

高灵敏假单胞菌铁载体的平板检测方法*

陈绍兴 赵翔 沈萍 谢志雄**

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)

摘要: CAS 蓝色检测平板是一种筛选、检测各类细菌铁载体的常用方法,而蔗糖-天冬酰胺培养基被用于假单胞菌产铁载体规律的研究。用天冬氨酸替代天冬酰胺,将 CAS 蓝色检测液与蔗糖-天冬氨酸培养基(MSA 培养基)相结合,得到一种改进的 MSA-CAS 检测平板。通过对假单胞菌属 7 个种 8 个株进行荧光与非荧光铁载体检测方面的比较研究,结果表明 MSA-CAS 检测平板假单胞菌铁载体的检测灵敏度比通用 CAS 检测平板高,而且在检测荧光铁载体方面具有荧光背景低、荧光铁载体晕圈明显和晕圈与背景的对比如大的优点。

关键词: 铁载体, CAS 检测平板, 假单胞菌, MSA 培养基

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 03-0122-06

High-sensitive Detection Method for Siderophores from *Pseudomonas**

CHEN Shao-Xing ZHAO Xiang SHEN Ping XIE Zhi-Xiong**

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

Abstract: CAS (Chrome azurol S) assay was a universal method for detecting the bacterial siderophores, and Sugar-Asn liquid medium has been applied to the studies on siderophores from *Pseudomonas*. In this paper, Asp has been substituted for Asn, and MSA-CAS agar plate was developed by integrating the MSA (sugar-Asp) medium and CAS bright blue dye, which has been used in the universal CAS assay. On the aspect of siderophores detection, 8 strains of 7 species from *Pseudomonas* had been screened on MSA-CAS agar plates and universal CAS assay respectively. The results showed that MSA-CAS agar was higher-sensitive and lower basic fluorescent than universal CAS assay.

Key words: Siderophore, CAS assay, *Pseudomonas*, MSA medium

微生物在周围环境缺乏铁离子时,可以分泌一种或者几种铁载体以从环境中获取铁离子;铁载体是一种低分子量、高铁螯和力的化合物^[1]。由于微生物生长所需的铁离子的浓度($10^{-8} \sim 10^{-6}$ mol/L)远高于环境中游离的铁离子浓度(10^{-17} mol/L)^[2],因此微生物必须要有富集铁离子的机制,以满足其正常生长的需要。

Schwyn 和 Neilands 在 1987 建立了通用的 CAS (Chrome azurol S) 检测方法, CAS 检测平板由 CAS 蓝色染液与 MM9、酸水解酪素和生物缓冲剂组成的固体培养基相结合而成^[3]。当高铁螯合能力的铁载体从由络天氰、铁离子和十六烷基基溴化铵形成的 CAS 蓝色检测液中夺取了铁离子时,这时检测液即会发生明显的由蓝到橙的颜色改变。1994 年王平等采用通用的 CAS 检测方法检测到了小麦根圈细菌的铁载体分泌^[4]。

为了研究不同的微生物产生的铁载体, Fekete 等人 1989 年用麦芽提取物作为培养基结合 CAS 蓝色染液建立检测平板用于检测使木材腐化的担孢子菌属^[5]。由于 CAS 蓝

* 武汉市科学与技术晨光计划资助项目 (No. 20015005051)

** 通讯作者 Tel: 027-68754533, E-mail: hsiech@263.net

收稿日期: 2005-08-19, 修回日期: 2005-10-23

色检测液对某些微生物有毒害作用, 为了减少这种毒害作用, Milagres 等人 1999 年采取将通用的 CAS 固体检测平板分成两部分的方法, 一半保持不变, 另一半用适合其他的各种微生物生长的固体培养基代替, 让微生物在这两部分的交界处生长, 微生物分泌铁载体可以渗透到通用 CAS 检测平板内^[6]。

假单胞菌是一类在农业上应用广泛的微生物, 许煜泉等人 1999 年的研究证明假单胞菌分泌的铁载体能够抑制稻瘟病^[7]; 但同时也是动物和人类的机会致病菌。这都与假单胞菌分泌铁载体有关。1982 年, Scher 和 Baker 首先采用蔗糖-天冬酰胺培养基来研究假单胞菌产铁载体的规律^[8]; 1994 年, Mannien 和 Mattila-Sandholm 用 SA 培养基研究假单胞菌在液体培养基中铁离子与铁载体产量的关系^[9]。

