

海洋假交替单胞菌生物膜产 ROS 特性研究

吕菁萍, 李泽龙, 张鹤睿, 王 竞*

(大连理工大学 环境学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 海洋微生物可以产生胞外活性氧(reactive oxygen species, ROS), 为深海无光区提供了活性氧. 而在实际海洋环境中, 海洋微生物更倾向于以生物膜形式生长, 但生物膜形态对菌体产 ROS 的影响鲜见报道. 考察了海洋假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.) GCY 生物膜产 ROS 特性. 结果表明, GCY 生物膜胞外 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 以及 $\cdot OH$ 等产量均高于游离菌体, 其中生物膜体系 H_2O_2 产量及 $O_2^{\cdot-}$ 产量最高可达到游离菌体体系的 3.10 倍和 3.56 倍. 同时 L-氨基酸氧化酶(LAAO)、脱氢酶活性(DHA)、电子传递系统活性(ETSA)均有所提高. 以生物膜形式生长的 GCY 与游离态 GCY 相比, 胞外聚合物组分中多糖和蛋白质含量均有提升, 胞外聚合物(EPS)总量增加了 $149\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 增强了细胞黏附性并减少了 ROS 对细胞造成的损伤.

关键词: 活性氧; 生物膜; 假交替单胞菌; 海洋环境

中图分类号: X53

文献标识码: A

doi: 10.7511/dllgxb202106003

0 引言

活性氧(ROS)包括 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 等, 在水体各类污染物的归趋及金属氧化还原循环中发挥着重要的作用^[1-3]. 一直以来光反应被认为是水体中 ROS 的主要形成因素^[4], 但是 Zhang 等发现, 在无光区水体中, 浮游微生物所产 ROS 占大部分^[5]. 同时, Diaz 等发现, 多个种属的海洋细菌可以产生一系列的胞外活性氧物种, 为深海无光区提供了 ROS^[6]. 并且, 这些微生物源胞外 ROS 很可能通过对海洋有机污染物的降解作用, 在污染物质的归趋转化过程中扮演重要角色^[7-8].

目前, 对于海洋产 ROS 细菌的研究仅集中在游离态菌体, 生物膜形态对海洋产 ROS 细菌的影响鲜见报道. 在实际海洋环境中, 存在着大量可供微生物附着的载体, 如海洋礁石、海洋甲壳动物、藻类残骸以及由地质演化、大气沉降、人类活动等形成的一些碳质颗粒物等^[9]. 而海洋微生物更倾向于在载体表面附着, 并形成生物膜, 这些生物膜往往在海洋环境中发挥着重要作用^[10-11], 被认为

是海洋环境中最普遍的生命形式^[12-13]. 以生物膜形式存在的微生物有着更广泛的信息交流及更精密的调控机制, 在生物活性等方面均有所提高^[14]. 因此, 研究海洋细菌生物膜产 ROS 的特性可以加深对海洋无光环境中生物源 ROS 的了解.

许多假交替单胞菌能够产生大量的胞外生物活性物质, 如抗生素、溶菌物质、胞外多糖等^[15-16], 进而快速适应海洋多变的生境, 在海洋生态系统中扮演了重要角色. 基于此, 本文选用海洋假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.) GCY, 该菌株已被证实可以产生 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 等胞外 ROS^[8]. 对这株代表性海洋产 ROS 细菌进行挂膜培养, 来探究 GCY 生物膜的生理生化特性; 以及与游离菌体相比, 生物膜产 ROS 性能及酶活性的变化.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的海洋假交替单胞菌 GCY 从中国大连市黑石礁海域(北纬 $38^{\circ}52'$, 东经 $121^{\circ}33'$)沉

收稿日期: 2021-04-02; 修回日期: 2021-09-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21876018).

作者简介: 吕菁萍(1996-), 女, 硕士生, E-mail: 2515280303@qq.com; 王 竞*(1967-), 男, 教授, 博士生导师, E-mail: jwang@dlut.edu.cn.

