

假单胞菌荧光与非荧光铁载体对铁离子的应答差异

陈绍兴^{1,2} 费宗伟¹ 何明涛¹ 沈萍² 谢志雄^{2*}

(1. 红河学院 生命科学与技术学院 蒙自 661100)

(2. 武汉大学 生命科学学院 武汉 430072)

摘要: 假单胞菌既能产荧光铁载体也能产非荧光铁载体。通过对假单胞菌在不同铁离子浓度下,在通用 CAS(Chrome azurol S)检测平板、改进的蔗糖-天冬氨酸(SA)平板(MSA)上以及通用液体 CAS 培养基和 MSA 培养基内的铁载体产生情况的比较,发现在通用 CAS 的液体培养基上产生的主要为非荧光铁载体(pyochelin),而在改进的 MSA 培养基上产生的主要为荧光铁载体(pyoverdine);在铁离子的应答方面, pyoverdine 较 pyochelin 灵敏, 较低的铁离子浓度即可抑制荧光铁载体的产生,但是不能抑制非荧光铁载体。

关键词: 铁载体, Pyochelin, Pyoverdine, 铁离子, 假单胞菌

Different Response of Fluorescent and Non-fluorescent Siderophores from *Pseudomonas* to Ferric Iron

CHEN Shao-Xing^{1,2} FEI Zong-Wei¹ HE Ming-Tao¹ SHEN Ping² XIE Zhi-Xiong^{2*}

(1. College of Life Sciences and Technology, Honghe University, Mengzi 661100)

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

Abstract: We have studied the influence of ferric iron on the production of siderophore (microbial iron transport compound) from *Pseudomonas* sp. on universal CAS (Chrome azurol S) assay agar and modified sugar-aspartic acid (MSA) agar or liquid medium respectively. The results showed that the non-fluorescent siderophores (pyochelin) were produced on universal CAS assay agar and liquid medium and fluorescent siderophores (pyoverdine) on MSA agar and liquid medium; and the pyoverdine was more sensitive to the response of ferric iron whatever on agar plate or in liquid medium.

Keywords: Siderophore, Pyochelin, Pyoverdine, Iron(), *Pseudomonas*

铁载体是生物体在周围环境缺乏铁离子的条件下,向周围的环境分泌的一种可溶性的小分子量的短肽^[1]与铁离子有很高的结合能力^[2]。虽然铁元素在

地壳中含量占第四位,大部分的铁元素以固体的形式存在,在周围环境中可被生物体利用的游离铁离子浓度极低^[3]。生物体特别是微生物通过自身分泌

铁载体或者利用其他微生物产生的铁载体与环境中低浓度的铁离子紧密结合, 以主动运输方式, 将环境中铁离子运输到细胞内, 以满足生物体生理需要^[4]。

假单胞菌为农业上应用极为广泛的微生物, 能够显著地促进马铃薯的产量^[5], 提高禾本科植物、很多是粮食作物和经济作物的抗病虫害能力^[6]。研究显示, 假单胞菌还能与很多的病原微生物竞争铁离子, 使得病原微生物缺乏铁元素, 从而抑制了病原微生物的生长^[7]。但是假单胞菌又是一种机会致病菌, 导致肺炎, 研究表明致病的机制也和铁载体的分泌有关^[8]。

按照铁载体的荧光特性, 铁载体可以分为荧光与非荧光两大类; 假单胞菌在不同条件下可分泌两种类型的铁载体^[9]。2003年, Eun-Jin等人报道铜绿假单胞菌在铁缺乏的条件下可以分泌 pyoverdine 和 pyochelin 两类铁载体^[10]; 环境中的游离铁离子浓度约为 10^{-17} mol/L^[11], 非荧光铁载体-pyochelin 与铁离子的结合能力为 1.5×10^{-7} mol/L^[12], 因此不能单独依靠假单胞菌 pyochelin 来吸收环境中微量的铁离子; 而假单胞菌分泌的另外一种荧光铁载体-pyoverdine 与铁离子的结合能力大于 10^{-20} mol/L^[13], 所以在环境中铁离子浓度极其微量时, pyoverdine 仍能从环境中吸收极其微量的铁离子; 因此假单胞菌分泌的两种铁载体 pyoverdine 和 pyochelin 与铁离子的结合能力不同, 两者对铁离子浓度的应答会有所差异。

