

适合高产铁载体细菌筛选、检测体系的改进与探析*

赵翔 谢志雄** 陈绍兴 沈萍

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)

摘要: 采用 pH 6.8 的磷酸缓冲液代替通用 CAS 固体检测培养基中的 MM9 缓冲体系, 不加吖嗪二乙醇磺酸, 得到颜色稳定、检测效果明显、配制方便, 适合高产铁载体细菌筛选与检测的新型检测平板。根据 CAS 检测液连续吸收光谱比较分析结果, 将 CAS 液体定量检测体系中的检测波长由 630 nm 改为 680 nm, 可以克服 OD_{630} 读数偏高、易受干扰的问题, 而且 OD_{680} 与铁载体浓度线性关系不变, 但采用 OD_{680} 检测不同细菌产铁载体能力的差异更为明显, 因此提高了 CAS 定量检测的灵敏度, 更适合高产铁载体细菌筛选与检测。

关键词: 铁载体, CAS 检测方法, 高产铁载体细菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0095-04

Improvement and Analysis in Over- siderophores Production Bacteria Filtrating and Detecting*

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

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

Abstract: A novel stable blue agar plate which is convenient to preparing and more effective than the universal chrome azurol sulfonate (CAS) assay established by Schwyn and Neilands was designed by replacing MM9 growth medium and pipes with certain concentrate of phosphorus buffer solution which pH could be stabled at 6.8. It is more suitable for screening over- siderophores production bacteria. Since OD_{630} of the sample is usually out of the range of spectrophotometer with CAS assay solution when quantifying the siderophores and the outcome is not steady, the measuring wavelength had been changed to 680 nm corresponding to the middle of max absorbance and the correlation between siderophores concentrations and OD was unchanged. But the detecting sensitivity is elevated by enlarged the absorbance differences among samples with different productivity of siderophores at 680 nm.

Key words: Siderophores, Chrome azurol sulfonate (CAS) assay, Over- siderophores production bacteria

铁是生物的必需元素。虽然铁在地壳元素丰度中排第 4 位, 但是由于地球的富氧环境, 铁以溶解度极低 (10^{-17} mol/L) 的氧化物形式存在, 因此许多微生物通过合成分泌与 Fe^{3+} 有特异螯合能力的小分子化合物 (分子量约 1,000) 来摄取环境中的铁, 这类化合物就是铁载体 (siderophore)^[1]。细菌铁载体的检测一直是相关研究的基础问题。目前应用最为普遍的细菌铁载体检测方法是 Schwyn 与 Neilands 于 1987 年建立的 CAS 检测体系 (Chrome azurol sulfonate assay), 适用于许多不同类型铁载体的检测^[2], 而且 CAS 染液对 G^- 细菌毒性较小, 还能用于 G^- 细菌铁载体固体平板检测^[3]。

本文在利用 CAS 检测方法筛选检测武汉东湖水中的高产铁载体细菌过程中, 在不改变基本检测效果的前提下对通用 CAS 检测方法作了相应改进, 使得改进后的 CAS 检

* 武汉市青年科技晨光计划 (No. 20015005051)

** 通讯作者 Tel: 86-27-68754533, E-mail: zxxie@whu.edu.cn, hsiech@263.net

收稿日期: 2006-01-13, 修回日期: 2006-04-28

测体系对筛选检测高产铁载体细菌更为有利。

1 材料与方法

1.1 菌株

Pseudomonas maltophilia AB90058 和 *P. fluorescens* AB92001 来源于中国典型培养物保藏中心。*E. coli* HB101 和 *Bacillus thuringiensis* Berliner 为本实验室保藏。高产铁载体菌 *P. fluorescens* sp-f 以及菌株 sp-a、sp-b、sp-c 和 sp-d 从武汉东湖中分离得到。

1.2 改进的 CAS 检测平板

1.2.1 CAS 检测平板配方：CAS 染液含 1 mmol/L CAS (铬天青), 0.1 mmol/L FeCl_3 , 4 mmol/L 十六烷基三甲基溴化胺 (HDTMA), 参见文献 [2, 4]; 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 pH 6.8, 每 100 mL 含 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.427 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5905 g, KH_2PO_4 0.075 g, NH_4Cl 0.250 g, NaCl 0.125 g, 使用时 10 倍稀释。

