

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (4) :408 - 416; 4 April 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.007

铁对产铁载体的沼泽红假单胞菌光合色素与铁载体合成的影响

胡碧惠, 赵春贵*, 杨素萍*

华侨大学生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

摘要: 【目的】探求铁对 1 株能产生铁载体的不产氧光合细菌 (Anoxygenic Phototrophic Bacteria, APB) 光合色素和铁载体合成的影响。【方法】通用 CAS 法检测铁载体产生, Arnow、Csaky 和 Shenker 法检测铁载体类型; 吸收光谱法和 HPLC 法分析光合色素的组分和含量。【结果】*Rhodospseudomonas palustris* CQV97 能够产生异羟肟酸型铁载体, 未添加 FeCl_3 时, 铁载体含量最高, 铁载体的产生与生长并非关联型。随 FeCl_3 浓度升高, 菌体生长潜伏期缩短, 生长速率、最终生物量以及细菌叶绿素 (Bacteriochlorophyll, BChl) *a* 和类胡萝卜素 (Carotenoid, Car) 含量均提高, 而检测到的游离铁载体含量降低; 菌体积累的 BChl *a* 的组成和相对含量未见明显变化, 但主要的 Car 组分由 Spirilloxanthin 转化为 Rhodopin, 菌体中积累 Car 组分的平均共轭体系降低, Car 组成的改变与色素提取液的 Car 特征性光谱蓝移现象相吻合。【结论】首次报道 APB 能够产生铁载体, CQV97 菌株能够产生异羟肟酸型铁载体。阐明了铁对 CQV97 生长、铁载体产生和光合色素合成的影响规律, 这些研究结果为深入开展 APB 铁载体分离纯化以及生物功能研究奠定了基础。

关键词: 不产氧光合细菌, 沼泽红假单胞菌, 铁载体, 细菌叶绿素, 类胡萝卜素

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 04-0408-09

铁是微生物生长所必需的微量元素, 在机体生理生化代谢、电子传递等生命活动过程中发挥着极其重要的作用。尽管铁位于地壳中第 4 位元素, 但主要以难溶的氧化铁或氢氧化铁等形式存在, 其生物可利用性很低, 环境中游离铁浓度仅约 10^{-9} - 10^{-18} mol/L, 海洋中铁离子浓度甚至低于 1 nmol/L^[1], 常引起大洋中出现许多高营养盐和低叶绿素 (High Nutrient Low Chlorophyll, HNLC) 海区。一般

认为, 微生物在长期的进化过程中, 形成了多种多样的摄铁机制, 其中铁载体是微生物摄取环境中铁的 1 种重要方式^[2]。

铁载体 (Siderophore) 是微生物在限铁环境中合成的 1 种对 Fe^{3+} 具有高亲和力 (亲和常数可达 10^{12} - 10^{52}) 的低分子量铁螯合剂。自 20 世纪 80 年代以来, 关于铁载体的研究涉及很多方面^[3], 如: 产铁载体微生物的生态分布及其生态学作用;

基金项目: 国家自然科学基金 (31070054, 31270106); 福建省自然科学基金 (2012J011136)

* 通信作者。Tel: +86-592-6166178; E-mail: chungui@hqu.edu.cn, yangsuping@hqu.edu.cn

作者简介: 胡碧惠 (1987 -) 女, 福建人, 硕士研究生, 研究方向为资源与环境微生物。

收稿日期: 2013-08-08; **修回日期:** 2013-12-09

微生物铁载体的分离与鉴定、结构与功能及转运机制;铁载体与产铁载体致病菌毒力关系及病原微生物的抑制和控制、疾病的控制、治疗和药物开发等。近年来,铁载体合成途径、调控机制和相应酶学研究取得了重要进展,铁载体在岩石风化及在地球生物化学循环中的重要作用也备受关注^[4]。目前已分离鉴定的铁载体有 500 余种,依据其功能基团主要可分为羟肟酸型(Hydroxamate)、儿茶酚型(Catecholate)、羧酸型(Carboxylate)和复合型 4 种类型^[4]。微生物铁载体的深入研究,对于深入理解微生物在生态学和生物地球化学循环中的作用,及其作为天然产物的挖掘和开发均具有重要意义。

不产氧光合细菌(Anoxygenic Phototrophic Bacteria, APB)代谢方式灵活多样,可光能自养和异养、化能自养和异养生长,不仅是光合作用、生物固氮、CO₂ 固定等机理研究的模型生物,而且在畜禽、水产和农业等领域也显示出诱人的应用前景。光合色素是 APB 进行光合生长的核心成分,包括细菌叶绿素(BChl)和类胡萝卜素(Car),其合成代谢受多种环境因子所调控,其中铁对 APB 生长、光合色素含量、光合产氢等具有重要的调控作用^[5-7],但铁对 APB 光合色素组分调控的研究尚未有系统报道,对 APB 产铁载体的研究和认识更为薄弱。目前 APB 类群中关于铁载体的研究仅球形红杆菌(*Rhodobacter sphaeroides*, *Rba. sphaeroides*) L. 2. 4. 1 和 L. 2. 4. 7 的报道,研究表明这 2 个菌株不能产生铁载体,但可以利用其它微生物产生的某些铁载体^[8]。究竟 APB 是否产生铁载体,目前尚无定论。沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris*, *Rps. palustris*)被认为是目前生物降解能力、重金属抗性和环境相容性最高的种类之一^[9],也是常用的饲料级微生物之一,已有广泛应用,在已报道全基因组序列的 7 个菌株中,仅有 CGA009 菌株含有源自固氮菌铁载体 Rhizobactin 的同源基因^[10],目前还缺乏其产生铁载体的实验证据。本文对本实验室保存的 24 株 APB 菌株进行检测,发现 1 株具有菲转化^[11]和高砷抗性^[12]能力的 *Rps. palustris* CQV97 能够产生铁载体,为了探究其产生铁载体的规律,本文着重研究了光照厌氧环境中,不同铁浓度对该菌株生长、光合色素以及产铁载体的影响,以期阐明铁调控 *Rps. palustris* 光合色素和铁载体合成的规律,为进

