

研究报告



荒漠土壤中两株抗氧化细菌的抗氧化生理生化特征

李婷^{1,2,3} 张威^{*1,3} 吴明辉^{3,4} 刘光琇^{1,3} 陈拓³ 李师翁^{3,5}

1 中国科学院西北生态环境资源研究院 沙漠与沙漠化重点实验室 甘肃 兰州 730000

2 云南大学生态学与环境学院 云南 昆明 650000

3 甘肃省极端环境微生物资源与工程重点实验室 甘肃 兰州 730000

4 中国科学院大学 北京 100049

5 兰州交通大学环境与市政工程学院 甘肃 兰州 730000

摘要:【背景】微生物在荒漠生态系统中经常面临多重胁迫,包括干旱、高温、UV 辐射,这些环境胁迫使得荒漠土壤微生物极易在体内外积累大量的超氧离子或过氧化物,抑制其生长或者直接造成死亡。【目的】荒漠土壤细菌为适应荒漠环境表现出抗氧化特性,作为荒漠生态系统重要组成部分,对其抗氧化特性的研究为荒漠地区抗氧化资源的开发提供科学依据和技术基础,也对荒漠微生物抗氧化机制的挖掘奠定了基础。【方法】利用过氧化氢氧化筛选出两株具有强抗氧化性的荒漠土壤细菌:海床动性微菌 AX6 (*Planomicrobium okeanoikoites* AX6)和海洋考克氏菌 KD4 (*Kocuria marina* KD4),通过测定其在过氧化氢条件下的生长曲线、细胞受损程度、抗氧化酶活性以及自由基清除能力,探究荒漠土壤微生物的抗氧化生理生化特征。【结果】两株细菌在低浓度过氧化氢中细胞丙二醛含量显著低于阴性对照大肠杆菌,在 1.5 mmol/L 过氧化氢中菌株 AX6 的谷胱甘肽过氧化物酶活性可达 108.33 U/mL,同时 DPPH、超氧阴离子自由基的清除能力显著升高;此外,在 3 mmol/L 过氧化氢中菌株 KD4 的过氧化氢酶活性升高至 1.16 U/mL,显著高于阳性对照耐辐射球菌,羟自由基的清除能力也显著升高。【结论】不同荒漠土壤细菌的活性抗氧化酶种类、自由基清除能力存在较大差异,表明荒漠土壤微生物抗氧化过程的多样性。

关键词: 荒漠土壤细菌, 抗氧化, 抗氧化酶, 自由基清除能力

Foundation items: External Cooperation Program of BIC, Chinese Academy of Sciences (131B62KYSB20160014); National Natural Science Foundation of China (31570498, 31870479, 41801045)

***Corresponding author:** E-mail: ziaoshen@163.com

Received: 12-05-2019; **Accepted:** 29-07-2019; **Published online:** 16-09-2019

基金项目: 中国科学院对外合作重点项目(131B62KYSB20160014); 国家自然科学基金(31570498, 31870479, 41801045)

***通信作者:** E-mail: ziaoshen@163.com

收稿日期: 2019-05-12; **接受日期:** 2019-07-29; **网络首发日期:** 2019-09-16

Physiological and biochemical characteristics of two antioxidant bacteria in desert soil

LI Ting^{1,2,3} ZHANG Wei^{*1,3} WU Ming-Hui^{3,4} LIU Guang-Xiu^{1,3} CHEN Tuo³
LI Shi-Weng^{3,5}

1 Key Laboratory of Desert and Desertification, Northwest Institute of Eco-Environment and Resources, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China

2 School of Ecology and Environmental Science, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650000, China

3 Key Laboratory of Extreme Environmental Microbial Resources and Engineering, Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730000, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

5 School of Environmental and Municipal Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou, Gansu 730000, China

Abstract: [Background] Microorganisms are frequently subjected to multiple stresses in deserts, including drought, high temperature and UV radiation. These natural stressors make it easy for desert soil microorganisms to accumulate numerous superoxide ions and peroxides inside and outside their bodies, inhibiting their growth or directly causing death. [Objective] Desert soil bacteria exhibit antioxidant properties in order to adapt to the desert environment. As an important part of the desert ecosystem, the research on its antioxidant properties provides the scientific and technical bases for the development of antioxidant resources in desert areas, as well as the antioxidant mechanism of desert microbes. [Methods] We used desert soil bacteria as the research object to obtain two bacteria with strong antioxidant activity by hydrogen peroxide: *Planomicrobium okeanoikoites* AX6 and *Kocuria marina* KD4. The antioxidant physiological and biochemical characteristics of bacteria in desert soil was explored by its growth curve under hydrogen peroxide, cell damage, antioxidant enzyme activities and free radical scavenging ability. [Results] The content of malondialdehyde in the cells of the two strains of bacteria in low concentration of hydrogen peroxide was significantly lower than that in negative control *Escherichia coli*. The glutathione peroxidase activity of strain AX6 was higher at 108.33 U/mL in 1.5 mmol/L hydrogen peroxide, meanwhile the scavenging ability of DPPH and superoxide anion radical was higher; while the catalase activity of strain KD4 increased to 1.16 U/mL in 3 mmol/L hydrogen peroxide was significantly higher than the positive control *Deinococcus radiodurans*, as well as the ability to scavenge hydroxyl radicals was higher. [Conclusion] There are large differences in the active antioxidant enzyme and free radical scavenging ability of bacteria in different desert soils, indicating the diversity of microbial antioxidant processes in desert soils.