积物中分离并富集培养得到,在整个实验过程中用到的均是纯培养菌株。

实验所用培养基均用人工海水配制^[17],并调节培养基初始 pH 至 8.0 左右。酵母浸粉培养基配方为酵母浸粉 $6\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 2216E 培养基配方为酵母浸粉 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

本实验选用泡沫炭载体作为碳质材料的代表,实验所用药品均购自阿拉丁化学试剂有限公司。

1.2 生物膜的培养及表征

1.2.1 生物膜的培养 生物膜的培养方法参照前人实验,并在此基础上作出了改进^[18-19]。将泡沫炭剪成 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 的小块,用无菌人工海水清洗数次,并用烘箱烘干灭菌。将无菌炭块固定在支架上,放置于装有 100 mL 酵母浸粉培养基的 250 mL 锥形瓶中,将活化后的菌体接种到泡沫炭上。在恒温摇床内培养 96 h,得到稳定生物膜。

1.2.2 生物膜生物量的测定 载体上生物量的测定采用超声分离法^[19-20],并加以改进:首先在无菌操作台中,将挂膜后的泡沫炭取出,并轻轻冲洗以去掉弱吸附微生物,超声预处理 30 min 将吸附于载体上的微生物转到 100 mL 无菌生理盐水中,然后通过紫外分光光度计在 600 nm 下检测微生物量。依据干质量曲线换算可得膜上微生物干质量:

$$y = 1.05x + 0.24004; R^2 = 0.997$$

1.2.3 生物膜形貌表征 采用扫描电子显微镜 (SEM) 来对微生物生物膜的形貌与形态进行表征,样品制备过程如下:用 $0.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 无菌 PBS 溶液洗涤生物膜 2~3 次,再使用 2.5% 戊二醛缓冲溶液 (pH=7.2) 固定 24 h,用无菌 PBS 溶液清洗炭块 2~3 次,加入不同质量分数的乙醇溶液 (15%、30%、50%、70%、80%、90% 和 100%) 梯度脱水,每个梯度预脱水处理 15 min,再将样品放入真空冷冻干燥箱里以 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h。干燥后的样品固定在导电胶带上进行喷金处理。在扫描电子显微镜下,观察样品表面的形貌与形态。

1.2.4 胞外聚合物的测定 使用碱提法,取 10 mL 菌液,离心 ($10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 20 min) 后得到的上清液即为溶解态胞外聚合物 (EPS)。再向沉淀中加入 7.14 mL 超纯水和 0.06 mL 的 36.5% 甲醛

溶液,反应 1 h 后再向体系中加入 2.86 mL 的 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液提取 2 h,在 $10\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心分离 20 min 后将上清液过膜,即为结合态 EPS。分别对两组样品中的多糖以及蛋白质进行测量。多糖测定使用苯酚-硫酸法,蛋白质测定使用考马斯亮蓝法。

1.3 ROS 及相关酶的测定

为探究 GCY 生物膜与游离菌体 GCY 产 ROS 的差异,将 GCY 生物膜设为实验组,游离菌体 GCY 为对照组,取胞外液测定其 ROS 产量,及 L-氨基酸氧化酶 (L-amino acid oxidase, LAAO)、铁载体等胞外活性物质活性。对生物膜进行超声剥落,与游离菌体进行对照,比较代谢相关酶的活性变化。

1.3.1 ROS 的测定 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 生成速率采用 NBT 还原显色法进行测定^[21],该方法可以反映基于 NADH 氧化还原酶所产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的速率。向待测胞外液中加入 $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NBT 溶液和 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NADH,使用紫外-可见分光光度计在 560 nm 处连续检测 300 s,得到扫描曲线,用曲线斜率来表示超氧生成速率。 H_2O_2 的测定使用 DPD/POD 法^[22]。 $\cdot\text{OH}$ 的测定采用苯甲酸高效液相色谱法^[23]。

1.3.2 代谢活性的测定 脱氢酶活性 (dehydrogenase activity, DHA) 的检测采用 TTC 法^[24]。电子传递系统活性 (electron transport system activity, ETSA) 的检测采用 INT 还原法^[25-26]。