但是, 日前还没有适合于假单胞菌铁载体的平板检测方法, 根据 Scher 和 Baker 的培养基配方, 通过对 20 种天然氨基酸在假单胞菌产铁载体方面进行比较研究, 发现用天冬氨酸来替代天冬酰胺时, 假单胞菌的铁载体产量提高了 20%, 据此建立改进的蔗糖-天冬氨酸 (MSA) 培养基。我们拟将 MSA 培养基与通用 CAS 平板检测所用的蓝色 CAS 检测液相结合, 得到一种适合于假单胞菌铁载体的平板检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株

见表 1。除 *Pseudomonas* sp. 为本实验室保存以外, 其他均来自中国典型培养物保藏中心。

表 1 菌株及来源

菌株	来源
<i>Pseudomonas solanacearum</i> AB 94179	CCTCC*
<i>Pseudomonas putida</i> AB 92019	CCTCC
<i>Pseudomonas geniculata</i> AB 93074	CCTCC
<i>Pseudomonas convexa</i> AB 93063	CCTCC
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AB 92001	CCTCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AB 91095	CCTCC
<i>Pseudomonas maltophilia</i> AB 90024	CCTCC
<i>Pseudomonas</i> sp.	本实验室保存

* CCTCC 中国典型培养物保藏中心

1.2 培养基与培养条件

挑取单菌落, 接入 5 mL 的新鲜 LB 培养基中, 28℃, 200 r/min 培养过夜, 分别取 50 μL 的菌悬液接于新鲜的 5 mL LB 培养基中, 相同条件培养 6 h。4℃, 8,000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 0.85% 的生理盐水洗涤两次, 并用 0.85% 的生理盐水重悬, 终浓度为 10⁶ CFU/mL, 作为菌悬液短期保存。

通用 CAS 平板检测及 CAS 染色液的制备参照 1987 年 Schwyn 和 Neilands 建立的方法; 固体 MSA-CAS 检测平板的制备: MSA 培养基参照 Scher 和 Baker 1982 年建立的方法, 仅用天冬氨酸替代天冬酰胺。当固体的 MSA 培养基的温度降为 60℃ 时, 加入灭了菌的 CAS 染色液, 充分混合均匀, 30 mL/皿 (直径 90 mm)。

1.3 铁载体的检测方法

1.3.1 固体平板上的定性检测: 每块平板铺上 4 片已灭菌的小滤纸片 (直径 6 mm),

以每片滤纸片接 $10\mu\text{L}$ 菌浓度为 10^6 CFU/mL 的菌悬液, 28°C 培养 12 h。在菌落的周围固体平板由原来的亮蓝色变为橙色, 这种典型的颜色改变即是铁载体分泌圈^[3]。产生的橙色圈即是铁载体螯合圈, 测定菌体周围的橙色晕圈的直径与菌苔的直径同时减掉滤纸片的直径的比值; 在 364 nm 紫外线照射下, 用柯达相机 (DC290) 进行照相, 曝光时间 8 s, 记录菌体周围荧光铁载体分泌所产生的荧光圈大小, 以及荧光圈直径与菌苔直径同时减掉滤纸片的直径的比值的大小。

1.3.2 液体培养基中铁载体的定量测定: 以在通用的 CAS 平板和改进的 MSA 检测平板均能较好生长的 *Pseudomonas* sp. 作为定量检测的对象, 按 1% 接种量, 将 $200\mu\text{L}$ 的浓度为 10^6 CFU/mL 的 *Pseudomonas* sp. 菌悬液接入含有铁离子终浓度分别为 0、1、10 和 $20\mu\text{mol/L}$ 的 20 mL MSA 液体培养基和通用 CAS 蓝平板所用的液体培养基中, 28°C , 200 r/min 培养 12 h; 4°C , 8,000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 用紫外-可见分光光度计进行 300 ~ 600 nm 的连续波段扫描。

