

## CAS 平板覆盖法检测氢氧化细菌铁载体

王卫星<sup>1</sup> 周晓伦<sup>1</sup> 李忠玲<sup>2</sup> 王明鹏<sup>1</sup> 王卫卫<sup>1\*</sup>

(1. 西北大学 生命科学学院 陕西 西安 710069)

(2. 陕西省科学院酶工程研究所 陕西 西安 710600)

**摘要:**【目的】用 CAS 平板覆盖法检测氢氧化细菌铁载体, 解决通用 CAS 琼脂平板法中十六烷基三甲基溴化铵对真菌和某些细菌的生长抑制问题。【方法】将改良的 CAS 检测培养基覆盖在长满菌落的无铁培养基上, 生长抑制问题因微生物未与十六烷基三甲基溴化铵直接接触而解决。【结果】3 株氢氧化细菌 SDW-5、SDW-9 和 AaP-13 均能产生单菌落, 加入 CAS 检测培养基 1 h 后, 菌落周围产生明显的铁载体晕圈。【结论】本方法成功解决了生长抑制问题, 可以作为检测微生物铁载体的通用方法。

**关键词:** 覆盖, 氢氧化细菌, 铁载体

## Detection of siderophore production from hydrogen-oxidizing bacteria with CAS overlay plate method

WANG Wei-Xing<sup>1</sup> ZHOU Xiao-Lun<sup>1</sup> LI Zhong-Ling<sup>2</sup> WANG Ming-Peng<sup>1</sup>  
WANG Wei-Wei<sup>1\*</sup>

(1. The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

(2. Institute of Enzyme Engineering, Shannxi Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi 710600, China)

**Abstract:** [Objective] CAS (Chrome azurol S) overlay plate method was used for the detection of siderophore from hydrogen-oxidizing bacteria, to address the problem of growth inhibition for fungi and certain bacteria caused by hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (HDTMA) in the popular CAS assay. [Methods] We just need to coverage the modified CAS medium on iron-free culture agar plates covered with colonies, then the problem of growth inhibition could be removed, due to the microorganisms tested with no direct contact with the hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (HDTMA). [Results] Three strains of hydrogen-oxidizing bacteria, SDW-5, SDW-9, AaP-13 could form single colony, the siderophore halo around the colonies will form in an hour after a modified CAS medium is covered on iron-free culture agar plates. [Conclusion] This method successfully avoided growth inhibition problems, hence it could become a universal method for the detection of microorganisms siderophores.

**Keywords:** Overlay, Hydrogen-oxidizing bacteria, Siderophores

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(No. SJ082ZT03); 中国科学院 2013 年度“西部之光”人才培养计划资助项目

\*通讯作者: ✉: wwwang@nwu.edu.cn

收稿日期: 2013-12-17; 接受日期: 2014-04-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-30

氢氧化细菌是一类能通过氧化氢气获得能量,固定二氧化碳作为唯一碳源的微生物<sup>[1-2]</sup>,土壤中分布广泛,尤其是豆科植物根际大量存在。氢氧化细菌没有单独的分类,多分布在诺卡式菌属、假单胞菌属、黄杆菌属、副球菌属、产碱菌属、分支杆菌属、节杆菌属之间<sup>[3]</sup>。氢氧化细菌属于植物根际促生菌,在农作物增产方面有巨大的应用潜力,所以其各种促生机制的研究已成为热点,其中分泌铁载体就是几种重要的促生机制之一<sup>[4]</sup>。

铁载体是一类能特异性结合铁离子并供给微生物细胞的低分子量物质<sup>[5-6]</sup>。铁元素是微生物生长的必需元素,在缺铁的环境中微生物会分泌铁载体整合铁离子满足自身生长需要<sup>[7]</sup>。目前,常用的铁载体检测方法为 Schwyn 和 Neilands 发明的通用 CAS 琼脂平板法<sup>[8]</sup>,当微生物产生的铁载体与由 CAS、十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)、铁离子组成的蓝色复合物结合后,会夺走铁离子,使平板颜色由蓝色变成桔黄色,产生明显的铁载体晕圈。