1.3.3 L-氨基酸氧化酶活性 向胞外液中加入等体积的 $5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 亮氨酸溶液作为反应底物,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30 min,测定反应前后 H_2O_2 浓度的差值,其差值即为 30 min 内产生的 H_2O_2 。

1.3.4 铁载体 铁载体的检测使用铬天青 CAS 法,将配制好的 CAS 检测液与胞外液样品等体积混匀后,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置 30 min,再使用紫外分光光度计在 630 nm 下测定吸光度。以酵母浸粉培养基作为空白对照,排除培养基成分的干扰。

2 结果与讨论

2.1 生物膜的表征

菌株 GCY 为海洋假交替单胞菌,该菌属的许多菌株已被证实具有形成生物膜的能力^[27]。通

过实验,结合菌株干质量曲线计算可知单位体积泡沫炭上的微生物干质量为 $22 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$,将制备好的样品按照前文所述方法,使用 SEM 观察其表面形貌.可以明显看出,菌体与其分泌的胞外聚合物覆盖在碳材料表面,生物膜系统趋于稳定(图 1).

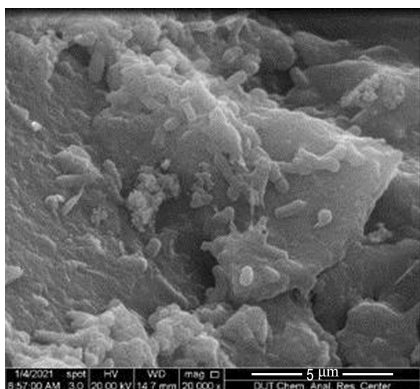


图 1 GCY 生物膜 SEM 表征

Fig. 1 SEM observation of GCY biofilm

EPS 是由微生物代谢所分泌的高分子聚合物,如蛋白质、多糖等. EPS 将微生物包埋在絮体中,是微生物生物膜的重要组成.因此,对 GCY 生物膜及游离菌体 GCY 的 EPS 进行检测.

多糖是具有黏性的大分子聚合物,在生物膜的形成过程中起重要作用.生物膜 EPS 和游离菌体 EPS 的多糖含量分别为 $313.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $220.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 2),由此可以得出,碳质载体的存在会刺激微生物分泌多糖类物质,有助于微生物在碳质载体表面的初始黏附并形成稳定生物膜.蛋白质是 EPS 的重要组分,生物膜 EPS 及游离菌体 EPS 中蛋白质含量分别为 $310.41 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $254.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 2).生物膜 EPS 中蛋白质含量的提升,暗示其可能具有更强的生物代谢活性.两体系内 EPS 以结合态为主,均占到总 EPS 质量的 90% 以上.生物膜总 EPS 含量高于游离菌体,说明以生物膜形式生长的菌体具有更好的抵御外界不良环境的能力.

2.2 生物膜与游离菌体 ROS 产量

为探究生物膜与游离菌体的 ROS 产量差异,分别对两体系内的 ROS 进行检测.菌株 GCY 可以产生胞外 H_2O_2 ,这一现象已被 Gu 等^[8,17]报道.生物膜体系的 H_2O_2 产量总体上要高于游离

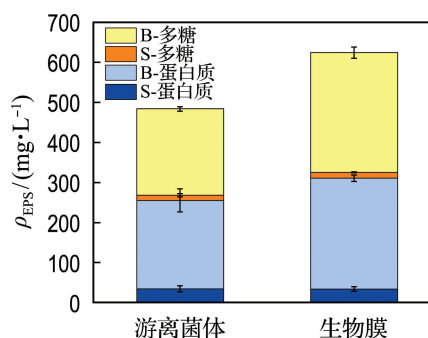


图 2 生物膜及游离菌体 EPS 分泌

Fig. 2 EPS production of biofilm and free cells

菌体体系.有趣的是,GCY 生物膜可以在菌株生长的对数期生成较高浓度的 H_2O_2 ,在 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上,18 h 以及 24 h 的生物膜体系 H_2O_2 产量可分别达到游离菌体体系的 3.10 倍和 1.94 倍(图 3).而之前的研究往往在对数期末期或稳定期开始检测到 H_2O_2 的生成^[17,24],生物膜的存在会使 H_2O_2 的产生提前.