2 结果与讨论

2.1 MSA-CAS 平板是一种灵敏的假单胞菌铁载体检测平板

28°C 培养 12 h, *P. fluorescens* 和 *P. aeruginosa*, *P. putida* 和 *P. maltophilia*, 在通用 CAS 平板上菌体的周围没有形成明显的橙色铁载体圈, 而相应的在 MSA-CAS 平板上已经产生了明显的橙色铁载体圈 (图 1); 尽管 *Pseudomonas* sp., *P. convexa* 和 *P. solanacearum* 在通用 CAS 平板与 MSA-CAS 平板上均可以产生橙色铁载体圈, 特别是 *Pseudomonas* sp. (图 1), 但其在 MSA-CAS 平板上产生的铁载体圈与菌落直径的比值明显比在通用 CAS 平板上大 (表 2)。

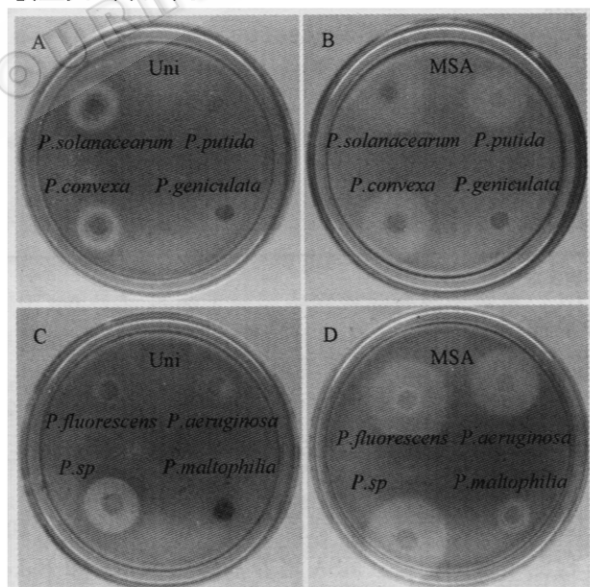


图 1 不同培养基 CAS 检测平板上产铁载体能力的比较 (12h)

A、C 通用 CAS 检测平板, B、D MSA-CAS 检测平板

表 2 产铁载体能力的半定量检测

	Uni	MSA
	(D-6) / (d-6)	
<i>P. solanacearum</i>	2.83	11.25
<i>P. putida</i>	2.00	12.00
<i>P. geniculata</i>	—	—
<i>P. convexa</i>	2.00	8.50
<i>P. fluorescens</i>	1.50	8.33
<i>P. aeruginosa</i>	1.50	16.00
<i>P. maltophilia</i>	—	1.50
<i>Pseudomonas</i> sp.	12.00	19.00

D 铁载体晕圈直径, d 菌落直径, 6 滤纸片的直径为 6 mm, — 代表结果不明显

由表 2 和图 1 可以看出 *P. maltophilia* 在通用 CAS 平板上没有发现铁载体的晕圈, 而在 MSA-CAS 平板上可以清晰观察到, 其比值为 1.5。对于其它几个种, 除了 *P. geniculata* 在通用 CAS 平板和 MSA-CAS 平板上均没有产生明显的铁载体晕圈之外, *P. solanacearum*, *P. putida*, *P. convexa*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* 和 *Pseudomonas* sp. 在 MSA-CAS 平板上的铁载体晕圈与菌落的比值是通用 CAS 平板上的 1.5 倍以上, 特别是 *P. aeruginosa* 达到了 10 倍以上。以上结果表明, MSA-CAS 与通用 CAS 检测平板相比, 在检测假单胞菌铁载体方面更灵敏。

1987 年 Schwyn 和 Nelands 建立的 CAS 平板检测方法, 已经用于许多的微生物分泌铁载体的检测; 但是不同的微生物都有各自合适的培养基, 在假单胞菌铁载体的检测方面还没有一套适用的平板检测方法; 我们将固体 MSA 培养基与 CAS 蓝色染料相结合, 通过以上的比较研究结果显示, MSA-CAS 平板是一种高灵敏的假单胞菌铁载体检测平板。

