Investigation of different methods in siderophore measurement in indigenous Fluorescent Pseudomonads

Rouhallah Sharifi *
Assistant professor of Plant Pathology, Razi University, Kermanshah, Iran, r.sharifi@razi.ac.ir
Hamidreza Alizadeh
Assistant professor of Plant Pathology, University of Jiroft, Jiroft, Iran, h_alizadeh48@yahoo.com
Masoud Ahmadzade
Professor of Plant Pathology, University of Tehran, Karaj, Iran, ahmadz@ut.ac.ir
MirHassan Rasouli Sadaghiani
Associate professor Soil Science, Urmia University, Urmia, Iran, m.rsadaghiani@urmia.ac.ir

Abstract

Introduction: Fluorescent pseudomonads produced a variety of siderophores in which the pyoverdine type siderophore is the main one. These bacteria employ siderophores to increase availability of Iron for their own and plants consumption. Siderophores have a special role in the biological control activity of these bacteria against plant pathogens.

Materials and methods: Siderophore production was checked in 21 indigenous Pseudomonads strains, two reference strains and one *Bacillus* sp. strain by qualitative CAS-Agar, semi-quantitative CAS-AD and quantitative spectrophotometric methods.

Results: Colony growth in some of isolates such as UTPF93 has been inhibited in CAS-Agar method because of the detergent compound HDTMA. So, siderophore production was low in these strains. All strains produced siderophore by the CAS-AD method. The highest and the lowest siderophore production were recorded in UTPF76 and UTPF45 with 1.005 and 0.0026 mM of defroxamin equivalent, respectively. The Pyoverdine mutant strain MPFM1 and the *Bacillus* sp. strain also produce low amounts of siderophore in two recent methods. So, these methods are non-selective to the type of siderophore. In quantitative method only Pyoverdine type siderophore was detectable and the strains MPFM1 and *Bacillus* sp. did not produce this type of siderophore. The highest amount of pyoverdine was recorded in non-indigenous strain 7NSK2 with 625.29 mM/L followed by UTPF65, UTPF81 and UTPF87.

Discussion and conclusion: CAS-AD was the best method for total siderophore measurement and spectrophotometric was the accurate and efficient method for detection of pyoverdine type siderophore in fluorescent pseudomonads.

Key words: CAS-Agar, fluorescent pseudomonads, Pyoverdine, siderophore

* Corresponding author
Received: October 5, 2015/ **Accepted:** July 3, 2016

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۱، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۱۰۶- ۹۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۱۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۱۳

بررسی روش‌های مختلف ارزیابی تولید سیدروفور در سودوموناس‌های فلورسنت بومی ایران

روح الله شریفی *: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران، r.sharifi@razi.ac.ir
حمیدرضا علیزاده: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران، h_alizadeh48@yahoo.com
مسعود احمدزاده: استاد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران، کرج، ایران، ahmadz@ut.ac.ir
میرحسن رسولی صدقیانی: دانشیار خاکشناسی، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ایران، m.rsadaghiani@urmia.ac.ir

چکیده

مقدمه: سودوموناس‌های فلورسنت سیدروفورهای متعددی را تولید می‌کنند که مهم‌ترین آنها سیدروفور نوع پایووردین است. تولید سیدروفور در این باکتری‌ها باعث افزایش فراهمی آهن موردنیاز باکتری و گیاهان می‌شود و همچنین اهمیت ویژه‌ای در کنترل بیماری‌های گیاهی دارد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور مقایسهٔ روش‌های اندازه‌گیری تولید سیدروفور، میزان تولید سیدروفور ۲۱ سویهٔ سودوموناس بومی ایران به‌همراه دو سویهٔ مرجع خارجی و یک سویهٔ *باسیلوس* با روش کیفی CAS-Agar، روش نیمه‌کمّی CAS-AD و روش کمّی اسپکتروفتومتری با استفاده از سیدروفور خالص اندازه‌گیری شد.

