperatures.

菌株 AXJ-M 在高温(80 °C)胁迫下培养第 5、6、7 天的细胞补偿效应,本研究选取 50 °C 为对照。

### 2.2 高温胁迫对菌株 AXJ-M 细胞形态的影响

由图 2 可知,菌株 AXJ-M 在最适培养温度(50 °C)下,通过扫描电镜可以观察到菌株形态为短杆状,其表面完整光滑,外形圆润饱满,大小比较均匀(图 2A);相较于 50 °C 处理,经高温(80 °C)胁迫的菌株形态更细长,并且其表面呈现出凸凹、粗糙且不平整的形态,甚至部分菌株聚集呈重叠状排列(图 2B)。说明温度胁迫程度越高,菌株 AXJ-M 的聚集状态越明显,这可能与耐热性的增加有关。上述研究结果表明,菌株 AXJ-M 受热胁迫的形态与最适温度下的菌株形态相比差异显著,并且个体间呈现聚集态,这可能有助于菌株 AXJ-M 避免在高温环境下产生损伤,是其在高温环境下生长而产生的一种自我保护方式。

### 2.3 高温胁迫对菌株 AXJ-M 细胞膜流动性的影响

为了使细胞膜行使正常的生理功能,适宜的细胞膜流动性是必不可少的。当细胞处于不利环境中时,为了提高菌体的抗逆能力,菌体会降低自身细胞膜的流动性<sup>[13-14]</sup>。在本研究中,采用 ANS 荧光探针法测定菌体细胞膜的流动性<sup>[10]</sup>,其原理是荧光强度与膜流动性呈负相关,荧光强度越强,膜流动性越弱<sup>[14]</sup>。如图 3 所示,相较于对照组,菌株 AXJ-M 在高温(80 °C)胁迫下的荧光强度值更高,而其细胞膜的流动性却明显变低,这可能是由于环境温度过高而引起菌株细胞膜的膜脂肪酸组成发生改变,导致细胞膜的流动性下降<sup>[15]</sup>。在高温(80 °C)胁迫下,菌株 AXJ-M 在稳定期(7 d)时,菌株细胞膜的流动性明显低于对数生长后期(6 d),这可能是因为菌株 AXJ-M 的代谢补偿机制协助菌株已经适应了外界的高温胁迫。

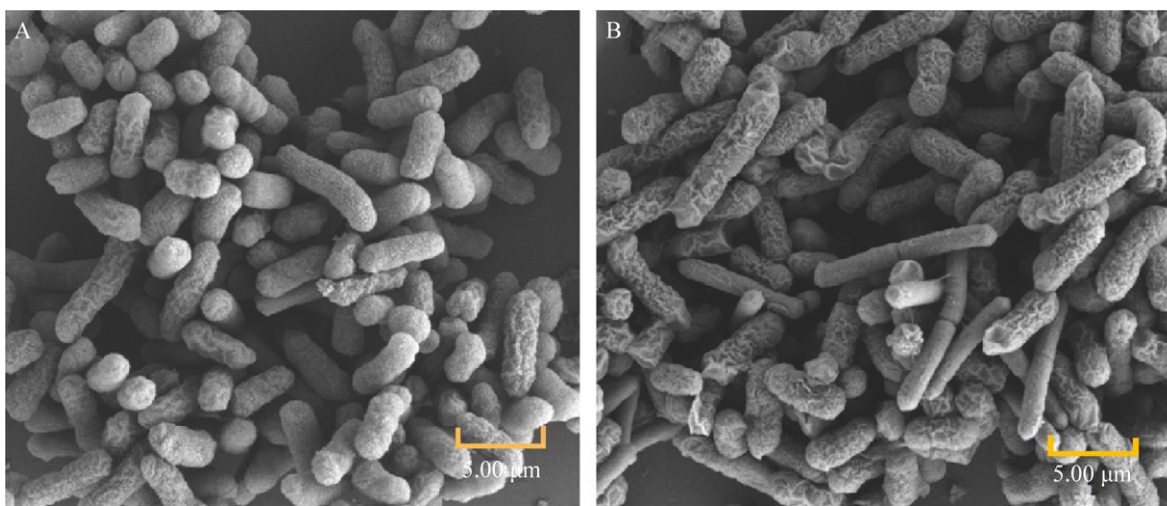


图2 菌株 AXJ-M 在 50 °C (A)和 80 °C (B)培养 7 d 的细胞形态

Figure 2 Cell morphology of strain AXJ-M cultured at 50 °C (A) and 80 °C (B) for 7 days.

## 2.4 高温胁迫对菌株 AXJ-M 膜渗透性的影响

细胞膜是保护和维持微生物细胞内部生理功能正常行使的关键，是细胞抵御外界压力的重要保护层，也是细胞完整性的重要标志<sup>[14]</sup>。在逆境中，微生物细胞膜的通透性会增加，加

强胞内的一些钾盐、磷酸盐及钠盐等小分子物质的释放，进而使培养液的电导率升高<sup>[16]</sup>。由图 4 可知，相较于最适温度(50 °C)，菌株 AXJ-M 在高温(80 °C)胁迫下的相对电导率显著提高，增长范围为 15%–20%。培养时间越长，培养液的电导率越高，到一定水平之后达到平衡。

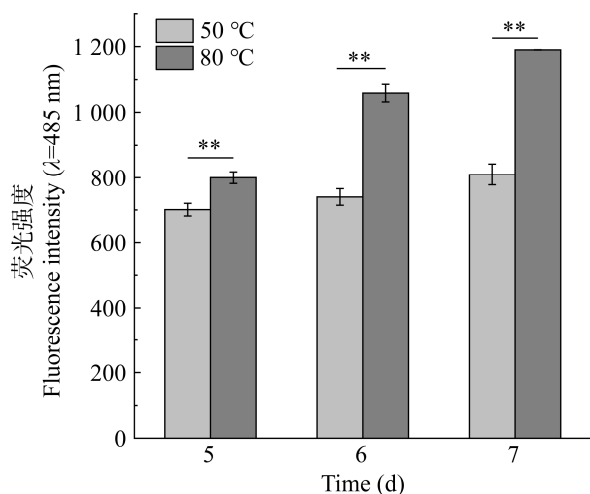


图3 菌株 AXJ-M 在 50 °C和 80 °C培养的细胞膜荧光强度

Figure 3 Cell membrane fluorescence intensity of strain AXJ-M cultured at 50 °C and 80 °C. \*\*:  $P < 0.01$ .