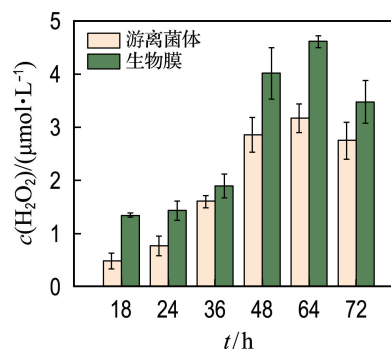
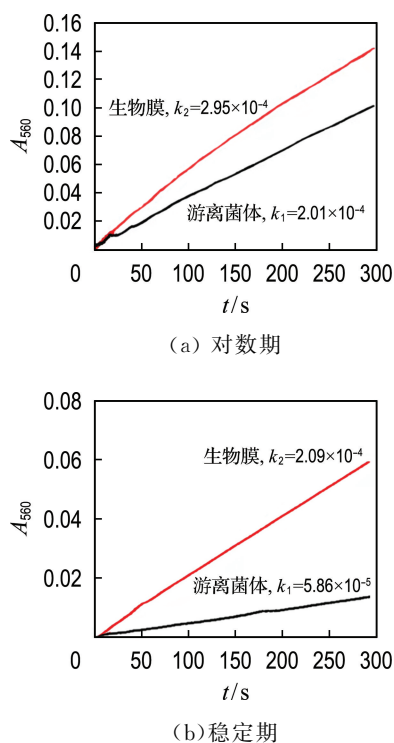


图 3 菌株胞外 H_2O_2 产量

Fig. 3 The generation of extracellular H_2O_2

分别在对数期及稳定期取样,对体系内 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 进行检测.菌株 GCY 在对数期及稳定期都可以生成超氧阴离子自由基,并且不论是游离菌体还是以生物膜形式生长的菌体,都在对数期有更大的超氧生成速率,这与郭定环等^[17]的研究结果相一致.而在生物膜体系中,在对数期以及稳定期,其产超氧的速率均要高于游离菌体体系,这表明以生物膜形式存在的 GCY 具有更强的产超氧能力(图 4).

据报道, $\text{O}_2^{\cdot -}$ 可以通过 Haber-Weiss 反应生成 $\cdot\text{OH}$,同时,在铁载体的存在下, H_2O_2 可以通过类 Fenton 反应生成 $\cdot\text{OH}$.菌株 GCY 以及假交替单胞菌属的多个菌株已被证实具有生成铁载

图 4 胞外 $O_2^{\bullet-}$ 产量Fig. 4 The generation of extracellular $O_2^{\bullet-}$

体的能力^[24,28]. 本实验分别对两体系的 $\cdot OH$ 及铁载体生成情况进行测定.

在本实验中,生物膜体系 $\cdot OH$ 产量增高,最高可以检测到 $1.04 \mu mol \cdot L^{-1}$ 的 $\cdot OH$,是同时点游离菌体体系的 1.44 倍(图 5(a)). 同时,在生物膜体系中检测到了更明显的铁络合现象(图 5(b)). 这表明相比于游离菌体体系,GCY 生物膜产生了更多的铁载体,并且铁载体的含量也与两体系中 $\cdot OH$ 的生成趋势相一致,结合两体系胞外 H_2O_2 以及 $O_2^{\bullet-}$ 的产量,可以推测 GCY 生物膜通过胞外发生的类 Fenton 反应使 $\cdot OH$ 浓度提高^[24].