نتایج: در روش CAS-Agar به‌علت وجود مادهٔ شویندهٔ HDTMA رشد سلولی تعدادی از سویه‌ها محدود و درنتیجه تولید سیدروفور آنها پایین بود. در روش CAS-AD همهٔ باکتری‌ها قادر به تولید سیدروفور بودند که بیشترین و کمترین مقدار تولید مربوط به *P. fluorescens* UTPF76 و *P. fluorescens* UTPF45 با تولید معادل ۱/۰۰۵ و ۰/۰۰۲۶ میلی‌گرم در لیتر دفروکسامین بود. در دو روش اخیر سویهٔ *باسیلوس* و موتانت پایووردین *P. aeruginosa* MPFM1 به‌میزان کمی تولید سیدروفور کردند که نشان‌دهندهٔ غیرانتخابی‌بودن این روش‌ها به نوع سیدروفور بود. در روش کمی فقط سیدروفور نوع پایووردین قابل‌اندازه‌گیری بود که سویه‌های *P. aeruginosa* MPFM1 و *Bacillus* sp. قادر به تولید آن نبودند. بیشترین میزان تولید پایووردین مربوط به سویهٔ خارجی 7NSK2 با ۶۲۵/۲۹ میکرومول بر لیتر بود و در پی آن سویه‌های *P. fluorescens* UTPF65، *P. fluorescens* UTPF81 و *P. fluorescens* UTPF87 در رتبهٔ بعدی قرار گرفتند.

بحث و نتیجه‌گیری: در مجموع روش CAS-AD بهترین روش برای بررسی میزان تولید سیدرفور کل و روش اسپکتروفتومتری نیز روشی دقیق و کارا برای تشخیص سیدروفور نوع پایووردین است که عمدتاً توسط سودوموناس‌های فلورسنت تولید می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سیدروفور، سودوموناس‌های فلورسنت، CAS-Agar، پایووردین

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

آهن چهارمین عنصر فراوان پوستهٔ زمین بعد از اکسیژن، سیلیسیم و آلومینیم با میزان ۵/۶ درصد است و تقریباً در هر نوع خاکی یافت می‌شود. این عنصر در pH بالای ۶/۵ برای رشد گیاهان بیشتر به‌صورت غیرقابل‌حل در بین لایه‌های مختلف کانی‌ها وجود دارد (۱). موجودات خاک برای فائق‌آمدن بر این مشکل سازوکارهای مختلفی را به کار می‌بندند که مهم‌ترین آنها تولید سیدروفورها است (۲).