Keywords: Bacteria in desert soils, Antioxidant, Antioxidant enzyme, Free radical scavenging ability

微生物在恶劣环境中容易受到氧化损伤,损伤主要集中在细胞内脂、蛋白质和 DNA,可导致细胞功能丧失而无法维持细胞正常代谢繁衍甚至死亡。强电离辐射、干旱、高温、高盐碱环境中产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)包括羟自由基($\text{HO}\cdot$)、超氧自由基(O_2^-)^[1],能够直接造成细胞氧化损伤。活性氧可以作用于细胞膜上的多元不饱和脂肪酸,造成脂质过氧化从而破坏细胞流动性^[2];引起蛋白质有害修饰,包括氨基酸中硫酰基氧化、与醛类反应;还可导致 DNA 的单键或双键

断裂^[3]。同时,这些反应产生了有毒害物质,进一步损害细胞。

荒漠特殊的环境条件极易造就强氧化环境,对生存其中的微生物产生氧化损伤。荒漠分布广泛,其面积约为陆地面积的 1/3,土壤盐碱化严重、强紫外辐射、水分含量极低。这些环境因子将荒漠中微生物置于强氧化条件下。尤其在紫外辐射下,有研究表明几乎 80%的细胞损伤属于氧化损伤^[4]。同样地,也有研究表明在干旱和盐碱土壤中发现了大量抗氧化基因,从而说明这样的环境中生物更易受

到氧化胁迫^[5-6]。

荒漠土壤细菌是荒漠生态系统中重要的群落组成,适应这一极端环境的微生物很可能具有特殊的生态适应机制及高效的抗氧化活性物质。目前微生物抗氧化研究多集中于食品微生物、肠道微生物,荒漠中对抗氧化特征与机理的研究多以植物为对象,荒漠土壤微生物抗氧化相关研究还较少。本文以荒漠土壤细菌为研究对象,用过氧化氢筛选得到2株具有强抗氧化能力的细菌,并对抗氧化菌株的抗氧化生理生化特征,包括氧化环境下抗氧化细菌生长情况、细胞受损程度、抗氧化酶活性、清除自由基能力展开研究。为恢复荒漠地区生物多样性、开发微生物抗氧化资源提供科学依据和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及培养基

从荒漠土壤样品中分离培养得到11株长势相同且生长良好的细菌,其中菌株AX6和菌株AX19分离自中国柴达木盆地,菌株sptzw03、sptzw12、sptzw15、sptzw24、sptzw42分离自中国腾格里沙漠,菌株KD3分离自北美洲死亡谷沙漠Badwater盆地,菌株KD4和菌株KD5分离自南极的Lake Vida,菌株KD6分离自南美洲的阿塔卡马沙漠。其中南极Lake Vida的样品由美国沙漠研究所Henry Sun教授提供,其余菌株由本实验室分离得到。

大肠杆菌对氧化物质的耐受性较低^[7],以*Escherichia coli* JM109为阴性对照,购自Solarbio公司,菌株编号C1310;耐辐射球菌*Deinococcus radiodurans*为阳性对照,它是存在于沙漠中具有超高抗辐射、抗氧化能力的菌株^[7-8],购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),菌株编号1.3828。

LB培养基(g/L):蛋白胨 10.00,酵母提取物 5.00,NaCl 10.00,琼脂 20.00(固体培养基)。R2A培养基(g/L):酵母提取物 0.50,胨蛋白胨 0.50,

酪蛋白氨基酸 0.50,葡萄糖 0.50,可溶性淀粉 0.50,丙酮酸盐 0.30,磷酸二氢钾 0.30,七水合硫酸镁 0.05,琼脂 15(固体培养基),用磷酸氢二钾和磷酸二氢钾调pH为7.4。

1.1.2 主要试剂和仪器

过氧化氢、无水乙醇、硫酸亚铁、EDTA二钠、邻苯三酚,天津市百世化工有限公司;DPPH, Aldrich公司;番红花T,上海埃彼化学试剂有限公司;细胞裂解液、PMSF,北京雷根生物技术有限公司。电泳槽,北京君意东方电泳设备有限公司;梯度PCR仪,东胜创新生物科技有限公司;电热恒温培养箱、恒温振荡培养箱,上海一恒科技有限公司;涡旋混合器,江苏东鹏仪器制造有限公司;紫外可见分光光度计,莱伯泰科仪器股份有限公司;凝胶成像系统,Alpha Innotech公司;滤膜, Merck Millipore有限公司。

1.2 采样方法

每个采样区域随机选择3个采样点,在无人为破坏的沙丘采集表层土样(2-5 cm),放入无菌采样袋,在-20℃条件下保存。

1.3 抗氧化细菌筛选

1.3.1 菌株活化

甘油冻存的菌株用接种针蘸取菌液,在LB固体培养基中划线。置于30℃恒温培养箱培养48-72 h。挑取形态、颜色和大小不一的菌落反复划线,直至得到单一菌落。

1.3.2 抗氧化细菌筛选

初次筛选过氧化氢浓度为0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mmol/L;二次筛选过氧化氢浓度为0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 mmol/L;3次筛选过氧化氢浓度为0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L。1 mL菌液加入1 mL过氧化氢稀释液,对照组加入1 mL去离子水,充分混匀后静置处理30 min,用PBS缓冲溶液冲洗3次,制成不同倍数菌液稀释液涂布计数,每个处理组作3个平行实验。根据存活率筛选出具有抗氧化活性的细菌。

1.4 细菌抗氧化生理生化特征

1.4.1 抗氧化菌株生长曲线测定

过氧化氢用 0.22 μm 滤膜灭菌后加入灭菌冷却的 LB 培养基,制成浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L 的过氧化氢 LB 液体培养基,接入 10% (体积比)的接种菌液,放入 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床培养箱中 200 r/min 培养,每 2–3 h 测定菌液的 OD_{600} ,直至生长到达衰落阶段。每个浓度设置 3 个平行,每次以培养基调零。以时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标作生长曲线。

1.4.2 抗氧化菌株氧化处理

菌株接种于 R2A 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 48 h,培养至菌液 OD_{600} 为 1 时,分装至 50 mL 锥形瓶,以不同浓度的过氧化氢处理,浓度梯度为 0、1.5、3.0 mmol/L,处理时间为 4 h。每组处理作 3 个平行实验。

