

海洋微生物铁载体的研究

Advance of the siderophors produced by marine microorganisms

方涛, 李道季, 余立华

(华东师范大学 河口海岸国家重点实验室, 上海 200062)

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 1002-3096(2007)10-0082-05

铁是许多生化过程所必需的元素, 如光合作用、呼吸作用、DNA 和叶绿素的合成以及硝酸盐的还原等, 然而供给生命体的铁在自然界 pH 条件下的水中主要是以 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 形式存在, 由于它的难溶性, 海水中可溶性铁的浓度是非常低的。根据北太平洋中央区域可溶性铁的垂直剖面图^[1], 海水表面混合层可溶性铁的最高浓度只有 0.37 nmol/kg, 中层和深层海区(500~4000 m)可溶性铁的平均浓度是 0.38 nmol/kg。在太平洋东北区, 表层海水可溶性铁的浓度不到 0.1 nmol/kg^[2]。海水中低浓度的铁极大地限制了生物体对它的摄取, 为此, 微生物体内会产生一种铁载体(siderophore)以保证其对铁元素的需求。

目前, 国际上对海洋铁载体的研究已经达到相当深度, 而国内尚未开始研究, 鉴于其研究的重大科学意义, 作者详细地介绍了铁载体目前研究的进展。

1 铁载体简介及检测方法

1.1 铁载体简介

铁载体是微生物在低铁应激条件下产生的分子质量较低的高铁离子特异性螯合剂。它们通常含有能螯合 Fe^{3+} 的去质子化的羟肟酸功能基[hydroxamate: $\text{CON}(\text{O})$]和儿茶酚残基的配位基团。其特性可概括为以下几个方面^[3]: (1) 分子质量小(500~1000 u); (2) 有 Fe^{3+} 特有的配合体, 不与 Fe^{2+} 结合; (3) 生物合成受溶液中铁浓度的调节, 在周围铁浓度高的情况下, 其合成则会受到抑制; (4) 对于 $\text{Fe}^{3+} + \text{L}^{12} \text{y FeL}^{3k}$ 类型的反应(L是配合体), 其形成常数(formation constant)大概在 10^{30} 左右或者更高。

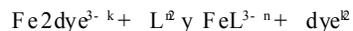
根据微生物铁载体配位点的化学性质可将其分为 4 种类型^[4]: 羟肟酸(hydroxamates)类型、儿茶酚(catecholates)类型、羧酸盐(carboxylates)类型和混合类型。海洋细菌和真菌都可以产生羟肟酸型铁载体, 前者是由羟基化和酰化的烷基胺组成, 后者

则是羟基化和酰化的鸟氨酸。儿茶酚型铁载体多产生于细菌, 含有儿茶酚残基和羟基基团, 而在真菌中未见报道^[5]。羧酸盐型铁载体多是由属于接合菌门(Zygomycota)的真菌和一些细菌: 苜蓿根瘤菌(Rhizobium meliloti)和猪葡萄球菌(Staphylococcus hyicus)产生, 通过羧基和羟基来结合铁^[6]。

1.2 铁载体检测方法

海洋中大部分区域铁的有机络合物的浓度只有 nmol 级水平, 因此对于海水中铁载体直接检测方法的研究有着很多困难, 相关方面的研究也很少。毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)是铁载体最有效的方法, Pitor 等^[7]通过毛细管电泳在 25 mmol/L 磷酸碱性缓冲液和 20 kV 的稳定电压下, 检测到波罗的海表面海水样品中含有由链霉菌(Streptomyces)产生的铁草胺(Ferrioxamine)E 和 G, 而在此之前这类铁载体还没有发现在波罗的海中存在。

对于实验室培养的微生物检测其分泌的铁载体一般按照 Schwyn 等^[8]的方法(图 1)。铬奥醇(Chrome Azurol Sulphonate, CAS)琼脂培养基中由于含有 CAS, 十六烷基三甲胺基(HDTMA)以及 Fe^{3+} 的三元复合物而呈蓝色。只有当更强的螯合剂将铁从该复合物中移出, 它的颜色才会由蓝色转为橙色:



如果在湿润光滑的菌落周围有明显的桔黄色透明晕圈生成, 则说明待测菌在生长过程中分泌了一种对铁具有较高亲和力的铁载体类物质。

收稿日期: 2002-04-28; 修回日期: 2002-07-20

基金项目: 国家 973 计划资助项目(2002CB412405)

作者简介: 方涛(1982), 男, 博士研究生, 研究方向: 河口海岸生物地球化学, E-mail: fang_tao13@yahoo.com.cn

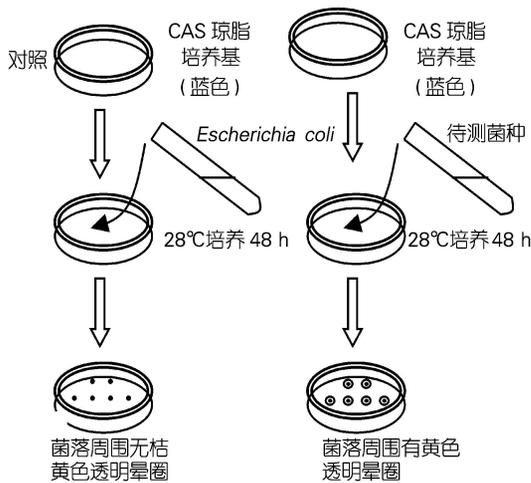


图 1 CAS 琼脂板测试步骤

2 海洋微生物铁载体的研究现状

与陆地上铁载体相比,海洋微生物产生铁载体的相关知识是很缺乏的,海洋真核藻类产生铁载体的报道很少^[9,10],而原生动植物产生铁载体的相关直接证据只限于腰鞭毛虫(*Proocentrum minimum*)^[11]。下面从海洋细菌、真菌、蓝细菌 3 个种类分别阐述海洋微生物铁载体的最新研究成果。

2.1 海洋细菌铁载体的研究

海水表面低浓度的铁是许多高营养盐低叶绿素(HNLC)区域海洋初级生产力的潜在限制因子^[12],海洋细菌的生长同微藻、蓝细菌一样也存在着铁限制。已有实验表明海洋细菌在低铁环境条件下会分泌铁载体^[13],迄今为止,只有少数类型海洋微生物铁载体的完整结构被人们所知^[14-20],它们大都来自于海水中一些独特的细菌(表 1)。

通过对这些细菌铁载体结构的研究,科学家们发现陆地上铁载体含有的异羟肟酸功能基和儿茶酚功能基在实验室提取的海洋铁载体中也存在。另外,Reid 等^[16]发现 β 羟基天冬氨酸基团(β -hydroxy aspartate)是某些海洋异养细菌铁载体的有效功能基。这些结构上的研究对最终了解海洋铁的生物可利用性和生物地球化学循环有着极其重要意义。

Gledhill 等^[21]通过往海水中加入葡萄糖、氨基酸和磷酸盐进行营养加富培养实验,培养 4 d 后发现浮游细菌产生了 7 种不同的铁载体,3 种属于 ferriox2 amines 系列,另外 4 种属于 amphibactins 系列,除此之外,结果还表明当铁载体超过海水中的铁的浓度后,铁载体也会与铝络合成复合物。

表 1 几种海洋细菌产生的铁载体

细菌名称	铁载体
鳃弧菌(<i>Vibrio anguillarum</i>) ^[14]	Anguibactin
浮游交替单胞菌 (<i>Alteromonas haloplanktis</i>) ^[15]	Biscaberin
藤黄紫交替单胞菌 (<i>A. luteoviridis</i>) ^[16]	Alterobactin A
藤黄紫交替单胞菌 ^[16]	Alterobactin B
弧菌(<i>Vibrio sp.</i>) ^[17]	Aerobactin
创伤弧菌(<i>Vibrio vulnificus</i>) ^[18]	Vulnibactin
深海中度嗜盐菌 (<i>Halomonas aquamarina</i>) ^[19,20]	Aquachelin
海杆菌(<i>Marinobacter sp.</i>) ^[19,20]	Marinobactin