1 材料与方法

1.1 菌株

Pseudomonas sp. 菌株是从武汉东湖浅表层(20 cm)处分离得到的, 由本实验室进行了生理生化和 16S rRNA 序列分析鉴定并保藏(结果未发表)。

1.2 通用 CAS 染色液的配制

通用 CAS 检测平板的染色液的配制根据文献^[14]。

1.3 不同铁离子浓度的液体培养基及固体检测平板的制作

通用的 CAS(Chrome azurol S)固体检测平板以及液体培养基(不含染色液)是根据文献^[14]配制;

改进的蔗糖-天冬氨酸培养基(MSA)是以文献

[15]的蔗糖-天冬酰胺培养基为基础, 文献将它用于假单胞菌和镰孢霉的培养, 而我们是假单胞菌产铁载体方面的研究, 对培养基进行了相应的改进, 通过 20 种天然氨基酸替代试验, 发现将天冬酰胺以天冬氨酸来代替(结果未发表)。其他的培养基成分保持不变。固体培养基加入 2% 的琼脂粉。

在倒平板之前加入过滤除菌的 FeCl_3 , 使得铁离子终浓度分别为: 0 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、40 $\mu\text{mol/L}$, 再铺一张灭过菌的小圆滤纸片; 而在制作不同铁离子浓度的液体培养基时, 在接菌之前加入 FeCl_3 , 使得铁离子的终浓度分别为: 0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、12.5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 。对于液体培养基来说, 每个浓度铁离子的培养基都准备两份, 一份用于接菌, 另外一份作为培养基的空白对照。

1.4 固体平板检测

在固体平板上接种 10 μL , 10^6 CFU/mL 的菌液, 放置 30 min 后, 28°C 倒置培养 12 h, 然后进行普通照相与荧光照相, 荧光照相的曝光时间为 7 s。

1.5 液体检测

1.5.1 ΔOD_{630} 测定总的铁载体量: 将已活化的菌液按 1% 的接种量接入 20 mL 含有不同浓度铁离子的液体的通用 CAS 液体培养基与液体的 MSA 培养基中, 28°C 200 r/min 培养 12 h; 每个浓度的菌悬液取 5 mL, 10°C 10000 r/min 离心 10 min, 取 4 mL 上清液与 CAS 蓝色染液混合均匀, 室温放置 30 min; 取 4 mL 的培养基对照与等体积的 CAS 蓝色染液混合均匀, 分别测定 OD_{630} 的值, ΔOD_{630} = 前者的 OD_{630} - 后者的 OD_{630} 。

1.5.2 OD_{400} 测定 pyoverdine 量: 接种及获得上清方法同上, 用 752 型紫外分光光度计测定培养基上清液的 OD_{400} 值。

2 结果与讨论

2.1 通用 CAS 平板试验

如图 1 所示, A、B、C 为普通的照片, 随着从 A 到 C 铁离子浓度的增大, 假单胞菌分泌铁载体的量不断减少; a, b, c 为相应的荧光照片, 除了 a 有少量的荧光, b 和 c 几乎没有荧光。结果显示: 在 CAS 通用平板上假单胞菌主要分泌非荧光类铁载体, 只有极少量的荧光类铁载体, 铁载体圈主要是由非荧光铁载体 pyochelin 产生。

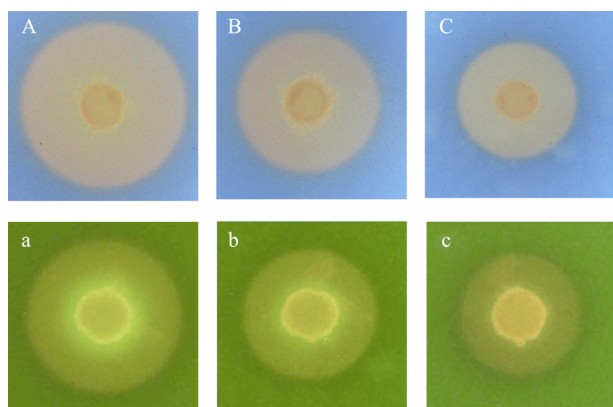


图1 通用 CAS 检测平板

Fig. 1 Universal CAS detection plate

注：外加铁离子的浓度：A 和 a 为 0 $\mu\text{mol/L}$ ；B 和 b 为 20 $\mu\text{mol/L}$ ；C 和 c 为 40 $\mu\text{mol/L}$ 。A、B、C 为普通照片；a、b、c 为荧光照片，曝光时间为 7 s

