

北极海洋沉积物高抗氧化活性菌株的筛选及其多样性分析*

王 桢^{1,2}, 李 阳^{1,2}, 车 帅^{1,2}, 林学政^{1,2*}

(1. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061; 2. 国家海洋局 海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061)

摘 要:利用过氧化氢耐受性实验对北极海洋沉积物中具有高抗氧化活性的菌株进行初筛,通过其对 DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)自由基、羟自由基和超氧阴离子清除能力的测定进一步验证其抗氧化能力;并对其进行了分子鉴定与系统发育分析。根据过氧化氢耐受性实验,从 145 株供测菌株中筛选出 25 株对过氧化氢具有较强耐受性的抗氧化活性菌株,占总供测菌株的 17.2%;其对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子均具有较强的清除能力,可分别高达 84.15%,88.61%和 45.77%。基于 16S rRNA 基因的分子鉴定与系统发育分析表明,筛选出的 25 株活性菌株多样性较高,分别属于细菌域的 5 个纲,15 个属,20 个种;其中以 γ -Proteobacteria 纲的菌株数量最多。北极海域的海洋沉积物中存在着丰富的具抗氧化活性的菌株资源,将了解极地微生物的抗氧化胁迫机制及极地来源的新型生物活性物质的研发打下一定的基础。

关键词:北极;海洋沉积物;抗氧化活性;系统发育分析

中图分类号:Q751

文献标识码:A

文章编号:1671-6647(2015)01-0063-08

极地是地球生物圈中重要的组成部分之一,极地微生物能够适应各种强胁迫条件而快速生长和繁殖,是巨大的基因遗传变异库^[1],也为人们寻找新的微生物或筛选新的活性代谢产物提供了丰富的种质资源^[2]。特殊的极地环境造就了极地微生物特殊的生物学特征及竞争优势。栖息于极地的细菌,为了适应恶劣的环境条件,必须采用独特的生存策略来获得生存优势^[3]。极地由于臭氧空洞的存在,使 UV-B 辐射增强,可诱导生物细胞内活性氧的产生;酷寒的自然环境,使得海水中溶解氧含量升高^[4];除此之外,有研究证明,冷胁迫往往伴随着细胞内氧胁迫的增加而增加^[5]。因此,极地微生物必然逐渐形成高水平的氧化应激反应来对活性氧产生较强的耐受性,以此适应特殊的生存环境。

活性氧会导致脂质过氧化反应,以此破坏膜的流动性,使线粒体凋亡^[6];对特定的氨基酸序列进行修饰,裂解肽链使酶失活,对蛋白质造成氧化损伤。活性氧还可造成基因缺失、突变等影响^[7]。生物体利用氧化应激反应来消除活性氧的损害^[8],而适当补充外源性抗氧化剂可清除自由基,阻断脂质过氧化反应,保持食品品质、治疗或缓解病症。因此,发展和应用更多有效的天然来源抗氧化剂正日益受到人们的关注。韩乐琳等^[9]对南极地衣提取物的抗氧化能力进行了初步研究,结果表明南极地衣具有较高的抗氧化活性;阎雪芬等^[10]对分离自北极海洋沉积物的 81 株真菌进行了抗氧化活性的筛选,其中 7 株对活性氧具有抑制作用;而其对 93 株红树林的内生真菌也进行了抗氧化的筛选,仅有 1 株具有抑制活性氧的作用,以上结果表明,海洋真菌是产生抗氧化活性物质的重要来源。Pereira 等^[11]对从南极发草、南极漆姑草和桧叶金发藓的提取物进行了抗氧化活性的研究,发现其能明显减少脂质过氧化反应,具有明显的抗氧化特性。而对微生物特别是北极细菌抗氧化活性的研究报道较少^[12-13]。

本文对分离自中国第五次北极科考采取的海洋沉积物的细菌进行了具抗氧化性活性菌株的筛选,并进

* 收稿日期:2014-04-09

资助项目:南北极环境综合考察与评估专项——2013 年度北极海域海洋生物和生态考察(CHINARE2013-03-05)

作者简介:王 桢(1989-),女,山东烟台人,硕士研究生,主要从事极地微生物学方面研究。E-mail:wangzhen@fio.org.cn

* 通讯作者,林学政(1971-),男,山东栖霞人,研究员,博士,主要从事海洋极端环境微生物学方面研究。E-mail:linxz@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