Takahiro 等^[22]研究了海洋浮游交替单胞菌(*Alteromonas haloplanktis*)分泌的铁载体对铁的氢氧化物的溶解能力,结果显示含有铁载体的溶液中铁的浓度比纯水中非结晶状态的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 的溶解铁浓度的 50 倍还要高,说明由海洋细菌分泌的铁载体能够明显地提高铁的氢氧化物的溶解能力,这一结果也暗示海洋中浮游植物所利用的大部分铁很可能来自于含铁的风化颗粒。但 Takahiro 并没有对非结晶状态的 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 在含有铁载体溶液中溶解的机制做进一步的解释。

Martinez 等^[19]从分子水平上研究了两类来自于不同属的海洋细菌铁载体,即由深海中度嗜盐菌(*Halomonas aquamarina*)分泌的 Aquachelins 和海杆菌(*Marinobacter sp.*)分泌的 Marinobactins,它们结构上都有一个肽链组成的亲水头部(结合铁的部位)和一个脂肪酸组成的疏水尾部,这些铁载体有一个临界微团浓度(critical micelle concentrations(CMCs)),在缺铁情况下,它们的浓度不超过 CMC 时,便以微团的形式存在,加入铁后,微团便会自发形成微囊。这种特征可能是为了防止蛋白质的水解,因为海水中广泛地存在着蛋白酶和其它降解酶,这些酶甚至存在于海洋浮游细菌的表面。这种结构是不是广泛地在海洋细菌中存在,是不是代表着一种特殊的利用铁的机制都还需要进一步的研究。

国内对海洋细菌铁载体的研究很少,马悦和张元兴^[23]以一株海洋鳃弧菌 pJM1 质粒缺陷株为研究对象,考察了儿茶酚类铁载体 Anguibactin 的合成代谢调控。研究发现,在由染色体和质粒共同编码介导的铁载体 Anguibactin 的合成途径中,其分界点位于 2,3,2-二羟基苯甲酸合成,2,3,2-二羟基苯甲酸合成之前代谢途径受染色体编码调节,之后由质粒编码介导,而

编码 2, 2-二羟基苯甲酸的染色体相关基因的表达受环境铁离子浓度的诱导调节。

2.2 海洋真菌铁载体的研究

海洋真菌不是一个分类和系统学上的概念, 而是一个生态和生理学意义上的一大类真菌的总称^[24]。与陆地上一样, 海洋真菌在低浓度铁环境下也可产生铁载体。Arefa 等^[4]研究了 20 个真菌(分别来自于海洋和陆地上相同的 10 个种)分泌的铁载体的特性差异, 发现除了海洋真菌黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*), 其它所有菌的铁载体在 FeCl_3 测试、CAS 分析和 CAS 琼脂板测试反应中都呈阳性, 说明在铁限制的环境条件下铁载体存在的广泛性。迄今为止, 关于真菌产生儿茶酚型铁载体还未见报道^[5], Arefa 的研究也发现除了 5 个霉菌产生羧酸盐型铁载体, 其它菌都产生异羟肟酸型铁载体, 而儿茶酚型铁载体在所有菌中均未产生, 因此, 铁载体的特性与微生物栖息环境是没有关系的。

2.3 海洋蓝细菌铁载体的研究

很多蓝细菌在低浓度可溶性铁的环境下都会分泌铁载体, 它作为高亲和力铁获取系统与细菌、真菌是类似的。在低浓度铁环境条件下, 海洋蓝细菌会产生多种铁载体: 异羟肟酸和儿茶酚型^[25]。微生物分泌铁载体可以提高对环境中铁的获取能力, 这种化合物可以促进细菌细胞膜上 $\text{Fe}\text{siderophore}$ 特殊的受体蛋白对铁的吸收, 而在蓝细菌中, 铁载体是通过两个步骤实现其功能的: 细胞微环境下亲水的异羟肟酸型铁载体与铁离子的结合, 再与疏水的儿茶酚型铁载体表面发生 Fe^{3+} 的交换。这种机制可以提高细胞与铁载体再相遇的机会^[25]。