1.2.2 CAS 检测平板制备：每 100 mL 含 20% 蔗糖溶液 1 mL, 10% 酸水解酪素 3 mL, 1 mmol/L CaCl_2 100 μL , 1 mmol/L MgSO_4 2 mL, 琼脂 1.8 g, 在约 60℃ 时缓慢加入盐溶液和 CAS 染液各 5 mL, 即得蓝色检测培养基。所有溶液均用去离子水配制。

1.3 CAS 液体定量检测

1.3.1 CAS 检测液配制：参照文献 [2, 4]。

1.3.2 CAS 检测液吸收光谱测定：CAS 检测液与去离子水等体积混合后用连续扫描分光光度计检测其 400 ~ 800 nm 的吸收光谱, 扫描间隔 0.5 nm。

1.3.3 铁载体定量检测：将 *P. fluorescens* sp-f 培养液上清过滤后, 用去离子水作 4、6、8 和 10 倍稀释, 将不同稀释浓度的样品与 CAS 检测液等体积混合, 充分反应后, 先检测 OD_{680} , 然后调 pH 至中性后检测 OD_{630} , 得光吸收值 A ; 以去离子水与 CAS 检测液等体积混合测得的 A_i 为对照。 A/A_i 代表样品中铁载体的相对含量, 该值越低, 表明铁载体含量越高。一般产铁载体能力较高 (+ + +) 的细菌 A/A_i 低于 0.5^[4]。

2 结果与讨论

2.1 CAS 检测平板的改进

细菌分泌的铁载体能整合 CAS 染液中的 Fe^{3+} 而导致颜色由蓝变橙^[2], 在 CAS 检测平板上形成橙色铁载体分泌圈。相同条件下, 晕圈直径越大的细菌产铁载体能力越高。

2.1.1 改进的 CAS 检测平板更简便实效：由于磷酸盐缓冲液缓冲能力强, 不需要补加哌嗪二乙醇磺酸钠 (Pipes) 作为辅助, 配制过程中无需调 pH。图 1 A ~ C 为通用 CAS 检测平板, A' ~ C' 为在不改变通用 CAS 检测平板营养条件的情况下, 结合假单胞菌铁载体研究常用的 GASN 培养基^[5], 用 pH 6.8 终浓度为 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲体系替换原来的 MM9 盐溶液和 Pipes 后配制的改进检测平板, 可发现两者颜色没有差别, 而且颜色稳定。

2.1.2 细菌产铁载体能力的平板检测：*P. fluorescens* 在改进后的蓝平板上菌落铁载体圈半径比有所减小, 但颜色比通用检测平板更加明显 (图 1A)。 *B. thuringiensis* Berliner 在原 CAS 固体平板上不能生长, *P. maltophilia* 在改进后的平板上微弱的铁载体圈更不明显, *E. coli* HB101 在改进后的平板上表现与 *P. maltophilia* 相当 (图 1B)。在改进的 CAS 平板上 *P. fluorescens* sp-f 的铁载体圈比在通用 CAS 平板上略小, 但形成速度远高