一步测定了其对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子的清除能力;利用 16S rRNA 基因对其进行了分子鉴定与系统发育分析,以期为了解极地微生物的抗氧化胁迫机制及极地来源的新型生物活性物质的研发打下一定的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

北极海域海洋沉积物样品为 2012-07-09 中国第五次北极科学考察采集,对箱式采样器和重力采样器采到的海洋沉积物样品,用无菌药匙采集后置于无菌封口袋中,于雪龙船现场进行可培养细菌的分离纯化并于 4 °C 保存,回实验室后进行进一步的分离纯化培养与鉴定。

海水 Zobell 2216E 培养基(1 000 mL):蛋白胨 5 g,酵母粉 1 g,琼脂粉 15 g, $V(\text{过滤原位海水}):V(\text{自来水})=1:2$ 。

1.2 具有 H₂O₂ 耐受性的活性菌株的筛选

向 Zobell 2216E 液体培养基中添加适量 H₂O₂ 使其终浓度为 1.0 mmol/L 后作为实验组,对照组则加入等量蒸馏水;按体积分数 1% 的接种量接入过夜活化的菌株,于 10 °C,150 r/min 振荡培养 24 h 后利用分光光度计于 600 nm 下测其培养液 OD 值^[20]。以实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times 100\% > 60\%$ 为依据,筛选具有高 H₂O₂ 耐受性的细菌。

1.3 活性菌株的抗氧化能力检测

将筛选到的活性菌株活化后接种于 Zobell 2216E 液体培养基中,于 10 °C,150 r/min 振荡培养 24 h,培养液经 6 000 r/min,4 °C 离心 10 min 后,收集菌体经 PBS 缓冲液两次洗涤后,再将菌体细胞重悬,调整细胞浓度为 1.0×10^9 个/mL,以此作为样品溶液,待测其对 DPPH 自由基、羟自由基、超氧阴离子的清除能力。

1.3.1 DPPH 自由基清除能力的测定

取样品 2 mL,加入 0.2 mmol/L DPPH 和无水乙醇 1 mL,混匀后在室温下避光反应 30 min,并在 6 000 r/min 下离心 10 min,取上清液于 517 nm 测定其吸光度,与待测液相同体积浓度为 1 mmol/L 的抗坏血酸做阳性对照,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,并以等体积蒸馏水和无水乙醇混合液空白调零,于 517 nm 分别测定其吸光度^[14]。DPPH 自由基的清除率为:

$$\text{清除率} = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_0 为对照组吸光度; A_i 为样品组吸光度; A_j 为空白组吸光度。

1.3.2 羟自由基(HO·)清除能力的测定

在具塞试管中依次加入 1 mL 5 mmol/L 硫酸亚铁溶液,1 mL 5 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液,1 mL 3 mmol/L 双氧水溶液,混匀后加入 0.5 mL 的待测样品,用双蒸水补齐至刻度 10 mL,在 (37 ± 0.1) °C 的恒温水中反应 15 min 后,6 000 r/min 离心 10 min,然后以双蒸水作参比,在 510 nm 下测定吸光度^[15]。与待测液相同体积浓度为 1 mmol/L 的抗坏血酸做阳性对照。清除率计算式为:

$$\text{清除率} = (A_0 - A_x)/A_0 \times 100\% \quad (2)$$

式中, A_0 为空白组的吸光度; A_x 为加入待测溶液后的吸光度。

1.3.3 超氧自由基清除能力的测定

取 4.5 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH=8.2)于试管中,依次加入 1.0 mL 1.0 mmol/L EDTA,1.0 mL 待测菌液,2.4 mL 蒸馏水。于 25 °C 水浴反应 10 min,再加入 2.0 mL 9 mmol/L 邻苯三酚准确反应 60 min 后,加入 0.1 mL 12.0 mol/L HCl 终止反应,于 325 nm 处测定吸光度(A_s)^[16]。与待测液相同体积

浓度为 1 mmol/L 的抗坏血酸做阳性对照。对照以 1.0 mL 蒸馏水代替样品,操作方法同样品管,测得吸光度(A_c)。超氧自由基清除率:

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

式中, A_c 为对照组的吸光度; A_s 为样品组的吸光度。

1.4 分子鉴定与系统发育分析

16S rRNA 基因扩增中的 DNA 模板的制备和 PCR 引物参照文献[17]进行。

反应条件:95 °C, 5 min; 95 °C, 1 min, 55 °C, 30 s, 72 °C, 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物送至南京金斯瑞生物股份有限公司进行纯化和测序。测序获得的 16S rRNA 基因序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 进行 BLAST 分析。序列比对采用 BioEdit 的多序列比对排列 (Clustalw multiple alignment), 系统发育分析采用 MEGA 4.0 软件的邻接法 (Neighbor-joining method)。利用 EzTaxon-e Database 检索与活性菌株相似性最高的模式菌株, 并与模式菌株的 16S rRNA 基因相似性进行比较 (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>)^[18]。

2 结果与分析

2.1 抗氧化活性菌株的筛选结果

根据 H_2O_2 耐受性实验, 对实验室保存的 145 株北极海洋沉积物细菌进行了抗氧化活性菌株的筛选。以实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times 100\% > 60\%$ 作为菌株具有强抗氧化性的依据, 共筛选出 25 株具有高 H_2O_2 耐受性的菌株, 有关实验结果和采样信息见表 1。可见, 筛选到的活性菌株的实验组 OD 值/对照组 OD 值为 62.63%~140.00%; 值得指出的是, 1 mmol/L H_2O_2 似乎对菌株 563 和 720-2 的生长具有一定的促进作用, 其原因值得进一步研究。25 株抗氧化活性菌株分离自 12 个站位中, 水深从 19~3 540 m 不等, 由此可见, 在北极海洋沉积物这一特殊生境中, 广泛分布着抗氧化细菌。

表 1 H_2O_2 耐受实验结果及采样信息

Table 1 Results of hydrogen peroxide tolerance test and locations of samplings

菌 株	实验组 OD 值/对照组 OD 值	站 位	经纬度	水深/m
630	100.00%	BL09	178°45'10"E, 59°21'36"N	3 540.0
657	86.21%	BM05	170°54'48"W, 62°48'18"N	36.3
583	91.67%	BS02	175°32'28"W, 61°07'29"N	91.1
645	97.96%	BS03	173°51'21"W, 61°07'15"N	69.7
642-2	76.62%	BS03	173°51'21"W, 61°07'15"N	69.7
621	75.29%	BS04	171°34'37"W, 61°11'52"N	48.5
624	91.64%	BS04	171°34'37"W, 61°11'52"N	48.5
563	140.00%	BS06	167°43'03"W, 61°41'11"N	19.0
741	98.27%	ICE-4	145°14'20"E, 85°00'01"N	2 860.0
594	89.78%	ICE-5	158°44'30"E, 86°04'49"N	3 180.0
614	71.68%	ICE-5	158°44'30"E, 86°04'49"N	3 180.0
567	63.96%	M06	172°11'25"W, 75°13'37"N	491.0
569	97.69%	M06	172°11'25"W, 75°13'37"N	491.0
763-1	82.85%	MA01	178°57'35"W, 82°01'52"N	2 295.0
720-2	106.38%	SR01	168°58'34"W, 66°43'04"N	34.0
632	84.15%	SR01	168°58'34"W, 66°43'04"N	34.0
541	66.05%	SR05	168°54'31"W, 68°36'54"N	44.7
544-1	62.63%	SR05	168°54'31"W, 68°36'54"N	44.7

续表

菌株	实验组 OD 值/对照组 OD 值	站 位	经纬度	水深/m
697	76.00%	SR11	168°58'34"W,72°59'55"N	64.9
701	63.25%	SR11	168°58'34"W,72°59'55"N	64.9
695-2	72.58%	SR11	168°58'34"W,72°59'55"N	64.9
694	82.43%	SR11	168°58'34"W,72°59'55"N	64.9
528	63.84%	SR14	168°58'39"W,78°00'35"N	609.0
532-2	60.74%	SR14	168°58'39"W,78°00'35"N	609.0
R	98.94%	IS-2	19°24'21"W,62°17'51"N	1 636.5

2.2 DPPH 自由基、羟自由基(HO·)和超氧自由基清除能力的测定

由表 2 可见,25 株活性菌株对 DPPH 自由基、羟自由基(HO·)和超氧自由基的清除能力:25 株活性菌株对 DPPH 自由基有着不同的清除效率,清除率为 25.36%~84.15%,其中以菌株 563 的清除率最高,可达 84.15%;25 株活性菌株对 HO· 也具有较强的清除能力,清除率在 65.72%~88.61%之间;其中菌株 567 的清除能力最强,可达 88.61%;通过邻苯三酚自氧化法测定活性菌株的超氧自由基清除能力的研究结果也表明,25 株菌株均对其有着一定的清除作用,但清除能力相对较弱,清除率为 11.25%~45.77%,其中以菌株 763-1 超氧自由基的清除率最高,可达 45.77%。