1.4.3 抗氧化菌株丙二醛含量以及 SOD、CAT、GSH-Px 活性测定

丙二醛(malondialdehyde,MDA)具有 $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ 结构,是一种生物体脂质氧化后的产物,它的产生标志着氧化应激反应的发生。细菌细胞膜在过氧化氢条件下氧化生成丙二醛的多少,可用于表征细菌膜损伤程度^[9],其含量测定使用 TBA 法^[10]。细菌超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定采用邻苯三酚自氧化法^[11]等;过氧化氢酶(catalase, CAT)活性测定采用分光光度法,通过过氧化氢吸光度变化值来表征,测定步骤改自 Nakayama 等^[12];谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性测定采用比色法,使用 Leagene 公司试剂盒。

1.4.4 羟自由基清除能力测定

羟自由基清除能力测定方法^[13]:反应终体积 1 mL,其中含 150 mmol/L 磷酸钠盐缓冲液(pH 7.4),114 $\mu\text{mol/L}$ 番红花 T,1.0 mmol/L 硫酸亚铁,3% (质量体积比) H_2O_2 以及不同处理后菌液样品,空白组以蒸馏水代替样品,对照组以蒸馏水代替样品和硫酸亚铁。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 30 min 后用 0.3 mol/L 的 EDTA 二钠终止反应,测 520 nm 处吸光值。

羟自由基清除率计算式为:

$$\text{清除率}=(A_s-A_b)/A_c\times 100\% \quad (1)$$

式中, A_b 为空白组吸光度, A_c 为对照组吸光度, A_s 样品为样品组吸光度。

1.4.5 超氧阴离子自由基清除能力测定

超氧阴离子自由基清除能力测定方法改自 Wang 等^[14],pH 8.2 的 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 0.6 mL,样品 0.2 mL 于各试管中,对照组用蒸馏水代替。于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中保温 10 min,加入同样预温的 30 mmol/L 邻苯三酚盐酸液 40 μL ,混匀后精确反应 4 min,用 0.1 mL 浓盐酸终止反应,测 320 nm 处吸光度,以等体积的 Tris-HCl 缓冲液作为空白组。

超氧阴离子自由基清除率计算公式如下:

$$\text{清除率}=(A_c-A_s)/(A_c-A_b)\times 100\% \quad (2)$$

式中, A_b 为空白组吸光度, A_c 为对照组吸光度, A_s 样品为样品组吸光度。

1.4.6 DPPH 清除能力测定

DPPH 清除能力的测定方法改自 Lee 等^[15],500 μL 样品与 500 μL 的 0.4 mmol/L DPPH 乙醇,空白组以等体积无水乙醇代替 DPPH 溶液,对照组以等体积蒸馏水代替样品溶液,混匀后在室温下避光反应 30 min,并在 6 000 r/min 离心 10 min,取上清液,以等体积蒸馏水和无水乙醇混合液调零,于 517 nm 测定吸光度。

DPPH 自由基清除率计算公式为:

$$\text{清除率}=[1-(A_s-A_b)/A_c]\times 100\% \quad (3)$$

式中, A_b 为空白组吸光度, A_c 为对照组吸光度, A_s 样品为样品组吸光度。

1.5 数据分析

数据用 R 3.5.1 进行分析方差分析,采用 Excel 和 SPSS 16.0 作图。系统发育树由软件 MEGA 7.0 作图。

2 结果与分析

2.1 荒漠土壤细菌基于 16S rRNA 基因的系统发育树分析

用 LB 固体培养基对不同样品中分离出的菌株进行培养,筛选出长势良好的 11 株细菌,将它们

进一步活化后进行 16S rRNA 基因扩增、测序,得到的序列在 Contig 软件中拼接后上传至美国国家生物技术信息中心(NCBI)的核酸数据库 BLAST 进行比对,构建系统发育树(图 1)。在门水平上,11 株菌隶属于 4 个常见的土壤微生物菌群^[16],其中菌株 sptzw03、sptzw42、KD4、KD5、KD6 属于放线菌门(*Actinobacteria*),菌株 sptzw12 属于拟杆菌门(*Bacteroidetes*),菌株 sptzw15、AX6、AX19 属于厚壁菌门(*Firmicutes*),菌株 sptzw24、KD3 属于变形菌门(*Proteobacteria*)。从属水平看,分属于微杆菌属(*Microbacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、动性微菌属(*Planomicrobium*)、糖球菌属(*Gracilibacillus*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)和短波单胞菌属(*Brevundimonas*)。

2.2 抗氧化细菌的筛选

图 2 为 11 株细菌在不同浓度过氧化氢处理后

的存活率曲线,控制过氧化氢浓度为 0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 mmol/L 浓度梯度,菌株 KD4 (*Kocuria*)、AX6 (*Planomicrobium*)、sptzw42 (*Arthrobacter*)三株菌在 0.06 mmol/L 过氧化氢处理后存活率依然保持在 80%以上,分别为 94.75%、95.34%和 80.99%。其余菌株存活率在 0.06 mmol/L 时均低于 50%,初步筛选出在氧化处理后具有较高存活率的 3 株细菌 AX6、sptzw42、KD4。

增加过氧化氢浓度进一步对菌株 AX6、sptzw42、KD4 进行复筛,并加入大肠杆菌作为阴性对照,存活率曲线如图 3 所示。在过氧化氢浓度升高之后,菌株 AX6、sptzw42、KD4 在各个浓度均保持较高的存活率。

在高浓度过氧化氢条件下,加入耐辐射球菌作为阳性对照,存活率曲线如图 4 所示。菌株 AX6、KD4 存活率下降趋势与耐辐射球菌存活曲线类似、较为平缓,在浓度为 2 mmol/L 处存活率分别保持