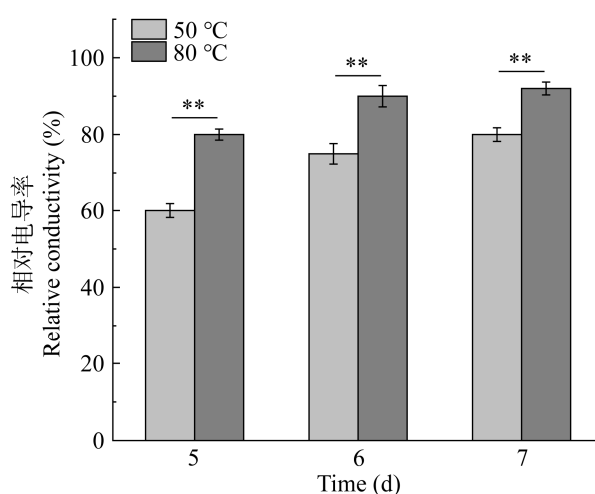


图4 菌株 AXJ-M 在 50 °C和 80 °C培养的相对电导率

Figure 4 Relative conductivity of strain AXJ-M cultured at 50 °C and 80 °C. \*\*:  $P < 0.01$ .



## 2.5 高温胁迫对菌株 AXJ-M 细胞海藻糖含量的影响

海藻糖在渗透调节中起着重要的作用,因为当生物体暴露在外界压力下时,它会在生物体内积累,这样对质膜、核酸和其他生物分子起到了保护层的作用,保护它们的空间结构和活性中心,维持细胞渗透压,从而帮助细胞抵御恶劣的外部环境<sup>[14,17]</sup>。如图 5 所示,相较于对照组,菌株 AXJ-M 在高温胁迫(80 °C)下海藻糖含量显著提高,增长范围为 5%–7%。在高温胁迫(80 °C)下,在稳定期(7 d)和对数生长后期(6 d)菌株 AXJ-M 的海藻糖含量变化显著。

## 2.6 高温胁迫对菌株 AXJ-M 抗氧化酶活性的影响

当生物体受到外界胁迫时,生物体会增加其体内的活性氧自由基的产生,从而破坏活性氧的产生与清除之间的平衡,进一步导致脂质过氧化,最终对细胞产生氧化损伤<sup>[18]</sup>。实验研究了在热胁迫下菌株 AXJ-M 胞内的抗氧化酶(SOD、POD 和 CAT)的活性。由图 6A 可知,相较于最适温度(50 °C),菌株 AXJ-M 在高温胁迫

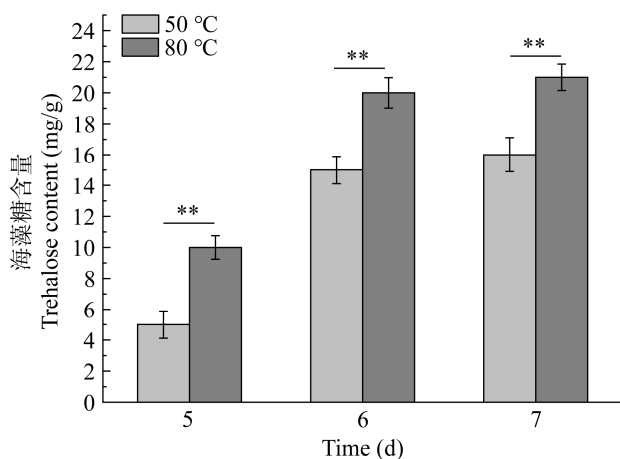


图 5 菌株 AXJ-M 在 50 °C 和 80 °C 培养的海藻糖含量

Figure 5 The trehalose content of strain AXJ-M cultured at 50 °C and 80 °C. \*\*:  $P < 0.01$ .

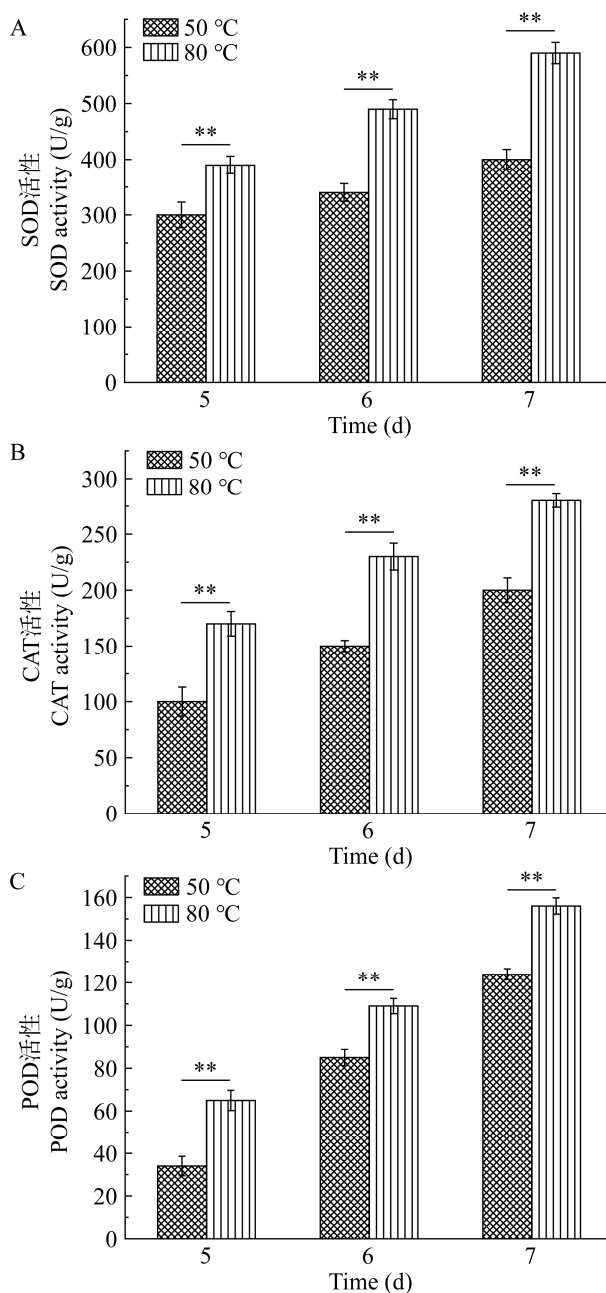


图 6 菌株 AXJ-M 在 50 °C 和 80 °C 培养的 SOD 活性(A)、CAT 活性(B)和 POD 活性(C)

Figure 6 SOD activity (A), CAT activity (B), and POD activity (C) of strain AXJ-M cultured at 50 °C and 80 °C. \*\*:  $P < 0.01$ .