总体来说,菌株 563 对 DPPH 自由基、羟自由基(HO·)和超氧自由基清除能力都具有较好的清除作用,清除率分别为 84.15%,70.71%,42.46%;菌株 630 对 3 种自由基也都具有较好的清除作用,清除率分别为 83.89%,78.91%,45.56%。菌株 563 和 630 的抗氧化特性值得进一步研究。

表 2 25 株活性菌株对自由基清除能力的测定

Table 2 Results of antioxidant activity of 25 isolated antioxidative strains

菌株	DPPH 自由基清除率/%	羟自由基清除率/%	超氧自由基清除率/%
R	42.66±1.38	68.43±0.02	35.75±0.13
583	62.91±0.03	83.03±0.53	42.32±0.23
720-2	27.60±0.53	73.59±0.18	40.62±0.33
632	31.76±0.20	65.72±0.29	32.81±0.12
697	42.48±1.01	80.52±0.37	16.27±0.05
701	43.47±1.61	70.52±0.34	41.34±0.32
695-2	49.06±0.26	81.57±0.19	11.25±0.12
621	42.17±1.89	78.35±0.19	32.45±2.89
594	25.40±0.23	83.05±0.08	30.89±0.73
614	52.70±1.06	79.22±0.11	31.98±1.76
645	70.71±0.43	79.35±0.25	31.01±0.73
567	57.47±0.65	88.61±0.37	43.04±0.31
642-2	26.51±0.36	76.73±0.15	38.34±0.17
541	44.13±0.16	83.37±0.18	31.99±0.48
563	84.15±0.61	70.71±0.18	42.46±0.59
741	32.45±0.31	82.83±0.92	14.92±0.21
569	25.36±0.19	80.48±0.54	37.36±0.06
657	53.48±0.44	77.35±0.06	37.69±0.44
624	76.96±0.15	81.63±0.30	39.11±0.13
630	83.89±0.49	78.91±0.24	45.56±0.07
528	64.58±0.26	84.74±0.47	14.58±0.26
532-2	49.88±0.13	83.70±0.16	34.79±0.12
544-1	54.84±0.17	73.52±0.33	32.75±0.12
763-1	42.33±0.38	83.29±0.33	45.77±0.04
694	44.30±0.34	67.66±0.41	34.37±0.39
抗坏血酸	96.12±0.36	98.47±0.15	81.78±0.48

2.3 活性菌株的系统发育分析

对 25 株抗氧化活性菌株的 16S rRNA 基因序列采用 BioEdit 软件进行序列比对,然后利用 MEGA 4.0 软件的邻接法,构建 25 株抗氧化菌株及其同源性较高的模式菌株的系统发育树(图 1)。由图 1 可见,筛选到的抗氧化活性菌株有着丰富的种类多样性。从纲水平上来说,25 株活性菌株分属于细菌域的 5 个纲,其中有 14 株属于 γ -Proteobacteria 纲,占总菌株的 56%,为优势种群;4 株属于 α -Proteobacteria 纲,占 16%;4 株属于 Actinobacteria_c 纲,占 16%;有 2 株属于 Bacilli 纲,占总菌数的 8%;还有 1 株属于 Flavobacteria 纲,占 4%。从属水平上来说,25 株细菌分属于 15 个属,其中假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)多样性最高,含 4 株菌,其次为盐细菌属(*Salinibacterium*),含有 3 株菌。种水平上,25 株细菌分属于 20 个种,多样性丰富。

