

铜胁迫对苜蓿中华根瘤菌抗氧化酶系的影响

马占强^{1,2}, 赵龙飞¹, 王莉¹, 李哲斐¹, 韦革宏^{1*}

(1.西北农林科技大学生命科学学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2.河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471003)

摘要: 探讨铜胁迫对苜蓿中华根瘤菌抗氧化酶系的影响, 揭示苜蓿中华根瘤菌对铜的生理抗性机制。以铜抗性菌株 *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 和铜敏感性 *S. meliloti* CCNWSX 0018 为材料, 测定其对铜的最小抑制浓度(MIC)和最大耐受浓度(MTC)及不同铜浓度对其抗氧化保护酶活性的变化。结果表明: (1)在 YMA 固体培养基上, *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX 0018 的 MIC 分别为 0.5 mmol·L⁻¹ 和 0.2 mmol·L⁻¹ Cu²⁺, MTC 分别为 1.8 mmol·L⁻¹ 和 0.8 mmol·L⁻¹ Cu²⁺。(2)Cu²⁺浓度≤0.4 mmol·L⁻¹ 时, *S. meliloti* CCNWSX0020 菌体内的 SOD、CAT 和 GPX 活性变化不显著; *S. meliloti* CCNWSX 0018 菌体内的 SOD、CAT 和 GPX 活性显著升高; Cu²⁺浓度为 0.6 mmol·L⁻¹ 和 0.8 mmol·L⁻¹ 时, 前者 SOD、CAT 和 GPX 活性显著升高, 后者保护酶活性开始降低。随着 Cu²⁺浓度升高, *S. meliloti* CCNWSX0020 的 GR 活性增强, 与对照相比, Cu²⁺浓度为 0.8 mmol·L⁻¹ 时 GR 活性提高了 110.51%; 而 *S. meliloti* CCNWSX 0018 的 GR 活性则反之。(3)在 Cu²⁺浓度≤0.8 mmol·L⁻¹ 胁迫下, 抗性菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 可通过提高 SOD、CAT、GPX、GR 的活性以降低 Cu²⁺的毒害效应, 为丰富根瘤菌抗铜机制提供了理论基础。

关键词: 苜蓿中华根瘤菌; 铜胁迫; 抗氧化酶

中图分类号: Q945.78 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2011)06-1058-06

Effects of Copper Stress on Antioxidant Enzymes of *Sinorhizobium Meliloti*

MA Zhan-qiang^{1,2}, ZHAO Long-fei¹, WANG Li¹, LI Zhe-fei¹, WEI Ge-hong^{1*}

(1. College of Life Science, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, China; 2. College of Agronomy, Henan Sci-Tech University, Luoyang 471003, China)

Abstract: The physiological mechanism of the resistance to heavy metal stress in rhizobium could be explored through the research on its antioxidant activity. Strain *S. meliloti* CCNWSX0020 exhibited high intrinsic tolerance to copper and therefore was used in this work to study the physiological mechanism of the bacterial responses to copper stress, and compared with copper-sensitive stain *S. meliloti* CCNWSX 0018. The results showed that the activities of SOD, CAT, GPX and GR in *S. meliloti* CCNWSX0020 significantly increased in 0.6 mmol·L⁻¹ Cu²⁺, and their activities reached the maximum levels in 0.8 mmol·L⁻¹ Cu²⁺. In comparison, the activities of SOD and CAT in *S. meliloti* CCNWSX 0018 significantly increased in 0.2 mmol·L⁻¹ Cu²⁺, and the activity of GPX increased in 0.4 mmol·L⁻¹ Cu²⁺, while the activity of GR decreased in copper-stress. These results indicated that copper-resistant strain *S. meliloti* CCNWSX0020 could reduce the damage of copper stress by enhancing the activities of SOD, CAT, GPX and GR, which could be the physiological basis for the copper-resistance in rhizobium.