تقریباً همهٔ میکروارگانیسم‌هایی که قابل‌کشت هستند به غیر از لاکتوباسیلوس‌ها قادر به تولید سیدروفور هستند (۳). تاکنون تقریباً ۵۰۰ ساختار سیدروفوری شناخته شده است؛ اگرچه به نظر می‌رسد که تعداد زیادی از اینها نتیجهٔ اختلافات واقعی ساختاری نباشند. براساس ساختار مولکولی و نوع باندها سیدروفورها به چهار گروه باکتریایی و سه گروه قارچی تقسیم‌بندی می‌شوند (۴). سیدروفورهای باکتری‌ها شامل موارد هستند: ۱. گروه فنول کاتکول‌ها از جمله انتروباکتین که بالاترین میل ترکیبی برای آهن را بین سیدروفورهای شناخته شده دارد؛ اما این ترکیب بسیار ناپایدار است و به‌سرعت در خاک هیدرولیز می‌شود. انتروباکتین توسط *E. coli* و همچنین *Enterobacte* spp. تولید می‌شود. اگروباکتین و پایوچلین هم از این گروه هستند. ۲. هیدروکسیمات‌ها از جمله ائروباکتین و فروکسامین‌ها؛ این سیدروفورها اغلب توسط اعضای خانواده انتروباکتریاسه[1] و اکتینومیست‌ها تولید می‌شوند که همه کلونیزه‌کننده‌های عمومی ریشهٔ گیاهان هستند. سیدروفور تولیدشده توسط قارچ‌ها به غیر از موارد معدودی از این نوع است، این نوع سیدروفور بیشترین غلظت را در خاک دارد؛ ولی ثابت پایداری (قدرت اتصال به آهن) آن نسبتاً پایین است؛ لذا می‌تواند نقش مهمی در افزایش رشد گیاه داشته باشد (۵). ۳. گروه ریزوباکتین‌ها (در بعضی منابع کربوکسیلات نامیده می‌شوند) که توسط اعضای جنس *ریزوبیوم*[2] تولید می‌شوند و به‌عنوان منبع مؤثری از آهن برای گیاهان عمل می‌کنند. ۴. گروه آخر از سیدروفورهای میکروبی پایووردین‌ها هستند که ساختار مرکب و پیچیده‌تری دارند. وجود این ترکیبات اولین بار در سال ۱۹۴۳ گزارش شد و در سال ۱۹۷۸ مایر و عبدالله[3] ساختار شیمیایی و خصوصیات فیزیولوژیکی آن را مشخص کردند (۶). این سیدروفورها به‌طور اختصاصی توسط اعضای جنس *سودوموناس* تولید می‌شوند و نقش مهمی در توان رقابتی سودوموناده‌های عامل کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی ایفا می‌کنند (۶ و ۷). گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که این سیدروفورها نقش مهمی در تأمین آهن موردنیاز گیاهان ایفا می‌کنند (۸). گفتنی است که سودوموناس‌های فلورسنت علاوه بر پایووردین سیدروفورهای دیگری از جمله پایوچلین، اسیدسالیسیلیک و کوئینولوباکتین را نیز تولید می‌کنند که کارایی آنها در جذب آهن بسیار پایین‌تر از پایووردین است (۳). تاکنون روش‌های متعددی برای بررسی میزان تولید سیدروفور ارائه شده است که پژوهشگران بسته به نیاز، از آنها استفاده می‌کنند. برای اولین بار شان و نیلند[4](۹) روش CAS[5]-Agar را برای بررسی میزان تولید سیدروفور ارائه دادند. نقطه ضعف این روش وجود مادهٔ دترجنت HDTMA[6] بود که مانع رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌شد. برای رفع این نقص روش CAS-AD[7] معرفی شد که میکروارگانیسم ابتدا در محیط اختصاصی خود رشد داده می‌شود و سپس مایع رویی حاوی سیدروفور به چاهک‌های محیط کشت CAS اضافه می‌شود. روش

اسپکتروفتومتری که مایر و عبدالله (۶) معرفی کردند، امکان تعیین دقیق مقدار سیدروفور نوع پایووردین را فراهم کرد اما سیدروفورهای دیگر تولیدشده توسط سودوموناس‌ها با این روش قابل‌اندازه‌گیری نبودند. در ایران برای اولین بار رسولی صدقیانی و همکاران (۱۰) به‌منظور غربال باکتری‌های محرک رشد گیاه، میزان تولید سیدروفور سودومونادهای فلورسنت ریزوسفری را با روش CAS-Agar بررسی کردند. هدف از این پژوهش بررسی میزان تولید سیدروفور سودوموناس‌های فلورسنت بومی خاک‌های ایران با روش‌های اندازه‌گیری متفاوت و مقایسهٔ این روش‌ها برای ارائهٔ بهترین روش برای هر شرایط است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری: ۲۲ سویهٔ باکتری از سویه‌های منتخب کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست قطب کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران که دارای قدرت بالایی در بیوکنترل عوامل بیمارگر مختلف بوده و همچنین قادر به بهبود صفات رشدی گیاه بودند انتخاب شدند. سویهٔ *P. aeruginosa* 7NSK2 جداشده از مزارع جو بلژیک (۱۱) به‌عنوان سویهٔ مرجع استفاده شد. وجود سه نوع سیدروفور پایووردین، پایوچلین و سالیسیلیک‌اسید در این سویه به اثبات رسیده است. سویهٔ *P. aeruginosa* MPFM1 موتانت پایووردین سویهٔ 7NSK2 و مقاوم به آنتی‌بیوتیک کانامایسین است. این سویه توانایی تولید سیدروفور نوع پایووردین را ندارد (۱۱).