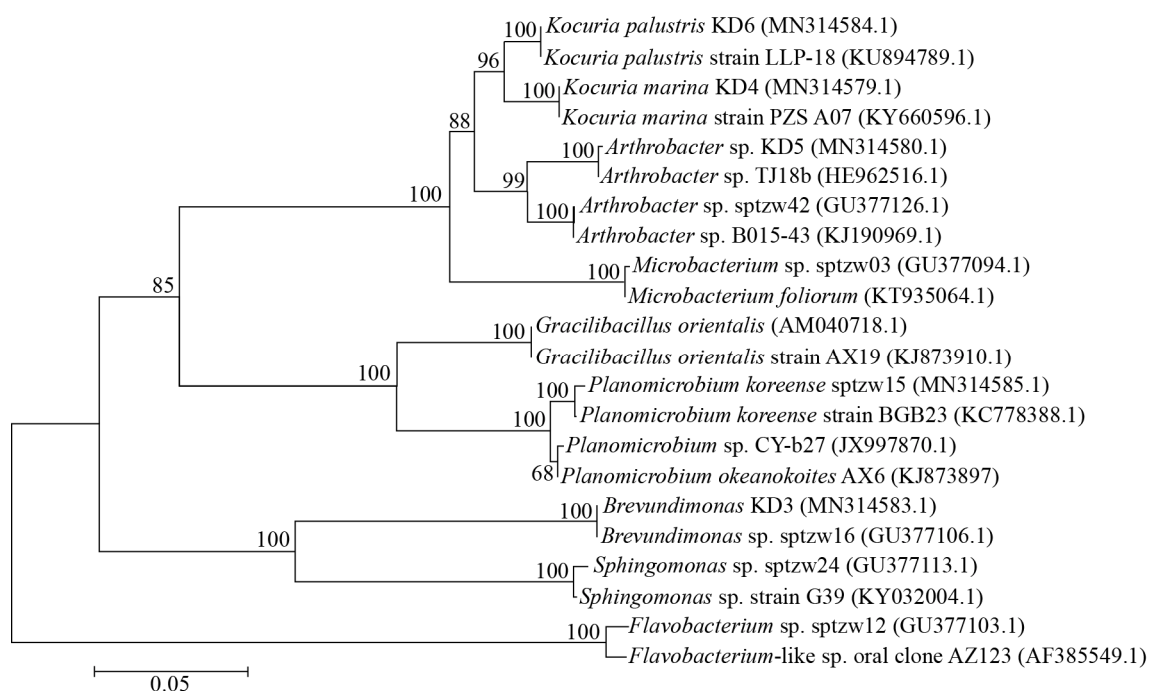


图 1 菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of the strains

注: 括号内数字: 菌株的 GenBank 序列号; 分支处数字: Bootstrap 支持率; 标尺: 5% 差异的分支长度。

Note: Numbers in brackets: GenBank accession numbers of the strain; Numbers in branch points: Percentages supported by bootstrap; Bar: 5% nucleotide divergence.

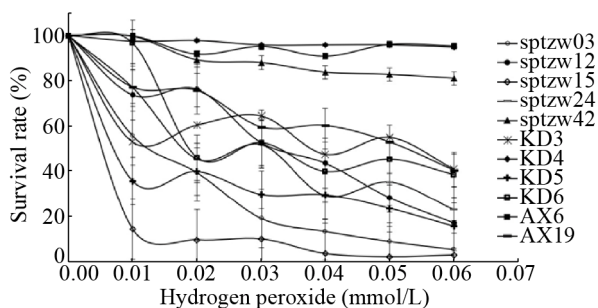


图2 过氧化氢处理下荒漠土壤细菌存活率曲线
Figure 2 Survival curve of bacteria in desert soils treated with hydrogen peroxide stress

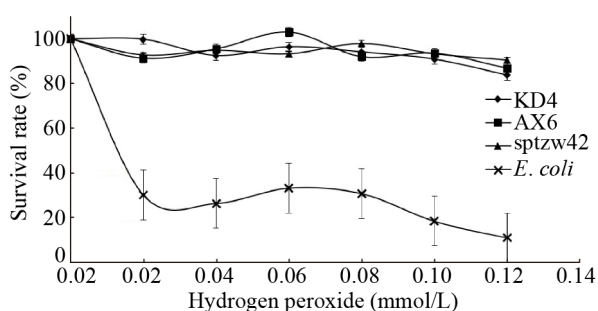


图3 过氧化氢处理下菌株 KD4、AX6、sptzw42 存活率曲线
Figure 3 Survival curve of strains KD4, AX6, sptzw42 treated with hydrogen peroxide

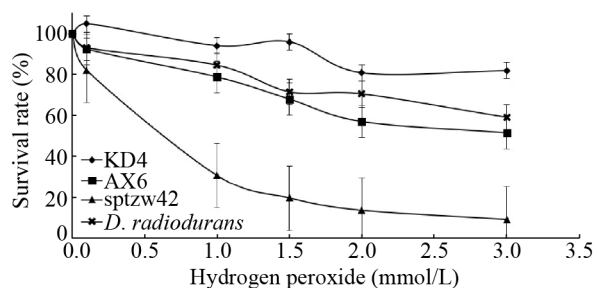


图4 较高浓度过氧化氢处理下菌株 KD4、AX6、sptzw42 存活率
Figure 4 Survival curves of strains KD4, AX6, sptzw42 treated with higher concentration hydrogen peroxide

在 60.00% 和 80.81%。sptzw42 存活率在 0.5 mmol/L 处明显下降, 在 3 mmol/L 处存活率低至 8.96%。随着过氧化氢浓度的持续升高, 菌株 AX6、KD4 的存活率明显高于其他菌株。

2.3 抗氧化菌株在氧化环境中的生长曲线

抗氧化菌株 AX6、KD4 在不同浓度过氧化氢

处理下的生长曲线如图 5、图 6 所示。随着过氧化氢浓度的升高, 菌株 AX6、KD4 适应期增加, 在过氧化氢为 1.5 mmol/L 时生长浓度最高, OD_{600} 分别为 2.66 和 10.71。菌株生长曲线测定表明, 菌株 AX6 和 KD4 在过氧化氢浓度高于 1.5 mmol/L 时, 菌株的适应期长, 对数期生长速率低, 稳定期的菌液浓度也低。因此确定 1.5 mmol/L 的过氧化氢浓度是 AX6 和 KD4 的最优耐受氧化浓度。

2.4 抗氧化菌株丙二醛含量及抗氧化酶活性

不同浓度过氧化氢处理下, 抗氧化菌株丙二醛含量如图 7A 所示。用 1.5 mmol/L 浓度过氧化氢处理后, 菌株 AX6 的丙二醛含量显著上升 ($P < 0.05$), 但是其含量显著低于阴性对照大肠杆菌 ($P < 0.05$), KD4 则无显著上升趋势。相比于普通细菌, 菌株 AX6、KD4 在氧化环境中受到氧化损害的程度更小。