Keywords: *Sinorhizobium meliloti*; copper stress; antioxidase

铜是微生物生长发育过程中必不可少的微量元素, 是超氧化物歧化酶、氨基氧化酶、络氨酸酶等蛋白

质的重要辅助因子, 参与呼吸代谢中的氧化还原反应和电子接受与传递等多种生理代谢过程。在微生物抵抗外界氧化胁迫、蛋白质合成和细胞生长发育中发挥着重要作用^[1]。但是, 过量的铜能使脂类和蛋白质氧化, 产生过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 对微生物的细胞结构、细胞分裂、酶学系统等产生毒害, 影响微生物生长发育^[2]。为了适应 Cu、Cd、Zn、Pb等重金属胁迫, 微生物体内形成了 6 类相应的抗性或解

收稿日期: 2010-10-19

基金项目: 国家自然科学基金(30970003, 30670372); 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2015ZDKG-59)

作者简介: 马占强(1978—), 男, 河南南乐人, 在读博士, 主要从事微生物重金属抗性机制研究。E-mail: mzqnx@163.com

* 通讯作者: 韦革宏 E-mail: weigehong@yahoo.com.cn

毒机制,包括细胞外排、胞外沉淀、胞内扣押或隔离、主动输出、酶类解毒及降低细胞对重金属敏感性^[3]。这些机制一是可以通过外排作用将重金属离子主动从细胞中排出,从而减少对该离子的富集,由P-型ATP酶运载、CDF(cation diffusion facilitator)阳离子扩散家族运载或CzcCBA-介导外流离子而保护细胞;二是重金属离子可以与含硫醇分子如各种金属螯合物和金属硫蛋白等结合形成复杂的化合物而在胞内被隔离开;三是通过酶促或化学反应,将有毒的物质还原成无毒或低毒物质。此外,微生物还通过胞外多聚物吸收、外膜或细胞壁结合、胞内吸收、重金属盐形式沉淀和金属硫蛋白类蛋白的产生而增加对重金属的抗性。目前,大量的研究集中于前4类,对微生物如何降低细胞对重金属敏感性和酶类解毒研究较少^[4-6],而微生物降低细胞对重金属敏感性机制主要指抗氧化系统的保护作用,包括抗氧化酶类如超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)和低分子量的非酶抗氧化剂如还原型谷胱甘肽(GSH)及参与GSH循环的GSH过氧化物酶(GPX)和GSH还原酶(GR)。

不同微生物细胞抵抗氧化胁迫的生理功能不尽相同。微生物抗氧化机制在真核微生物中已有部分报道^[7-8]。在原核生物中,革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为模式种,研究者对其抗氧胁迫的研究较为深入,而对其他原核微生物特别是革兰氏阴性菌的抗氧化机制研究国内外相对较少。目前,已在部分革兰氏阴性菌中发现SOD基因*sodA*^[9],CAT基因*katA*、*katB*和*katC*^[10],GSH基因*gsh1*、*gsh2*、*gor*和*gpx*^[11],但很少报道这些革兰氏阴性菌中关于抗氧化系统的生理作用。根瘤菌作为革兰氏阴性菌,是土壤中广泛分布的一类能与豆科植物共生结瘤固氮的重要农业微生物资源,根瘤菌-豆科植物的共生固氮体系是生物固氮体系的重要组成。高浓度的重金属对结瘤和固氮产生限制,影响到植物根系发育和营养元素的吸收^[12-13],也会对豆科植物根和根瘤的抗氧化系统产生影响^[14-16],而单一根瘤菌在重金属胁迫下的抗氧化生理作用还很少报道。

在研究中,我们从陕西凤县铅锌尾矿区分离出一株铜抗性根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX-0020,在YMA固体培养基上最高可抗 $1.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cu}^{2+}$,对其抗铜机制进行的研究表明,*S. meliloti* CCNWSX0020可以通过吸附、胞外沉淀来降低Cu的毒性,也可以通过能量介导的输出系统来降低Cu的毒性^[17]。本文以铜敏感性菌株 *S. meliloti* CCNWSX 0018

为参比菌株,研究不同水平的铜胁迫对 *S. meliloti* CCNWSX0020的抗氧化酶类活性的影响,探讨其对重金属铜污染的响应,以期阐明根瘤菌在铜胁迫下的抗氧化机制,为丰富根瘤菌抗铜机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养

菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 在YMA固体培养基(甘露醇10g,酵母粉3g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, NaCl 0.1g, 琼脂粉18g, 蒸馏水1000mL, pH 7.0)划线培养,挑单菌落于5mL TY液体培养基(胰蛋白胨5g, 酵母酶解粉3g, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.6g, pH 7.0)中培养至指数期,备用。

1.2 最小抑制浓度(MIC)和最大抗性水平(MTC)的确定

最小抑制浓度(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)是指培养基中重金属离子超过MIC值,细菌的生长就会受到抑制。最大耐受浓度(Maximal Tolerance Concentration, MTC)是指细菌对某一重金属离子的耐受临界浓度,超过这一浓度细菌即停止生长。MIC和MTC的确定采用梯度平板培养法,即YMA固体培养基中加入系列浓度重金属,使用 CuCl_2 、 $\text{CdCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 NiSO_4 和 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 。*S. meliloti* CCNWSX0020和*S. meliloti* CCNWSX0018在TY液体培养基中培养至指数期,于 $8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、5min离心收集菌体,用无菌水洗涤2次。采用多点接种法,吸取100 μL 菌悬液到多点接种器槽内,然后接种到含不同浓度重金属离子的YMA平板培养基上,于28℃、黑暗条件培养5~7d,观察菌株的生长情况。

1.3 酶活性的测定

1.3.1 细胞破碎和酶液制备

培养指数期的 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 按1%的接菌量接种于含 Cu^{2+} 为0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 250mL的TY液体培养基中,于28℃、 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养72h后,于4℃、 $8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5min收集菌体。菌体用4℃预冷的磷酸缓冲液(0.05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.8)洗涤3次,迅速置于无菌的干滤纸上,吸去表面残余液。称量1g菌体置于10mL的离心管中,加入4mL、4℃预冷的磷酸盐提取液(0.05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.8, 含1% PVP),混匀,置于冰上超声波破壁,4℃、 $15000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15min,上清液即为抗氧化酶粗提液,保存

于-20℃,备用。

1.3.2 抗氧化物活性测定

SOD 活性采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法,以抑制 NBT 光化还原 50%为一个酶活性单位^[18]。CAT 活性采用紫外吸收法测定,以每分钟减少 0.1 个 OD₂₄₀ 值所需的酶量为 1 个酶活力单位^[19]。GSH 过氧化物酶(GPX)活性采用 5,5'-二硫代对二硝基苯甲酸(DTNB)法,以单位鲜重(g)的菌体在 37℃下每分钟使 GSH 的改变为总量的 0.001 时为一个酶活单位(扣除非酶反应的 GSH)^[20]。谷胱甘肽还原酶(GR)的活性采用 NADPH 法,以每分钟每毫克蛋白氧化 1 nmol NADPH 为一个活性单位^[20]。

2 结果与分析

2.1 菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 的 MIC 和 MTC

评价细菌对重金属的耐受能力通常采用 MIC 和 MTC。对菌株 *S. meliloti* CCNWS0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 在 6 种重金属离子下的 MIC 和 MTC 值进行测定,并与文献报道的一些重金属抗性根瘤菌在同样培养基上所测定的 MIC 和 MTC 进行比较。由表 1 可知,在含有不同重金属的培养基中,不同种属的根瘤菌的 MIC 和 MTC 差异较大,表明不同种属的根瘤菌对不同重金属的耐受能力不同。在 YMA 固体培养基上 *S. meliloti* CCNWSX0020 对 Cu 的 MIC 与 *Mesorhizobium loti* AY509218 相同,是其他抗性菌株的 2.5~5 倍;对 Cu 的 MTC 为 2 mmol·L⁻¹,是其他抗性菌株的 1.2~4 倍,表明菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 对 Cu 具有较好的抗性;同时 *S. meliloti* CCNWSX0020

对 Zn 的抗性也较好。与其他菌株相比,菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 对 Cd 和 Ni 抗性较差。而 *S. meliloti* CCNWSX0018 对 6 种重金属的 MIC 和 MTC 值都较低,抗性较差。