迫(80 °C)时 SOD 活性提高了 30%–47%, 差异显著( $P < 0.01$ )。由图 6B 和图 6C 可以看出, 在最适温度下和高温胁迫下 CAT 活性和 POD 活

性的变化与 SOD 活性的变化类似。

## 2.7 菌株 AXJ-M 基因组功能注释

### 2.7.1 GO 数据库注释

GO 数据库包括三大类: 细胞组分(cellular component, CC)、生物过程(biological process, BP)和分子功能(molecular function, MF)。通过对菌株 AXJ-M 基因组进行蛋白功能分析(图 7), 染色体和质粒 GO 分类在 42 种功能分类中分别有 3 936 个和 129 个基因得到注释, 占有所有基因的 81.52%和 50.98%。其中, 染色体和质粒中 BP 注释最多的前三位均是生物过程、细胞氮化合物代谢过程及生物合成过程; 在 CC 注释中, 细胞及细胞组分是染色体和质粒中基因数量最多的功能注释; 在 MF 中得到功能注释最多的前三位是分子功能、金属离子结合及 DNA 结合。

### 2.7.2 COG 数据库注释

COG 是通过已知蛋白对未知蛋白序列进行功能注释的数据库。染色体和质粒中分别有 4 566 个和 162 个基因完成蛋白注释, 占全部基因的 94.57%和 64.03% (图 8), 其中包含大量未知功能的基因, 说明可以进一步探索和挖掘这些基因的功能。染色体已知编码功能的基因中, 与转录功能相关基因最多, 有 440 个, 占编码基因总数的 9.64%; 而在质粒中, 与复制、重组和修复功能相关基因最多, 有 56 个, 占编码基因总数的 34.57%。染色体中比较多的富集基因类群还包括能源生产和转化、氨基酸运输和代谢、无机离子运输与代谢、碳水化合物转运与代谢、细胞壁/膜/包膜生物发生、翻译, 核糖体结构和生物发生、信号转导机制等。

### 2.7.3 KEGG 数据库注释

KEGG 数据库既是基因组研究方面的公共数据库, 又是系统地分析基因的功能及其关联基因组的信息和功能信息的综合性数据库。菌株 AXJ-M 染色体和质粒中分别有 3 061 个和 397 个

蛋白编码基因分别注释到 KEGG 功能, 占基因组的 63.40%和 51.4% (图 9)。KEGG 功能注释表明, 染色体中代谢通路相关的基因数目最多, 与碳水化合物代谢、氨基酸代谢、辅助因子和维生素代谢以及能源代谢等通路的相关基因较多, 分别为 525、370、205 和 188 个; 而在质粒中, 与信号和细胞过程、遗传信息处理等过程相关的基因较多, 分别为 39 个和 18 个。菌株 AXJ-M 中具有 29 个参与环境适应的基因, 将这部分基因与参与上述代谢的基因联系起来研究, 可以进一步为阐述 AXJ-M 的环境适应机理提供有力证据。

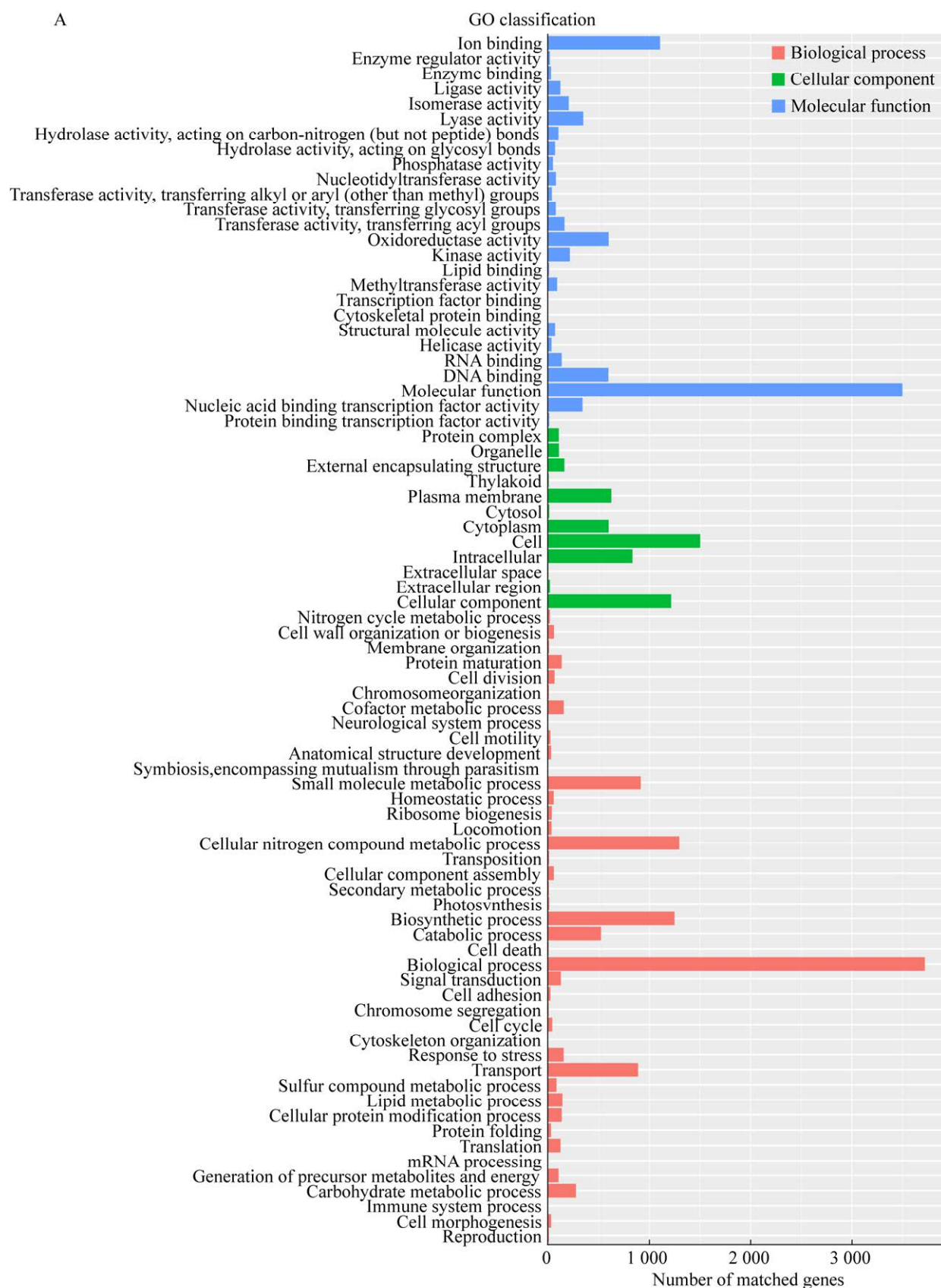
## 2.8 菌株 AXJ-M 中适应高温胁迫基因的预测

为了研究菌株 AXJ-M 对高温胁迫的适应性, 对其全基因组进行了测序, 并将测序结果与各种基因功能注释数据库进行比对, 筛选出与菌株适应高温胁迫的相关基因。与细胞膜流动性相关的基因, 包括 Acyl-CoA 脱氢酶、NADH 脱氢酶和细胞色素氧化酶亚基; 与菌株响应热胁迫和调节的基因, 包括热激蛋白 HtpX 和 HspQ、RrmJ 家族蛋白和小热激蛋白 IbpA 基因; 与抗氧化相关的酶包括 SOD、CAT 和 POD 的基因, 这一注释结果与实验测定结果相一致。因此, 上述基因的存在可能在菌株适应高温胁迫过程中起到了一定的作用。表 1 中列出了这些酶蛋白的 ID 和序列长度。