2.2 MSA-CAS 更适合假单胞菌荧光铁载体的平板检测

由荧光照相的结果显示, 28℃ 培养 12h 后, 在 MSA-CAS 平板上的荧光铁载体圈的直径与荧光强度要比在通用 CAS 平板上的荧光铁载体圈更大和更强 (图 2); 其中荧光铁载体的荧光圈的直径与菌落的直径比值结果见表 3, 在通用 CAS 平板上几乎没有明显的荧光铁载体产生的荧光圈, 而在 MSA-CAS 平板上其比值除了 *P. geniculata* 和 *P. maltophilia* 之外的其它 6 个种的假单胞菌的比值都超过了 3, *P. aeruginosa* 则超过了 10 达到 12。而这两种假单胞菌在通用 CAS 平板上同样不产荧光圈。由此可以看出, 在荧光铁载体的检测方面, MSA-CAS 平板明显优于通用 CAS 平板, 而且 MSA-CAS 平板的荧光背景要远比普通的 CAS 平板上的低。

表 3 荧光方法半定量检测荧光铁载体

	Uni	MSA
	(D' -6) / (d' -6)	
<i>P. solanacearum</i>	—	8.50
<i>P. putida</i>	—	9.00
<i>P. geniculata</i>	—	—

续表 3

<i>P. convexa</i>	—	6.00
<i>P. fluorescens</i>	—	3.67
<i>P. aeruginosa</i>	—	12.00
<i>P. maltophilia</i>	—	—
<i>Pseudomonas</i> sp.	—	7.00

D' 铁载体荧光晕圈, d' 菌落直径, 6 滤纸片的直径为 6 mm, — 代表结果不明显

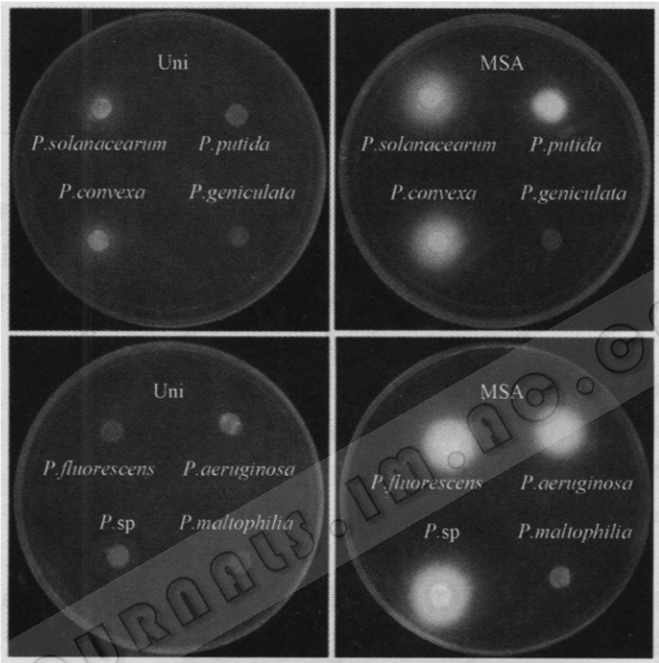


图 2 不同培养基 CAS 检测平板上产荧光铁载体能力的比较 (12h)
左边 (Uni) 通用 CAS 检测平板, 右边 (MSA) MSA-CAS 检测平板

根据铁载体在紫外照射下是否有荧光, 可以将铁载体分为两大类, 荧光和非荧光铁载体。由于在通用 CAS 平板检测方法中用到了复杂的营养成分, 酸水解酪素, 其培养基本身含有较多含苯环的芳香族氨基酸, 在紫外线照射下检测平板的背景荧光较深; 而 MSA 培养基是由简单的碳源 (蔗糖), 氮源 (天冬氨酸) 组成, 荧光背景相对较低, 只有在铁载体分泌的范围才能产生强烈的荧光, 从而对比较强, 容易分辨。

MSA-CAS 检测平板与通用 CAS 检测平板相比, 紫外线照射下, 前者的荧光背景较后者低、荧光铁载体晕圈反差较大; 荧光铁载体的晕圈, 前者在荧光强度和直径与菌落直径的比值上, 均较后者的强、大, 在后者上几乎观察不到, 结果表明 MSA-CAS 检测平板比通用 CAS 检测平板更加适合于检测假单胞菌荧光类铁载体。