Borwn 和 Trick^[26]发现小颤藻(*Oscillatoria tenuis*) 在周围环境铁的浓度较低时, 其产生的铁载体多是儿茶酚型, 而不是异羟肟酸型, 可见在铁限制较为严重时, 儿茶酚型铁载体发挥着更加关键的作用。

3 海洋微生物铁吸收机制的研究

许多陆地上的细菌、真菌和较高级的植物在可利用铁含量低的环境下已经发展形成了一些特殊的铁吸收机制。最普遍的两种机制就是铁载体的分泌和细胞表面有机络合铁的还原。前者是细胞表面分泌的铁载体扩散后与外界 Fe^{3+} 结合, 再回到细胞表面进而被细胞所吸收; 后者则是细胞外界环境下自然存在的 Fe^{3+} 有机络合物经过细胞膜上特殊还原酶

的作用变成 Fe^{2+} 而被细胞所吸收^[27]。 $\text{Fe}\text{siderophore}$ 吸收也常常包括还原的过程^[27], 所以这两种吸收机制并不一定是单独存在的。

然而在海洋环境中, 浮游生物通过这两种方式吸收铁的相关证据却很少, 有时甚至是矛盾的。Hudson 和 Morel^[28,29]已经证明一些硅藻对铁的吸收率是受无机 Fe^{3+} 氢氧化物浓度的影响, 吸收包括两个步骤即与特殊有机络合物的结合以及复合物的内化(internalization)。蓝细菌在吸收 $\text{Fe}\text{siderophore}$ 时, 溶解的异羟肟酸型铁载体会和羧酸盐型铁载体发生铁原子的交换^[25]。尽管真核浮游植物本身一般不产生铁载体, 但某些种在铁限制的环境下也可以通过细胞表面的还原酶吸收利用 $\text{Fe}\text{siderophore}$ ^[30], 真核浮游植物和原核浮游植物在吸收 $\text{Fe}\text{siderophore}$ 的能力上也存在着差异, $\text{Fe}\text{siderophore}$ 更有利于原核微藻的吸收^[31]。浮游植物吸收 $\text{Fe}\text{siderophore}$ 也可以通过多种机制, 比如硅藻中的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*) 在利用 Desferrioxamine E 和 B 结合的铁时, 前者是细胞直接吸收, 后者吸收则需要经过细胞膜的还原过程^[32]。最近有研究指出往自然海水中加入 Desferrioxime B(由真菌分泌的一种铁载体)时, 真核浮游植物铁的利用率会降低, 但并不是所有铁载体对真核微藻铁的吸收都产生影响, 有两种海洋铁载体(PIP 和 PCC7002 No. 1)对真核藻类铁吸收不产生或产生极小的影响^[33]。

Barbeau 等^[34,35]发现光对海洋微生物体铁的吸收起着重要作用(图 2), 由细菌分泌的铁载体在与 Fe^{3+} 结合后会发生光化学反应, 其产物可被其他微生物体更有效地吸收。根据最近的研究, 只有含有异羟肟酸基团的铁载体比如 desferrioxamine B(DFOB)才能够发生光化学反应, 形成不感光的铁复合物^[36], 而且 $\text{Fe}(\text{O})_2\text{DFOB}$ 的氧化是在瞬间完成的^[37]。这个循环的关键特征就是有机络合铁的光解, 即 Fe^{3+} 的还原和铁载体的氧化。这个循环很可能是海洋铁的生物地球化学的基本特征, 大大地影响了海洋生物区和铁这个关键微量元素相互的作用。

由于细胞分泌的铁载体在海水中很容易被扩散, 从而大大降低微生物以分泌铁载体作为铁吸收途径的有效性^[38], Christonph 等^[39]通过数字模型探讨了铁载体的自由扩散、铁载体与铁离子络合反应动力学和细胞吸收动力学对海洋浮游生物利用上述两种机制吸收铁的影响, 但并没有考虑 $\text{Fe}\text{siderophore}$ 的光解等因素。