Note: Iron for addition. The concentration of iron in A and a, B and b, C and c was 0 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$ and 40 $\mu\text{mol/L}$, respectively. A, B, and C were normal photographs. a, b and c were fluorescence photographs. The exposure time was 7 s

2.2 改进的 MSA 固体平板试验

如图 2 所示，在没有外加铁离子的条件下，A 的铁载体圈最大，而且相应 a 的荧光也最强。

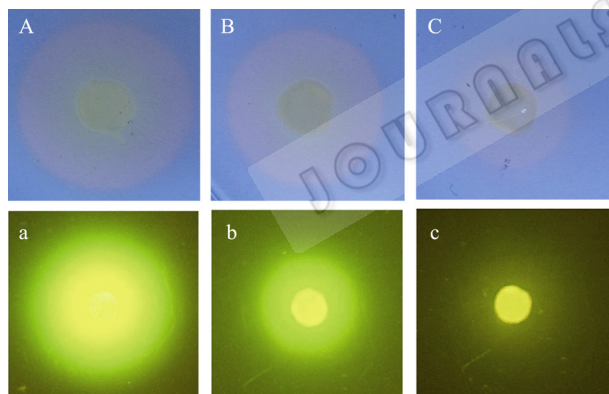


图2 改进的 MSA 检测平板

Fig. 2 The modified MSA detection plate

注：外加铁离子的浓度：A 和 a 为 0 $\mu\text{mol/L}$ ；B 和 b 为 20 $\mu\text{mol/L}$ ；C 和 c 为 40 $\mu\text{mol/L}$ 。A、B、C 为普通照片；a、b、c 为荧光照片，曝光时间为 7 s

Note: Iron for addition. The concentration of iron in A and a, B and b, C and c was 0 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$ and 40 $\mu\text{mol/L}$, respectively. A, B, and C were normal photographs. a, b and c were fluorescence photographs. The exposure time was 7 s

随着 MSA 固体平板上铁离子浓度的升高，从 B 到 C，铁载体的圈迅速减小，并且从荧光较强的 b 变成几乎没有荧光的 c；即在平板上能够产生明显的

铁载体圈见图 2C，而没有明显的荧光见图 2c，说明在图 2C 中产生的铁载体圈是由非荧光铁载体 pyochelin 产生。

1987 年，Schwyn 和 Neilands 构建了通用的 CAS 检测平板用于铁载体的检测^[14]。文献[16]报道假单胞菌在缺乏铁离子条件下，可分泌在紫外线照射下产荧光的 pyoverdine 和不产荧光的 pyochelin 两种类型的铁载体。当在通用的 CAS 平板上再外加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 的铁离子时荧光消失，表明荧光铁载体 pyoverdine 消失，见图 1b，但仍然有明显的铁载体圈，表明是由非荧光的 pyochelin 产生的；而在含有 40 $\mu\text{mol/L}$ 的铁离子时，MSA 平板上时荧光消失，见图 2c，同样有明显的铁载体圈，但是铁载体圈的直径要远小于前者；结果显示，荧光铁载体 pyoverdine 对铁离子的应答较非荧光铁载体 pyochelin 灵敏，在通用 CAS 平板上大多是 pyochelin，而在 MSA 平板上主要是荧光铁载体 pyoverdine；两组平板都说明了只有在极低的铁离子浓度下才分泌荧光铁载体 pyoverdine，而非荧光铁载体 pyochelin 在较高的铁离子浓度下仍然分泌。