## 3 讨论

已经从造纸废水以及被其污染的自然环境中分离出多种能够降解木质素的微生物<sup>[19-21]</sup>, 这些菌株降解造纸废水中木质素的降解途径及其分子调控机制鲜有报道<sup>[8]</sup>。微生物在造纸废水处理中会面临许多胁迫问题(如碱、高温及





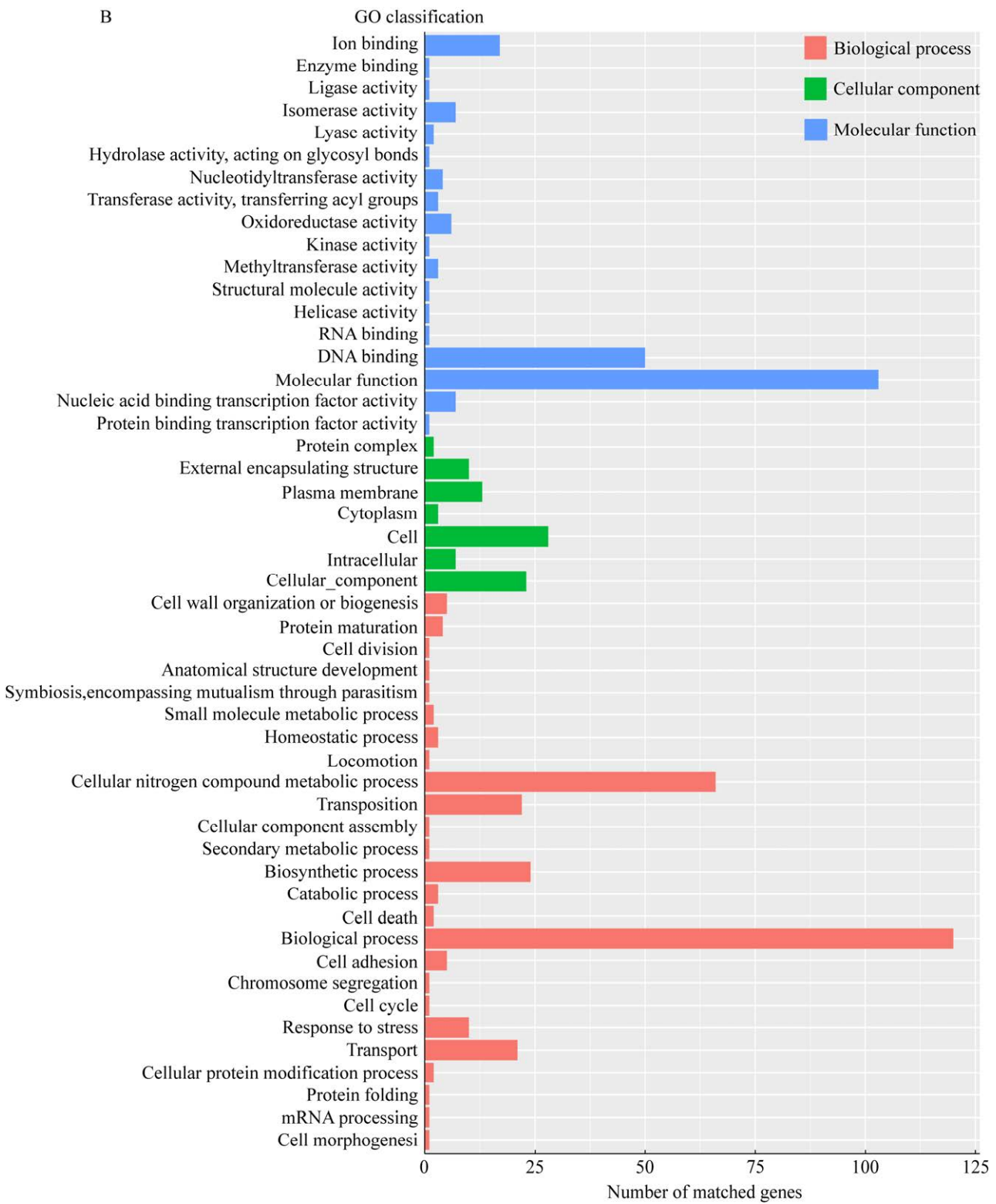


图 7 菌株 AXJ-M 的 GO 功能分类图 A: 染色体. B: 质粒

Figure 7 GO function classification map of strain AXJ-M. A: Chromosome. B: Plasmid.