2.3 生物膜 ROS 形成机理分析

本课题组已经在 GCY 的基因组中发现了基因 *lodA*,并证实了其编码的 L-氨基酸氧化酶参与了菌株 GCY 生成 H_2O_2 的过程^[24]. 因此,本实验对胞外体系的 L-氨基酸氧化酶活性(以 H_2O_2 为基准)进行测定. 菌株 GCY 在生长的各个阶段均检测到 L-氨基酸氧化酶活性,在稳定期 48 h 时,生物膜体系的 L-氨基酸氧化酶活性可达游离菌体体系的 1.33 倍. 值得注意的是,在对数期 24 h 时,生物膜体系内也检测到了较高的

L-氨基酸氧化酶活性,这也解释了生物膜体系中 H_2O_2 产生提前的原因(图 6).

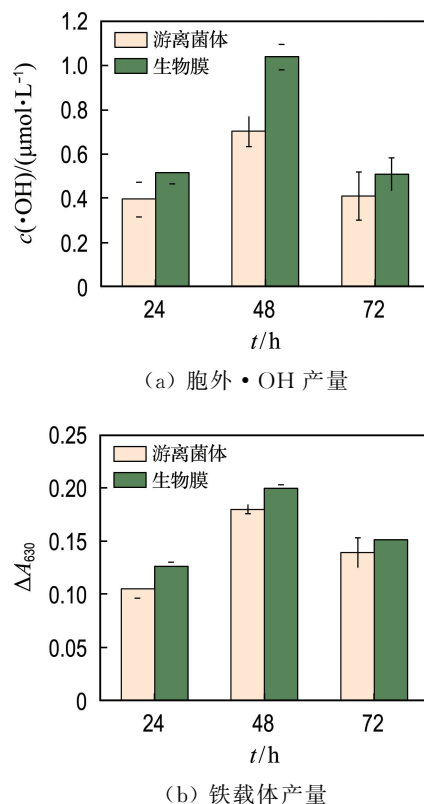
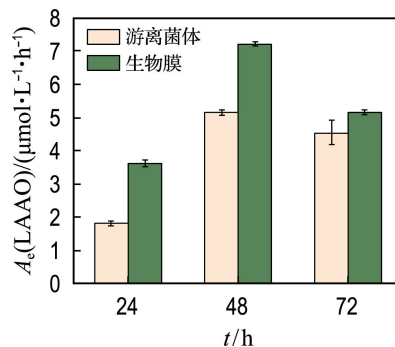
图 5 胞外 $\cdot OH$ 及铁载体产量Fig. 5 The generation of extracellular $\cdot OH$ and siderophore

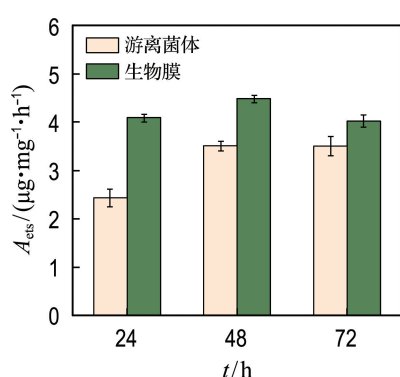
图 6 L-氨基酸氧化酶活性

Fig. 6 L-amino acid oxidase activity

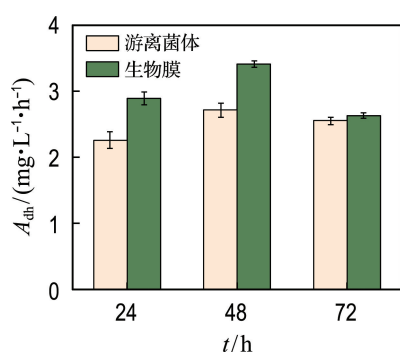
前期研究表明,菌株 GCY 在 Na^+ -转位 NADH:醌氧化还原酶作用下产生 $O_2^{\bullet-}$,该酶与膜转运以及细胞呼吸相关,在细胞增殖中起作用. 其中 NADH:醌氧化还原酶在生物呼吸链上参与电子传递,是参与电子传递过程最主要的功能酶复合体之一,因此该酶活性与体系内的电子传递

活性及微生物代谢活性紧密相关^[29]. 为探究该酶在有无生物膜条件下的活性变化情况, 分别对 GCY 生物膜和游离菌体 GCY 的 ETSA 以及 DHA 进行测定.