2.2 Cu²⁺胁迫对 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 的 SOD 和 CAT 活性的影响

图 1A 表明 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 的 SOD 活性随着 Cu²⁺浓度升高呈先上升后下降趋势。与 0.0 mmol·L⁻¹ Cu²⁺相比,Cu²⁺浓度为 0.6 mmol·L⁻¹ 和 0.8 mmol·L⁻¹ 时,前者 SOD 活性显著升高 ($P<0.05$),分别提高了 75.56%和 88.53%,且 Cu²⁺浓度为 0.8 mmol·L⁻¹ 时 SOD 活性最高。Cu²⁺浓度为 0.0 mmol·L⁻¹ 时,*S. meliloti* CCNWSX0018 与 *S. meliloti* CCNWSX0020 的 SOD 活性无明显差异;但 *S. meliloti* CCNWSX0018 在 0.2 mmol·L⁻¹ Cu²⁺时 SOD 活性就显著升高($P<0.05$),提高了 40.34%;在 0.4 mmol·L⁻¹ Cu²⁺时 SOD 活性达到最高,提高了 107.49%,比 *S. meliloti* CCNWSX0020 SOD 的最高活性高 9.02%。可见,*S. meliloti* CCNWSX0018 对 Cu²⁺比较敏感,低浓度 Cu²⁺就可引起 CCNWSX0018 的 SOD 活性显著升高,而菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 对 Cu²⁺具有较好的抗性。

由图 1B 可知,Cu²⁺对 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 的 CAT 活性影响的变化趋势与 SOD 活性变化一致。前者 CAT 活性在 ≤ 0.4 mmol·L⁻¹ Cu²⁺浓度下,没有发生显著变化;Cu²⁺浓度为 0.6 mmol·L⁻¹ 和 0.8 mmol·L⁻¹ 时,菌体内 CAT 活性显著升高($P<0.05$),与 0.0 mmol·L⁻¹ Cu²⁺相比分别提高了 114.14%和 168.84%。与 0.0 mmol·L⁻¹ Cu²⁺相比,*S.*

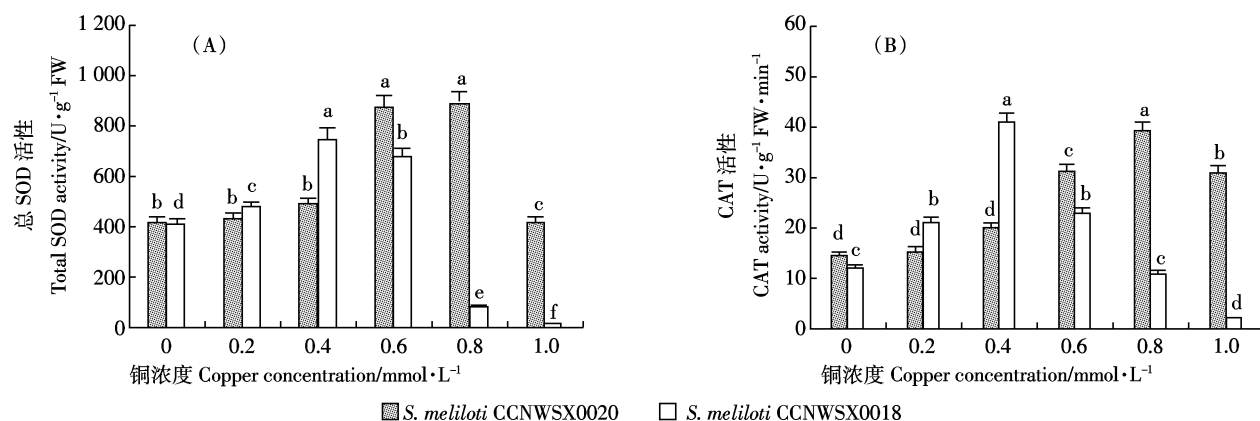
表 1 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 的 MIC 和 MTC 值(mmol·L⁻¹)与其他根瘤菌的比较