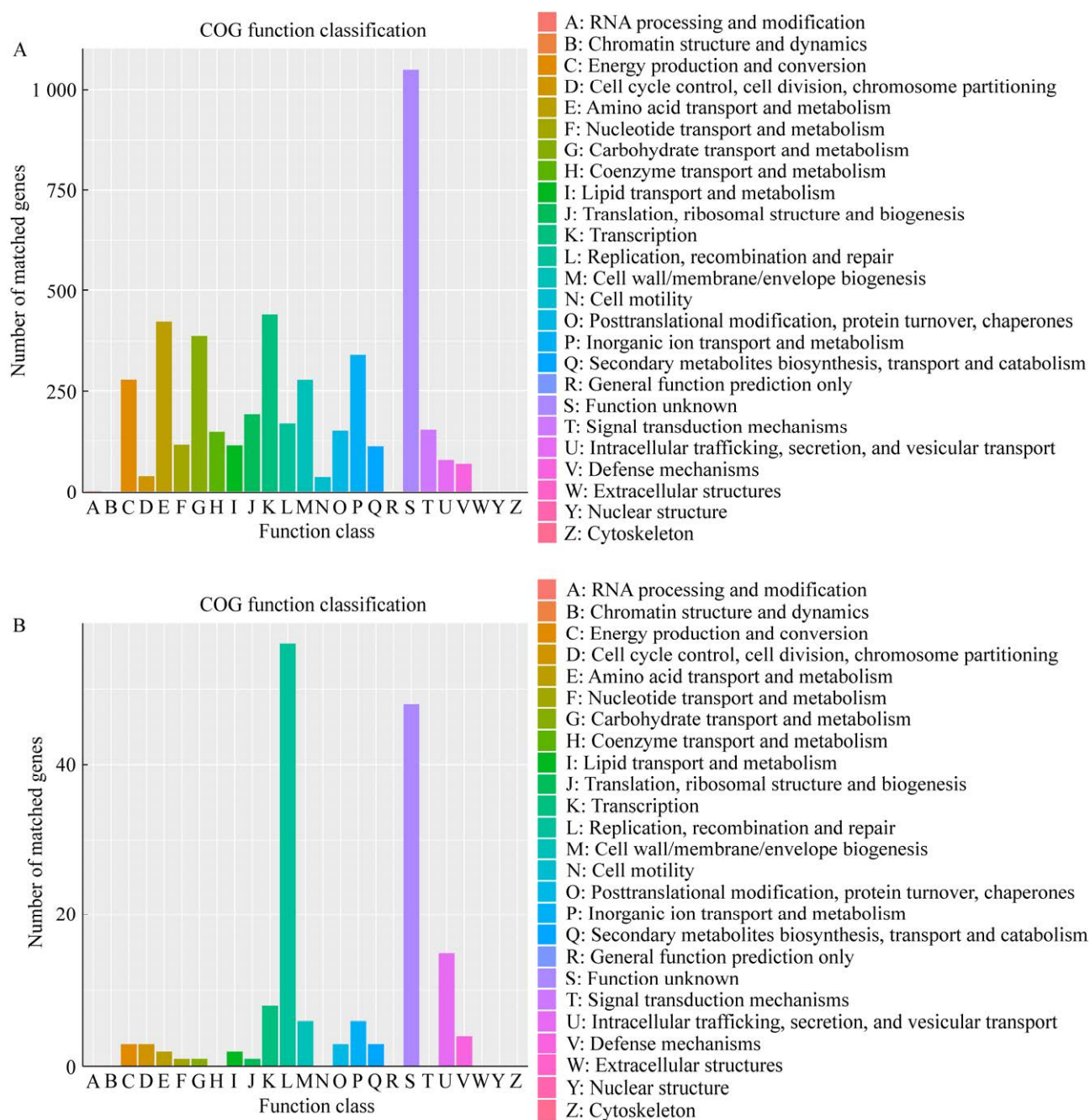
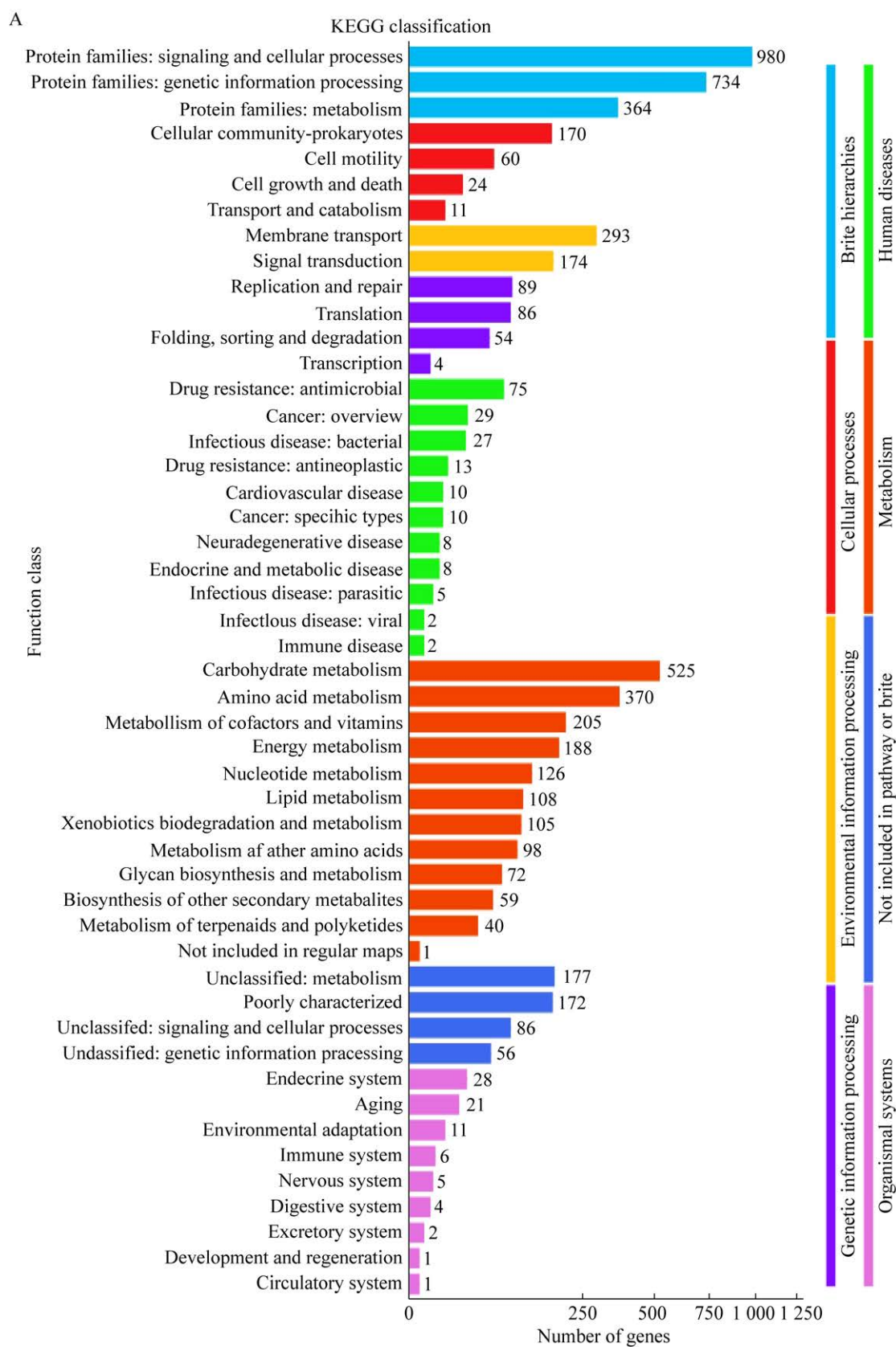


图8 菌株AXJ-M的COG功能分类图 A: 染色体. B: 质粒

Figure 8 COG function classification map of AXJ-M strain. A: Chromosome. B: Plasmid.