ETSA 可以表示经氧化呼吸链传递给最终电子受体的电子数量, 进而指示微生物的代谢活性. 在菌株生长的整个阶段, 生物膜上微生物的 ETSA 均要显著高于游离菌体体系, 最高可达游离菌体体系的 1.74 倍. 可见, 生物膜上微生物的代谢活性有所提高, 尤其是呼吸链电子传递方面的代谢活性(图 7(a)).



(a) ETSA



(b) DHA

图7 菌株 GCY 的 ETSA 及 DHA

Fig. 7 ETSA and DHA of strain GCY

菌株脱氢酶是菌体氧化还原反应的关键酶, 在细菌生长和代谢过程中起重要作用, 因此可作为衡量微生物活性的指标. 实验测定了不同时刻两体系内菌体 DHA 的差异. 在 24 h 以及 48 h, 两体系的 DHA 差异较为显著, 生物膜上微生物的 DHA 要高于游离菌体体系(图 7(b)). 菌株 GCY 形成生物膜后, 代谢活性相较于游离菌体 GCY 有所提高. 推测 GCY 生物膜为菌株提供了更适宜的生长环境, 保证了菌株更强的生长代谢活性,

使与 $O_2^{\cdot-}$ 生成相关的 NADH: 醌氧化还原酶酶活性提高, 进而促进 $O_2^{\cdot-}$ 产生. 同时, 有报道表明, 胞外 ROS 可能对细菌细胞结构存在损害并引起胞内氧化应激, 而 EPS 则可以减少 ROS 带来的损害. 以生物膜形式存在的菌株可以形成更多的胞外 EPS, 这有利于其抵抗高浓度的胞外 ROS, 保护菌株免于氧化应激的伤害.

综上, 生物膜的存在将会显著提高 L-氨基酸氧化酶酶活性, 使胞外 H_2O_2 产量提升, 并且生物膜体系 DHA、ETSA 等菌株代谢的活性提高, 进而使其产 $O_2^{\cdot-}$ 的关键酶 NADH: 醌氧化还原酶酶活性提高, 这是生物膜 $O_2^{\cdot-}$ 产量显著提升的主要原因.

3 结 语

本文以海洋假交替单胞菌 GCY 为代表, 探究了海洋产 ROS 细菌生物膜的产 ROS 能力. 通过实验证实 GCY 生物膜产胞外 H_2O_2 以及 $O_2^{\cdot-}$ 的能力相比于游离菌体显著提升, 生物膜体系产 H_2O_2 过程的关键酶 L-氨基酸氧化酶酶活性明显提升. 同时, 对 DHA、ETSA 等生理生化指标进行测定, 发现以生物膜形式生长的 GCY 生长代谢活性提高, 胞外 $O_2^{\cdot-}$ 的生成成为部分生长偶联型, 因此推测代谢活性的提升是其 $O_2^{\cdot-}$ 产量增加的原因. 海洋环境中的 ROS 可以影响污染物的归趋, 以 GCY 为代表的海洋细菌生物膜产 ROS 能力提高, 暗示了生物膜对于海洋环境中各类污染物去除的潜力.

参考文献:

- [1] LAMBETH J D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(3): 181-189.
- [2] DIXON T C, VERMILYEA A W, SCOTT D T, *et al.* Hydrogen peroxide dynamics in an agricultural headwater stream: Evidence for significant nonphotochemical production [J]. *Limnology and Oceanography*, 2013, 58(6): 2133-2144.
- [3] ROSE A L, WEBB E A, WAITE T D, *et al.* Measurement and implications of nonphotochemically generated superoxide in the equatorial Pacific Ocean [J]. *Environmental Science*