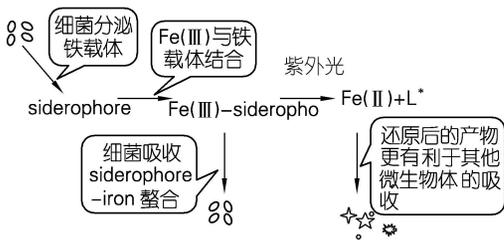


图2 海水中铁的光化学循环
L* 是 siderophore 的光解产物

4 存在的问题

由于缺乏灵敏高效的分析技术,海洋微生物铁载体的研究尚需解决的问题还有很多,除了上述方面外,还有以下问题值得人们关注:

(1) 虽然科学家们已经从铁载体化合物中检测出螯合基团,而且已经证实铁载体与其它有机配体有相似的铁结合力,但是关于海水中铁载体存在的直接证据却很少。

(2) 只有在低浓度可利用铁的环境下,海洋微生物才会分泌铁载体,但是铁浓度低到多少才能引发铁载体的产生现在还不知道,因此铁载体的产生在不同的海洋系统(如大洋、上升流、海岸)发挥的重要性也就无法得到了解。

(3) 当前的研究多集中于定性研究,而关于铁载体重要性的定量研究却很少,进一步扩大这方面的研究将对海洋铁的生物地球化学循环有着重要意义。

(4) 由于海洋微生物铁利用机制的复杂性,铁载体在铁利用机制方面的作用还不清楚,尤其是有关分子基因水平研究上的内容还很缺乏。

参考文献:

[1] Bruland K W, Orians K J, Cowen J P. Reactive trace metals in the stratified central North Pacific [J]. *Geochim Cosmochim*, 1994, 58: 3 1723 182.

[2] Martin J H, Gordon R M. Northeast Pacific iron distributions in relation to phytoplankton productivity [J]. *Deep Sea Res*, 1988, 35: 172196.

[3] Neilands J B. Microbial iron compounds [J]. *Annu Rev Biochem*, 1981, 50: 7152731.

[4] Baakza A, Vala A K, Dave B P, et al. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2004, 311: 129.

[5] Thieken A, Winkelmann G. A novel bioassay for the detection of siderophores containing ketohydroxy b2

dentate ligands [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 111: 281.

[6] Drechsel H, Tschierske M, Thieken A, et al. The carboxylate type siderophore rhizoferrin and its analogs produced by direct fermentation [J]. *J Ind Microbiol*, 1995, 14: 102112.

[7] Mucha P, Rekowski P, Kosakowska A, et al. Separation of siderophores by capillary electrophoresis [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 830: 1832189.

[8] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores [J]. *Anal Biochem*, 1987, 160: 47256.

[9] Trick C G, Andersen R J, Price N M, et al. Examination of hydroxamate siderophore production by n2ritic eukaryotic marine phytoplankton [J]. *Mar Biol* Berl, 1983, 75: 217.

[10] Benderliev K M, Ivanova N I. High affinity siderophore mediated iron transport system in the green alga *Scenedesmus incrasatulus* [J]. *Planta*, 1994, 193: 162166.

[11] Trick C G, Andersen R J, Gillam A, et al. Prorocentrin: an extracellular siderophore produced by the marine dinoflagellate *Prorocentrum minimum* [J]. *Science*, 1983, 219: 3062308.

[12] Martin J H, Caole K H, Johnsons K S, et al. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean [J]. *Nature*, 1994, 371: 1232129.

[13] Trick C G. Hydroxamate siderophore production and utilization by marine eubacteria [J]. *Curr Microbiol*, 1989, 18: 372378.

[14] Jalal M A F, Hossain M B, van der Helm D, et al. Structure of Anguibactin, a unique plasmid related bacterial siderophore from the fish pathogen *Vibrio anguillarum* [J]. *J Am Chem Soc*, 1989, 111: 2922 296.

[15] Takahashi A. Biscaberin, a new siderophore, sensitizing tumor cells to macrophage mediated cytotoxicity [J]. *J Antibiot*, 1987, 40: 1 6721 676.

[16] Reid R T, Live D H, Faulkner D J, et al. A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant [J]. *Nature*, 1993, 366: 4552458.