渗透压胁迫等)<sup>[3,5]</sup>。菌株的种类、其细胞状态及菌株所处的环境会影响菌株的抗热性<sup>[22]</sup>。经过高温(80 °C)胁迫处理后,菌株AXJ-M菌落形态与在最适生长温度下差别明显,其菌落边缘不

圆滑,表面较干燥且变得更为粗糙,菌体形状变长,菌株自身产生的这些变化可能是为了保护自身生长抵御高温产生的热损伤。有研究表明,大肠杆菌在一些抗生素作用下能使大肠杆





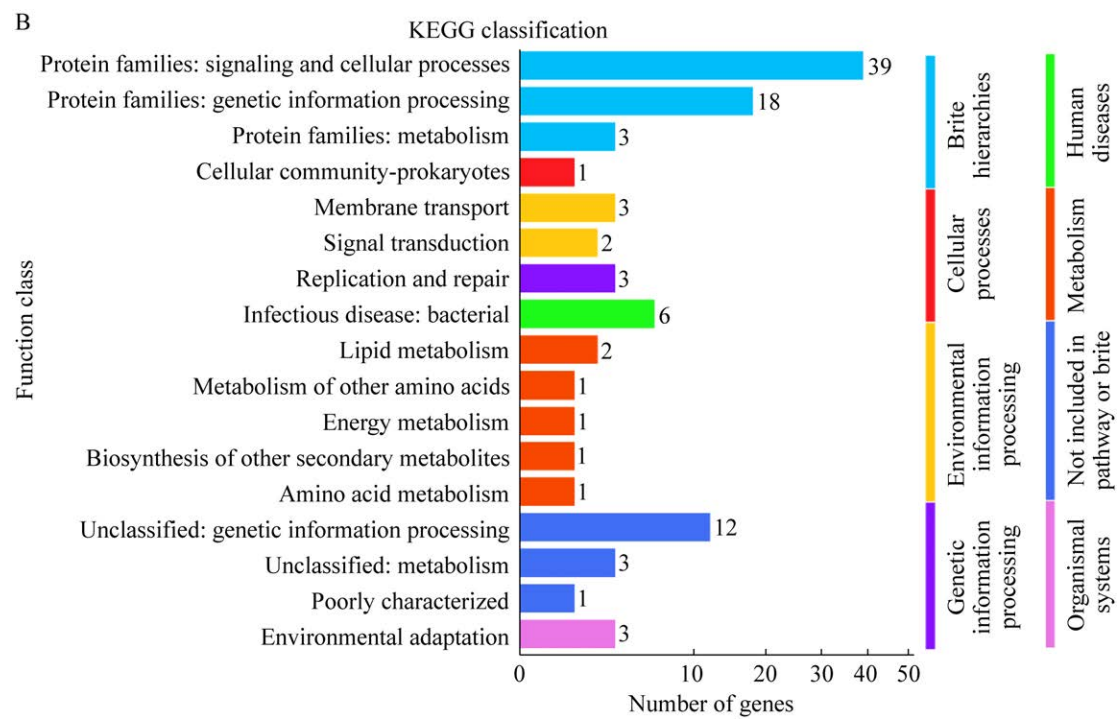


图 9 菌株 AXJ-M 的 KEGG 功能分类图 A: 染色体. B: 质粒

Figure 9 KEGG function classification map of strain AXJ-M. A: Chromosome. B: Plasmid.

表 1 菌株响应高温胁迫相关酶的预测

Table 1 Prediction of enzymes related to strain response to high temperature

序列名称 Sequence name	序列长度 Sequence length (bp)	NR 数据库注释 NR database annotations
chr_gene2016	292	Heat shock protein HtpX
chr_gene1680	105	Heat-shock protein HspQ
chr_gene378	209	RrmJ family heat shock protein
chr_gene11	137	Small heat shock protein IbpA
chr_orf1334	628	Sigma54-dependent transcriptional activator SfnR
chr_gene24	131	Superoxide dismutase (SOD)
chr_3300	478	Catalase (CAT)
chr_2560	395	Peroxidase (POD)
chr_821	818	Acyl-CoA dehydrogenase
chr_1821	434	NADH dehydrogenase
chr_2348	622	NADH dehydrogenase
chr_3328	915	NADH dehydrogenase subunit G
chr_3330	183	NADH dehydrogenase subunit
chr_3332	224	NADH dehydrogenase
chr_953	112	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit IV
chr_954	172	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit III
chr_955	663	Cytochrome ubiquinol oxidase subunit I
chr_956	265	Cytochrome ubiquinol oxidase subunit II

菌由短杆状变为细长的丝状体,大肠杆菌发生形态的改变是为了帮助自身抵抗不良环境的胁迫<sup>[23]</sup>。本研究结果表明,菌株 AXJ-M 经高温(80 °C)热处理后,菌株的细胞形态由短杆状变为长杆状,为此,我们推测高温迫使菌株 AXJ-M 的形态改变为长杆状可能与菌株本身耐热性的提升有关系。

当菌体在不良环境中生长时,菌体会通过降低其细胞膜流动性来提高菌体对不良环境的抵御能力<sup>[13]</sup>。本研究中,在高温(80 °C)胁迫下菌株 AXJ-M 的细胞膜流动性降低,推测原因可能是高温(80 °C)胁迫改变了菌株 AXJ-M 细胞膜的成分。这种细胞膜流动性发生的改变,使菌株 AXJ-M 能够更好地适应高温(80 °C)环境。实验室前期研究表明<sup>[3]</sup>,当培养温度为 80 °C 时,菌株 AXJ-M 几乎不降解木质素,结合本研究结果,说明在高温胁迫下,细胞膜上的各种运动,如主动运输、协助扩散等过程将难以进行,同时导致细胞代谢功能紊乱,最终细胞死亡,细胞丧失了降解木质素的能力。孟玉芳等<sup>[24]</sup>也证实了此结论。张爱静等<sup>[13]</sup>研究发现,胁迫温度越高,抗热性菌株大肠杆菌膜流动性越弱,与本研究结果趋势一致。一般而言,细菌的生理功能是通过控制其膜的流动性来维持,流动性与细菌的生命活动相协调,这种适应性变化可以保护细菌<sup>[14]</sup>。因此,菌株 AXJ-M 细胞膜流动性的变化可能有利于其在高温下保持正常的活性。

相较于最适温度(50 °C),经高温(80 °C)胁迫后,菌株 AXJ-M 的相对电导率显著提高,这可能是由于高温胁迫造成膜蛋白质结构改变,使细胞渗透调节系统失衡,导致细胞膜的通透性提高,最终造成细胞内部电解质的渗漏<sup>[25]</sup>。徐礼云等<sup>[14]</sup>研究发现,瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*) NCUF 210.1 在受高温胁迫后,随着培养时间的延长,培养液的电导率显著升高。

本研究中,菌株 AXJ-M 在高温(80 °C)胁迫条件下,培养液的电导率随着培养时间的延长显著增加,达到一定水平后趋于稳定。可能是菌株 AXJ-M 需要一定的时间来适应高温胁迫,在此过程细胞不能适应环境,导致细胞膜的保护屏障减弱,增加细胞膜的通透性,电解质等细胞内容物泄漏,导致发酵液相对电导率逐渐增加。随着高温胁迫时间的延长,细胞经历了对环境的适应过程,导致细胞内电解质渗漏速率变慢,从而使发酵液的相对电导率趋于稳定<sup>[26]</sup>。