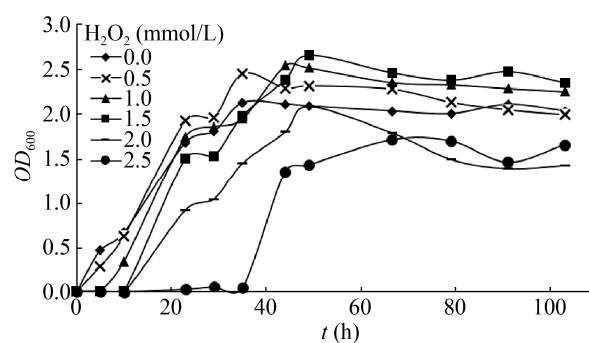


图5 不同浓度过氧化氢条件下菌株 AX6 生长曲线
Figure 5 Growth curve of strain AX6 in different concentrations hydrogen peroxide

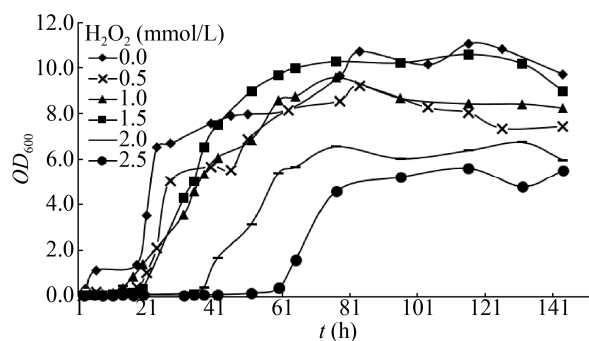


图6 不同浓度过氧化氢条件下菌株 KD4 生长曲线
Figure 6 Growth curve of strain KD4 in different concentrations hydrogen peroxide

用 3 mmol/L 浓度过氧化氢处理之后, 菌株 KD4 的丙二醛含量显著低于大肠杆菌($P<0.05$), 说明菌株 KD4 在高浓度过氧化氢条件下细胞受损程度较低。

不同浓度过氧化氢处理下抗氧化菌株 SOD 活性如图 7B 所示。随着过氧化氢浓度增加菌株 AX6 与 KD4 的 SOD 活性显著下降($P<0.05$), SOD 活性呈现低过氧化氢浓度时最高, 高过氧化氢浓度时最低的变化趋势, 且与对照菌株相比无显著差异。表明在过氧化氢为主要氧化物质的环境中, 抗氧化菌株 AX6、KD4 的 SOD 抗氧化作用并未启动。

不同浓度过氧化氢处理下抗氧化菌株 CAT 活性如图 8A 所示。1.5 mmol/L 过氧化氢处理后, 菌株 AX6、KD4 的 CAT 活性显著降低($P<0.05$); 3 mmol/L 过氧化氢处理后, 菌株 KD4 酶活性显著升高($P<0.05$)。表明在受到较高浓度过氧化氢胁迫时菌株 KD4 通过 CAT 抗氧化作用来抵抗氧化胁迫, 而菌株 AX6 的 CAT 抗氧化作用不明显。

不同浓度过氧化氢处理下抗氧化菌株 GSH-Px 活性如图 8B 所示。1.5 mmol/L 过氧化氢处理后, 菌株 AX6 的谷胱甘肽过氧化物酶活性显著升高达

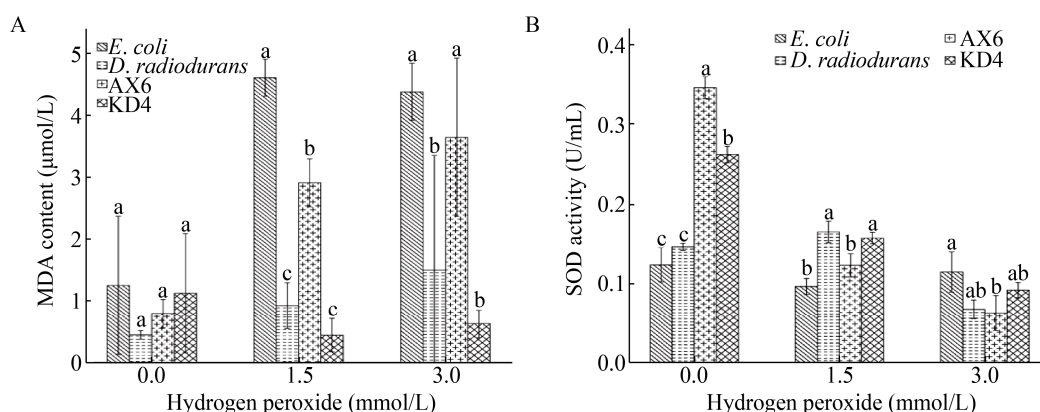


图 7 不同浓度过氧化氢处理菌株丙二醛含量(A)以及超氧化物歧化酶活性(B)

Figure 7 Level of malondialdehyde (A) and activity of superoxide dismutase (B) of strains treated with different concentrations hydrogen peroxide

注: 不同的小写字母表示处理之间在统计学上差异显著($P<0.05$). 下同.

Note: The different lowercases represent statistically significant difference ($P<0.05$). The same below.