然而,对生长条件要求苛刻的细菌,如氢氧化细菌很难在通用 CAS 检测培养基上生长。因为,制备通用 CAS 检测平板添加的十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)被证明对某些细菌和真菌的生长有强烈的抑制作用,而不利于铁载体的检测<sup>[9-10]</sup>。虽然 Milagres 等对通用 CAS 琼脂平板法进行了改进<sup>[10]</sup>,使得某些被抑制的细菌或真菌能够被检测,但这些方法应用起来方便性差或效率较低。本文用 CAS 平板覆盖法对氢氧化细菌铁载体进行检测,为氢氧化细菌及其他微生物铁载体的检测提供有效、方便、通用的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

3 株氢氧化细菌: AaP-13、SDW-5、SDW-9,从西北大学果园豆科植物沙打旺根际土壤中分离得到;未知产铁载体菌株: S1、S2 从西北大学果园三叶草根际土壤中分离得到;不产生铁载体的负对照菌株: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、BD-6

(*Microbacterium* sp. GenBank 登录号 KC182738)、BD-8 (*Arthrobacter* sp. GenBank 登录号 KC182735)、AD-13 (*Microbacterium* sp. GenBank 登录号 KC182739)、JX-42 (*Pseudomonas* sp. GenBank 登录号 KC182724)、AD-2 (*Pseudomonas* sp. GenBank 登录号 KC182722)、AD-4 (*Stenotrophomonas* sp. GenBank 登录号 KC182732)、BD-1 (*Paracoccus* sp. GenBank 登录号 KC182734),为本实验室保藏。

### 1.2 改进的 CAS 检测培养基

CAS 检测培养基<sup>[8,11]</sup>: 铬天青 S (CAS) 60.5 mg, 十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA) 72.9 mg, 1 mmol/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10 mmol/L HCl 配制) 10 mL, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 50 mL, 蒸馏水 940 mL, 琼脂 0.9%。磷酸盐缓冲液(g/L):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  5.905,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  24.270,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2.500,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.750,  $\text{NaCl}$  1.250, pH 6.8, 用时 10 倍稀释<sup>[11]</sup>。铬天青 S (Chrome azurol S), CAS 上海化学试剂采购供应站试剂厂;十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA, WOLSEN)。

牛肉膏蛋白胨培养基参照文献[12]配制, MKB 无铁培养基参照文献[13]配制。

本文所用培养基为适合氢氧化细菌生长的无铁培养基,检测其他微生物铁载体时,可以用最适合待测微生物生长的培养基,试验中用到的所有器皿需做去铁敏处理。

### 1.3 铁载体的检测

**1.3.1 氢氧化细菌铁载体的检测:**为促进铁载体的产生需将 3 株菌进行铁饥饿处理,将 3 株氢氧化细菌分别接种至 5 mL 液体 MKB 无铁培养基,摇床中 28 °C、180 r/min 培养 72 h。将菌液 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,然后用无菌超纯水 1 000 r/min 离心 5 min 洗涤 2 次,再用无菌超纯水稀释 10 倍得到菌悬液。取 10  $\mu\text{L}$  菌悬液接种于无铁 MKB 培养基平板或用接种环划线接种于无铁 MKB 培养基平板,每株菌 3 个重复,置于 28 °C 生化培养箱中

培养 2 d。

2 d 后可见每个 MKB 无铁培养基平板上都长出了明显的单菌落,待灭菌后的改良 CAS 检测培养基冷却至 60 °C 左右时,将其按每个平板 10 mL 倒入 MKB 无铁培养基平板中,放置 1 h 观察每个平板的颜色变化,并记录结果。对照组为不接菌的 MKB 培养基平板和按同样方法处理的接有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、BD-6、BD-8、AD-13、JX-42、AD-2、BD-1、AD-4 的平板。

同时,将经过铁饥饿处理的 3 株氢氧化细菌,以同样方法接种于按照通用 CAS 平板法<sup>[8]</sup>配制的铁载体检测平板上,置于 28 °C 生化培养箱中培养,每天观察平板上有无菌落产生和菌落周围是否有铁载体晕圈。

**1.3.2 产铁载体氢氧化细菌的再活化:**用灭菌牙签以穿刺的方式,从已产生铁载体晕圈的原始培养基中挑取适量菌苔,接种到 5 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基中,于摇床中 28 °C、180 r/min 活化 24 h。用接种环挑取一环培养液划线接种到固体牛肉膏蛋白胨平板上,每株菌 3 个重复,生化培养箱中 28 °C 培养 24–48 h 后可观察到每株菌均能产生单菌落。