2.3 液体 CAS 培养基试验

文献[17]报道， ΔOD_{630} 值变化和铁载体的变化成一定的线性关系；1999 年，Milagres 等人发现假单胞菌荧光类的铁载体在 400 nm 处有特异的吸收峰^[18]。如图 3 所示，在液体 CAS 培养基中，代表总的铁载体量的 OD_{630} 值随着铁离子浓度的上升而下降；而 OD_{400} 值保持在较低的背景值水平，只有在没有外加铁离子的条件下有一定的 OD_{400} 值；当外加铁离子达到 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 以上时，产生的几乎全为非荧光铁载体 pyochelin。结果显示：当外加铁离子达到 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时，液体 CAS 培养基中的 OD_{400} 值趋于 0，即无荧光铁载体 pyoverdine 产生，而只有当铁离子浓度达到 50 $\mu\text{mol/L}$ 时，总的铁载体量，即 ΔOD_{630} 值趋于 0，即此时还没有非荧光铁载体 pyochelin 分泌，以上结果显示：在对铁离子的应答方面，荧光铁载体 pyoverdine 较非荧光铁载体 pyochelin 灵敏。

2.4 液体 MSA 培养基试验

如图 4 所示，在液体 MSA 培养基中，铁载体的量随着液体培养基中铁离子浓度的上升而下降，并且较在液体的 CAS 培养基明显； OD_{400} 值的减少

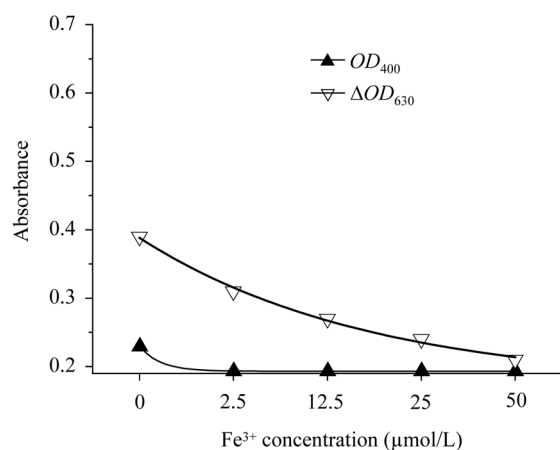


图3 液体CAS培养基, 28°C, 培养12 h后, 将无细胞上清与蓝色CAS染色液1:1混合均匀, 室温放置30 min, 测定结果

Fig. 3 Liquid CAS medium. Culture for 12 h at 28°C, and the cell free supernatant was collection, and combined with liquid CAS, than 30 min at room temperature. And the result was detected

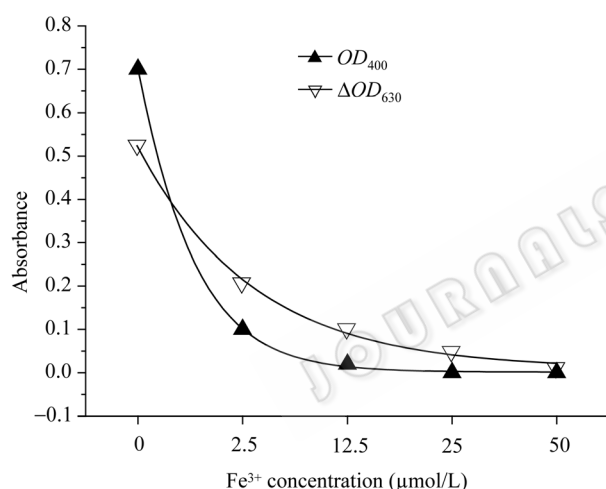


图4 液体MSA培养基

Fig. 4 Liquid modified MSA medium

注: 28°C, 培养12 h后, 将无细胞上清与蓝色CAS染色液1:1混合均匀, 室温放置30 min, 测定结果

Note: Culture for 12 h at 28°C, and the cell free supernatant was collection, and combined with liquid CAS, than 30 min at room temperature. And the result was detected

速率比 ΔOD_{630} 值的减少速率较大, 如图4, 即在加入微量的铁离子时, 我们推测荧光铁载体 pyoverdine 的量迅速下降, 而非荧光的铁载体 pyochelin 则此时没有明显的变化, 从而导致了荧光铁载体迅速下降速度小于总的铁载体, 这也同样说明在对铁离子的应答方面, 荧光铁载体 pyoverdine 较非荧光铁载体 pyochelin 灵敏。