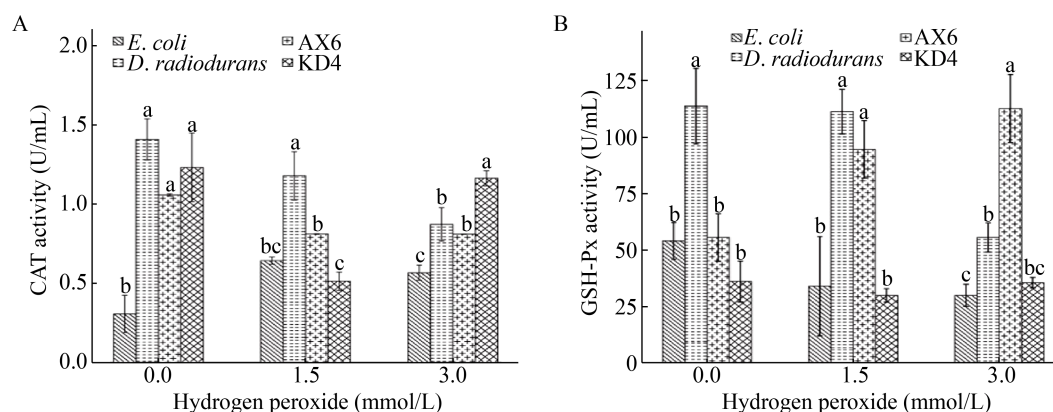


图 8 不同浓度过氧化氢处理菌株过氧化氢酶(A)以及谷胱甘肽过氧化物酶活性(B)

Figure 8 Activity of catalase (A) and glutathione peroxidase (B) of strains treated with different concentrations hydrogen peroxide

108.33 U/mL ($P<0.05$), 3 mmol/L 过氧化氢处理后, 菌株 AX6 的酶活性显著高于耐辐射球菌($P<0.05$); 而菌株 KD4 的酶活性没有显著变化。表明菌株 AX6 在受到过氧化氢胁迫时主要依靠谷胱甘肽过氧化物酶来抵抗氧化胁迫, 而 KD4 则没有这样的特征。

虽然 SOD 是生物体中分布广泛的抗氧化酶, 但在过氧化氢胁迫下, 两株抗氧化细菌并没有利用 SOD 进行抗氧化。一方面, SOD 是将超氧化物转化为过氧化氢, 过氧化氢为主的氧化环境抑制了 SOD 产生过氧化氢的过程, 导致 SOD 活性下降^[17]。另一方面, 过多的 SOD 会与 CAT 结合, 导致细胞清除过氧化氢的能力下降^[18], 因而细胞主动抑制 SOD 的活性升高。两株菌可能分别通过上调 CAT 与 GSH-Px 合成相关酶清除过氧化氢, 从而表现出抗氧化特性。

2.5 抗氧化菌株清除各氧化物质能力

荒漠土壤中存在大量的羟自由基和超氧阴离子自由基。荒漠中强烈的紫外辐射激发大气中的原子产生超氧阴离子自由基, 氧与水反应生成羟自由基^[19]。羟自由基和超氧阴离子自由基具有较强的氧化性, 可引起高氧中毒和细胞损伤^[20]。另外, 在实验室中通常用 DPPH 自由基清除率判定物质抗氧化能力。因此测定了羟自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH 的清除率来表征抗氧化菌株的抗氧化

化生理生化特征。

不同浓度过氧化氢处理后抗氧化菌株的超氧阴离子自由基清除率如图 9A 所示。1.5 mmol/L 浓度过氧化氢处理后的菌株 AX6 和 KD4 对超氧阴离子自由基清除率均显著上升($P<0.05$)分别达到 18.33% 和 13.54%。表明低过氧化氢诱导可以提高菌株 AX6 和菌株 KD4 的超氧阴离子自由基清除能力。

不同浓度过氧化氢处理后抗氧化菌株的羟自由基清除率如图 9B 所示。在 1.5 mmol/L 浓度过氧化氢处理时, 菌株 KD4 的羟自由基清除能力显著增加($P<0.05$), 最高清除率为 71.21%, 在 3 mmol/L 过氧化氢处理后清除率与阳性对照耐辐射球菌无显著差异。说明在低过氧化氢诱导下菌株 KD4 对羟基自由基的清除能力会被激发。

不同浓度过氧化氢处理后抗氧化菌株的 DPPH 清除率如图 10 所示。菌株 AX6 的 DPPH 清除能力显著高于阴性对照大肠杆菌($P<0.05$), 且在 3 mmol/L 的过氧化氢处理后清除能力与阳性对照耐辐射球菌无显著差异。说明抗氧化菌株 AX6 具有良好的 DPPH 清除能力, 在过氧化氢胁迫下清除能力并未受到影响。

菌株 AX6 具有良好的 DPPH 清除能力, Boujida 等^[21]分离出来的抗氧化嗜盐菌同样具有较好的 DPPH 清除能力, 说明在较小的氧化胁迫下其对超氧阴离子自由基清除能力能够被激发, 相比之下菌株

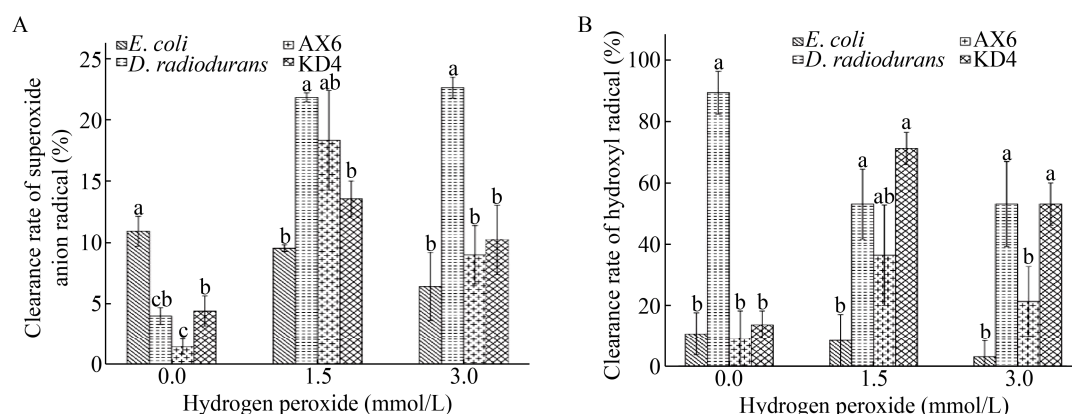


图 9 不同浓度过氧化氢处理菌株超氧阴离子自由基(A)以及羟自由基清除率(B)

Figure 9 Clearance rate of superoxide anion radical (A) and hydroxyl radical (B) of strains treated with different concentrations hydrogen peroxide

