

## 双层平板法检测嗜盐古菌铁载体

陈绍兴<sup>1,2</sup> 赵翔<sup>2</sup> 谢志雄<sup>2\*</sup>

(1. 红河学院 理学院生物系 蒙自 661100)

(2. 武汉大学 生命科学学院 武汉 430072)

**摘要:** 采用双层平板法应用于嗜盐古菌铁载体的原位检测。双层平板的上层为不添加铁离子的嗜盐古菌培养基,嗜盐古菌可在其上生长,在缺铁胁迫下可向外分泌铁载体;下层为含有 CAS 检测液用于铁载体检测的琼脂。当上层平板生长的嗜盐古菌分泌的铁载体透过培养基渗透到下层检测琼脂后,即可在下层检测平板上产生明显的特征性的铁载体整合晕圈,表明双层平板法在嗜盐古菌的铁载体检测中确实可行,且较原有的嗜盐古菌铁载体检测方法简便、直接。

**关键词:** 双层平板,嗜盐古菌,铁载体

## Detection of Siderophore from Halophilic Archaea with Two-layer Plate

CHEN Shao-Xing<sup>1,2</sup> ZHAO Xiang<sup>2</sup> XIE Zhi-Xiong<sup>2\*</sup>

(1. Department of Biology, School of Sciences, Honghe University, Mengzi 661100)

(2. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract:** A two-layer plate was developed for *in situ* detection of siderophore from halophilic archaea. Halophilic archaea could grow on the upper nutrient layer without addition of iron and excrete siderophore under iron-limited stress. The lower layer was the detection agar, which contained universal blue-coloured ferric-CAS complex. The presence of the siderophore was indicated by the decolorization of the blue complex, resulting in a yellow-orange halo around colonies growing on the upper nutrient layer, when the excreted siderophore penetrated from the upper nutrient layer into the lower detection agar. The results showed that the two-layer plate method was applicable to the detection of siderophore from halophilic archaea, which was more convenient and definite than former approach for halophilic archaea siderophore detection.

**Keywords:** Two-layer detection plate, Siderophores, Halophilic archaea

古菌(Archaea) 是一类与细菌及真核生物显著不同的生命的第三种形式<sup>[1]</sup>, 大多生活在极端或特殊环境中, 主要包括产甲烷古菌(Methanogenic archaea)、极端嗜盐古菌(Extremely halophilic archaea) 和极端嗜热古菌(Extremely thermophilic archaea) 等三大类。极

端古菌是极端环境微生物的重要成员,也是极端环境微生物资源开发的重要领域。

铁元素是绝大多数的微生物生长所必需的元素之一。铁载体是微生物在缺铁的情况下分泌的低分子量、对铁离子有很强的螯合力的化合物<sup>[2]</sup>, 以满足

基金项目: 红河学院硕、博士科研启动基金项目(No. XSZ05024)

\* 通讯作者: Tel: 027-68754533-81; ✉: zxxie@whu.edu.cn; shaixinchen@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-04-18; 接受日期: 2007-07-05

微生物生长的需要。目前常用的铁载体检测方法为 CAS 平板法<sup>[3]</sup>, 即在不含铁的合成培养基中加入用铬天青 S(Chrome azurol S, CAS)、十六氨基烷基溴化铵(HTDMA)、铁离子络合成的蓝色复合染料进行检测。

由于嗜盐古菌无法直接在含有 HTDMA 等表面活性剂的 CAS 检测培养基上生长, 并且嗜盐古菌生长所需的高盐环境(4.2 mol/L NaCl)不利于 CAS 检测平板所需的蓝色复合染料的形成, 从而使得嗜盐菌的生长过程和铁载体的检测过程不能同时在一块平板中得到实现<sup>[3]</sup>。此外, 目前也有先过柱分离纯化, 再进行通用的 CAS 染色液检测来检测嗜盐古菌的铁载体的报道, 检测方法比较繁琐<sup>[15]</sup>。双层平板的方法<sup>[5,6,7]</sup>应用广泛, 但是目前还没有应用到嗜盐古菌铁载体的检测应用中, 本文拟采用成熟的双层平板的方法, 对嗜盐古菌的铁载体进行检测。为嗜盐古菌铁载体检测提供较为有效、方便的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

