

# 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* sp-f 的筛选鉴定及其铁载体特性研究

赵 翔 陈绍兴 谢志雄\* 沈 萍

( 武汉大学生命科学院 武汉 430072 )

**摘 要** 采用改进的 CAS 检测平板从东湖中筛选得到了一株高产铁载体细菌 sp-f,并用 CAS 检测液定量检测其分泌铁载体量,发现其  $A_s/A_r$  仅 0.09(  $OD_{680}$  ), $S_u$ ( Siderophore Unit)为 90% 达到产铁载体菌最高级。用 BIOLOG 检测板 结合细菌生理生化反应、形态观察和 16S rDNA 序列比对分析等分类鉴定方法,确定 sp-f 为一株荧光假单胞菌。*P. fluorescens* sp-f 生长过程中胞外铁载体的量在对数生长前期累积达到最高后有所减少,至稳定期时菌液中铁载体量达到稳定。在已知铁载体特异吸收峰波长下,用反向高效液相色谱检测无铁环境和高铁环境下培养液上清,比较发现 sp-f 上清含有 3 种含儿茶酚胺类基团铁载体,其中包括荧光和非荧光性的脓菌素,200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Fe}^{2+}$  可完全抑制荧光性质脓菌素的分泌,但非荧光脓菌素的分泌不受抑制,并且对非脓菌素的儿茶酚胺类铁载体的合成分泌反而具有一定的诱导作用。

**关键词** :高产铁载体 荧光假单胞菌 细菌鉴定 脓菌素

中图分类号 :Q939 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2006)05-0691-05

铁载体(siderophores)是一类具有很强的特异螯合  $\text{Fe}^{3+}$ (螯合系数可达  $10^{20} \sim 10^{30}$ )的小分子(1~2 kDa)化合物<sup>[1,2]</sup>,绝大多数细菌和真菌都能通过非核糖体途径合成并分泌一种或几种铁载体。它的产生是地球上的微生物适应地球地壳高氧低铁环境的结果<sup>[3]</sup>。细菌利用合成的铁载体攫取外界游离  $\text{Fe}^{3+}$  来维持正常的生理活动<sup>[1]</sup>。环境中游离的铁载体也可以为其他细菌所用,细菌在环境中的生存地位也可以通过其对环境中铁源的争夺能力而反映出来<sup>[4]</sup>。因此对自然条件下高产铁载体菌的研究能够帮助我们解决许多因细菌引起的环境问题,也为进一步研究细菌铁载体合成调控机制提供不可多得的材料。

由于假单胞菌分泌一种特有的铁载体——脓菌素(pyoverdins)<sup>[6]</sup>,它同时具有革兰氏阳性菌铁载体的异羟肟基和革兰氏阴性菌铁载体的儿茶酚胺基<sup>[5]</sup>,荧光性脓菌素还有能在紫外下激发荧光的二羟基喹啉基团,它结合  $\text{Fe}^{3+}$  后在 400nm 左右有特异的吸收峰<sup>[6-8]</sup>。国际上已将其性质和分子基团特征作为假单胞菌属内的一个分类标准<sup>[7,9,10]</sup>。目前对脓菌素的研究表明它可能是许多假单胞菌作用于动植物的媒介,例如许多植物根际菌是高产铁载体荧

光假单胞菌<sup>[11]</sup>,并且某些假单胞菌分泌的脓菌素与其致病性相关<sup>[9]</sup>。本文报道从武汉东湖水中筛选分离得到一株高产铁载体荧光假单胞菌菌株。对其铁载体分泌的相关研究可以有助于进一步研究环境中假单胞菌的致病机理和防治手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验菌株** :*Pseudomonas maltophilia* AB90058 (CCTCC),*P. fluorescens* AB92001 (CCTCC),大肠杆菌 *Escherichia coli* HB101(本实验室保存),产铁载体细菌菌株 sp-f 由本实验室分离。