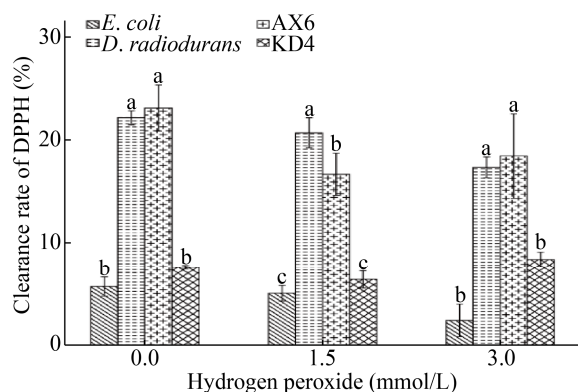


图 10 不同浓度过氧化氢处理菌株 DPPH 清除率

Figure 10 Clearance rate of DPPH of strains treated with different concentrations hydrogen peroxide

KD4 只是在羟自由基清除方面有较为突出的能力, 在低浓度过氧化氢环境中这种能力被激发。

3 讨论与结论

荒漠中的年平均太阳辐射可达到 334 W/m^2 , 这种程度的太阳辐射不仅直接对生物造成光损伤^[22], 还会形成一个高氧化强度的环境。为了避免自身结构功能以及繁殖受到影响, 荒漠土壤微生物体内外会产生一系列抗氧化过程相关反应。不同的荒漠土壤微生物中发生的抗氧化过程不尽相同, 不同的生理生化特征包括细胞膜损伤、抗氧化酶活性和活性氧清除能力, 从而表现出抗氧化能力的差异性。

3.1 抗氧化细菌的筛选

短时的氧化处理下, 菌株的存活率可以表征菌株的氧化应激反应强度^[23]。从荒漠土壤中培养得到的细菌氧化耐受能力差异明显, 在较高的过氧化氢浓度中筛选出高存活率菌株海床动性微菌 AX6 (*Planomicrobium okeanoikoites* AX6) 和海洋考克氏菌 KD4 (*Kocuria marina* KD4) 具有强的氧化应激反应, 说明这两个菌株的抗氧化能力强。海床动性微菌曾在波斯湾海水、中国福建东海岸带的沉积物、中国 1 号冰川以及内蒙古地质公园的土壤中被分离得到, 研究表明它具有耐低温、耐盐特性, 因此能在不同环境中广泛分布^[24-28]。同样地, 有研究表明海洋考克氏菌具有耐碱、耐盐特性, 它曾在特

罗坦湾、印度的科瓦兰盐场中被分离出来^[29-31], 其具有适应荒漠氧化环境的能力或许与这些抗逆特性有关。

3.2 抗氧化细菌的酶活性以及自由基清除能力

抗氧化菌株要维持自身在氧化环境中正常生命活动, 一方面要防止自身细胞结构受到损伤, 另一方面对外界和体内的活性氧进行清除^[32]。本研究证实在氧化条件下, 2 株抗氧化细菌受到的细胞氧化损伤低于普通土壤菌株, 并通过不同种类抗氧化酶以及活性氧清除能力来抵抗氧化胁迫。

菌株 KD4 和 AX6 的主要抗氧化过程分别依靠 CAT 和 GSH-Px 分解过氧化氢。值得注意的是, 绝大部分革兰氏阳性菌不能自主合成 GSH-Px 抗氧化过程反应中所需底物谷胱甘肽, 现有报道中只有 2 种革兰氏阳性菌具有这种能力^[33], 菌株 AX6 表现出较高活性的 GSH-Px, 可以进一步探明 GSH-Px 在革兰氏阳性菌中的作用过程, 补充完善细菌抗氧化系统的作用机理。

其次, 菌株 AX6 在清除超氧阴离子自由基和 DPPH 时表现出良好的能力, 而菌株 KD4 在清除羟自由基时表现出突出的能力。菌株 AX6 与 KD4 在过氧化氢氧化胁迫下表现出的突出抗氧化酶活性以及自由基清除能力帮助细菌清除了体内外的活性氧, 保护菌株不受损伤。但两株菌表现出来的生理特征不尽相同, 说明了抗氧化过程的多样性。

3.3 展望

某些细菌在具有抗干旱能力、抗辐射能力和抗盐碱能力的同时具备抗氧化能力, 使它们具备这些抗性的进化适应机制一直是研究热点, 因此对其生态适应机制的研究具有重要生态学意义。本研究对荒漠土壤中抗氧化细菌的生理生化特征做研究, 发现不同的细菌其抗氧化特征不尽相同, 且这些抗氧化菌株存在其他抗性。单从细胞层面挖掘不同逆境中抗氧化机制的多样性以及不同抗性机制之间的联系是远远不够的, 这方面工作需要从分子层面展开研究。

此外, 抗氧化制剂在医药、健康、食品和工业都广泛应用并且消费量逐年增加, 由于合成抗氧化剂的毒性问题, 开发利用天然抗氧化剂已成为近年来抗氧化剂研发的新热点。现有的天然抗氧化剂主要来源于植物, 较传统的植物提取而言, 微生物发酵提取抗氧化剂有着诸多优势, 但目前关于微生物源性抗氧化剂的研究很少。本研究中的抗氧化菌株具有较高的抗氧化酶活性, 因此从极端干旱环境生存的微生物中寻找天然的抗氧化活性物质或抗氧化酶是一种新的并且可行的途径。在分子生物技术创新和成本下降的条件下, 通过不断挖掘荒漠微生物抗氧化基因资源, 荒漠环境抗氧化微生物资源开发将得到新的机遇。