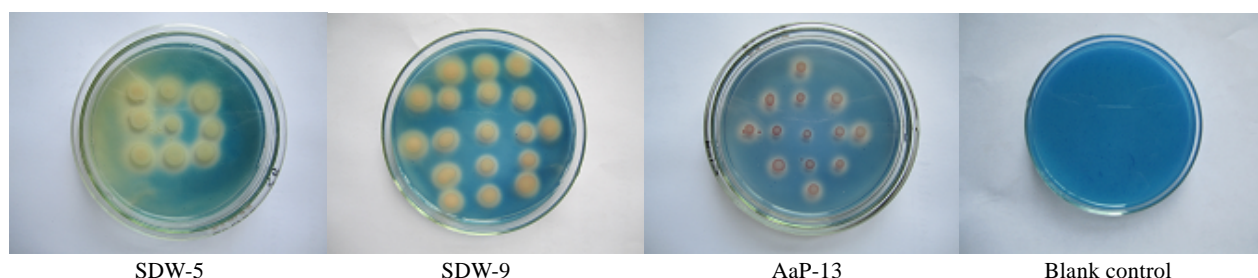
**1.3.3 未知产铁载体细菌的筛选及检测:**将三叶草根际土壤进行梯度稀释,按 1.3.1 中的方法铁饥饿处理后涂布于按照 CAS 平板覆盖法配制的铁载体检测平板上,进行产铁载体细菌的筛选与纯化,经过纯化的菌重复 1.3.1 中铁载体检测方法并拍照。

## 2 结果与分析

图 1 显示在 MKB 无铁培养基平板上,3 株氢氧化细菌,SDW-5、AaP-13 和 SDW-9 生长良好,2 d 后能产生明显菌落,将改良 CAS 检测培养基倒入后,大约 1 h 后试验菌株菌落周围均产生了特征性的铁载体整合晕圈(图 1),而没有接菌的空白对照组平板颜色没有变化。不产生铁载体的负对照菌株,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、BD-6、BD-8、AD-13、JX-42、AD-2、BD-1 和 AD-4 等 8 株菌生长良好均能产生明显菌落,且所在平板颜色也没有发生变化,仍为蓝色,菌落周围也没有产生铁载体晕圈(图 2)。

为证明 CAS 平板覆盖法的优越性,用通用 CAS 平板法对 3 株氢氧化细菌进行了铁载体检测(图 3),与 CAS 平板覆盖法的检测效果作比较。结果显示,与 CAS 平板覆盖法相比在相同条件下培养 2 d 后 3 个平板上几乎看不到菌落生长的迹象,直到第 7 天接种有 SDW-5 和 SDW-9 的平板才产生明显的菌落,而接种有 AaP-13 的平板仍无菌落产生。由此可以判断,在通用 CAS 平板上 SDW-5 和 SDW-9 受到十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)抑制生长变缓,AaP-13 则无法生长,另外 SDW-5 和 SDW-9 产生的铁载体晕圈也不如 CAS 平板覆盖法明显,将平板表面的菌落用蒸馏水冲洗干净后,才可以观察到微弱的铁载体晕圈。

为验证 CAS 平板覆盖法的通用性,从三叶草



SDW-5

SDW-9

AaP-13

Blank control

图 1 CAS 平板覆盖法检测 3 株氢氧化细菌铁载体的结果

Figure 1 Detection of siderophore from 3 strains of hydrogen-oxidizing bacteria by CAS overlay plate method