一步开展 *Rps. palustris* 铁载体分离、纯化和生物学功能的研究,以及深入理解 APB 制剂防病、促生长机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Rps. palustris* CQV97, 16S rRNA 基因 GenBank 登录号分别为 EU882154, 本实验室分离、鉴定并保存。

1.1.2 主要仪器和试剂: CTO-20A 高效液相色谱仪 (SPD-M20A DAD Detector, Shimadzu)。UV-3200 PCS 紫外可见分光光度计 (MAPADA)。MilliQ 超纯水仪 (美国 Millipore 公司)。RE-52C 旋转蒸发仪 (巩义予华仪器公司)。规格 25 mL 细胞培养瓶 (江苏南通鑫尚实验器材厂)。甲醇和乙酸乙酯为色谱纯,无水哌嗪、十六烷基三甲基溴化铵、FeCl₃、铬天青、甲醇和丙酮,均为国产分析纯试剂。

1.2 溶液的配制和培养基的制备

FeCl₃ 溶液: 用 0.01 mol/L HCl 溶液配制 16.7 mmol/L 的储备液,使用时用 0.01 mol/L HCl 稀释成不同浓度 FeCl₃ 溶液。液体培养基按文献方法配制^[5]。无铁(不含外加铁)培养基是删去液体培养基中的 FeSO₄ · 7H₂O 和 EDTA,磷含量调整为原来的 1/2, pH 7.0。实验中使用的玻璃器皿等,用 6 mol/L HCl 浸泡、洗净、超纯水冲洗。所有试剂及培养基均用超纯水(18.2 MΩ·cm)配制。

1.3 产铁载体的测定和铁载体相对含量的测定

铁载体的定性和定量检测均按文献 [13] 方法进行:其中定性检测采用改进的 CAS 检测平板法,检测平板采用不含外加铁的培养基配制,将菌种点种在 CAS 检测平板上,30℃,3000 lux 光照厌氧培养 3 d,观察菌体生长和培养基颜色变化情况。铁载体的相对含量测定采用 CAS 液体检测法进行检测。铁载体类型的测定:将菌体接种于不含外加铁的培养基中,30℃,3000 lux 光照厌氧培养 5 d,离心取上清液,儿茶酚型铁载体采用 Arnow 试验法^[14]、羟肟酸型铁载体采用 Csaky 试验法^[15]、羧酸型铁载体类型采用 Shenker 试验法^[16]。

铁载体相对含量的测定采用 CAS 液体检测法进行:培养液离心取上清,按公式 $Su = (Ar - A) / Ar \times 100\%$ 计算铁载体的含量^[13,17],其中 A 和 Ar 分别为

待测样品和对照样品(无外加铁培养基)在 630 nm 处的吸光度值, S_u 表示铁载体的含量。

1.4 FeCl_3 处理体系和细菌的培养

菌种的培养是将菌种接种到液体培养基中于 30℃, 3000 lux 光照厌氧培养 4 d, 离心收集菌体, 无菌水洗涂 3 次后悬浮到原体积, 3% (V/V) 接种到盛有无铁培养基玻璃瓶中, 分装至含有 200 μL 不同浓度 FeCl_3 的细胞培养瓶中, 再加入 200 μL 0.01 mol/L NaOH, 用培养基充满培养瓶, 总体积为 32 mL, 旋紧瓶盖, 于 30℃, 3000 lux 光照厌氧培养。培养瓶中 FeCl_3 终浓度分别为 0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 、30.0 $\mu\text{mol/L}$ 、80.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 。每隔 12 h 测定菌体生物量, 培养 156 h 测定活细胞吸收光谱、菌体湿重和铁载体含量。选取铁载体产量高的 FeCl_3 浓度, 配制无外加铁培养基, 3% (V/V) 接种后 30℃, 3000 lux 光照厌氧培养, 每隔 12 h 取样, 测定铁载体含量变化。

1.5 生物量的测定

以培养基为对照, 光程为 1 cm 比色杯测定的 660 nm 吸光度 (OD_{660}) 表示培养过程中的菌体生物量。测定时直接将厚度为 2.0 cm 的细胞培养瓶置于分光光度计的光路上测定 660 nm 吸光度 (OD'_{660}), 通过 OD'_{660} 与 OD_{660} 的对应关系, 将培养瓶的测定值 (OD'_{660}) 换算成光程为 1 cm 比色杯的测定值 (OD_{660})。最终生物量用每升菌悬液中湿菌体质量 (ρ , g/L) 来表示。