**1.1.2 培养基** :MKB 液体培养基,LB 培养基,GASN 培养基<sup>[9,11]</sup>。

**1.1.3 CAS 检测液的配制** 参见文献 [2, 12]

**1.1.4 改进后 CAS 检测平板的制备** :配方如文献 [11] 将 MM9 缓冲液换为 pH 6.8 的磷酸缓冲液,维持  $\text{PO}_4^{3-}$  浓度不变。

### 1.2 高产铁载体细菌的筛选和铁载体定量检测

产铁载体细菌的筛选采用改进的 CAS 平板检测法,通过观察细菌分泌铁载体形成的橙色晕圈的大小做定性筛选。

基金项目 武汉市青年科技晨光计划(20015005051)

\* 通讯作者。Tel 86-27-68754533 E-mail :hsiech@263.net

作者简介 赵 翔(1982-)男,湖北孝感人,硕士研究生,主要研究方向为微生物遗传学。E-mail :realhover@hotmail.com

收稿日期 2005-11-25 接受日期 2006-01-13 修回日期 2006-04-01

**1.2.1 高产铁载体菌株筛选** :武汉大学凌波门处东湖水面下 0.5m 和 3.5m 处水样 ,10 倍梯度稀释涂布于 CAS 检测平板。28℃ 培养 48h。

**1.2.2 铁载体定量测定** :检测方法参见文献 [8] ,但检测波长改为 680nm。

**1.2.3 铁载体分泌曲线测定** :将培养过夜的 sp-f 菌液按 1% 接种量转接到装有 50mL 无菌 MKB 液体培养基的 250mL 三角瓶中 28℃ 200r/min。检测  $OD_{680}$  后 ,按上一节方法检测样品  $A_s$  ( $OD_{680}$ ) ,不同时间取样直至稳定期。每次测量均设去离子水与检测液等体积混合对照  $A_r$ 。

### 1.3 细菌鉴定

**1.3.1 生理生化反应** :革兰氏染色确定 sp-f 菌株革兰氏属性后用相应的 BIOLOG 生理生化鉴定板进行快速鉴定<sup>[13]</sup> ,显色后底板扫描送中国科学院微生物研究所 BIOLOG Station System 分析。明胶水解、反硝化和氧化酶反应参见文献 [14]。

**1.3.2 形态观察** :从平板上挑单菌落至 5mL LB 培养基中 ,200r/min 28℃ 培养过夜。低速离心收集菌体 ,用生理盐水洗涤菌体 2~3 次 ,用 300 $\mu$ L 生理盐水悬浮 ,磷钨酸负染制样。透射电子显微镜 HITACHI H-8100 观察。

**1.3.3 假单胞菌特异铁载体——脓菌素检测** :sp-f 菌株与 AB92001 培养 12h 的 GASN 培养液离心过滤上清后 ,检测 200~500nm 连续光谱吸收<sup>[6,7]</sup> ,扫描间隔 0.5nm。0.2 $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌后真空干燥浓缩约 50 倍 ,滴 10 $\mu$ L 于 CAS 检测平板上的直径 6mm 滤纸片上 ,反应 2h 后 364nm 观察。

**1.3.4 16S rDNA 片段扩增及序列分析** :用通用 27F/1495r 引物(正向引物 :5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3' ;反向引物 :5'-ACGGCTACCTGTACCA CT-3')。以 sp-f 菌株总 DNA 为模板进行扩增 ,将 PCR 产物连接到 pMD-18 T 上 ,测序后与 GenBank 中序列进行同源性比对。

**1.3.5 基因组 DNA (G + C)mol % 的测定** :采用热变性法<sup>[14]</sup>。

### 1.4 反向高效液相色谱(RP-HPLC, Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography)分析

**1.4.1 检测系统和方法** :25cm Nucleosyl C18 柱子 ,柱直径 20mm ,洗脱相为 1:4 的水/甲醇溶液 ,洗脱速度为 0.1mL/min ,检测波长为 254nm<sup>[2]</sup>和 403nm<sup>[6,7]</sup> ,每个样品重复 3 次。