于同步培养的另一株筛选得到的菌株 sp-a, 此时 *P. maltophilia* 在检测平板上甚至还未能形成明显菌落 (图 1C)。

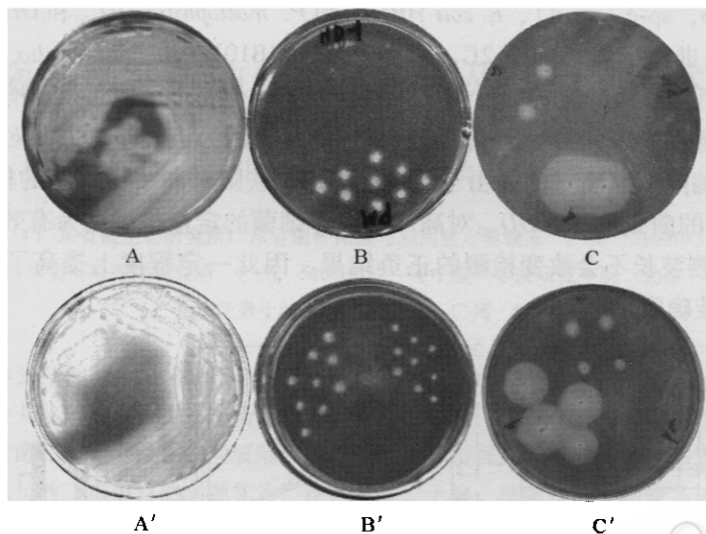


图 1 CAS 检测平板检测细菌铁载体

A~C 为通用 CAS 检测平板, A'~C' 为改进的 CAS 检测平板, A 和 A' 培养 48 h 的 *P. fluorescens*, B 培养 48 h 的 *B. thuringiensis* Berliner (上) 与 *P. maltophilia* (下), B' 培养 48 h 的 *P. maltophilia* (左) 与 *E. coli* HB101 (右), C 和 C' 培养 12 h 的 *P. fluorescens* sp-f (b), *P. maltophilia* (PM) 与菌株 sp-a (a)

2.1.3 改进的 CAS 检测平板利于筛选高产铁载体细菌: 能分泌铁载体的 G^- 细菌在改进后的 CAS 检测蓝平板上都能生长出圈, 但分泌铁载体量较低的 *P. maltophilia* 与 *P. fluorescens* 的铁载体圈有所减小。高产铁载体菌 *P. fluorescens* sp-f 虽然铁载体圈也有略微减小, 但仍然比普通细菌的大许多。因此虽然改进后的 CAS 检测平板对细菌铁载体灵敏度有所降低, 但却使高产铁载体菌的铁载体圈相对一般产铁载体细菌更为显著。合成铁载体量较少的细菌由于体系中的 Fe^{3+} 受到更强的限制, 从而生长受到抑制, 因此分泌铁载体的速度和量都有所减少。

2.2 铁载体定量检测

2.2.1 连续吸收光谱检测及定量检测波长确定: CAS 检测液的 400 nm ~ 800 nm 连续吸收光谱如图 2A, 630 nm ~ 730 nm 之间的光吸收值为“S”曲线。原方法采用最大光吸收的 630 nm 作为检测波长^[2], 但是 CAS 检测液吸收峰在不同 pH 条件下极易产生偏差^[2], 而细菌培养液样品 pH 变化较大, 使得检测数据可靠性较低。因此采用 OD_{630} 进行检测时, 必须先将样品 pH 调至 6.8 后才能检测, 但是调整样品 pH 对样品浓度有一定影响, 而且操作也十分不便。由“S”曲线函数中值斜率最大的规律, 采用最大吸收中间值 Ab_m 所对应的波长 $\lambda_m \approx 680$ nm 为检测波长, 检测结果受 pH 影响较小, 而且由图 2B 可以发现在铁载体浓度较高时, 680 nm 的吸光值可以维持在 1.0 以下, 在普通分光光度计的读数范围内, 而相应的 OD_{630} 则数值较高, 不利于检测。此外, 铁载体相对浓度与 A/A_m 相关。根据 Beer-Lambert 法则, 相同波长条件下, 检测的灵敏度与光吸收系数无关, 因此最大吸收值对应波长并非 CAS 检测液最灵敏的检测波长。

2.2.2 采用 OD_{680} 进行铁载体定量分析: OD_{680} 与样品铁载体浓度关系的检测结果如图 2B。两个波长下倍比稀释样品的 OD 与铁载体相对浓度进行线性拟合, 结果为一条重