1.6 光合色素含量和组分分析

采用文献 [18] 方法进行: 采用改良的丙酮甲醇法制备色素提取液, 稀释至 0.01 g/mL 菌体的提取液, 于光程为 1 cm 石英比色杯中测定其吸收光谱, 按 Beer-Lambert-Bouguer 定律和 Jessen 公式分别计算 BChl 和 Car 含量 (W , mg/g)。

色素组分的 HPLC 分析采用反向 C18 柱 (Shim-pack VP-ODS, 150 mm \times 4.6 mm I. D, Shimadzu), PDA 检测器, Car 和 BChl 检测波长为 475 nm 和 770 nm, 柱温 25℃, 流动相 A 为甲醇:水 (95 : 5 V/V), 流动相 B 为乙酸乙酯。梯度洗脱程序为: 0 - 5 min, 0% B; 5 - 25 min, 0% - 30% B; 25 - 40 min, 30% - 45% B; 40 - 60 min, 45% - 60% B。上样量为 20 μL , 流速 0.7 mL/min。依据洗脱时间和吸收光谱, 参照文献 [18] 对各色素组分进行定性, 计算各色素

组分的相对峰面积 ($S\%$)。

2 结果和分析

2.1 产铁载体的测定

CAS 平板检测结果如图 1-A 所示: CQV97 能够在 CAS 检测平板上生长, 3 个菌落周围都产生了明显的橙红色晕圈, 表明铁载体检测为阳性。铁载体类型判定结果如图 1-B 所示: 培养液上清浓缩 10 倍, Csaky 法检测结果呈阳性, 在 520 nm 处有异羟肟酸型铁载体的特征性吸收峰, 而其它铁载体类型检测反应均呈阴性, 表明 CQV97 能够产生异羟肟酸型铁载体。为探求该菌株产生铁载体的规律, 我们进一步研究了铁对菌体生长、光合色素和铁载体合成的影响。

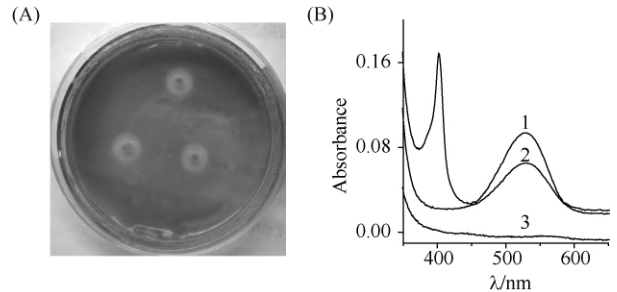


图 1. 产铁载体的 CAS 平板检测 (A) 和 Csaky 检测 (B)
Figure 1. Siderophore production determined by CAS agar plate assay (A) and Csaky test (B). 1: Cell-free supernatants concentrated 10-fold. 2: 20 $\mu\text{g/L}$ hydroxylamine hydrochloride (positive control). 3: Culture medium concentrated 10-fold (blank control).

2.2 铁对菌体生长的影响

铁对菌株 CQV97 生长的影响见图 2-A。结果表明: 未添加 FeCl_3 时, 菌体生长延滞期很长, 生长速率和生物量 (OD_{660}) 也很低。随着 FeCl_3 浓度升高, 延滞期逐渐缩短, 生长速率和生物量也逐渐升高, 当 FeCl_3 浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 延滞期反而延长, 但生长速率和生物量没有明显降低。不同浓度铁对菌体生物量和铁载体含量的影响见图 2-B, 培养 156 h 时, 随着添加 Fe(III) 浓度的升高, 菌体生物量逐渐升高, 达到 80 $\mu\text{mol/L}$ 时, 生物量不再增加; 相反, 铁载体含量却随 Fe(III) 浓度的升高而逐渐降低, 0 - 2 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 时, CAS 检测呈阳性, 未添加 FeCl_3 时, 铁载体的含量最高, 其浓度单位 S_u 为 21.5%。当铁浓度高于 5 $\mu\text{mol/L}$, CAS

反应呈阴性,检测值甚至为负值。其原因是 CAS 法主要检测体系中游离铁载体的含量,在中性 pH 培养体系中, FeCl_3 完全水解形成难溶的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$, 即使是体系中存在过量的难溶 $\text{Fe}(\text{OH})_3$, 也会干扰铁载体的测定,再者菌体产生铁载体,与难溶的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 竞争结合 $\text{Fe}(\text{III})$, CAS 法也检测不到,因此与对照(无外加铁培养基)相比,CAS 检测结果呈现负值。

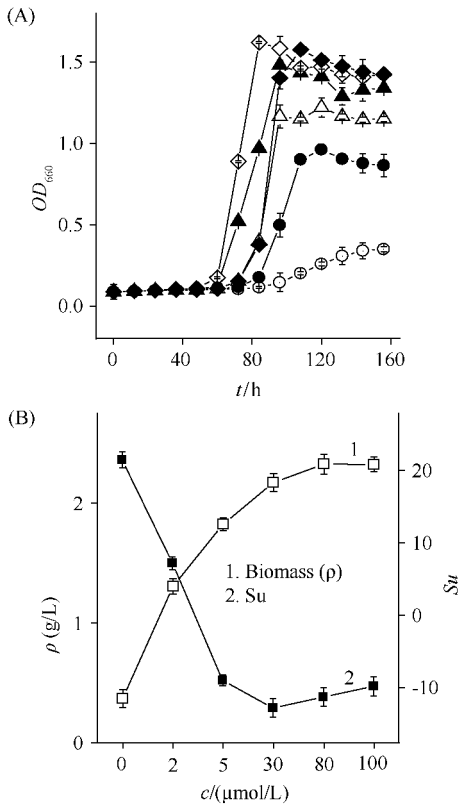


图 2. 铁浓度对 CQV97 菌株生长(A)、最终生物量和铁载体含量(B)的影响

Figure 2. Effects of FeCl_3 concentrations on the cell growth (A), biomass and siderophore content (B). c (FeCl_3) / $\mu\text{mol/L}$: 0 (\circ), 2.0 (\bullet), 5.0 (\triangle), 30.0 (\blacktriangle), 80.0 (\diamond), 100.0 (\blacklozenge).