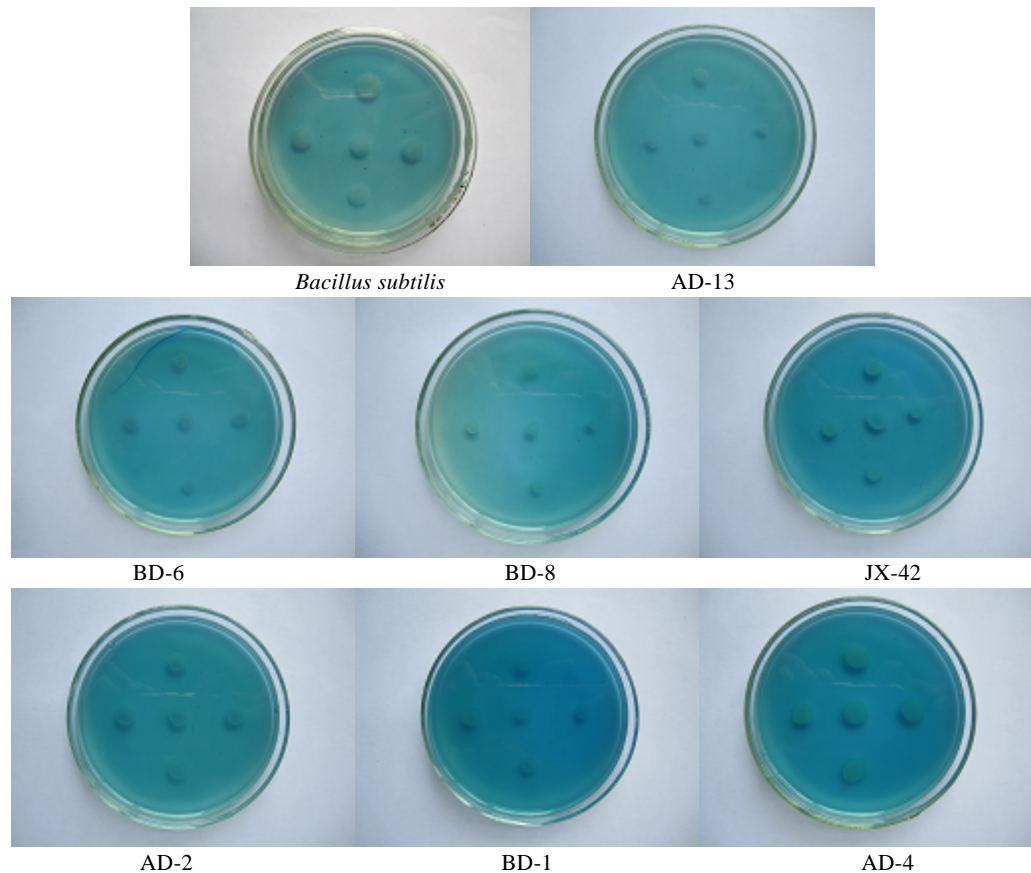


图 2 不产生铁载体菌株的负对照结果

Figure 2 Negative results of strains did not produce siderophores

根际对未知铁载体产生菌进行了筛选和铁载体检测。事实证明,最终纯化出的 2 株菌 S1、S2 在按 CAS 平板覆盖法配制的检测平板上生长良好,并能产生特征性的铁载体晕圈(图 4)。

### 3 讨论

针对通用 CAS 铁载体检测培养基中十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)对某些细菌和真菌的生长抑制问题,有些研究者进行了改进。Milagres 等的方法中,CAS 检测平板由适合各种微生物生长的培养基和 CAS 检测培养基两部分组成,微生物在两种培养基的交界处生长时分泌的铁载体渗透到另一侧的 CAS 检测平板内,微生物未与十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)直接接触,生长抑制问题迎刃而解,从而允许检测各种微生物<sup>[10]</sup>。这种方法制作 CAS 检测平板步骤繁琐,容易染菌,得到结果的时间较

长。陈绍兴等的方法中,把 CAS 检测培养基置于下层,细菌生长培养基置于上层,细菌分泌的铁载体需透过上层平板渗透到下层 CAS 检测平板,产生铁载体晕圈<sup>[14]</sup>。然而,此方法对于铁载体分泌能力较弱的细菌来说,效果可能不够明显。

CAS 平板覆盖法效果良好,在不改变基本检测效果的前提下充分借鉴前人方法<sup>[10,14]</sup>对通用 CAS 检测方法加以改进,将 CAS 检测培养基置于上方,细菌生长培养基置于下方,细菌分泌的铁载体可以直接与 CAS 检测培养基接触,效果也更加明显。无铁培养基可以选择最适合待测微生物生长的培养基,待测微生物在未与十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)直接接触的条件下可以迅速生长,同时产生的铁载体也分泌到了培养基中,此时将 CAS 检测培养基倒入检测平板,最快 1 h 后就能观察到