**1.4.2 样品制备** :挑取单菌落到 5mL 的 MKB 液体培养基中 ,28℃ 200r/min 培养过夜 ,取 1mL 菌液转

入装有 50mL GASN 培养基的三角瓶中 ,振荡培养至稳定期。10000r/min 离心 1min ,0.2 $\mu$ m 微孔滤膜过滤收集上清 ,依样品浓度取 2~5 $\mu$ L 403nm 检测脓菌素时在检测样品中加 1mol/L FeCl<sub>3</sub> 至 Fe<sup>3+</sup> 终浓度为 4mmol/L<sup>[7]</sup>。同时 GASN 液体培养基中预先加入终浓度 200 $\mu$ mol/L 的 Fe<sup>2+</sup><sup>[1]</sup> ,培养至稳定期检测外界 Fe<sup>2+</sup> 对 sp-f 菌株铁载体的抑制 ,作为正常培养的对照。

## 2 结果和讨论

### 2.1 高产铁载体菌的筛选

**2.1.1 高产铁载体菌的定性筛选** :利用改进的 CAS 检测平板从东湖水中分离产铁载体细菌 ,发现 sp-f 菌株在 CAS 平板上的铁载体圈最大。与 *E. coli* HB101 ,*P. maltophilia* AB90058 和 *P. fluorescens* AB92001 相比 ,在检测平板上它生长和出圈快 ,培养 6h 菌落周围便出现铁载体晕圈 ,12h 就可形成明亮醒目的橙黄色产铁载体圈(图 1-C) ,与菌落直径比约 5~10 倍。培养时间越长菌圈越大 ,最终可使整个平板变为橙黄色。反复传代产铁载体能力稳定。而检测平板上点种培养的 *E. coli* HB101 与 *P. maltophilia* AB90058(图 1-A)仅出现微弱的铁载体圈 ,*P. fluorescens* AB92001 也是在培养 2d 后才有较为明显的铁载体圈(图 1-B) 。图 1 中所示检测效果均能稳定重复 ,各组平板均有两个以上的平行比较。

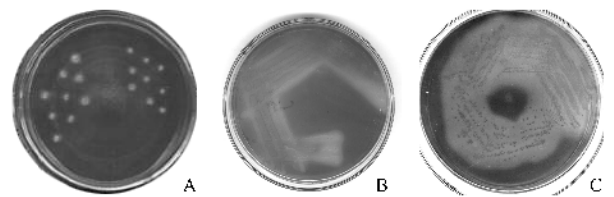


图 1 CAS 检测平板筛选产铁载体细菌

Fig.1 Isolating of siderophores producing bacteria by CAS detecting plates. A : *P. maltophilia*( left ) and *E. coli* HB101( right ) had been cultured for 72h ; B : *P. fluorescens* AB92001 had been cultured for 48h ; C : Strain sp-f had been cultured just for 12h.

**2.1.2 铁载体定量检测** :产铁载体细菌菌株 sp-f、*E. coli* HB101、*P. maltophilia* 及 *P. fluorescens* AB92001 在 MKB 培养基中培养 12h 后 ,比较上清  $OD_{680}$  的  $A_s/A_r$  值 ,其中 sp-f 菌株的  $A_s/A_r$  值最低 ,约 0.10 左右 ,折合为铁载体浓度单位为  $Su = (A_r - A_s)/A_r = 90%$  ,铁载体浓度与  $A_s/A_r$  成线性关系<sup>[2,12]</sup> ,CAS 染液中铁离子的浓度约为 20 $\mu$ mol/L ,可推算 sp-f 菌株上清中铁载体浓度约为 15 $\mu$ mol/L。并且 sp-f 上清加入 CAS 检测液 10min 内便可由蓝变橙。依据文献 [15] 对细菌产铁载体能力的划分  $A/A_r$

A<sub>1</sub> 从 1.0~0 之间以 0.2 为间隔,每减小 0.2 增加一个+),该菌株分泌铁载体的能力为+++++,比以往文献报道的产铁载体菌都要高<sup>[11]</sup>,并且分泌迅速。因此 sp-f 菌株为一株高产铁载体细菌。

## 2.2 高产铁载体菌 sp-f 菌株的鉴定

**2.2.1 电镜观察** 结果发现 sp-f 菌株为短杆菌,两端钝圆,直径 0.5~1 $\mu$ m,菌体长 4~8 $\mu$ m,4~6 根鞭毛极生,无鞭毛鞘,无荚膜(图 2)。菌落隆起,圆形,边缘完整,颜色为黄色或者褐色(生长 96h 后)。



图 2 sp-f 菌株形态观察(7500 $\times$ )

Fig.2 The morphology of strain sp-f(7500 $\times$ ).