2.3 菌体生长与铁载体含量的关系

由于未添加 FeCl_3 时,CAS 法检测菌悬液中游离的铁载体含量最高,因此,在该培养条件下探求了 CQV97 菌株生长与产生铁载体的关系,结果如图 3 所示。随着时间的延长,铁载体合成量升高,当铁载体含量 (Su) 积累至一定量(约为 12%)时,菌体呈现出快速生长,随着菌体量的升高,铁载体含量进一步升高,约为 108 h 铁载体含量达到最大

并趋于平衡,而生物量约为 160 h 达到最大,由此可见,铁载体的产生与菌体生长并非关联,铁载体的分泌早于菌体的生长,菌体产生铁载体助其生长。在该培养条件下,铁载体相对含量 (Su) 最高达 21.0%。1992 年 Manjanatha 根据铁载体的相对强度 (A/Ar) 划分了微生物产生铁载体能力的参考标准^[19],依据这一标准可知,*Rps. palustris* CQV97 产铁载体的相对强度为“++”,产铁载体的能力较弱。

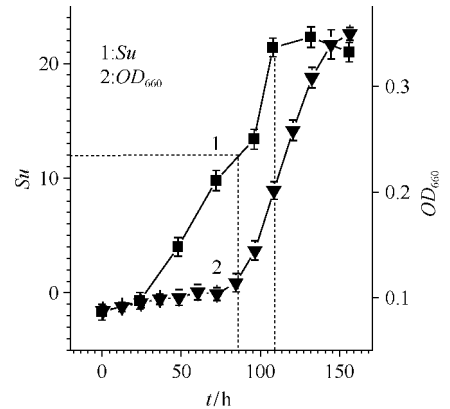


图 3. CQV97 菌体生长与铁载体含量的关系

Figure 3. The relationship of cell growth and siderophore production of strain CQV97.

2.4 铁对光合色素含量的影响

光合色素是 APB 进行光合生长的重要功能单位,其含量与组成的变化反映细胞光合作用能力和生长状况,具体反映于吸收光谱吸光强度和峰位的变化。如图 4-A 所示,在选择的浓度范围内,随着铁浓度升高,BChl a 的 770 nm 处特征性吸收峰位未见明显变化,而 Car 的特征性吸收峰则发生明显蓝移,最大吸收峰由 489 nm 和 519 nm 蓝移至 481 nm 和 511 nm。图 4-B 显示,随着铁浓度的升高,菌体细胞中积累的 BChl a 和 Car 含量增加,而且同步升高,添加 100 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 培养的菌体细胞的色素含量最高,与未添加 FeCl_3 相比,单位质量菌体内 BChl a 和 Car 含量分别提高了 1.7 倍和 1.6 倍,单位培养容积内菌体 BChl a 和 Car 含量分别提高了 10.7 倍和 10.1 倍。由此可见:铁对菌体的生长和光合色素的合成具有重要的调控作用。为深入理解细胞 Car 特征峰发生蓝移的现象,以及铁对光合色素组分合成的影响规律,我们进一步进行了光合色素的组分分析。

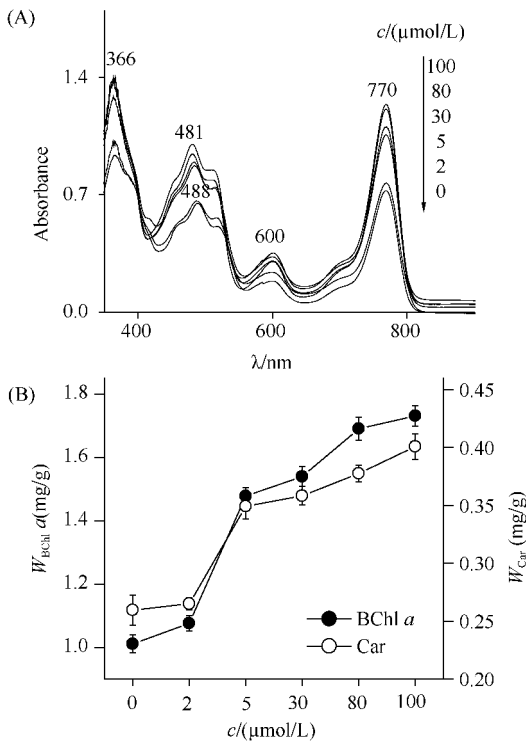


图 4. 铁浓度对色素提取液 (0.01 g/mL 菌体) 吸收光谱 (A) 和菌体色素含量 (B) 的影响

Figure 4. Effects of FeCl₃ concentration on the absorption spectra of pigment extracts (A) and the total amounts (B) of BChls *a* and Cars.