REFERENCES

- [1] Gutteridge JMC, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, 899(1): 136-147
- [2] Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species[J]. *International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2000, 3(1): 3-8
- [3] Thapa G, Sadhukhan A, Panda SK, et al. Molecular mechanistic model of plant heavy metal tolerance[J]. *Biometals*, 2012, 25(3): 489-505
- [4] Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation[J]. *International Journal of Radiation Biology*, 1994, 65(1): 27-33
- [5] Zhang TG, Li QL, Diao ZH, et al. Effects of salt and drought stresses on antioxidant system and *RbohC* and *RbohF* genes expression in *Brassica campestris*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(3): 969-978 (in Chinese)
张腾国, 李巧丽, 刁志宏, 等. 盐及干旱胁迫对油菜抗氧化系统和 *RbohC*、*RbohF* 基因表达的影响[J]. *应用生态学报*, 2019, 30(3): 969-978
- [6] Pandit AS, Joshi MN, Bhargava P, et al. A snapshot of microbial communities from the Kutch: one of the largest salt deserts in the World[J]. *Extremophiles*, 2015, 19(5): 973-987
- [7] Paulino-Lima IG, Azua-Bustos A, Vicuña R, et al. Isolation of UVC-tolerant bacteria from the hyperarid Atacama Desert, Chile[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 65(2): 325-335
- [8] Lim S, Jung JH, Blanchard L, et al. Conservation and diversity of radiation and oxidative stress resistance mechanisms in *Deinococcus species*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43(1): 19-52
- [9] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges[J]. *Analytical Biochemistry*, 2017, 524: 13-30
- [10] Bao L, Hong LY, Lou DL. Dynamic observation of superoxide dismutase and malondialdehyde in toxic bacterial dysentery[J]. *Clinical Medicine*, 1996, 16(2): 36-37 (in Chinese)
包玲, 洪连云, 楼德理. 中毒性细菌性痢疾超氧化物歧化酶及丙二醛的动态观察[J]. *临床医学*, 1996, 16(2): 36-37
- [11] Chen LL, Zhang W, Wang ZX, et al. Determination of superoxide dismutase activity in methanobactin-copper complexes by pyrogallol autoxidation[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2017, 8(9): 3438-3444 (in Chinese)
陈林林, 张伟, 王振兴, 等. 邻苯三酚自氧化法测定甲烷氧化菌素-铜配合物的超氧化物歧化酶活性[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(9): 3438-3444
- [12] Nakayama M, Nakajima-Kambe T, Katayama H, et al. High catalase production by *Rhizobium radiobacter* strain 2-1[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(6): 554-558
- [13] Das D, Goyal A. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2015, 61(1): 263-268
- [14] Wang YC, Yu RC, Chou CC. Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria[J]. *Food Microbiology*, 2006, 23(2): 128-135
- [15] Lee BJ, Kim JS, Kang YM, et al. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods[J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(1): 271-276
- [16] Makhallanyane TP, Valverde A, Gunnigle E, et al. Microbial ecology of hot desert edaphic systems[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(2): 203-221
- [17] Macmillan-Crow LA, Crow JP. Does more MnSOD mean more hydrogen peroxide?[J]. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2011, 11(2): 178-180
- [18] Mao GD, Thomas PD, Lopaschuk GD, et al. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(1): 416-420
- [19] Georgiou CD, Sun HJ, McKay CP, et al. Evidence for photochemical production of reactive oxygen species in desert soils[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7100
- [20] Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(35): 27986-28006
- [21] Boujida N, Palau M, Charfi S, et al. Isolation and characterization of halophilic bacteria producing exopolymers with emulsifying and antioxidant activities[J].

- Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 16: 631-637
- [22] McKay CP, Friedmann EI, Gómez-Silva B, et al. Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: four years of observations including the El Niño of 1997-1998[J]. Astrobiology, 2003, 3(2): 393-406
- [23] Zhang N, Jiang JC, Yang J, et al. Study on the relationship between survival rate and total antioxidant capacity (T-AOC) of microbe implanted by N^+ ion[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2012, 30(5): 316-320 (in Chinese)
张宁, 蒋剑春, 杨静, 等. 离子注入微生物存活率与总抗氧化能力(T-AOC)的关系[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2012, 30(5): 316-320
- [24] Akbari E, Beheshti-Maal K, Nayeri H. Production and optimization of alkaline lipase by a novel psychrotolerant and halotolerant strain *Planomicrobium okeanoites* ABN-IAUF-2 isolated from Persian gulf[J]. International Journal of Medical Research & Health Sciences, 2016, 5(4): 139-148
- [25] Luo XN, Zhang JL, Li D, et al. *Planomicrobium soli* sp. nov., isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(8): 2700-2705
- [26] Zhang DC, Liu HC, Xin YH, et al. *Planomicrobium glaciei* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a glacier[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(6): 1387-1390
- [27] Dai X, Wang YN, Wang BJ, et al. *Planomicrobium chinense* sp. nov., isolated from coastal sediment, and transfer of *Planococcus psychrophilus* and *Planococcus alkanoclasticus* to *Planomicrobium* as *Planomicrobium psychrophilum* comb. nov. and *Planomicrobium alkanoclasticum* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(2): 699-702
- [28] Ramezani M, Nikou MM, Pourmohyadini M, et al. *Planomicrobium iranicum* sp. nov., a novel slightly halophilic bacterium isolated from a hypersaline wetland[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(5): 1433-1437
- [29] Kim SB, Nedashkovskaya OI, Mikhailov VV, et al. *Kocuria marina* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from marine sediment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(5): 1617-1620
- [30] Sarafin Y, Donio MBS, Velmurugan S, et al. *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2014, 21(6): 511-519
- [31] Horiuchi A, Kubota N, Hidaka E, et al. Notable alkaline tolerance of *Kocuria marina* isolate from blood of a pediatric patient with continuous intravenous epoprostenol therapy[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2015, 21(9): 680-686
- [32] Wu TT, Huang Q, Wang XL, et al. Mechanistic investigation on ROS resistance of phosphorothioated DNA[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 42823
- [33] Fu RY, Chen J, Li Y. The function of glutathione/glutathione peroxidase system in the oxidative stress resistance systems of microbial cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(5): 770-775 (in Chinese)
付瑞燕, 陈坚, 李寅. 谷胱甘肽/谷胱甘肽过氧化物酶系统在微生物细胞抗氧化胁迫系统中的作用[J]. 生物工程学报, 2007, 23(5): 770-775