**2.2.2 生理生化反应检测结果:**明胶水解阳性,反硝化试验为阴性或者弱阳性。过氧化氢酶反应为弱阳性。革兰氏染色为阴性。依据革兰氏染色鉴定结果选用(G<sup>-</sup>)BIOLOG 鉴定板 A<sub>h</sub> 及 24h 反应结果经 BIOLOG Station 分析结果表明 sp-f 菌株为一株荧光假单胞菌菌株。

**2.2.3 假单胞菌脓菌素荧光和特异吸收峰检测:**用荧光假单胞菌模式菌株 *P. fluorescens* AB92001 作为对照,发现 sp-f 菌株与其细菌培养上清液在 364nm 紫外激发下都产生荧光,sp-f 菌株上清连续光谱分析发现在 405nm 附近有一个特异吸收峰,与假单胞菌脓菌素的特异吸收峰相近<sup>[9]</sup>。

**2.2.4 sp-f 基因组 DNA(G+C)mol% 的测定和 16S rDNA 序列分析:**以 *P. fluorescens* AB92001 和 *E. coli* K12 菌株作为对照,熔解温度法( $T_m$ )测 sp-f 菌株的(G+C)%<sup>[14]</sup>。测得 sp-f G+C% $\approx$ 59.6%。将扩增得到的 1500bp 16S rDNA 片端序列(GenBank,序列号为 DQ256083)与 GenBank 中的序列进行比对,发现与该序列同源性在 95% 以上的均为假单胞菌属细菌,与 *P. putida* Gi 30519877 的 16Sr DNA 序列的同源性在 98% 以上,因此可以确定 sp-f 菌株属于假单胞菌属。因为明胶液化是荧光假单胞菌区别于恶臭假单胞菌的最明显指标,并且恶臭假单胞菌与荧光假单胞菌同属于 rRNAI 群荧光 DNA 同源组,差异很小<sup>[14]</sup>,故判定 sp-f 菌株为一株荧光假单胞菌。

## 2.3 RP-HPLC 分析 sp-f 菌株铁载体性质

HPLC 是一种十分灵敏有效的检测分离溶液中性质不同化合物的方法,参考文献[12,9,20]选取 254nm 与 403nm 作为检测波长,对 sp-f 菌株与 *P. fluorescens* AB92001 培养液上清中的儿茶酚胺类铁载体及脓菌素进行比较分析。在含 200  $\mu$ mol/L Fe<sup>2+</sup> 的高铁浓度 GASN 中 sp-f 菌株培养液上清作为铁载体分泌受抑制对照<sup>[1,7]</sup>。

**2.3.1 RP-HPLC 254nm 检测:**结果如图 3 所示,所有样品均作相同处理。sp-f 菌株与 *P. fluorescens* AB92001 GASN 上清(图 3-A,3-C)都有 3 个峰,它们对应的洗脱时间一致,为 I = 16.95( $\pm$ 0.1)min, II = 21.45( $\pm$ 0.1)min, III = 23.80( $\pm$ 0.1)min。因此可以判断 sp-f 菌株与 AB92001 上清主要成分一致。与峰 I、II 相比,峰 III 是 sp-f 菌株主要分泌的铁载体。在含过量 Fe<sup>2+</sup> 的 GASN 样品中(图 3-B)3 个峰的洗脱时间未发生变化,峰 III 明显降低,表明其合成分泌被抑制。峰 II 增强,说明该类铁载体的分泌不仅未受抑制,反而被诱导。文献报道培养基中适当浓度的 Fe<sup>2+</sup> (<1 $\mu$ mol/L)可诱导 *E. coli* 铁载体合成相关基因表达<sup>[16]</sup>,但是高浓度 Fe<sup>2+</sup> 诱导细菌铁载体合成的现象未见报道。峰 I 是特征峰中最低的一个,在图 3-A 和 3-B 中变化不明显,仅略微变小。推测为一类芳香烃类化合物,不受外界 Fe<sup>2+</sup> 影响。