2.5 铁对菌体色素组分的影响

色素组分及其相对含量的测定结果如图 5-A 所示, 770 nm 检测波长处的 HPLC 图谱呈现 4 个色谱峰, 按洗脱峰出峰顺序依次编号 P1-P4, 475 nm 检测波长处的 HPLC 图谱则主要呈现 6 个色谱峰, 按出峰顺序依次编号 P5-P10。依据各色素组分的相对极性、吸收光谱和文献数据^[18], P1-P4 依次鉴定为 BChl *a*_{GC}、BChl *a*_{DHGC}、BChl *a*_{THGC} 和 BChl *a*_P, P5-P10 依次鉴定为 Rhodovibrin、3, 4-Didehydrorhodopin、Rhodopin、Spirilloxanthin、Anhydrohydrovibrin 和 Lycopene。另外, 475 nm 检测 16.6 min 呈现 BChl *a*_P 洗脱峰, 30 μmol/L FeCl₃ 条件下, 24.1 min 处呈现类似 Car 的三指峰, 应该为类胡萝卜素前体, 27.2 min 呈现脱镁细菌叶绿素的洗脱峰。

2006 年, 日本学者 Hitoshi^[20] 研究阐明了 BChl *a* 最后 4 步合成反应及相应 4 种 BChl *a* 衍生物的结构,

其合成途径为细菌叶绿素酸酯 *a* → BChl *a*_{GC} (P1) → BChl *a*_{DHGC} (P2) → BChl *a*_{THGC} (P3) → BChl *a*_P (P4)。2008 年, Takaichi 对紫细菌中螺菌黄素途径和奥氏酮途径中各 Car 的分布、合成基因及合成途径等进行了详细阐述^[21], 由文献可知 6 种 Car 组分的合成途径中的顺序依次为 Lycopene (P10) → Rhodopin (P7) → 3, 4-Didehydrorhodopin (P6) → Anhydrohydrovibrin (P9) → Rhodovibrin (P5) → Spirilloxanthin (P8)。

以相对峰面积 (*S*) 表示 BChl *a* 和 Car 各组分的相对含量, 如图 5-B 所示。以无外加铁培养基菌体色素的相对含量为对照, 添加铁的各组与对照组相对含量差值 ($\Delta S\%$) 的变化见图 5C。结果表明: 随着铁浓度的升高, 单位质量细胞累积的 4 种 BChl *a* 衍生物的相对含量没有发生明显变化, 其相对含量由高到低的顺序为 P4、P1、P3 和 P2, 而 6 种 Car 组分相对含量的高低顺序则发生明显变化, 主要表现在: 随着铁浓度的升高, P7 和 P10 逐渐升高, P5 逐渐降低, P6 变化不明显; P8、P9 呈现 2 个变化过程: 0-5 μmol/L FeCl₃ 范围内, P8 大幅度降低, P9 相对含量明显升高; 当铁浓度继续升高, P8 缓慢升高, 而 P9 逐渐降低。最终由 P7 替代 P8 成为主要的 Car 成分。Car 的特征吸收光谱与 Car 共轭体系的大小有关, 共轭体系增大, 特征吸收光谱红移, 反之则蓝移。分析各色素组分结构和特征吸收光谱可知, P7 和 P10 的共轭长度为 11, P5、P6 和 P9 的共轭长度为 12, P8 的共轭长度为 13。在 0-5 μmol/L FeCl₃ 范围内, 随着铁浓度的升高, 共轭体系 13 的 Car (P8) 相对含量大幅度降低, 共轭体系 12 的 Car (P5, P6, P9) 相对含量升高, 菌体积累 Car 的平均共轭体系降低。铁浓度进一步升高, 共轭体系 13 的 Car (P8) 相对含量逐渐缓慢回升, 共轭体系 12 的 Car (P5, P6, P9) 相对含量却明显下降, 且共轭长度为 11 的 Car (P7, P10) 的相对含量大幅度升高, 从它们的相对变化量来看, 菌体积累 Car 的平均共轭体系逐渐降低。由此可见, 在所测定的铁浓度范围内, 细胞中累积的 Car 的特征吸收光谱蓝移, 这与色素提取液中 Car 特征性吸收峰随铁浓度升高而发生蓝移的结果相吻合 (图 4-A)。