表 1 菌株与来源  
Table 1 Strains and source

| 菌株 Strains                          | 来源 Source          |
|-------------------------------------|--------------------|
| <i>Halobacterium</i> sp. AB91137    | CCTCC <sup>a</sup> |
| <i>Haloarcula quadrata</i> DSM11927 | A. Oren [9] 赠送     |
| <i>Haloferax volcanii</i> WFD11     | W. F. Doolittle 赠送 |

(CCTCC<sup>a</sup>, China Center for Type Culture Collection)

### 1.2 CAS 蓝色检测液的配制

CAS 蓝色检测液的配制参照文献[3]。铬天青 S(Chrome azurol S, CAS sigma)、十六氨基烷基溴化铵(HTDMA, 中国医药集团上海化学试剂公司)

### 1.3 嗜盐菌培养基的配制

参照文献[9], 但不加铁盐。

### 1.4 双层平板的制备

下层平板: 当 1% 琼脂温度下降到 65℃ 时, 按 5 mL CAS 蓝色检测液/100 mL 1% 琼脂的比例, 将 65℃ 水浴 30 min 的 CAS 蓝色检测液与其混合均匀, 20 mL/皿, 作为下层平板。

上层平板: 即按 1.3 配制的固体培养基, 20 mL/皿, 作为上层平板。

### 1.5 嗜盐菌的活化与接种

挑取嗜盐古菌单菌落, 转接入 5 mL 嗜盐古菌液

体培养基<sup>[10]</sup>中, 37℃ 培养 1 周, 再以 1% 的接种量将上述的菌液接入新鲜的嗜盐古菌液体培养基中, 37℃ 振荡培养 1 周。

在双层平板上铺一张已经灭过菌的小圆滤纸片(直径为 6 mm), 取 10 μL 约 10<sup>6</sup> 菌落形成单位(CFU)/mL 的菌液接种到小圆滤纸片上, 30 min 后, 于 37℃ 倒置培养。两周后观察记录结果。

## 2 结果与讨论

图 1 显示, 在由嗜盐古菌固体培养基与通用 CAS 检测平板所组成的双层平板上, 3 个属的嗜盐菌, *Halobacterium* sp. AB91137、*Haloarcula quadrata* DSM11927 和 *Haloferax volcanii* WFD11, 能够在上层的嗜盐古菌培养基上生长良好, 在下层的 CAS 检测平板上能够产生典型的铁载体整合晕圈。DSM11927 菌株产生的铁载体晕圈直径较 AB91137 与 WFD11 菌株的大(见表 2), 对铁载体所产生的特征性整合晕圈进行半定量的测定, 结果见表 2, AB91137 与 WFD11 菌株产生的铁载体晕圈大小相近, 并且均小于 DSM11927 菌株产生的铁载体整合晕圈; 在铁载体晕圈与菌落直径的比值上, AB91137 与 DSM11927 菌株的大小相近, 并且小于 WFD11 菌株的铁载体晕圈与菌落直径。由此可知, DSM11927 菌株产铁载体的能力最强, 铁载体整合的特征晕圈较大, 但由于其生长速度相应也较快, 从而其铁载体特征性整合晕圈与菌落直径的比值和 AB91137、WFD11 菌株的相近。因此铁载体整合特征性晕圈与菌落直径比值可以作为产铁载体能力的一种半定量方法。

表 2 嗜盐菌产铁载体比较  
Table 2 Compared the production of siderophores from halophilic archaea

| 编号 No. | 菌株 Strains                          | D (mm)       | d (mm)       | D/d  |
|--------|-------------------------------------|--------------|--------------|------|
| A      | <i>Halobacterium</i> sp. AB91137    | 40.2 ± 0.032 | 18.2 ± 0.122 | 2.20 |
| B      | <i>Haloarcula quadrata</i> DSM11927 | 50.9 ± 0.732 | 22.6 ± 0.408 | 2.25 |
| C      | <i>Haloferax volcanii</i> WFD11     | 41.8 ± 0.163 | 16.7 ± 0.245 | 2.50 |

注: D: 晕圈直径; d: 菌落直径

Note: D: diameter of halo; d: diameter of colony

根据文献[3]报道, 当微生物产生的铁载体与由 CAS、HTDMA、铁离子组成的蓝色复合染料相结合,

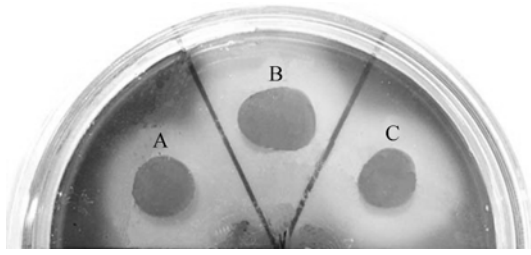


图1 嗜盐古菌“铁载体”的平板检测

Fig. 1 Detection of siderophores secreted by halophilic archaea on agar plate

A: *Halobacterium* sp. AB91137; B: *Haloarcula quadrata* DSM11927; C: *Haloferax volcanii* WFD11