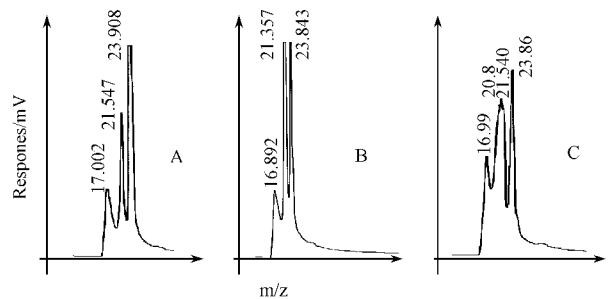


图 3 RP-HPLC 254nm 检测图谱

Fig.3 Result of RP-HPLC analysis detected at 254nm. A: The supernate of strain sp-f cultured in GASN; B: The supernate of strain sp-f cultured in GASN added 200 $\mu$ mol/L FeSO<sub>4</sub> beforehand; C: The supernate of AB92001 cultured in GASN. All of them had three peaks, I = 16.95( $\pm$ 0.1)min, II = 21.45( $\pm$ 0.5)min, III = 23.80( $\pm$ 0.1)min.

**2.3.2 RP-HPLC 403nm 检测:**用 Fe<sup>3+</sup> (4 mmol/L)完全整合上述样品中铁载体后于 403nm 处检测<sup>[7]</sup>。图 4-A、4-B 中 sp-f 菌株与 AB92001 均只有一个相同的峰于 23.12min( $\pm$ 0.005 min),可判定两者分泌结构相同的荧光脓菌素。根据脓菌素细菌分类的标准<sup>[9,10]</sup>,进一步表明 sp-f 菌株为一株荧光假单胞菌。该峰与图 3 中的峰 III 对应,洗脱时间略有减小(约

0.7min)这是因为脓菌素结合  $Fe^{3+}$  后电荷和极性发生改变。在含过量  $Fe^{2+}$  的 sp-f 菌株 GASN 培养液样品中没有检测到洗脱峰(图 4-C),表明外源的铁离子可有效抑制荧光脓菌素的合成分泌,但 254nm 检测 sp-f 菌株含铁 GASN 培养液上清时相近的峰 III 并未消失只是减弱,因此认为 254nm 检测图谱的峰 III 是由结构和大小相似的荧光性脓菌素和非荧光性脓菌素两种铁载体构成,因为两种脓菌素在 254nm 都有一定的吸收,而非荧光性脓菌素缺乏完整的喹啉环而在 403nm 没有特异吸收<sup>[9]</sup>。

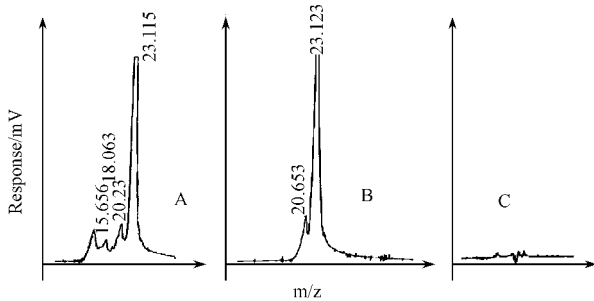


图 4 RP-HPLC 403nm 检测图谱

Fig.4 Result of RP-HPLC analysis detected at 403nm. A: The supernate of strain sp-f cultured in GASN; B: The supernate of the AB92001 cultured in GASN; C: The supernate of strain sp-f cultured in GASN added 200 $\mu$ mol/L  $FeSO_4$  beforehand.

综上,可初步确定 sp-f 菌株可分泌 3 种铁载体。外界  $Fe^{2+}$  完全抑制含有完整的喹啉环的荧光脓菌素的合成,不能完全抑制非荧光脓菌素分泌。此外,sp-f 菌株还合成一种儿茶酚胺类铁载体,与以往报道的铁载体调控机制不同,在高  $Fe^{2+}$  浓度下反而被诱导。sp-f 菌株作为环境中分离得到的高产铁载体菌,根据目前报道还无法详细解释其不同铁载体分泌规律,因此对其进一步研究将有助于了解高产铁载体菌的铁载体代谢调控机制。