2.3 荧光铁载体的液体检测

Manninen 和 Mattila-Sandholm 在 1994 年采用 300 ~ 600nm 的全波段扫描研究铁载体与铁离子的变化关系^[9]。我们选择在通用 CAS 平板和 MSA-CAS 平板上都有较大的铁载体圈与菌落直径比值的 *Pseudomonas* sp. 作为定量研究的模型。结果如图 3 所示, 在不

外加铁离子的条件下, *Pseudomonas* sp. 在 MSA 培养基中荧光铁载体的量 (图 3A) 是其在通用的 CAS 液体培养基中的 5~10 倍 (图 3B)。在加入微量的铁离子时, MSA 培养基中荧光铁载体的含量显著减少, 而在通用的 CAS 液体培养基中却没有显著变化。结果表明, 在对铁离子反应的敏感程度上, 前者也明显优于后者, 适用于荧光铁载体铁应答的研究。

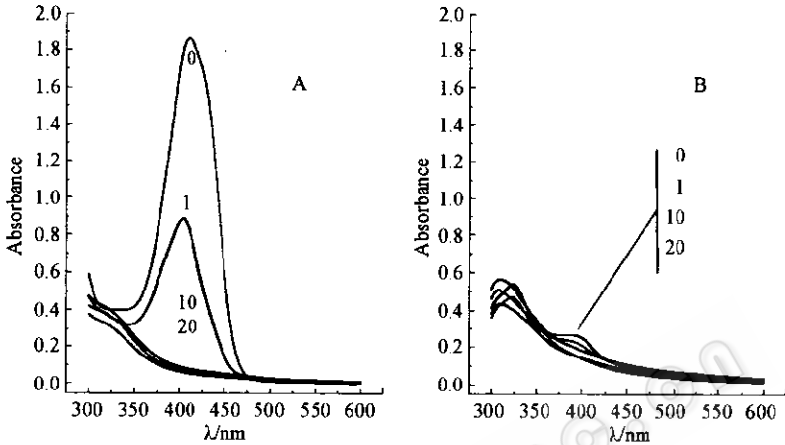


图 3 不同培养基中铁离子对 *Pseudomonas* sp. 产铁载体能力的抑制作用 (12h)

A MSA 培养基, B 通用 CAS 检测平板所用的酸水解酪素培养基

铁离子的终浓度分别为 0、1、10 和 20 μmol/L

总之, 通过对 7 个种的假单胞菌产铁载体平板检测和 *Pseudomonas* sp. 产荧光铁载体的半定量检测比较, 结果表明: (1) 在假单胞菌铁载体检测方面, MSA-CAS 固体检测平板较通用 CAS 平板具有更高的灵敏度; (2) 液体半定量测定也显示 MSA 培养基更适合于假单胞菌荧光铁载体的研究。这可能与 MSA 培养基较低铁离子浓度、培养基成分简单, 不含有具有紫外吸收的芳香族氨基酸和其它复杂的营养成分有关。

参 考 文 献

- [1] Neilands J B, Leong S A. Annu Rev Plant Physiol, 1986, **37**: 187 ~ 208.
- [2] Gueriot M L. Annu Rev Microbiol, 1994, **48**: 743 ~ 772.
- [3] Schwyn B, Neilands J B. Anal Biochem, 1987, **160** (1): 47 ~ 56.
- [4] 王 平, 董 颺, 李早棟, 等. 微生物学通报, 1994, **21** (6): 323 ~ 326.
- [5] Fekete F A, Chandhoke B, Jellison J. Appl Environ Microbiol, 1989, **55** (10): 2720 ~ 2722.
- [6] Milagres A M, Machuca A M, Napoleão D J. Microbiol Methods, 1999, **37**: 1 ~ 6.
- [7] 许煜泉, 高 虹, 童耕雷. 微生物学通报, 1999, **26** (3): 180 ~ 183.
- [8] Scher F M, Baker R. Phytopathology, 1982, **72**: 1567 ~ 1573.
- [9] Manninen M, Mattila-Sandholm T. J Microbiol Methods, 1994, **19**: 223 ~ 234.