Table 1 The MIC and MTC(mmol·L⁻¹) of CCNWSX0020 and CCNWSX0018 comparing with other rhizobium

菌株 Strain	重金属 Heavy metal											
	Cd		Co		Cu		Ni		Pb		Zn	
	MIC	MTC	MIC	MTC	MIC	MTC	MIC	MTC	MIC	MTC	MIC	MTC
<i>S. meliloti</i> CCNWSX0020	0.06	0.2	0.6	2.5	0.5	1.8	2	4	0.5	2	0.5	2.5
<i>S. meliloti</i> CCNWSX0018	0.05	0.1	0.2	1	0.2	0.8	1	2.5	0.3	1.5	0.3	1.8
<i>S. meliloti</i> AH12	-	0.5	-	-	-	0.5	-	-	-	1.5	-	-
<i>S. medicae</i> CCNWSX1921-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. fredii</i> AY509242	0.1	-	1	-	0.1	-	2.5	-	5	-	0.5	-
<i>Bradyrhizobium</i> sp. 750	-	0.5	-	-	-	1.5	-	-	-	2	-	1
<i>Mesorhizobium loti</i> AY509218	0.1	-	0.1	-	0.5	-	5	-	5	-	0.5	-
<i>Rhizobium sllae</i> CCNWSX1294	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	2.5	-	2

注:“-”文中未给出。

Note: data in paper not mentioned.



图中不同小写字母表示同一菌株在不同铜胁迫下差异达到显著性差异($P<0.05$)。下同。

Values are the means ($n=3$) $\pm$ one standard error. Different superscripts letters represent significant differences ($P<0.05$) between values of the same strain at different copper concentration. The same below.

图1 铜对 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 的 SOD(A) 和 CAT(B) 活性的影响

Figure 1 Effects of copper on SOD(A) and CAT(B) activities in *S. meliloti* CCNWSX0020 and *S. meliloti* CCNWSX0018

meliloti CCNWSX0018 的 CAT 活性在 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 时就显著升高($P<0.05$), 提高了 75.89%; Cu^{2+} 浓度为 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 菌体内 CAT 活性最强, 提高了 259.11%; Cu^{2+} 浓度高于 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 菌体内 CAT 活性开始降低。

2.3 Cu^{2+} 胁迫对 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 的 GPX 和 GR 活性的影响

图 2A 表明 *S. meliloti* CCNWSX0020 的 GPX 活性呈现先升高后下降趋势, 与对照相比, Cu^{2+} 浓度 $\leq 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 GPX 活性没有发生显著变化; Cu^{2+} 为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 时, 菌体 GPX 活性显著提高($P<0.05$), 分别提高了 162.89% 和 345.43%; Cu^{2+} 浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 处理

相比显著下降($P<0.05$)。 Cu^{2+} 对 *S. meliloti* CCNWSX-0018 的 GPX 活性影响与 *S. meliloti* CCNWSX0020 变化趋势一致, 在 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 时 GPX 活性显著提高($P<0.05$), 且活性最高, 与 $0.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 相比 GPX 活性提高了 39.90%; 随着 Cu^{2+} 浓度增加 GPX 活性下降。

由图 2B 可知, 与 $0.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 相比, *S. meliloti* CCNWSX0020 的 GR 活性在 $\leq 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 时没有发生显著变化; Cu^{2+} 浓度为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 时, 菌体 GR 活性显著提高($P<0.05$), 分别提高了 75.72% 和 110.51%。随着 Cu^{2+} 浓度增加, *S. meliloti* CCNWSX0018 的 GR 活性则呈现下降趋势, 在 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 时, 菌体内 GR 活性显著下降($P<$