[17] Haygood M G, Holt P D, Butler A. Aerobactin production by a planktonic marine *Vibrio* sp. [J]. *Limnol Oceanogr*, 1993, 38: 1 09121 097.

[18] Okujo N, Saito M, Yamamoto S, et al. Structure of vulnibactin, a new polyamine containing siderophore from *Vibrio vulnificus* [J]. *BioMetals*, 1994, 7: 102116.

- [19] Martinez J S, Zhang G P, Holt P D, et al. Self-assembling amphiphilic siderophores from marine bacteria [J]. *Science*, 2000, 287: 1242-1247.
- [20] Martinez J S, Franklin J N C, Mann E L, et al. Structure and membrane affinity of a suite of amphiphilic siderophore produced by a marine bacterium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(7): 3752-3759.
- [21] Gledhill M, McCormack P, Ussher S, et al. Production of siderophore type chelates by mixed bacterial plankton populations in nutrient enriched seawater incubations [J]. *Marine chemistry*, 2004, 88(2004): 728-3.
- [22] Takahiro Y, Ken-ichiro H, Hiroshi O. Dissolution of iron hydroxides by marine bacterial siderophore [J]. *Chemical Geology*, 2002, 184: 129.
- [23] 马悦, 张元兴. 海洋鳃弧菌铁载体合成的调控[J]. *华东理工大学学报*, 2002, 28(3): 232-240.
- [24] 林永成, 周世宁. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [25] Wilhelm S W, Trick C G. Iron-limited growth of cyanobacteria: multiple siderophore production is a common response [J]. *Limnology and Oceanography*, 1994, 39: 1972-1984.
- [26] Brown C M, Trick C G. Response of the cyanobacterium *Oscillatoria tenuis* to low iron environments: the effect on growth rate and evidence for siderophore production [J]. *Arch Microbiol*, 1992, 157: 342-354.
- [27] Guerinet M L. Microbial iron transport [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48: 743-772.
- [28] Hudson R J M, Morel F M M. Iron transport in marine phytoplankton: kinetics of cellular and medium coordination reactions [J]. *Limnology and Oceanography*, 1990, 35: 1002-1020.
- [29] Hudson R J M., Morel F M M. Trace metal transport by marine microorganisms: implications of metal coordination kinetics [J]. *Deep Sea Research*, 1993, 40: 129-150.
- [30] Maldonado M T, Price N M. Reduction and transport of organically bound iron by *Thalassiosira oceanica* (bacillariophyceae) [J]. *J Phycol*, 2001, 37: 292-309.
- [31] Hutchins D A, Witter A E, Butler A, et al. Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species [J]. *Nature*, 1999, 400: 852-861.
- [32] Soriano-Dengg S, Horstmann U. Ferrioxamines B and E as iron sources for the marine diatom *Phaeodactylum tricoratum* [J]. *Marine Ecology progress Series*, 1995, 127: 269-277.
- [33] Mark L W, Charles G T. Controlling iron availability to phytoplankton in iron-replete coastal waters [J]. *Marine Chemistry*, 2004, 86: 123.
- [34] Barbeau K, Rue E L, Bruland K W, et al. Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron(II)-binding ligands [J]. *Nature*, 2001, 413: 402-413.
- [35] Barbeau K, Zhang G P, Live D H, et al. Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 3782-379.
- [36] Barbeau K, Rue E L, Trick C G, et al. Photochemical reactivity of siderophores produced by marine heterotrophic bacteria and cyanobacteria based on characteristic Fe(II)-binding groups [J]. *Limnol Oceanogr*, 2003, 48: 1062-1078.
- [37] Welch K D, Davis T Z, Aust S D. Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 397: 362-369.
- [38] Hutchins D A, Rueter J G, Fish W. Siderophore production and nitrogen fixation are mutually exclusive strategies in *Anabaena 7120* [J]. *Limnology and Oceanography*, 1991, 36: 121.
- [39] Velker C, WolGladrow D A. Physical limits on iron uptake mediated by siderophores or surface reductases [J]. *Marine Chemistry*, 1999, 65: 227-244.

(本文编辑: 张培新)