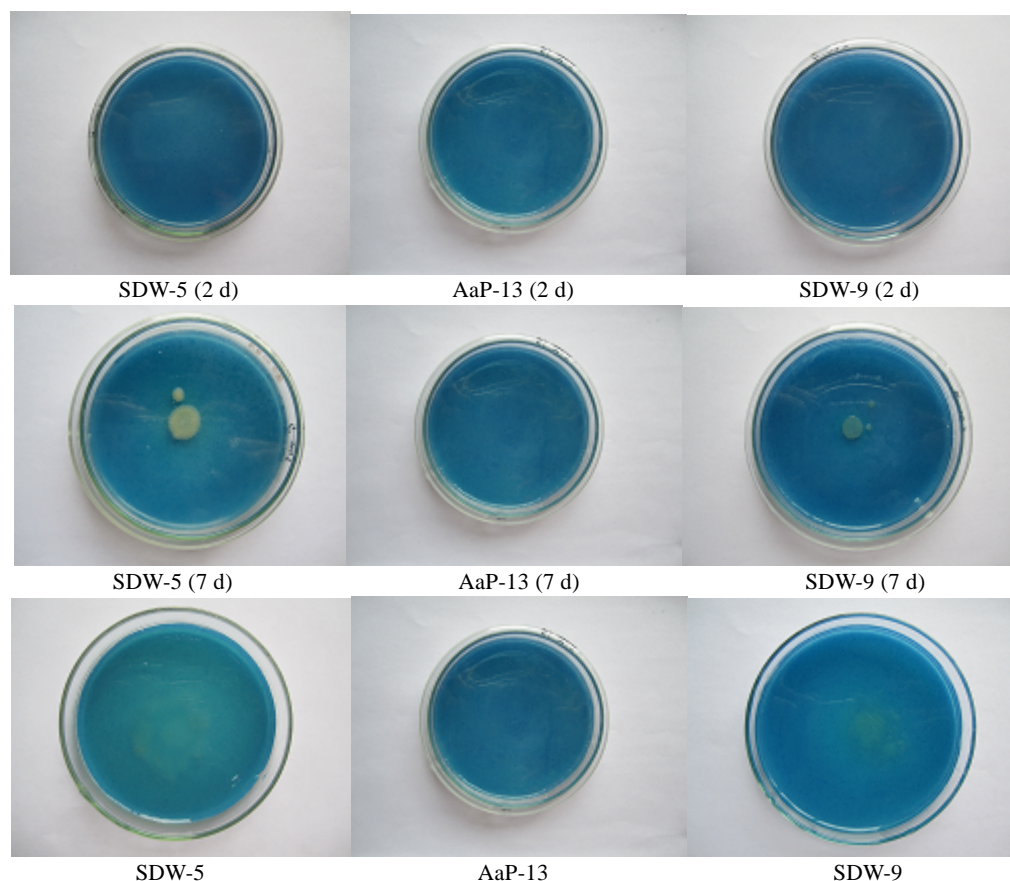


图3 通用 CAS 平板法检测 3 株氢氧化细菌铁载体的结果

Figure 3 Detection of siderophore from 3 strains of hydrogen-oxidizing bacteria by popular CAS assay

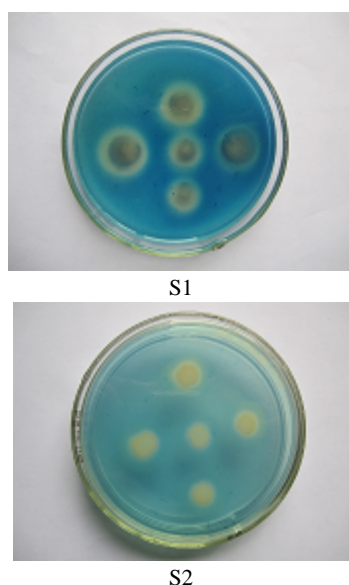


图4 CAS 平板覆盖法检测未知细菌铁载体的结果

Figure 4 Detection of siderophore from unknown bacteria by CAS overlay plate method