合的直线, R 分别为 0.987 (OD_{630}) 与 0.954 (OD_{680})。因此 OD_{680} 与铁载体含量仍然保持线性关系。在无铁 MKB 培养基中培养 24 h 后, 分别检测另外 3 株产铁载体能力不同的细菌 (sp-b, sp-c, sp-d)、*E. coli* HB101 和 *P. maltophilia* OD_{680} 和 OD_{630} 的 A/A_r , 与 sp-f 菌株的结果进行比较, 如图 2C。对于 *E. coli* HB101, *P. maltophilia* 等分泌铁载体量较低的菌株而言, 两种波长的检测结果差别不大, 但是 OD_{680} 的 A/A_r 稍高。但对高产铁载体的菌株而言, OD_{680} A/A_r 的降低比 OD_{630} 更多。因为该种检测方法对铁载体的定量是通过 A/A_r 值的降低来衡量的, 由于 Beer-Lambert 法则对高浓度样品的检测并不适用, 因此结合图 2B 的曲线变化, OD_{680} 对高产铁载体细菌的定量检测更为有效和准确。选用 680 nm 作为检测波长不会改变检测的正负结果, 因此一定程度上提高了高产铁载体细菌定量检测的准确度。

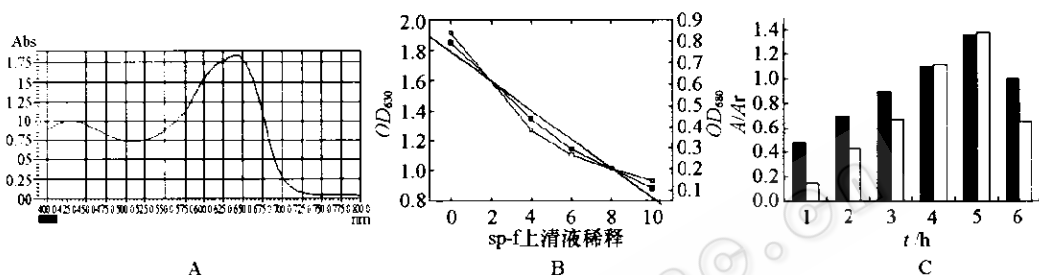


图 2 细菌铁载体检测

A CAS 液体检测液 400 ~ 800 nm 吸收光谱, B 梯度稀释样品 OD_{630} 和 OD_{680} 曲线, ■ OD_{630} , □ OD_{680} , - 线性拟合, C 不同产铁载体能力细菌 OD_{680} 和 OD_{630} 检测 A/A_r 比较结果: 1 sp-f, 2 sp-b, 3 sp-c, 4 *E. coli* HB101, 5 *P. maltophilia*, 6 sp-d, ■ OD_{630} , □ OD_{680}

3 小结

通用的 CAS 检测体系是目前应用最为广泛的一种细菌铁载体检测方法。自从该方法报道以来, 除了为适用真菌或其他特殊细菌营养条件的不同而对培养基中的营养成分作相应改动外^[6,7], 未见报道对其配方作改进。本报道将 CAS 固体琼脂检测平板的复杂缓冲体系用 pH 6.8 的磷酸缓冲液代替, 并将培养基中 PO_4^{3-} 浓度控制在检测细菌铁载体允许的浓度范围内^[2], 在不改变检测效果前提下, 简化了 CAS 检测平板的配制方法, 而且有利于高产铁载体细菌的检测。同时定量检测分析结果表明细菌铁载体 CAS 液体定量检测的检测波长为 680 nm 的条件下, 不仅保持了 630 nm CAS 检测液吸收峰检测时光吸收值与样品铁载体浓度的线性关系, 而且对高浓度铁载体样品更为灵敏, 而对低浓度铁载体样品的检测并无影响。

参考文献

- [1] Simon C A, Andrea K R, Francisco R Q. FEMS Microbiol Rev, 2003, 27: 215 ~ 237.
- [2] Schwyn B, Neilands J B. Analytical Biochemistry, 1987, 160: 47 ~ 56.
- [3] Neilands J B. J Biol Chem, 1995, 270 (45): 26723 ~ 26726.
- [4] 王 平, 董 巍, 李卓棣, 等. 微生物学通报, 1994, 21 (6): 323 ~ 326.
- [5] Alain B, Isabelle G. Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (1): 325 ~ 331.
- [6] Machuca A, Milagres A M F. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36: 177 ~ 181.
- [7] Gram L. J Microbiol Meth, 1996, 25: 199 ~ 255.