以上实验结果显示, 虽然在固体平板与液体培养基中抑制铁载体产生所需要的铁离子浓度不同, 但是随着铁离子浓度的增加铁载体量的减少的规律是一致的, 并且在低浓度的铁离子条件下, 荧光铁载体即受到明显的抑制, 而只有在较高的铁离子浓度下非荧光的铁载体才被铁离子所抑制; 即荧光铁载体 pyoverdine 对铁离子的应答较非荧光铁载体 pyochelin 灵敏; 推测假单胞菌等根圈菌在周围环境中的铁离子浓度极低, 或者在与其他微生物竞争微量的铁离子的情况下, 可能通过向周围环境分泌与铁离子有更高结合能力并且对铁离子极其敏感的荧光类铁载体(pyoverdine)来提高生存和竞争能力; 在周围环境中的铁离子相对不是极其缺乏的条件下, 一般可能通过分泌非荧光铁载体(pyochelin), 即可满足自身的需要, 不需要消耗更多的能量去合成荧光类的铁载体; 这样调控方式能灵活地对周围环境的铁离子作出反应, 更能够适应环境。

参考文献

- [1] Sokol PA, Woods DE. Demonstration of an iron-siderophore-binding protein in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 1983, 40(2): 665-669.
- [2] Ferguson AD, Breed J, Diederichs K, et al. An internal affinity-tag for purification and crystallization of the siderophore receptor FhuA, integral outer membrane protein from *Escherichia coli* K-12. *Protein Sci*, 1998, 7(7): 1636-1638.
- [3] Griffiths GL, Sigel SP, Payne SM, et al. Vibriobactin, a siderophore from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem*, 1984, 259(1): 383-385.
- [4] Jalal MA, Love SK, van der Helm. Siderophore mediated iron (III) uptake in *Gliocladium virens* 2 role of ferric mono- and dihydroxamates as iron transport agents. *J Inorg Biochem*, 1987, 29(4): 259-267.
- [5] Biosca EG, Fouz B, Alcaide E, et al. Siderophore-mediated iron acquisition mechanisms in *Vibrio vulnificus* bio-type 2. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(3): 928-935.
- [6] Dileep C, Kumar BS. Influence of metham sodium on suppression of collar rot disease of peanut, *in vitro* anti-biosis, siderophore production and root colonization by a fluorescent *Pseudomonas* strain FPO4. *Indian J Exp Biol*, 2000, 38(12): 1245-1250.
- [7] Birch LE, Ruddat M. Siderophore accumulation and phytopathogenicity in *Microbotryum violaceum*. *Fungal*

- Genet Biol*, 2005, **42**(7): 579–589.
- [8] Starkenburg SR, Casey JM, Cianciotto NP. Siderophore activity among members of the *Legionella* genus. *Curr Microbiol*, 2004, **49**(3): 203–207.
- [9] Sriyosachati S, Cox D. Siderophore-mediated iron acquisition from transferrin by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 1986, **52**(3): 885–891.
- [10] Eun-Jin Kim. Iron deficiency leads to inhibition of oxygen transfer and enhanced formation of virulence factors in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 2003, **149**: 2627–2634.
- [11] 陈绍兴, 赵翔, 沈萍, 等. 高灵敏假单胞菌铁载体的平板检测方法. *微生物学通报*, 2006, **33**(3): 122–126.
- [12] Heinrichs DE, Young L, Poole K. Pyochelin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a high-molecular-mass outer membrane protein. *Infect Immun*, 1991, **10**(59): 3680–3684.
- [13] 赵翔, 陈绍兴, 谢志雄, 等. 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* Sp-f 的筛选鉴定及其产铁载体特性研究. *微生物学报*, 2006, **46**(5): 691–695.
- [14] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*, 1987, **160**(1): 47–56.
- [15] Scher FM, Baker R. Effect of *Pseudomonas putida* and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. *Phytopathology*, 1982, **72**(7): 1567–1573.
- [16] Cox CD, Adams P. Siderophore activity of pyoverdine for *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 1985, **48**(1): 130–138.
- [17] Xu YQ, Gao H, Tong GL, et al. Siderophore production and their activity against *Piricularia oryzae* by *Pseudomonas* JKD-2. *Microbiology*, 1999, **26**(3): 180–183.
- [18] Milagres AM, Machuca AM, Napoleão D, et al. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J Microbio Methods*, 1999, **37**(4): 1–6.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学各分支学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 最好包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势。即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。