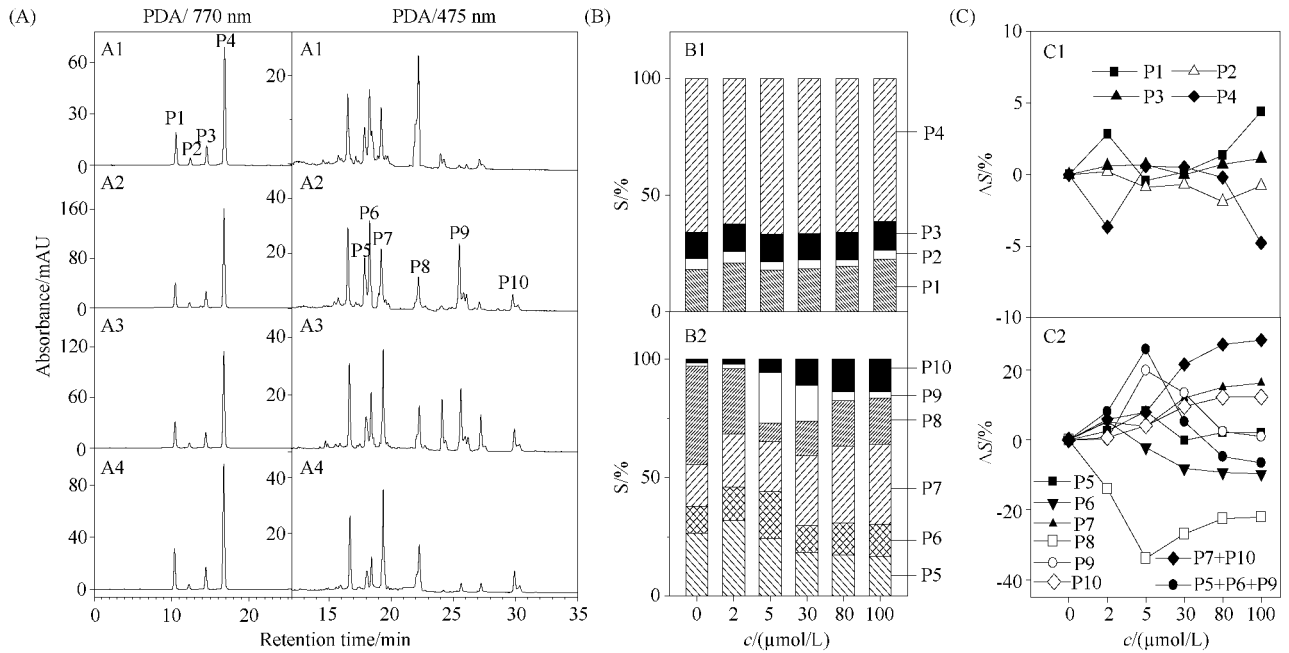


图 5. 铁对光合色素组成和相对含量的影响

Figure 5. Effects of $FeCl_3$ concentrations on composition and relative contents of photosynthetic pigments of *R. palustris* CQV97. A: HPLC profiles of pigment extracts, $c(FeCl_3) / \mu mol/L$ from A1 to A4 were 0, 5.0, 30.0, 100.0, respectively. Biomass contained in pigment extracts ($\rho, g/ml$) / from A1 to A4 were 0.0567, 0.0662, 0.0608, 0.0501, respectively. B: Relative peak areas (S%) of P1 to P8 from HPLC profile. C: The increments of relative peak areas ($\Delta S\%$) of P1 to P8 compared to control.

3 讨论

铁载体是 1 种重要的天然产物,不同微生物产生的铁载体在结构、功能和性质方面有较大差异。铁载体与微生物(包括致病菌)、动植物之间相互作用关系研究表明:铁载体不仅对微生物摄铁、生态系统种群数量控制,以及生物地球化学的转化过程有重要作用,而且对铁载体药物的开发也具有重要意义。因此,开展 APB 铁载体及其调控研究,对于深入理解 APB 在自然界生态中及其在动植物中促生长、防病治病方面的作用具有重要意义。

目前 APB 铁载体相关研究报道甚少,APB 类群是否产生铁载体也尚无定论。1984 年,Moody 等^[8]曾开展了 *Rba. sphaeroides* L. 2.4.1 和 L. 2.4.7 铁载体研究,结果显示,在限铁条件下均未检测到儿茶酚型或异羟肟酸型铁载体的产生;在限铁条件下,该菌不能利用铁转运蛋白(Ferric transferrin)结合的铁,但当加入 2,3-异羟苯甲酸后,则可利用铁转运蛋白结合的铁;该菌可吸收外源铁载体 Parabactin 结合的铁,而不能吸收 Desferal 和 Rhodotorulate 结

合的铁,由此表明这两个菌株不能够产生铁载体。2011 年,Peuser 等^[22]敲除 *Rba. sphaeroides* 2.4.1 菌株的 *fur* 基因(编码 ferric uptake regulator),通过转录组学方法,研究了缺铁条件下 *fur* 突变对基因的表达调控的影响,结果表明该菌株有铁载体转运系统,但未发现铁载体合成酶基因,也即意味着不能产生铁载体。2003 年 *Rps. palustris* CGA009 菌株的全基因组测序完成^[10],表明该基因组中拥有固氮菌(*Sinorhizobium meliloti*)铁载体 Rhizobactin^[23]的同源基因(*rpa2388-rpa2390*),从基因分析可知该菌株具有产生铁载体和利用多种铁载体摄铁的潜能^[10],但缺乏其产生铁载体的实验证据。目前,通用的 CAS 检测铁载体的方法,简便快速,检测结果明确,已广泛应用于微生物产铁载体的初步判定及产铁载体微生物的筛选,因此我们采用 CAS 法,并结合功能基团的化学检测方法,表明 CQV97 至少能够产生 1 种异羟肟酸型铁载体,且产生的铁载体类型与 Rhizobactin^[23]类型相吻合。