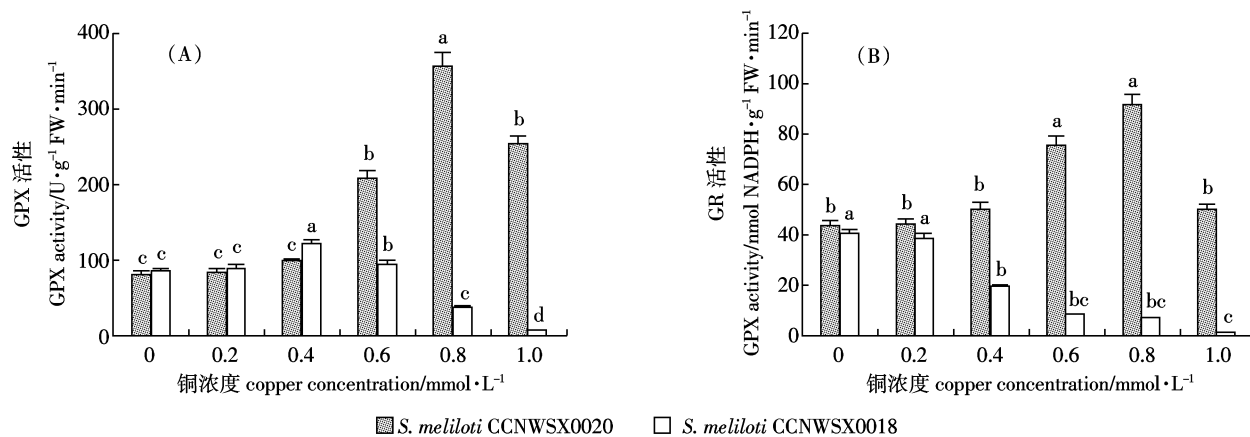


图2 铜对 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 的 GPX(A) 和 GR(B) 活性的影响

Figure 2 Effects of copper on GPX(A) and GR(B) activities in *S. meliloti* CCNWSX0020 and *S. meliloti* CCNWSX0018

0.05),与 $0.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 相比降低了 54.07%;随着 Cu^{2+} 浓度增加,菌体内 GR 活性进一步受到抑制。

3 讨论

在自然进化过程中,根瘤菌对有害物质和环境改变形成了一定的适应性,表现为根瘤菌的抗性,目前,已筛选出多种重金属抗性根瘤菌^[21-22]。MIC 和 MTC 是评价微生物抗重金属能力高低的重要指标,对 *S. meliloti* CCNWSX0020 和 *S. meliloti* CCNWSX0018 在 6 种重金属离子下的 MIC 和 MTC 值进行测定,并与已知抗性根瘤菌比较。由表 1 可知,菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 对铜具有很好的抗性,而 *S. meliloti* CCNWSX0018 抗性较差,为敏感性菌株。

细菌耐受重金属胁迫与抗氧化酶活性的高低有重要关系^[23]。Bhattacharyya 等研究表明 *Rhizopus arrhizus* 受到 Pb 胁迫时 SOD 和 CAT 对清除 H_2O_2 具有重要作用^[24]。试验中, Cu^{2+} 浓度 $\leq 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,铜抗性菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 体内的保护酶 SOD 和 CAT 活性没有显著升高,而敏感性菌株 *S. meliloti* CCNWSX0018 体内 SOD 和 CAT 活性显著升高,可能是抗性菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 分泌的脂多糖等胞外分泌物使 Cu^{2+} 发生胞外沉淀,不足以引起胞内产生过多的 ROS;敏感性菌株为了适应 Cu^{2+} 胁迫,SOD 和 CAT 活性显著升高,是根瘤菌抗铜胁迫的一种防卫响应。 Cu^{2+} 浓度 $> 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时,可能胞外沉淀不能完全阻止 Cu^{2+} 对菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 的毒害,菌体内 SOD 和 CAT 活性显著升高,以清除菌体内过多的 O_2^- 和 H_2O_2 ,降低 ROS 毒性效应; Cu^{2+} 浓度 $> 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Cu^{2+} 毒害效应超出了保护酶的防御能力,保护酶系统破坏,SOD 和 CAT 活性降低。菌株 *S. meliloti* CCNWSX0018 体内的 SOD 和 CAT 活性在 Cu^{2+} 浓度为 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 达到最高,且高于 *S. meliloti* CCNWSX0020 内的 SOD 和 CAT 活性,表明 *S. meliloti* CCNWSX0018 对 Cu^{2+} 比较敏感,低浓度 Cu^{2+} 就可引起 *S. meliloti* CCNWSX0018 的 SOD 和 CAT 活性显著升高,而菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 对 Cu^{2+} 具有较好的耐性。此外,试验中没有检测到 POD 的活性,可能是两株菌种没有 POD 的相关基因,对 *S. meliloti* 1021 全基因组分析,发现其不含 POD 基因,但含有 SOD 基因 *sodB*、*sodC* 和 CAT 基因 *catA*、*catB*、*catC*。