نگهداری باکتری‌ها: باکتری‌ها روی محیط کشت کینگ‌بی داخل لوله آزمایش به‌صورت مورب کشت داده شدند و بعد از رشد کامل باکتری روی آن پارافین مایع دوبار سترون‌شده ریخته و در دمای منفی چهار درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

نگهداری به‌صورت یخ خشک نیز انجام شد. در این روش یک میلی‌لیتر محیط کشت شیرخشک بدون چربی (شیرخشک بدون چربی ۱۰۰ گرم، پپتون ۵ گرم، ساکاروز ۵ گرم در یک لیتر آب) درون لوله‌های آزمایشی با حجم چهار میلی‌لیتر ریخته و اتوکلاو شد. بعد از سردشدن در شرایط سترون یک لوپ باکتری به این لوله‌ها اضافه شد. بعد از هشت ساعت محیط درون لوله‌ها با استفاده از نیتروژن مایع منجمد شد. این لوله‌ها به‌مدت ۱۲ ساعت در دستگاه لیوفلیز قرار داده شدند تا به‌طور کامل آبگیری شوند. سپس با استفاده از شعلهٔ گاز اکسیژن سر لوله‌ها بسته و در دمای محیط نگهداری شدند (۱۲).

خالص‌سازی پیووردین: تهیه و خالص‌سازی پایووردین سویهٔ *P. fluorescens* UTPF59 با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی براساس روش مایر و عبدالله (۶)، با اندکی تغییر (۱۳) انجام شد.

برای بررسی میزان تولید سیدروفور در تیمارهای مختلف لازم بود منحنی استاندارد این متابولیت با استفاده از پایووردین خالص رسم شود. بدین منظور ۹۰ میلی گرم سیدروفور خالص در آب مقطر حل شد و حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. محلول حاصل از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد تا سترون شود. محلول فوق در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در تاریکی نگهداری شد. غلظت‌های مختلف این محلول در آب مقطر تهیه شد و میزان جذب آنها در طول موج ۴۰۰ نانومتر خوانده شد (دستگاه پی‌جی اینسترومنت[۸] مدل T70[+]). با استفاده از داده‌های به‌دست‌آمده، منحنی استاندارد در نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۷ رسم شد و معادله خط همبستگی نوشته شد. با استفاده از معادله خط و وزن ملکولی پایووردین

ضریب مولی پایووردین محاسبه شد (ε= ۷۳۰۰). براساس این ضریب مولی و فرمول زیر غلظت پایووردین اندازه‌گیری شد (۶).

A=εBC A = جذب در ۴۰۰ نانومتر ε= ضریب مولی B= قطر کووت C= غلظت پایووردین

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور در سویه‌ها

روش CAS-Agar: در این بررسی از روش الکساندر و زوبرر[۹] (۱۴) استفاده شد. محیط CAS-Agar از چهار محلول که هر کدام به‌صورت جداگانه‌ای سترون می‌شوند تهیه می‌شود.

محلول معرف Fe-CAS (محلول ۱): این محلول از اختلاط ۱۰ میلی‌لیتر $FeCl_3$-$6H_2O$ یک میلی‌مولار (در اسیدکلریدریک ۱۰ میلی مولار) با ۵۰ میلی‌لیتر محلول CAS (۱/۲۱ میلی گرم‌درلیتر) تهیه شد. محلول ارغوانی تیرهٔ حاصل به‌آرامی و همراه با تکان‌دادن پیوسته به ۴۰ میلی‌لیتر محلول HDTMA (۱/۸۲ میلی گرم‌درلیتر) اضافه شد. محلول حاصل که دارای رنگ آبی تیره بود اتوکلاو شد و در دمای محیط تا ۵۰ درجه سانتیگراد سرد شد. این محلول باید به‌صورت تازه تهیه شود.