#### 2.4 sp-f 铁载体分泌规律

sp-f 菌株分泌铁载体并不是简单的累积效应,它的铁载体合成分泌是与其生长状态密切相关的。其生长曲线和铁载体分泌曲线见图 5。在 sp-f 菌株对数生长初期,  $A_s/A_r$  值持续下降,铁载体量快速增加。对数生长中期 7~8h 左右降到最低( $A_s/A_r = 0.09$ , + + + + +),菌液中的相对铁载体单位可达到 CAS 检测液浓度的 90%, 大约为 15 $\mu$ mol/L<sup>[21]</sup>。随着细菌浓度增加和菌体的成熟,  $A_s/A_r$  值逐渐增加,对数生长后期铁载体浓度有所回落,但是  $A_s/A_r$  仍然可维持在 0.3 以下。当细菌生长稳定后,  $A_s/A_r$  基本稳定在 0.2~0.3 之间。每个取值点均为 3 次以

上平均值。在菌体生长前期以分泌为主,后期以吸收为主。

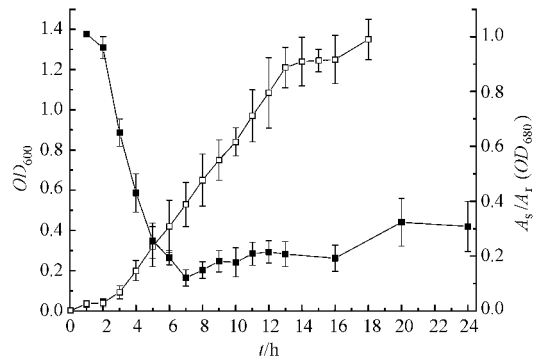


图 5 MKB 培养基中 sp-f 菌株铁载体量变化规律

Fig.5 Siderophores production of strain sp-f when cultured in the MKB medium.  $\square$ , The growth curve of strain sp-f;  $\blacksquare$ , The synchronous siderophores concentration curve of strain sp-f.

一般认为高分泌铁载体对细菌生长不利<sup>[1]</sup>,但由 sp-f 菌株分泌规律,结合假单胞菌特点,它在环境中迅速稳定的高分泌铁载体不仅仅给自身提供充裕的可吸收铁源,它还提供过量的铁载体而造成相对高铁浓度的小生境,有利于其他利用同源铁载体的细菌或动植物的生长,同时它过量分泌的脓菌素结合的  $Fe^{3+}$  会给环境中带来过高的铁氧化还原压力<sup>[17]</sup>,抑制某些不能利用其铁载体细菌的生长。这可能是荧光假单胞菌抑制某些植物病原菌,作为根际铁的提供者促进植物发育的途径。作为铁源的供体菌,sp-f 菌株在自然环境中具有重要的作用和地位,因此对其进一步的研究将有助于我们了解铁载体的生理作用与细菌群体进化关系。

### 3 小结

①本实验利用改进后的 CAS 检测平板从东湖中筛选得到了一株高产铁载体菌 sp-f 菌株,经鉴定为一株荧光假单胞菌。其培养液上清中铁载体量可达 15 $\mu$ mol/L 左右,产铁载体量最高时在 + + + + + 以上,这比以往报道的产铁载体菌的产铁载体能力都要高。其分泌的铁载体远远超过自身生长需要,是环境中铁源的供体菌。这一特性可能与荧光假单胞菌在环境中的作用和地位直接相关。

②对 sp-f 菌株培养液上清的 RP-HPLC 结果分析表明其分泌的铁载体主要有 3 类,初步确定它们为荧光脓菌素、非荧光脓菌素和儿茶酚胺类铁载体,分泌量最高的为荧光脓菌素。外界铁离子压力对于它们的分泌调控有不同作用,其中荧光性的脓菌素分泌可被外界亚铁离子严格抑制,而非荧光性质脓菌素不能被完全抑制。同时 sp-f 菌株儿茶酚胺类铁

载体的分泌,不仅不受抑制,反而被诱导,甚至可超过荧光胞菌素正常分泌量。该现象在其他细菌中还没有类似报道,这对进一步研究假单胞菌铁载体调控机制具有重要的指导意义。

### 参 考 文 献

[ 1 ] Simon CA, Andrea KR, Francisco RQ. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 2003, **27**: 215 - 237.