GPX 和 GR 是 GSH 过氧化物系统抵御外界氧化胁迫的重要保护酶,可以直接和间接清除细胞内过多

的 H_2O_2 。在 GSH/GPX 系统中,GSH 经 GPX 氧化生成 GSSG,GSSG 通过 GR 再被还原成 GSH。根瘤菌的 GSH 合成、消耗和所处的氧化还原状态在根瘤菌对 Cd、盐和酸胁迫忍耐中起重要作用^[25-26]。试验中, Cu^{2+} 浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,抗性和敏感性菌株的 GPX 活性都没有显著变化,可能是机体内其他抗氧化系统(如 SOD)的介入,菌体内活性氧浓度水平较低造成的。 Cu^{2+} 浓度 $> 0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,两者 GPX 活性都提高。已有的一些研究表明植物和微生物受到重金属胁迫时会发生氧化应激反应,其表现之一即为体内 GSH 含量会在一定程度上明显增加,而 GPX 活性也往往随着 GSH 含量的增加而增加^[24,27]。实际上,GSH 和 GPX 的这种应激反应是受时间和重金属剂量影响的,本研究 Cu 胁迫 72 h,属于慢性染毒,抗性菌株 GPX 活性明显高于敏感菌株,是生物体内多个抗氧化系统作用的结果。 Cu^{2+} 浓度 $> 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,抗性菌株的 GPX 活性又开始降低,说明 GPX 抗氧化防御系统的调节能力是有限的,当胁迫超过调节极限时,ROS 与抗氧化系统之间的动态平衡就会被破坏。在 Cu^{2+} 浓度 $< 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,只有抗性菌株的 GR 活性提高,持续把 GSSG 还原成 GSH,也为 GPX 提供了一定水平的底物,使 GPX 活性维持在较高水平,共同参与抗氧化作用,抵制 ROS 破坏^[28]。敏感性菌株在 Cu^{2+} 胁迫下 GR 活性降低,表明 GR 相对其他抗氧化酶对 Cu^{2+} 较敏感,低浓度 Cu^{2+} 就可能导致 GR 破坏^[29],以致 GR 还原 GSSG 的能力下降,GSH 含量也随之降低,这与敏感性菌株体内 GPX 活性变化是一致的。