محلول بافر (محلول ۲): محلول شماره دو با حل کردن ۳۰/۲۴ گرم بافر PIPES (piperazine-N,N′-bis(2-ethanesulfonic acid) در ۷۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی حاوی ۰/۳ گرم KH_2PO_4، ۰/۵ گرم NaCl و ۱/۰ گرم NH_4Cl تهیه گردید و pH آن با KOH ۵۰٪ به ۶/۸ رسانده شد. قبل از اتوکلاو، به محلول فوق ۱۵ گرم آگار اضافه شد و با افزودن آب مقطر حجم آن به ۸۰۰ میلی‌لیتر رسید. بعد از اتوکلاو تا ۵۰ درجه سانتیگراد سرد شد.

محلول غذایی (محلول ۳): حاوی دو گرم گلوکز، دو گرم مانیتول، ۴۹۳ میلی گرم $MgSO_4$. $7H_2O$، ۱۱ میلی گرم $CaCl_2$، ۱/۱۷ میلی گرم $MnSO_4.H_2O$، ۱/۴ میلی گرم H_3BO_3، ۰/۰۴ میلی گرم $CuSO_4.5H_2O$، ۱/۲ میلی گرم $ZnSO_4$. $7H_2O$ و ۱/۰ میلی گرم Na_2MoO_4. $2H_2O$ است. این محلول نیز به‌صورت جداگانه اتوکلاو و سرد شد.

محلول کازامینواسید (محلول ٤): مقدار سه گرم کازامینواسید به ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. این محلول با استفاده از دستگاه میلی‌پور از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد تا سترون گردد.

ابتدا محلول چهار و سپس محلول سه به محلول بافر اضافه شد. در آخر محلول معرف به‌آرامی و با هم‌زدن کافی اضافه شد و در تشتک‌های پتری نُه سانتیمتری توزیع شد. برای تلقیح این تشتک‌های پتری، پنج میکرولیتر سوسپانسیون، از کشت ۲۴ساعته باکتری‌ها به‌صورت قطره‌گذاری استفاده شد. از سویهٔ 7NSK2 به‌عنوان شاهد مثبت و از سویهٔ MPFM1، (موتانت پایووردین) به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. این تشتک‌های پتری در دمای ۲۷°C نگهداری شدند.

تولید سیدروفور باعث جداشدن آهن از CAS می‌شود که نتیجهٔ آن تولید یک هالهٔ نارنجی‌رنگ اطراف کلنی باکتری است. قطر این هاله در سه روز متوالی ثبت شد و میانگین سه روز نیز محاسبه گردید.

روش CAS-AD: محیط CAS agar به‌دلیل داشتن مادهٔ دترجنت کاتیونی HDTMA که برای جلوگیری از رسوب کمپلکس Fe-CAS اضافه می‌شود، مانع رشد بسیاری از باکتری‌های ریزوسفری است. طبق گزارش الکساندر و زوبرر (۱۴)، ۷۹-۷۰درصد باکتری‌های ریزوسفری که روی محیط کشت غیرانتخابی TSA[۱۰] رشد کرده بودند، قادر به رشد روی محیط CAS-Agar نبودند.

ترکیبات محیط CAS-Agar برای این آزمایش مشابه آزمایش قبل است. به غیر اینکه تمام مواد غذایی (محلول ۳ و۴) حذف شدند. بعد از ریختن محیط درون تشتک پتری، با استفاده از چوب‌پنبه‌سوراخ‌کن پنج میلی‌متری، چاهک‌هایی در تشتک‌های پتری CAS-Agar ایجاد شد. این تشتک‌های پتری تا زمان استفاده درون نایلون های پلاستیکی و در یخچال نگهداری شدند (۱۵).