- and Technology, 2008, **42**(7): 2387-2393.
- [4] ZHANG Y, DEL VECCHIO R, BLOUGH N V. Investigating the mechanism of hydrogen peroxide photoproduction by humic substances [J]. **Environmental Science and Technology**, 2012, **46**(21): 11836-11843.
- [5] ZHANG T, HANSEL C M, VOELKER B M, *et al.* Extensive dark biological production of reactive oxygen species in brackish and freshwater ponds [J]. **Environmental Science and Technology**, 2016, **50**(6): 2983-2993.
- [6] DIAZ J M, HANSEL C M, VOELKER B M, *et al.* Widespread production of extracellular superoxide by heterotrophic bacteria [J]. **Science**, 2013, **340**(6137): 1223-1226.
- [7] 郭雅丽, 王 竞, 顾 晨, 等. 海洋麦氏交替单胞菌共代谢降解布洛芬研究 [J]. 大连理工大学学报, 2021, **61**(1): 14-21.
- GUO Yali, WANG Jing, GU Chen, *et al.* Study of ibuprofen degradation by marine *Alteromonas macleodii* under co-metabolic conditions [J]. **Journal of Dalian University of Technology**, 2021, **61**(1): 14-21. (in Chinese)
- [8] GU Chen, WANG Jing, GUO Mengfan, *et al.* Extracellular degradation of tetrabromobisphenol A via biogenic reactive oxygen species by a marine *Pseudoalteromonas* sp. [J]. **Water Research**, 2018, **142**: 354-362.
- [9] MIDDELBURG J J, NIEUWENHUIZE J, VAN BREUGEL P. Black carbon in marine sediments [J]. **Marine Chemistry**, 1999, **65**(3/4): 245-252.
- [10] PAERL H W, PINCKNEY J L. A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling [J]. **Microbial Ecology**, 1996, **31**(3): 225-247.
- [11] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix [J]. **Nature Reviews Microbiology**, 2010, **8**(9): 623-633.
- [12] DE CARVALHO C. Marine bio films: A successful microbial strategy with economic implications [J]. **Frontiers in Marine Science**, 2018, **5**: 126.
- [13] KUBOTA H, SENDA S, TOKUDA H, *et al.* Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149 [J]. **Food Microbiology**, 2009, **26**(6): 592-597.
- [14] 唐家桓, 刘 毅, 周顺桂, 等. 电活性生物膜: 形成、表征及应用 [J]. 应用与环境生物学报, 2014, **20**(6): 1096-1103.
- TANG Jiahuan, LIU Yi, ZHOU Shungui, *et al.* Electrochemically active biofilms: formation, characterization and application [J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 2014, **20**(6): 1096-1103. (in Chinese)
- [15] HOLMSTRÖM C, KJELLEBERG S. Marine *pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents [J]. **FEMS Microbiology Ecology**, 1999, **30**(4): 285-293.
- [16] CUI Z, LAI Q, DONG C, *et al.* Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge [J]. **Environmental Microbiology**, 2008, **10**(8): 2138-2149.
- [17] 郭定环, 王 竞, 顾 晨, 等. 海洋假交替单胞菌产胞外活性氧特性研究 [J]. 大连理工大学学报, 2020, **60**(6): 555-561.
- GUO Dinghuan, WANG Jing, GU Chen, *et al.* Study of characteristics of extracellular reactive oxygen species produced by a marine *Pseudoalteromonas* sp. [J]. **Journal of Dalian University of Technology**, 2020, **60**(6): 555-561. (in Chinese)
- [18] LI Q, LU H, YIN Y, *et al.* Synergic effect of adsorption and biodegradation enhance cyanide removal by immobilized *Alcaligenes* sp. strain DN25 [J]. **Journal of Hazardous Materials**, 2019, **364**: 367-375.
- [19] 周 艳. 电化学活性菌/酞改性 PUF 协同降解硝基苯研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2012.
- ZHOU Yan. Study on degradation of nitrobenzene by synergies of electrochemically active bacteria and quinoid-modified polyurethane foam [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2012. (in Chinese)
- [20] FALÅS P, BAILLON-DHUMEZ A, ANDERSEN H R, *et al.* Suspended biofilm carrier and activated sludge removal of acidic pharmaceuticals [J]. **Water Research**, 2012, **46**(4): 1167-1175.
- [21] STENUIT B, LAMBLIN G, CORNELIS P, *et al.* Aerobic denitration of 2,4,6-trinitrotoluene in the