铁作为微生物生长所必需的营养元素,全面调控微生物的生长代谢,如:DNA 合成、多种酶的辅基合成、参与电子传递等。已有研究表明:铁限制条件

下,细胞中 H_2O_2 、 HO^\cdot 和过氧亚硝基阴离子等活性氧(ROS)含量明显升高^[22],对 APB 产生氧化胁迫(Oxidative Stress),但大肠杆菌和枯草芽孢杆菌等非光合生物中却没有发现这种现象,由此认为缺铁产生氧化胁迫是光合生物具有特性^[22]。一般认为,铁载体的产生发生在缺铁或铁限制条件下,那么铁浓度过低或铁载体产生条件下,铁对 APB 生长代谢、光合作用功能单位-光合色素的合成以及铁载体的合成具有怎样的调控作用?因而为了了解铁载体产生规律,深入开展铁载体生物学特性研究,本文侧重研究了铁对 CQV97 生长、光合色素和铁载体合成影响,结果表明:随 FeCl_3 浓度升高,菌体摄铁能力提高,生长潜伏期缩短,对数期生长速率、最终生物量以及菌体内积累的光合色素(BChl *a* 和 Car)含量均升高,但采用 CAS 法测定的铁载体的相对含量却降低。铁载体在菌体摄铁过程中发挥着重要的作用,菌体摄铁能力提高,生物量升高,CAS 测定的铁载体量却降低,甚至呈负值?其一是由于高浓度铁能够抑制铁载体的产生^[3],菌体产生少量铁载体即可满足菌体的摄铁要求。其二是由于 CAS 法适合于测定游离铁载体,若产生的铁载体与铁结合,则检测不到信号。其三是由于培养体系中铁含量升高,即使形成难溶的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 胶体,CAS 试剂能够竞争结合这种难溶的铁,造成检测结果成为负值。由此可见,即使在难溶于水的铁源存在下,CAS 法难以检测与 Fe^{3+} 结合的铁载体,并且受样品中难溶铁源的严重干扰。因此,本文无添加铁时,测定的菌体分泌的铁载体含量最高;但若研究菌体铁载体的合成情况,还应该包括结合 Fe^{3+} 的铁载体,究竟是否如此,有待于进一步研究。

APB 细胞中积累的光合色素是光氧调控和细胞内生理代谢的综合体现,关于 APB 光合色素的光氧调控已有深入研究。如:光强升高,*Rps. palustris* NBRC100419,3,4-Didehydrorhodopin 和 Lycopene 的含量上升,Spirilloxanthin 含量下降,而在 *Rps. sp. Rits*,*Rps. palustris* CGA009,*Rps. palustris* Morita 和 *Rhodospirillum rubrum* S1 等 4 个菌株中则表现出相反结果^[24],由此可见,在不同的菌株中,光对细胞内积累的光合色素呈现不同的变化规律。而铁对色素的调控研究还没有系统报道,本研究结果表明:随着培养体系中外加 FeCl_3 浓度升高,单位质量菌体中积累的 BChl *a* 和 Car 总量升高,4 种 BChl *a* 组分的

相对含量未发生明显变化,但 Car 组分则发生了明显的变化。随着 FeCl_3 浓度升高,菌体积累的主要 Car 由 Spirilloxanthin 转化为 Rhodopin,而且积累 Car 组分的平均共轭体系逐渐减小,与光合色素提取液 Car 特征性吸收峰蓝移结果一致。

综上所述:*Rps. palustris* CQV97 能够产生异羟肟酸型铁载体,但产铁载体能力较弱。在无外加铁源时,菌体产生铁载体助其生长,铁载体的分泌早于菌体的生长,铁载体产生与菌体生长呈非关联关系。随着外加 FeCl_3 浓度升高,菌体摄铁能力提高,表现在生长的潜伏期缩短,对数期生长速率、最终生物量以及菌体内积累的光合色素(BChl *a* 和 Car)含量均升高。细胞中积累的 4 种 BChl *a* 衍生物的相对含量未发生明显变化,而 Car 相对组分含量呈现规律性变化,即随着外加 FeCl_3 浓度升高,细胞中积累的共轭体系大的 Car 组分含量降低,共轭体系小的 Car 组分含量升高,主要的 Car 由 Spirilloxanthin 转化为 Rhodopin,与 CQV97 活细胞和色素提取液中 Car 的特征光谱蓝移现象相吻合。这些研究为进一步开展 APB 铁载体分离纯化和生物功能研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Tortell PD, Maldonado MT, Granger J, Price NM. Marine bacteria and biogeochemical cycling of iron in the oceans. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 1999, 29 (1): 1-11.
 - [2] Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 2003, 27 (2): 215-237.
 - [3] Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. Microbial siderophores: a mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 2012, 54 (4): 1-15.
 - [4] Maurice PA, Haack EA, Mishra B. Siderophore sorption to clays. *Biomaterials: an International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry and Medicine*, 2009, 22 (4): 649-658.
 - [5] Yang S, Zhao C, Qu Y, Qian X. Effects of iron and nickel on hydrogen photoevolution, cell growth, and photosynthetic pigment of photosynthetic bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43 (2): 257-263. (in Chinese)
- 杨素萍,赵春贵,曲音波,钱新民.铁和镍对光合细菌生长和产氢的影响.微生物学报,2003,43(2):