铁载体晕圈,时间的长短及铁载体晕圈大小要视被检测菌产铁载体能力的大小而定。参照凝胶内沉淀单向扩散试验平板法<sup>[15]</sup>,CAS 检测培养基中的琼脂浓度为 0.9%,此浓度利于铁载体扩散与 CAS、十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)、铁离子组成的蓝色复合物中的铁离子结合,缩短观测结果所用时间。磷酸盐缓冲液缓冲能力很强,可以完全替代哌嗪-1,4-二乙磺酸,略去中间调 pH 的操作,既节约成本又简化 CAS 检测培养基的配制方法<sup>[11]</sup>。除不接菌的平板作空白对照外,还用不产生铁载体的菌株,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、BD-6、BD-8、AD-13、JX-42、AD-2、BD-1 和 AD-4 等 8 株不同革兰氏阳性和阴性细菌作负对照,结果显示 8 株菌生长良好,都能产生明显菌落,经过相同处理后检测平板颜色没有变化,仍为蓝色,负对照细菌的菌落周围均无铁载体晕圈产生。表明,实验组中菌落

周围的晕圈确由细菌分泌铁载体产生。作者所知的已发表的文章中都介绍了他们所用方法的实效性和通用性,但文中并未就新方法的检测效果与通用 CAS 平板法的检测效果比较,来证明新方法的优点,也没有用新方法筛选和检测未知的铁载体产生菌来验证新方法的通用性。本文将新方法“CAS 平板覆盖法”和旧方法“通用 CAS 平板法”两种方法的检测效果做了比较,结果证明 CAS 平板覆盖法的检测效果比通用 CAS 平板法明显,而且也解决了某些菌株(如本文中的 AaP-13)在通用 CAS 平板上无法生长的问题,为证明 CAS 平板覆盖法不仅能检测已知铁载体产生菌,而且也能用于筛选和检测未知的铁载体产生菌,用 CAS 平板覆盖法从三叶草根际筛选到了 2 株未知的铁载体产生菌 S1、S2 且检测效果良好(图 4),以上结果证明了 CAS 平板覆盖法的通用性。

CAS 平板覆盖法快速、简便、实效,通过避免氢氧化细菌生长时与十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)直接接触,很好的解决了十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)对氢氧化细菌生长抑制的问题,用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液代替通用 CAS 琼脂平板法中的复杂缓冲体系,不但没有改变检测效果,而且颜色变化比通用 CAS 琼脂平板法更加明显<sup>[11]</sup>。3 株氢氧化细菌经重新活化后,都能产生单菌落,说明 CAS 平板覆盖法使用的试剂以及其所包含的金属离子基本不会抑制试验菌株的生长。因此,CAS 平板覆盖法可以作为检测微生物铁载体的通用方法。

## 参 考 文 献

[1] Volova TG, Kiselev EG, Shishatskaya EI, et al. Cell growth and accumulation of polyhydroxyalkanoates CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> of a hydrogen-oxidizing bacterium, *Cupriavidus eutrophus* B-10646[J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 215-222.

- [2] 蒙渊, 王卫卫, 陈兴都, 等. 氢氧化细菌分离、筛选及促生机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1525-1532.
- [3] Maimaiti J, Zhang Y, Yang J, et al. Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(2): 435-444.
- [4] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Physiologia Plantarum, 2003, 118(1): 10-15.
- [5] Ma ZC, Chi Z, Geng Q, et al. Disruption of the pullulan synthetase gene in siderophore-producing *Aureobasidium pullulans* enhances siderophore production and simplifies siderophore extraction[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(12): 1807-1812.
- [6] Beasley FC, Heinrichs DE. Siderophore-mediated iron acquisition in the staphylococci[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2010, 104(3): 282-288.
- [7] Wang ZP, Liu ZH, Yu F, et al. Siderophore-modified Fenton-like system for the degradation of propranolol in aqueous solutions at near neutral pH values[J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 229: 177-182.
- [8] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56.
- [9] Shin SH, Lim Y, Lee SE, et al. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophore in biological fluids[J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44(1): 89-95.
- [10] Milagres A, Machuca A, Napoleao D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 37(1): 1-6.
- [11] 赵翔, 谢志雄, 陈绍兴, 等. 适合高产铁载体细菌筛选、检测体系的改进与探析[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 95-98.
- [12] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 214.
- [13] 王平, 董飏, 李阜棣, 等. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326.
- [14] 陈绍兴, 赵翔, 谢志雄. 双层平板法检测嗜盐古菌铁载体[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 142-144.
- [15] Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion[J]. Immunochemistry, 1965, 2(3): 235-254.