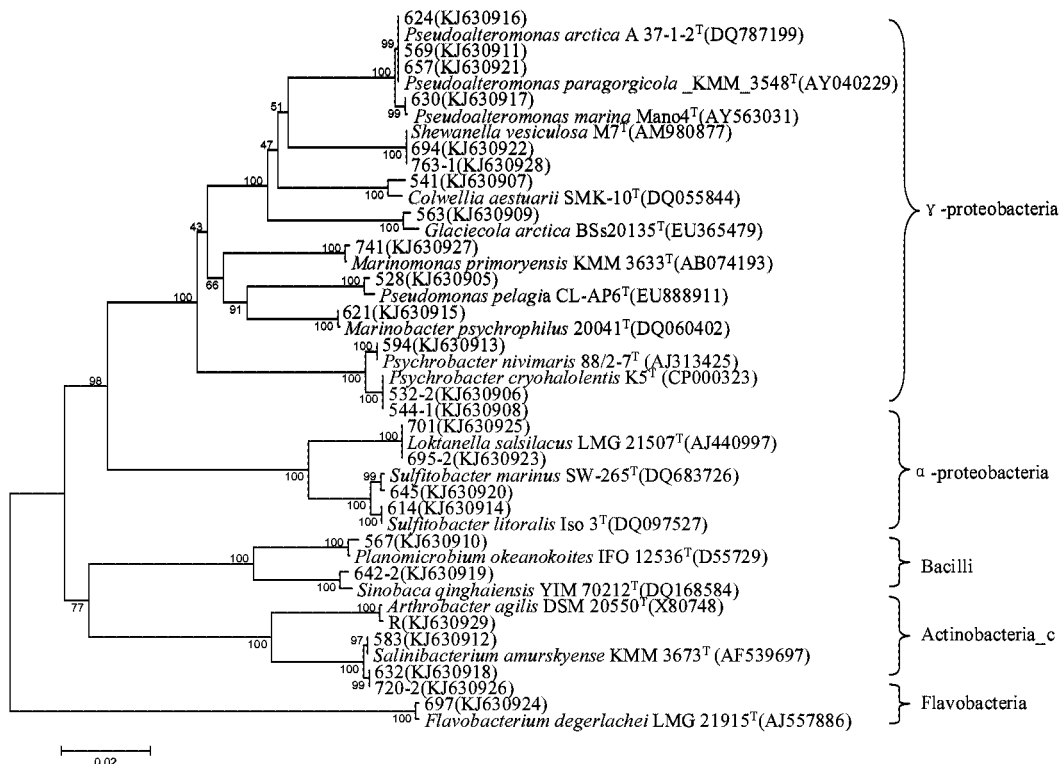


图 1 基于 16S rRNA 基因序列的具有抗氧化活性菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the bacteria with antioxidant activity based on the partial 16S rRNA gene sequences

3 讨 论

极地微生物不仅要适应低温,也需要抵御其他胁迫条件如紫外辐射等^[19]。为了在极端环境中得以生存,这些微生物必然形成不同抗氧化系统去抵抗由活性氧引起的氧化胁迫。本文通过对来自北极深海沉积物中的 145 株菌株进行了抗氧化性菌株的筛选,获得了 25 株抗氧化性较强的菌株;并采用 DPPH 自由基、羟自由基和超氧自由基清除能力实验综合评价了其抗氧化能力。三组实验从多个角度对菌株抗氧化性能进行了测试,结果表明,对 H₂O₂ 具有较强耐受性的活性菌株,对 DPPH 自由基、羟自由基和超氧自由基均有着一定的清除能力,但对三者的清除能力没有必然联系,不存在线性关系。

目前,对抗氧化菌株的筛选及其生物活性物质的研究主要集中于乳酸杆菌,如张凤敏等^[20]从传统发酵食品中筛选出两株对过氧化氢耐受能力较强的乳酸菌,并研究了其对 DPPH 自由基和羟自由基的清除能

力,表明这两株乳酸菌对 DPPH 自由基和羟自由基都具有一定的清除能力。海洋抗氧化菌株的研究主要集中于真菌,如陈霞等^[21]对 8 株来源于东海海洋的真菌提取物进行了抗氧化和抗肿瘤活性筛选,表明海洋真菌是潜在的活性代谢产物的重要来源。在极地微生物方面,则多集中于色素的抗氧化研究,如 Daniela 等^[22]对从南极土地杆菌属细菌 *Pedobacter* sp. 中提取的混合色素进行抗氧化能力的检测,表明这些色素具有极强的抗氧化能力。本文样品取自具有强烈促氧化作用的北极生态系统,筛选到的抗氧化活性菌株的 DPPH 自由基清除率的范围为 25.36%~84.15%,羟自由基(HO·)清除率在 65.72%~88.61%;而张凤敏等^[20]对筛选出的两株高抗氧化活性乳酸菌对 DPPH 自由基和羟自由基(HO·)清除率最高仅分别为 37.18%和 10%。由此可见,本实验获得的活性菌株清除 DPPH 自由基和清除羟自由基能力更强。