相较于最适温度(50 °C),经高温(80 °C)胁迫处理后,菌株 AXJ-M 体内的海藻糖含量显著增加,产生这种现象的原因可能是因为海藻糖是一种生物应激代谢产物,在恶劣条件下生长的微生物细胞中其海藻糖含量会显著高于适宜条件下生存的微生物。海藻糖可以保护生物体免受外界胁迫,因为它能够通过增加渗透调节物质的含量来降低生物体的渗透压,从而加强细胞膜的完整性,使其对外部压力更具弹性<sup>[11,17,26]</sup>。有研究发现酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 在 42 °C 热胁迫下,其海藻糖含量比对照组增加了 4 倍,进一步说明了海藻糖可以帮助细胞抵御不良环境对细胞造成的伤害<sup>[27]</sup>。Williams 等<sup>[28]</sup>发现,微生物处于不利环境中时,为了保护细胞且防止细胞凋亡,海藻糖会诱导细胞自噬,最终使微生物在不利环境中生存。

微生物通过构建抗氧化防御系统消灭胞内多余的活性氧来抵御由外界胁迫引起的胞内氧化损伤<sup>[29]</sup>。抗氧化酶(SOD、POD 和 CAT)是微生物抗氧化系统的核心,这 3 种酶共同作用可以减少外界胁迫对微生物引起的氧化损伤<sup>[30]</sup>。在高温胁迫条件下,菌株 AXJ-M 中检测到了上述 3 种抗氧化酶,并且其活性随着温度的升高而升高。由此推测这 3 种酶相互协助来清除微生物中累积的活性氧。为了证实上述结论,本

研究通过组学测序对菌株 AXJ-M 中的各种功能的抗氧化酶如何相互协作对抗高温胁迫所引起的氧化应激进行了深入的研究。其中,菌株在高温胁迫下 SOD 活性最高,其酶活性在不同温度下差异显著,这可能是因为在高温胁迫下,菌株 AXJ-M 激活了代谢补偿机制,提高了体内 SOD 活性,加强菌体清除  $O_2^-$  的能力,并降低了细胞膜脂质的过氧化,减轻高温对自身的损害,从而实现保护菌株不凋亡<sup>[11]</sup>。因此,推测 SOD 可能是菌株 AXJ-M 响应高温胁迫的关键抗氧化酶,这一推断还有待进一步借助分子生物学的方法来验证。

热激蛋白对于细菌在高温条件下的生存具有重要意义,当产生热激蛋白时,它们对外界不利环境迅速做出反应,并表现出耐热性,这是生物体适应热应激的关键因素<sup>[8]</sup>。Leyer 等<sup>[31]</sup>进行了一项研究,以调查酸适应应激在保护沙门氏菌(*Salmonella*)免受热、盐、表面活性物质等方面的作用。结果表明,酸适应可以促使沙门氏菌产生特殊的外膜蛋白,从而增强其对恶劣外界条件的耐受能力。本研究通过对菌株 AXJ-M 进行全基因组测序分析发现,菌株中含有 4 个热激蛋白。因此,推测热激蛋白是菌株 AXJ-M 在高温胁迫下良好生存的关键耐热酶之一,但这一推断还有待进一步验证。

## 4 结论

本研究发现菌株 AXJ-M 处于 80 °C 高温胁迫时,其形态、膜流动性、膜渗透性、海藻糖含量和抗氧化酶活性均发生了变化。相较于最适温度(50 °C),高温(80 °C)胁迫后菌株 AXJ-M 的细胞膜流动性降低且细胞形态变长。此外,膜渗透性、海藻糖含量和抗氧化酶活性均升高,这些改变是为了维持菌体细胞膜的功能,保护细胞免受外界恶劣条件的影响。菌株 AXJ-M 全

基因组测序及其编码基因蛋白的功能注释结果表明,菌株含有响应高温胁迫的基因。综上,当菌株 AXJ-M 处于高温环境中时,会通过改变其形态、调整膜流动性及增加抗氧化酶活性来适应不利环境,提高其生存能力。

## REFERENCES

- [1] WANG Y, WU BW, MA T, MI YZ, JIANG HY, YAN HH, ZHAO PC, ZHANG S, WU LX, CHEN L, ZANG HL, LI CY. Efficient conversion of hemicellulose into 2,3-butanediol by engineered psychrotrophic *Raoultella terrigena*: mechanism and efficiency[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 359: 127453.
- [2] WANG Y, CHEN X, WU BW, MA T, JIANG HY, MI YZ, JIANG C, ZANG HL, ZHAO XY, LI CY. Potential and mechanism for bioremediation of papermaking black liquor by a psychrotrophic lignin-degrading bacterium, *Arthrobacter* sp. C2[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 439: 129534.
- [3] AN XJ, ZHONG B, CHEN GT, AN WJ, XIA X, LI HG, LAI FJ, ZHANG QH. Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality for papermaking black liquor by a new isolated thermophilic and alkali-tolerant *Serratia* sp. AXJ-M[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 406: 124285.
- [4] HUANG B, FANG GC, WU H, SUN JB, LI ZM, YE Q. Efficient biosynthesis of succinate from paper mill wastewater by engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 189(4): 1195-1208.
- [5] MAZHAR S, DITTA A, BULGARIU L, AHMAD I, AHMED M, NADIRI AA. Sequential treatment of paper and pulp industrial wastewater: prediction of water quality parameters by Mamdani fuzzy logic model and phytotoxicity assessment[J]. *Chemosphere*, 2019, 227: 256-268.
- [6] FONG K, WANG SY. Heat resistance of *Salmonella enterica* is increased by pre-adaptation to peanut oil or sub-lethal heat exposure[J]. *Food Microbiology*, 2016, 58: 139-147.
- [7] ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ A, PRIETO M, BERNARDO A, HILL C, LÓPEZ M. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: an adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host[J]. *Food Research International*, 2012, 45(2): 482-492.