باکتری‌ها به‌مدت ۴۰ ساعت، در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد روی محیط کشت سوکسینات (۶ گرم‌برلیتر K_2HPO_4، ۳ گرم‌برلیتر KH_2PO_4، ۰/۲ گرم‌برلیتر H_2O۷ $MgSO_4$، یک گرم‌برلیتر NH_4SO_4 و ۴گرم‌برلیتر سوکسینیک‌اسید که با استفاده از KOH ۵۰٪ به pH ۷ رسانده شد) رشد داده شدند و سپس سوسپاسیون باکتری در ۱۰۰۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی جدا شد. به‌میزان ۳۵ میکرولیتر از مایع رویی هر سویه درون چاهک‌ها ریخته شد. بعد از جذب آن مقدار مساوی دیگر از همان مایع رویی دوباره به چاهک‌ها اضافه شد. تشتک‌های پتری به‌مدت ۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و قطر هالهٔ نارنجی اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری شد. از سری رقت‌های محلول ۲/۵ میلی‌گرم‌درلیتر سیدروفور تجاری دسفرال® برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و درنهایت میزان تولید سیدروفور به‌صورت معادل دسفرال اندازه‌گیری شد.

روش اسپکتروفتومتری: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ساعتهٔ باکتری‌ها در محیط سوکسینات به فلاسک‌های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط سوکسینات منتقل شد. این سوسپانسیون‌های باکتری به‌مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد و ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژکردن در ۱۰۰۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف سلول‌ها میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از مایع رویی به‌دست‌آمده از موتانت پایووردین (MPFM1) به‌عنوان شاهد استفاده شد. داده‌های حاصل با استفاده از منحنی استاندارد به‌دست‌آمده از پایووردین خالص به مول‌برلیتر تبدیل شدند. بدین منظور از پایوورین خالص‌سازی‌شدهٔ سویهٔ UTPF5 استفاده شد. تمام لوازم شیشه‌ای استفاده‌شده در این روش با اسیدهیدروکلریدریک ۰/۱ نرمال اسیدشویی شدند تا آلودگی‌های آهن زدوده شود (۹).

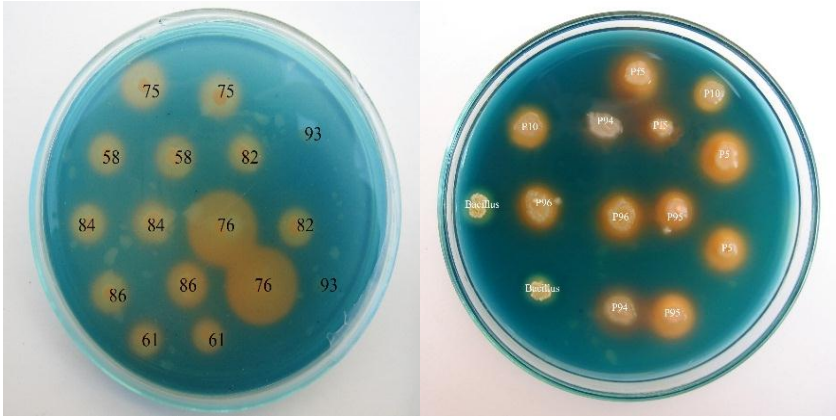
محاسبات آماری: تجزیهٔ واریانس و مقایسهٔ میانگین صفات به روش حداقل تفاوت معنی دار[11] ($P<0/05$) و با استفاده از روش مدل خطی[12] SAS، انجام گرفت. نرمال‌بودن پراکنش داده‌ها قبل از آنالیز آماری با نرم‌افزار SAS آزمایش شد (۱۷).

نتایج

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور در سویه‌ها

۱- **روش CAS-Agar:** معرف CAS، هنگامی که آهن به آن متصل است به‌رنگ آبی دید می‌شود و در صورتی که آهن آن جدا شود نارنجی‌رنگ می‌شود. چون اتصال CAS-Fe قوی نیست، هر عاملی که بتواند با گرفتن آهن این پیوند را بشکند باعث بروز رنگ نارنجی می‌شود، قطر هالهٔ تغییر رنگ داده‌شده برآوردی تقریبی از مقدار آن ماده است (شکل ۱). قابل توجه است که این محیط در مقابل هر ماده‌ای که خاصیت سیدروفوری داشته باشد جواب می‌دهد؛ بنابراین قطر هاله نمایانگر مجموع سیدروفورهای آن سویه است. از بین سویه‌های موردآزمایش سویهٔ UTPF76 با هاله‌ای به‌قطر ۲۰/۴ میلی‌متر بیشترین تولید سیدروفور را داشت و به دنبال آن