从而铁载体将复合染料中的铁离子夺走,使得复合染料的颜色发生明显的改变,从蓝色变成桔黄色,即产生典型的铁载体晕圈。此检测铁载体的方法被广泛的采用<sup>[10-14]</sup>,其可靠性和通用性已经得到印证。在CAS检测平板上能够产生铁载体的特征性整合晕圈,即产生橙黄色的整合晕圈,即可认为铁载体的存在。Hubmacher等人在2002年分离了嗜盐古菌 *Halobacterium salinarum* 的铁载体,但是由于培养基上清中含有很高的盐离子浓度(4.2 mol/L),使得上清液与通用的CAS染色液进行反应时显阴性<sup>[15]</sup>。本文改变检测模式,采用菌体的生长和铁载体的检测相分离的双层平板检测法,对其产铁载体情况进行检测,结果在下层的通用CAS检测平板(铁载体指示平板)上得到了阳性结果。从以上的实验结果显示:(1)通用的CAS平板检测法所用的CAS复合染料在嗜盐古菌的铁载体检测中仍然适用;(2)双层平板检测法解决了嗜盐古菌的生长需要高盐与铁载体的检测不能高盐的矛盾;(3)嗜盐古菌在双层平板上产生典型的铁载体整合的特征性橙黄色的晕圈,进一步证明了嗜盐古菌可以产生分泌型铁载体的事实。

## 参 考 文 献

[1] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria, and eukarya. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(2): 4576-4579.  
 [2] Guerinot ML. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol*. 1994, **48**(1): 743-772.

[3] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination siderophores. *Anal Biochem*, 1987, **160**(1): 47-56.  
 [4] 孙军德, 赵春燕, 李炳学, 等. 光合细菌双层平板计数方法的研究. *沈阳农业大学学报*, 2001, **32**(2): 110-112.  
 [5] 苏 雄, 汪梦萍, 陈毓川, 等. 用双层平板和双温培养法分离支气管败血波氏杆菌. *华中农业大学学报*, 1994, **13**(5): 487-491.  
 [6] 田 蕴, 郑天凌. 应用双层平板技术评估海水沉积物中多环芳烃-芘的污染研究. *中国生态农业学报*, 2004, **12**(1): 23-25.  
 [7] 任光文, 赵 昕, 屠晓平, 等. 溶菌酶高产链霉菌RX-17的筛选及其特性研究. *山东大学学报*, 2004, **39**(1): 109-112.  
 [8] Oren A, Ventosa A, Gutiérrez MC, et al. *Haloarcula quadrata* sp. nov., a square, motile archaeon isolated from a brine pool in Sinai (Egypt). *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**(3): 1149-1155.  
 [9] Ye X Ch, Ou JH, Ni LN, et al. Characterization of a novel plasmid from extremely halophilic Archaea: nucleotide sequence and function analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, **221**(1): 53-57.  
 [10] Gram L. The influence of substrate on siderophore production by fish spoilage bacteria. *J Microbiol Methods*, 1996, **25**(3): 199-205.  
 [11] Farkas E, Megyeri K, Somsák L, et al. Interaction between Mo(VI) and siderophore models in aqueous solution. *J Inorg Biochem*, 1998, **70**(1): 41-47.  
 [12] Shin SH, Lim Y, Lee SE, et al. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J Microbiol Methods*, 2001, **44**(1): 89-95.  
 [13] Coccozza C, Tsao C CG, Cheah SM, et al. Temperature dependence of goethite dissolution promoted by trihydroxamate siderophores. *Geochim Cosmochim Acta*, 2002, **66**(3): 431-438.  
 [14] Parker DL, Sposito G, Tebo BM. Manganese(III) binding to a pyoverdine siderophore produced by a manganese(II)-oxidizing bacterium. *Geochim Cosmochim Acta*, 2004, **68**(23): 4809-4820.  
 [15] Hubmacher D, Matzanke BF, Anemüller S. Investigations of iron uptake in *Halobacterium salinarum*. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**(4): 710-712.