- 257-263.
- [6] Liu BF, Ren NQ, Ding J, Xie GJ, Guo WQ. The effect of Ni^{2+} , Fe^{2+} and Mg^{2+} concentration on photo-hydrogen production by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34(2): 721-726.
- [7] Horne IM, Pemberton JM, McEwan AG. Manganous ions suppress photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology*, 1998, 144(8): 2255-2261.
- [8] Moody MD, Dailey HA. Siderophore utilization and iron uptake by *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1984, 234(1): 178-186.
- [9] Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty JT. The Purple Phototrophic Bacteria (In *Advances in Photosynthesis and Respiration*). The Netherlands: Springer, 2008, 537-682.
- [10] Larimer FW, Chain P, Hauser L, Lamerdin J, Malfatti S, Do L, Land ML, Pelletier DA, Beatty JT, Lang AS. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium. *Nature Biotechnology*, 2003, 22(1): 55-61.
- [11] Zhao L, Zhao C, Han D, Yang S, Chen S, Yu CP. Anaerobic utilization of phenanthrene by *Rhodospseudomonas palustris*. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(11): 2135-2140.
- [12] Lv C, Zhao C, Yang S, Qu Y. Arsenic metabolism in purple nonsulfur bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(012): 1497-1507. (in Chinese)
吕常江, 赵春贵, 杨素萍, 曲音波. 紫色非硫细菌的砷代谢机制. 微生物学报, 2012, 52(012): 1497-1507.
- [13] Bernhard S, Neilands B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1): 47-56.
- [14] Arnow LE. Colorimetric determination of the components of the 3,4-dihydroxyphenylalanine-tryosine mixtures. *The Journal of Biological Chemistry*, 1937, 118(1): 531-537.
- [15] Csaky T. On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. *Acta Chemica Scandinavica*, 1948(2): 450-454.
- [16] Shenker M, Oliver I, Helmann M, Hadar Y, Chen Y. Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Plant Nutrition*, 1992, 15(10): 2173-2182.
- [17] Wang P, Dong B, Li F, Hu Z. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizobia bacteria. *Microbiology China*, 1994, 21(6): 323-326. (in Chinese)
王平, 董飏, 李阜棣, 胡正嘉. 小麦根圈细菌铁载体的检测. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326.
- [18] Zhuo M, Zhao C, Cheng Q, Yang S, Qu Y. Establishment and rapid analysis of natural pigment fingerprinting of purple bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(6): 760-768. (in Chinese) 卓民权, 赵春贵, 程茜茹, 杨素萍, 曲音波. 紫细菌光合色素指纹图谱的建立与色素分析. 微生物学报, 2012, 52(6): 760-768.
- [19] Manjanatha M, Loynachan T, Atherly A. Efficiency, competitiveness, and persistency of chinese *Rhizobium fiedii* in Iowa soils. *Agronomy Journal*, 1992, 84(4): 676-681.
- [20] Mizoguchi T, Harada J, Tamiaki H. Structural determination of dihydro-and tetrahydrogeranylgeranyl groups at the 17-propionate of bacteriochlorophylls-a. *Federation of European Microbiological Societies Letters*, 2006, 580(28-29): 6644.
- [21] Takaichi S. Distribution and biosynthesis of carotenoids // Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC, Beatty JT. The Purple Phototrophic Bacteria. The Netherlands: Springer, 2008: 97-117.
- [22] Peuser V, Metz S, Klug G. Response of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* to iron limitation and the role of a Fur orthologue in this response. *Environmental Microbiology Reports*, 2011, 3(3): 397-404.
- [23] Lynch D, O'Brien J, Welch T, Clarke P, ÓCuív P, Crosa JH, O'Connell M. Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(8): 2576-2585.
- [24] Mizoguchi T, Isaji M, Harada J, Tamiaki H. Identification of 3, 4-didehydrorhodopin as major carotenoid in *Rhodospseudomonas* species. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2008, 7(4): 492-497.

Influence of iron on siderophore and photosynthetic pigments biosynthesis by siderophore-producing *Rhodospseudomonas palustris*

Bihui Hu, Chungui Zhao^{*}, Suping Yang^{*}

Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] To explore the regulation of iron on siderophore production, cell growth and photosynthetic pigments biosynthesis by siderophore-producing anoxygenic phototrophic bacteria. [Methods] Siderophore production was determined using Chrome Azurol S (CAS) assay. The siderophore types were determined by Arnow method, Csaky test and Shenker test. The compositions and contents of photosynthetic pigments were determined by spectrophotometry and HPLC analysis. [Results] *Rhodospseudomonas palustris* (*Rps. palustris*) CQV97 was capable of producing hydroxamate-type of siderophore. Siderophore production reached the highest yield in the absence of ferric chloride. With increasing ferric chloride concentrations, the lag phase of cell growth was shortened, and the cell growth rate, final biomass and the total amounts of carotenoid and bacteriochlorophyll *a* were increased significantly. The characteristic absorption maxima of carotenoids from pigment extracts were blueshifted. Iron concentration had little effect on the compositions and relative contents of bacteriochlorophylls *a*, whereas predominately affected carotenoid compositions, rhodopin was present as major carotenoid component instead of spirillixanthin. Culture tends to accumulate the Cars having shorter conjugated double bonds at the expense of longer conjugated double bonds as the ferric chloride concentration increased. The changes in carotenoid composition were consistent with those of the blue shift of absorption spectra of pigment extracts. [Conclusion] *Rps. palustris* CQV97 can produce siderophore and the changes in microbial growth, siderophore production and photosynthetic pigments accumulation of anoxygenic phototrophic bacteria are related to the iron concentration in the medium.

Keywords: *Rhodospseudomonas palustris*, siderophore, bacteriochlorophyll, carotenoid, anoxygenic phototrophic bacteria

(本文责编:王晋芳)