[ 2 ] Shelley MP. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology*, 1994, **235**: 329 - 344.

[ 3 ] David AH, Amy EW, Alison B, et al. Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Letters to Nature*, 1999, **400**: 858 - 861.

[ 4 ] Ashleigh SG, Stuart AW, Angus B. Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Letters to Nature*, 2004, **430**: 1024 - 1027.

[ 5 ] Winkelmann G. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**(4): 691 - 696.

[ 6 ] Yvonne SC, Dennis CG. Characterization of Pyoverdinin<sub>55</sub>, the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl Environ Microbiol* 1987, **53**(5): 928 - 934.

[ 7 ] Alain B, Isabelle G, Bernard W, et al. High-performance liquid chromatography analyses of pyoverdinin siderophores differentiate among phytopathogenic fluorescent *Pseudomonas* species. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(2): 1143 - 1153.

[ 8 ] Demange P, Bateman A, Mertz C, et al. Bacterial siderophores: structures of pyoverdinin Pt, siderophores of *Pseudomonas tolaasii* NCPPB 2192, and pyoverdinin Pf, siderophores of *Pseudomonas fluorescens* CCM 2798. Identification of an unusual natural amino

acid. *Biochemistry* 1990, **29**(50): 11041 - 11051.

[ 9 ] Alain B, Isabelle G, Henri M, et al. Characterization of fluorescent and nonfluorescent peptide siderophores produced by *Pseudomonas syringae* strains and their potential use in strain identification. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(4): 1718 - 1727.

[ 10 ] Meyer JM, Valerie AG, Nader B. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonads*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(6): 2745 - 2753.

[ 11 ] 王平,董隄,李阜棣,等. 小麦根圈细菌铁载体的检测. *微生物学通报*, 1994, **21**(6): 323 - 326.

[ 12 ] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochem*, 1987, **160**: 47 - 56.

[ 13 ] 谢家仪,王永. 细菌自动鉴定系统的应用与研究. *微生物学通报*, 1996, **23**(5): 264 - 267.

[ 14 ] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 北京:科学出版社, 2001, 162 - 171.

[ 15 ] Manjanatha MG, Loynachan TE, Atherly AG. Trn5 mutagenesis of Chinese *Rhizobium fredii* for siderophore overproduction. *Soil Biol and Biochem*, 1992, **24**(2): 151 - 155.

[ 16 ] Daniel V, Christian A, Michael C, et al. Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2005, **56**(4): 958 - 970.

[ 17 ] Rong X, William SK. Fluorescent pseudomonad pyoverdins bind and oxidize ferrous ion. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(4): 1472 - 1476.

## Isolation, identification and over- siderophores production of *Pseudomonas fluorescens* sp-f

ZHAO Xiang, CHEN Shao-xing, XIE Zhi-xiong\*, SHEN Ping  
(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract** Strain sp-f was isolated, a siderophores over producing bacterium, using an improved universal Chrome Azurol (CAS)-agar plate method from Donghu Lake. The result of the CAS solution siderophores quantitative determination showed the lowest  $A_s/A_r$  ( $OD_{680}$ ) ratio could be as low as 0.09 with  $S_u$  (Siderophore Unit) of 90%. Some more experiments were made to make out the pertinence between its growth and siderophores production, indicating that its siderophores quantity reached maximum amount during the prophase of logarithmic growth. After then, siderophores concentration stopped accumulating and turned to be stable at stationary phase. Based on the characteristics of morphology, cultivation, physiology, (G + C)mol % content, 16S rDNA sequence and BIOLOG station system analysis, it was identified as *Pseudomonas fluorescens* sp-f strain. RP-HPLC analysis showed there exist at least 3 kinds of catecholate siderophores, including fluorescent and non-fluorescent pyoverdins. But only fluorescent pyoverdinin's excretion was completely repressed by the 200  $\mu\text{mol/L Fe}^{2+}$  in the medium. And the non-pyoverdinin siderophores excretion was induced at the same time, contrarily.

**Keywords**: Over excreting siderophore; *Pseudomonas fluorescens*; Bacterial identification; Pyoverdins