研究结果表明,在极地海洋沉积物这一特殊的生境,广泛分布着抗氧化活性菌株,且其种类多样。从 145 株北极海洋沉积物微生物中分离到 25 株抗氧化活性菌株,比例可达 17.2%;对 25 株活性菌株的分子鉴定与系统发育表明, γ -Proteobacteria 纲细菌数量最多,含 14 株,占总分离菌数的 56%,物种多样性也最为丰富,含有 12 个种,占有种的 60%;其次有 4 株属于 α -Proteobacteria 纲,数量占总分离菌数的 16%,分属于 3 个种,占有种比例达到 15%;Actinobacteria_c 纲筛选得到 4 株,放线菌与人类关系密切,目前广泛应用的抗生素约 70%是各种放线菌所产生。一些特殊的放线菌还能产生各种酶制剂、维生素和有机酸等。因此对北极地区放线菌次级代谢产物的研究具有重大的理论意义和应用价值。

极地特殊的环境条件造就了极地微生物特殊的生物学特征及竞争优势,栖息于极地的细菌,为了适应恶劣的环境条件,必须采用独特的生存策略来获得生存优势^[23],这使其将成为研究低温生物学的良好试验材料及新型活性物质的重要的潜在来源。有关极地微生物的资源勘探与代谢活性产物研发,已成为国际微生物学领域研究的热点之一^[24-25]。本文表明,北极蕴含着强抗氧化的细菌种质资源,并具有极好的多样性和丰富性。本文所获结果有助于人们认识和开发北极这一特殊海域的抗氧化微生物资源,加速海洋微生物抗氧化活性物质的开发利用。

致谢:中国第五次北极考察队采集样品及数据。

参考文献(References):

- [1] BOWLER C, KARL D M, COLWELL R R. Microbial oceanography in a sea of opportunity[J]. *Nature*, 2009, 459(7244): 180-184.
- [2] RUSSO R, GIORDANO D, RICCIO A, et al. Cold-adapted bacteria and the globin case study in the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125[J]. *Marine Genomics*, 2010, 3(3-4): 125-131.
- [3] GIUDICE A L, BRUNI V, MICHAUD L. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms[J]. *Journal of Basic Microbiol*, 2007, 47(6): 496-505.
- [4] HERMES L M, ZENTENO S T. Animal responses to drastic changes in oxygen availability and physiological oxygen stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002, 133(4): 537-556.
- [5] GOCHEVA Y G, TOSI S, KRUMOVA E T, et al. Temperature downshift induces antioxidant response in fungi isolated from Antarctic [J]. *Extremophiles*, 2009, 13(2): 273-281.
- [6] GREEN D R, REED J C. Mitochondria and apoptosis[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1309-1312.
- [7] IMLAY J A. Pathways of oxidative damage[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 395-418.
- [8] LOPEZ M G, ELNITSKY M A, BENOIT J B, et al. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica* and developmentally linked expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins[J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38(8): 796-804.
- [9] HAN L L, WEI J C. A preliminary study on antioxidant ability of Antarctic lichen extract[J]. *Institute of Microbiology*, 2009, 28(6): 846-849. 韩乐琳,魏江春. 南极地衣提取物抗氧化能力的初步研究[J]. *菌物学报*, 2009, 28(6): 846-849.
- [10] YAN X F, HUANG D H, DAI Y B, et al. Study on antioxidant activity of marine fungi[J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2007, 46(3): 418-421. 阎雪芬,黄丹虹,代宇博,等. 海洋真菌抗氧化活性物质的初步研究[J]. *厦门大学学报:自然科学版*, 2007, 46(3): 418-421.