- presence of phenazine compounds and reduced pyridine nucleotides [J]. **Environmental Science and Technology**, 2012, **46**(19): 10605-10613.
- [22] VOELKER B M, SULZBERGER B. Effects of fulvic acid on Fe (II) oxidation by hydrogen peroxide [J]. **Environmental Science and Technology**, 1996, **30**(4): 1106-1114.
- [23] ZHANG Peng, YUAN Songhu, LIAO Peng. Mechanisms of hydroxyl radical production from abiotic oxidation of pyrite under acidic conditions [J]. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, 2016, **172**: 444-457.
- [24] 顾晨. 海洋细菌好氧共代谢降解四溴双酚 A 机制研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2019.
- GU Chen. Study on mechanism of tetrabromobisphenol A biodegradation by marine bacteria under aerobic cometabolic conditions [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2019. (in Chinese)
- [25] BLENKINSOPP S A, LOCK M A. The measurement of electron-transport system activity in river biofilms [J]. **Water Research**, 1990, **24**(4): 441-445.
- [26] 尹军, 谭学军, 任南琪. 用 TTC 与 INT-电子传递体系活性表征重金属对污泥活性的影响 [J]. 环境科学, 2005, **26**(1): 56-62.
- YIN Jun, TAN Xuejun, REN Nanqi. Evaluation of TTC and INT-electron transport system activity tests for heavy metal inhibition of activated sludge [J]. **Environmental Science**, 2005, **26**(1): 56-62. (in Chinese)
- [27] PARRILLI E, RICCIARDELLI A, CASILLO A, *et al.* Large-scale biofilm cultivation of Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 for physiologic studies and drug discovery [J]. **Extremophiles: Life Under Extreme Conditions**, 2016, **20**(2): 227-234.
- [28] 方涛, 李道季, 余立华. 海洋微生物铁载体的研究 [J]. 海洋科学, 2007, **31**(10): 87-91.
- FANG Tao, LI Daoji, YU Lihua. Advance of the siderophors produced by marine microorganisms [J]. **Marine Sciences**, 2007, **31**(10): 87-91. (in Chinese)
- [29] VAN DEN ECKER D, VAN DEN BRAND M A, BOSSINGER O, *et al.* Blue native electrophoresis to study mitochondrial complex I in *C. elegans* [J]. **Analytical Biochemistry**, 2010, **407**(2): 287-289.

Study of ROS production characteristics of biofilm by marine *Pseudoalteromonas* sp.

LÜ Jingping, LI Zelong, ZHANG Herui, WANG Jing*

(School of Environmental Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Marine microorganisms, which can produce extracellular reactive oxygen species (ROS), are inferred as source of ROS for marine aphotic zones. However, in the actual marine environment, microorganisms have the tendency to form into biofilms, and the effect of biofilm on ROS production has rarely been reported. So ROS production characteristics of *Pseudoalteromonas* sp. GCY biofilm are investigated. According to the results, the extracellular H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ production of GCY biofilm is higher than that of free cells. Extracellular H_2O_2 production and extracellular $O_2^{\cdot-}$ production are 3.10 times and 3.56 times higher than that of free cells, respectively. Meanwhile, the activities of L-amino acid oxidase (LAO), dehydrogenase activity (DHA) and electron transport system activity (ETSA) are also increased. Compared with free cells, polysaccharide and protein contents in extracellular polymer substance (EPS) components are both increased. The total EPS production increases by $149\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, which enhances cell adhesion and reduces ROS-induced damage to cells.

Key words: reactive oxygen species; biofilm; *Pseudoalteromonas* sp.; marine environment