- [8] AN XJ, LI NJ, ZHANG SL, HAN YY, ZHANG QH. Integration of proteome and metabolome profiling to reveal heat stress response and tolerance mechanisms of *Serratia* sp. AXJ-M for the bioremediation of papermaking black liquor[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 450: 131092.
- [9] 胡春辉, 徐青, 孙璇, 于浩, 袁玉清. 几种典型扫描电镜生物样本制备[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(20): 5389-5392, 5402.
- HU CH, XU Q, SUN X, YU H, YUAN YQ. Several biological typical samples preparation methods of scanning electron microscope[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(20): 5389-5392, 5402 (in Chinese).
- [10] 郭茹鑫, 王志刚, 王春龙, 由义敏, 王恒煦. 邻苯二甲酸二甲酯对荧光假单胞菌的损伤研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(7): 1476-1481.
- GUO RX, WANG ZG, WANG CL, YOU YM, WANG HX. Study on the damage caused by dimethyl phthalate on *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(7): 1476-1481 (in Chinese).
- [11] 史明科. 逆境胁迫对发状念珠蓝细菌细胞生理生化的影响[D]. 洛阳: 河南科技大学硕士学位论文, 2012.
- SHI MK. Effect of adverse stress on physiological and biochemical of *Nostoc flagelliforme* cell[D]. Luoyang: Master's Thesis of Henan University of Science and Technology, 2012 (in Chinese).
- [12] LIU JX, WANG JX, LEE S, WEN RY. Copper-caused oxidative stress triggers the activation of antioxidant enzymes via ZmMPK3 in maize leaves[J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0203612.
- [13] 张爱静, 李琳琼, 王鹏杰, 高瑀珑. 热胁迫对大肠杆菌细胞膜和膜蛋白的影响[J]. 中国农业科学, 2020, 53(5): 1046-1057.
- ZHANG AJ, LI LQ, WANG PJ, GAO YL. Effects of heat stress on cell membrane and membrane protein of *Escherichia coli*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(5): 1046-1057 (in Chinese).
- [14] 徐礼云, 陈延儒, 董弦弦, 吴晓江, 邓梦菲, 巫小丹, 万茵, 刘成梅, 付桂明. 瑞士乳杆菌抗高温胁迫补偿机制[J]. 南昌大学学报(理科版), 2021, 45(1): 26-33.
- XU LY, CHEN YR, DONG XX, WU XJ, DENG MF, WU XD, WAN Y, LIU CM, FU GM. Effects of high temperature stress on the compensation effect mechanism of *Lactobacillus helveticus*[J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2021, 45(1): 26-33 (in Chinese).
- [15] WANG RY, OU Y, ZENG XA, GUO CJ. Membrane fatty acids composition and fluidity modification in *Salmonella* Typhimurium by culture temperature and resistance under pulsed electric fields[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(6): 2236-2245.
- [16] PATRA P, ROY S, SARKAR S, MITRA S, PRADHAN S, DEBNATH N, GOSWAMI A. Damage of lipopolysaccharides in outer cell membrane and production of ROS-mediated stress within bacteria makes nano zinc oxide a bactericidal agent[J]. Applied Nanoscience, 2015, 5(7): 857-866.
- [17] PARK M, MITCHELL WJ, RAFII F. Effect of trehalose and trehalose transport on the tolerance of *Clostridium perfringens* to environmental stress in a wild type strain and its fluoroquinolone-resistant mutant[J]. International Journal of Microbiology, 2016, 2016: 4829716.
- [18] DIMOVA M, TUGAI A, TUGAI T, IUTYNSKA G, DORDEVIC D, KUSHKEVYCH I. Molecular research of lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity of *Comamonas testosteroni* bacterial cells under the hexachlorobenzene impact[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 11415.
- [19] CHEN YH, CHAI LY, ZHU YH, YANG ZH, ZHENG Y, ZHANG H. Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain *Comamonas* sp. B-9 isolated from eroded bamboo slips[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(5): 900-906.
- [20] RAJ A, KUMAR S, HAQ I, SINGH SK. Bioremediation and toxicity reduction in pulp and paper mill effluent by newly isolated ligninolytic *Paenibacillus* sp.[J]. Ecological Engineering, 2014, 71: 355-362.
- [21] SHI Y, CHAI LY, TANG CJ, YANG ZH, ZHENG Y, CHEN YH, JING QX. Biochemical investigation of kraft lignin degradation by *Pandora* sp. B-6 isolated from bamboo slips[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(12): 1957-1965.
- [22] 张爱静, 李琳琼, 朱蕾, 王鹏杰, 高瑀珑. 热胁迫和培养温度对大肠杆菌抗热性的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 75-80.
- ZHANG AJ, LI LQ, ZHU L, WANG PJ, GAO YL. Effects of heat stress and growth temperature on the heat resistance of *Escherichia coli*[J]. Food Science, 2019, 40(22): 75-80 (in Chinese).
- [23] 王丽平, 郭永刚, 史晓丽, 陈绍峰. 不同抗生素对大肠杆菌形态的影响及其诱导游离内毒素的释放[J].

- 中国兽医学报, 2004, 24(6): 596-599.
- WANG LP, GUO YG, SHI XL, CHEN SF. Different antibiotics-induced morphological changes and free endotoxin release in *E. coli*[J]. Chinese Journal of Veterinary, 2004, 24(6): 596-599 (in Chinese).
- [24] 孟玉芳, 焦永红, 陈若男, 易楠, 李峰. SDBS 对菲降解菌细胞膜流动性影响的研究[J]. 湘潭大学学报(自然科学版), 2020, 42(1): 53-58.
- MENG YF, JIAO YH, CHEN RN, YI N, LI F. Effect of SDBS on membrane fluidity of phenanthrene degrading bacteria[J]. Journal of Xiangtan University (Natural Science Edition), 2020, 42(1): 53-58 (in Chinese).
- [25] HAYAT S, HASAN SA, YUSUF M, HAYAT Q, AHMAD A. Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2010, 69(2): 105-112.
- [26] de ANCHIETA CÂMARA A Jr, NGUYEN TD, JOSSIER A, ENDRIZZI A, SAUREL R, SIMONIN H, HUSSON F. Improving total glutathione and trehalose contents in *Saccharomyces cerevisiae* cells to enhance their resistance to fluidized bed drying[J]. Process Biochemistry, 2018, 69: 45-51.
- [27] 叶燕锐, 朱怡, 李莉莉, 林影, 杜红丽, 韩双艳. 耐热酿酒酵母海藻糖代谢途径对热胁迫的响应[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2010, 38(5): 139-143.
- YE YR, ZHU Y, LI LL, LIN Y, DU HL, HAN SY. Response of metabolic pathway of trehalose in heat-resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* to heat stress[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2010, 38(5): 139-143 (in Chinese).
- [28] WILLIAMS B, NJACI I, MOGHADDAM L, LONG H, DICKMAN MB, ZHANG XR, MUNDREE S. Trehalose accumulation triggers autophagy during plant desiccation[J]. PLoS Genetics, 2015, 11(12): e1005705.
- [29] ANGELOVA MB, PASHOVA SB, SPASOVA BK, VASSILEV SV, SLOKOSKA LS. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat[J]. Mycological Research, 2005, 109(2): 150-158.
- [30] GHORBANLI M, EBRAHIMZADEH H, SHARIFI M. Effects of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean[J]. Biologia Plantarum, 2004, 48(4): 575-581.
- [31] LEYER GJ, JOHNSON EA. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(6): 1842-1847.