4 结论

在 YMA 固体培养基上,菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 可抗 $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 。与铜敏感性菌株 *S. meliloti* CCNWSX0018 相比,铜抗性菌株 *S. meliloti* CCNWSX0020 在 Cu^{2+} 浓度 $\leq 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ 时,可能通过其他解毒方式(如胞外沉淀或积聚)来降低 Cu^{2+} 的毒性; Cu^{2+} 浓度 $> 0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌体受到胁迫增大,抗氧化保护酶系被激活,以提高 SOD、CAT、GPX、GR 的活性来清除体内过多的 ROS,降低 Cu^{2+} 的毒害效应; Cu^{2+} 浓度 $> 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,超出了保护酶防御能力,保护酶系统破坏,酶活性降低。以上表明抗氧化酶系是抗性根瘤菌 *S. meliloti* CCNWSX0018 耐受铜胁迫的重要机制之一,为根瘤菌抗铜机制研究奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] Athina A, Eddy J S, Marjon H J B, et al. Antioxidative properties of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen concentrations[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 203: 87–94.
- [2] Bhattacharyya S, Pal T K, Basumajumdar A. Modulation of enzyme activities of a lead-adapted strain of *Rhizopus arrhizus* during bioaccumulation of lead[J]. *Folia Microbiologica*, 2009, 54(6): 505–508.
- [3] Bruins M R, Kapil S, Oehme F W. Microbial resistance to metals in the environment[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 45: 198–207.
- [4] Nies D H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 27: 313–339.
- [5] Silver S, Phung T. A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2005, 32: 587–605.
- [6] Gomathy M, Sabarinathan K G. Microbial mechanisms of heavy metal tolerance[J]. *Agricultural Reviews*, 2010, 31(2): 133–138.
- [7] Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D, et al. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes[J]. *Trends in Microbiology*, 2005, 13(3): 111–118.
- [8] Sierra-Campos E, Pardo J P. The relationship between the antioxidant system and the virulence in *Ustilago maydis*, a fungal pathogen[J]. *Reviews Latinoam Microbiology*, 2009, 51(1–2): 7–17.
- [9] Merkamm M, Guyonvarh A. Cloning of the *sodA* gene from *Corynebacterium melassecola* and role of superoxide dismutase in cellular viability[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(4): 1284–1295.
- [10] Sigaud A, Becquet V, Frendo P, et al. Differential regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HPII-Like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(8): 2634–2639.
- [11] Brenot A, King K Y, Janoeiak B, et al. Contribution of glutathione peroxidase to the virulence of *Streptococcus pyogenes*[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(1): 408–413.
- [12] Ibekwe A M, Angle J S, Chaaney R L, et al. Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation legumes[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1995, 24: 1199–1204.
- [13] Obbard J P. Ecotoxicological assessment of heavy metals in sewage sludge amended soils[J]. *Applied Geochemistry*, 2001, 16: 1405–1411.
- [14] Monk L S, Fagerstedt K V, Crawford R M M. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as antioxidant in oxidative stress[J]. *Physiologia Plantarum*, 1989, 76: 456–459.
- [15] Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutases[J]. *Plant Physiology*, 1993, 101: 7–12.
- [16] Balestrasse K B, Gallego S M, Tomaro M L. Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants[J]. *Plant and Soil*, 2004, 262: 373–381.
- [17] Fan L M, Ma Z Q, Liang J Q, et al. Characterization of a copper-resistant symbiotic bacterium isolated from *Medicago lupulina* growing in mine tailings[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 703–709.
- [18] Beauchamp C O, Fdovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. *Analytical Biochemistry*, 1971, 44: 276–287.
- [19] Beers R F, Sizer I W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1952, 195: 276–287.
- [20] Dalton D A, Russell S A, Hanus F J, et al. Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1986, 83: 3811–3815.
- [21] 韦革宏, 马占强. 根瘤菌-豆科植物共生体系在重金属污染地修复中的地位、应用及潜力[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1421–1430.
- WEI Ge-hong, MA Zhan-qiang. Application of rhizobia-legume symbiosis for remediation of heavy-metal contaminated soils[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(11): 1421–1430.
- [22] 缪福俊, 熊智, 李素婷, 等. 会泽铅锌尾矿区豆科植物根瘤菌耐铅锌性及其生理生化特征研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(10): 1943–1947.
- MIAO Fu-jun, XIONG Zhi, LI Su-ting, et al. Tolerance and physiological response to lead-zinc stress of rhizobia isolated from nodules of leguminous plants in lead-zinc mining tailing of Huize, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(10): 1943–1947.
- [23] Figueira E M A P, Lima A I G, Pereira S I A. Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: Glutathione as a detoxifying agent[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51: 7–14.
- [24] Riccillo P M, Muglia C, D E Bruijn F G, et al. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 1748–1753.
- [25] Singh R, Tripathi R D, Dwivedi S, et al. Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 3025–3032.
- [26] Corticheiro S C, Lima A I G, Figueira E M A P. The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* under Cd exposure[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 40: 132–137.
- [27] Stochs S J, Bagchi D. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, 18: 321–336.
- [28] Schickler H, Caspi H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*[J]. *Physiologia Plantarum*, 1999, 105: 39–44.
- [29] Posmyk M M, Kontek R, Janas K M. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72: 596–602.