- [11] PEREIRA B K, ROSA R M, SILVA J D, et al. Protective effects of three extracts from Antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, 96: 117-129.
- [12] YAN X, NAGATA T, FAN X. Antioxidative activities in some common seaweeds[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1998, 52(3): 253-262.
- [13] RUPEREZ P, AHRAZEM O, LEAL J A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *fucus vesiculosus*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(4): 840-845.
- [14] HUANG S S, LIU J, ZHAO Z. Study on antioxidative activity of two lactic acid bacteria[J]. *China Dairy Industry*, 2010, 38(10): 8-27. 黄珊珊, 刘晶, 赵征. 植物乳杆菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种菌体外抗氧化活性的对比研究[J]. *中国乳品工业*, 2010, 38(10): 8-27.
- [15] LI Z Y, ZHANG H R, LIANG H Y. Comparison of the elimination of hydroxyl free-radicals by five kinds of wines[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2006, 4: 26-28. 李志英, 张海荣, 梁会艳. 5种葡萄酒清除羟自由基的比较[J]. *酿酒科技*, 2006, 4: 26-28.
- [16] LIU T W, PAN D D. Screening of lactic acid bacteria with antioxidant activity[J]. *Food Science*, 2011, 32(19): 125-129. 刘天祚, 潘道东. 抗氧化活性乳酸菌的筛选[J]. *食品科学*, 2011, 32(19): 125-129.
- [17] SUN F Q, WANG B J, LI G Y, et al. Diversity of bacteria isolated from the South China Sea sediments[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(12): 1578-1587. 孙凤芹, 汪保江, 李光玉, 等. 南海南沙海域沉积物中可培养微生物及其多样性分析[J]. *微生物学报*, 2008, 48(12): 1578-1587.
- [18] KIM O S, CHO Y J, LEE K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62: 716-721.
- [19] SMITH R C, PREZELIN B B, BAKER B S, et al. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in antarctic waters [J]. *Science*, 1992, 255(5047): 952-959.
- [20] ZHANG F M, TIAN F M, CHEN W, et al. Screening of antioxidative lactic acid bacteria[J]. *China Dairy Industry*, 2007, 35(2): 4-7. 张凤敏, 田丰伟, 陈卫, 等. 具抗氧化活性乳酸菌的筛选[J]. *中国乳品工业*, 2007, 35(2): 4-7.
- [21] CHEN X, YI Y, ZHAO M R. Screening of antioxidative and antitumor activities of eight marine fungi[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2012, 31(2): 1-6. 陈霞, 易喻, 赵美蓉. 8株海洋真菌的抗氧化和抗肿瘤活性筛选[J]. *中国海洋药物杂志*, 2012, 31(2): 1-6.
- [22] DANIELA N, CORREA L, MAXIMILIANO J, et al. Antioxidant capacity of novel pigments from an Antarctic bacterium[J]. *The Journal of Microbiology*, 2012, 50(3): 374-379.
- [23] GIUDICE A L, VIVIA B, MICHAUD L. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with a ntibacterial activities against terrestrial microorganisms[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2007, 47(6): 496-505.
- [24] MARX J C, COLLINS T, DAMICO S, et al. Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms[J]. *Marine Biotechnology*, 2007, 9(3): 293-304.
- [25] VARDHAN REDDY P V, SHIVA NAGESWARA RAO S S, PRATIBHA M S, et al. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active enzymes from culturable bacteria associated with sediment from a melt water stream of Midtre Loenbreen glacier, an Arctic glacier [J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(8): 538-546.

Screening and Diversity Analysis of the Bacteria With High Antioxidant Activity Isolated From Marine Sediments of Arctic

WANG Zhen^{1,2}, LI Yang^{1,2}, CHE Shuai^{1,2}, LIN Xue-zheng^{1,2*}

(1. *The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China;*

2. *Key Lab of Marine Bioactive Substanc, SOA, Qingdao 266061, China*)

Abstract: The bacteria isolated from Arctic marine sediments with high antioxidant activity were determined by their growth resistance ability to hydrogen peroxide, and their scavenging capacity for DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), hydroxyl radical and superoxide anion were also examined. Molecular identification and phylogenetic analysis were carried out on the basis of 16S rRNA gene. Twenty-five antioxidant strains were isolated from 145 strains tested by their growth resistance ability to hydrogen peroxide in vitro, accounting for 17.2% of total strains tested. The results of scavenging test for DPPH free radical, hydroxyl radical and superoxide anion showed that the scavenging ratio were up to 84.82%, 88.89% and 45.73%, respectively, indicating these strains had high antioxidant ability. Molecular identification and phylogenetic analysis revealed that these isolates belonged to five classes of the bacteria domain, 15 genera, and 20 species in total, and γ -Proteobacteria was dominant. A high diversity of antioxidant bacteria was existing in marine sediment of Arctic in term of both species number and phylogenetic composition, which deserve further study of adaptation mechanisms under oxidative stress and exploitation of novel bioactive substances.

Key words: Arctic; marine sediments; antioxidant; phylogenetic analysis

Received: April 9, 2014