سویه‌های 7NSK2، UTPF45 و UTPF68 قرار گرفتند که قطر هالهٔ تولیدشده توسط آنها به‌ترتیب ۱۳، ۱۲/۹۲ و ۱۱ میلی‌متر بود. در جدول ۱ قطر هالهٔ تولیدشده توسط سویه‌های مختلف در سه روز متوالی و همراه با میانگین سه روز آورده شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود سویهٔ MPFM1 که موتانت پایووردین است نیز هاله داده است؛ اما قطر این هاله در مقایسه با سویهٔ وحشی (7NSK2) خیلی کمتر است. همان‌طور که در قسمت خصوصیات سویه‌ها گفته شد، در این سویه علاوه بر پایووردین که سیدروفور اصلی است دست کم دو سیدروفور دیگر به‌اسم پایوچلین و سالیسیلیک‌اسید نیز تولید می‌شوند که می‌توانند باعث ایجاد هاله شوند. باکتری *باسیلوس* مورداستفاده نیز قادر به تولید هاله‌ای ضعیف بود که رنگ هالهٔ آن نیز با مابقی هاله‌ها متفاوت بود. سویهٔ UTPF93 در محیط CAS-آگار رشد ضعیفی داشت و فاقد توان تولید سیدروفور بود.



شکل ۱- تولید سیدروفور سویه‌ها در روش CAS-آگار. هالهٔ نارنجی‌رنگ اطراف کلنی باکتری‌ها نشان‌دهندهٔ میزان تولید سیدروفور کل آنها است. سویهٔ 7NSK2 با عدد ۹۵ و موتانت پایووردین آن (MPFM1) با عدد ۹۴ نشان داده شده است.

۲- روش CAS Agar Diffusion: بسیاری از باکتری‌های ریزوسفری به‌علت وجود مواد دترجنت HDTMA در محیط CAS-Agar فاقد توانایی رشد روی این محیط هستند؛ درنتیجه میزان تولید سیدروفور آنها به این روش قابل‌اندازه‌گیری نیست؛ بنابراین برای رفع این مشکل، این روش چند بار اصلاح شده است. شین و همکاران[۱۳] (۱۵) آزمونی را طراحی کردند که به جای کشت مستقیم باکتری روی محیط CAS از مایع رویی تولیدشده در محیط‌های اختصاصی آن گونه استفاده می‌شد. این آزمون در قسمت مواد و روش‌ها شرح داده شده است. نتایج به‌دست‌آمده از این روش دربارهٔ بسیاری از سویه‌ها با روش قبلی متفاوت بود. سویهٔ UTPF76 با تولیدی معادل ۱/۰۰۵ میلی‌گرم‌درلیتر دسفرال بیشترین میزان تولید را به خود اختصاص داد. سویه‌های UTPF92، UTPF87 و UTPF61 در گروه دوم قرار گرفتند؛ در صورتی که مقدار تولید آنها در روش قبلی پایین‌تر از میانگین بود (جدول ۱). سویه‌های UTPF75 و UTPF86 که طبق روش قبلی تولید بالایی داشتند در این روش در گروه آخر آماری قرار گرفتند. باکتری UTPF93 که قادر به رشد مطلوبی روی محیط CAS-Agar نبود و لذا سیدروفوری تولید نکرد در این روش تغییریافته، هالهٔ مشهودی تولید کرد و میزان تولید آن برابر ۰/۳۴۰ میلی‌گرم‌درلیتر دسفرال بود. تولید در موتانت MPFM1 و باکتری *باسیلوس* خیلی ناچیز بود که مربوط به متابولیت‌های غیر از پایووردین است.

جدول ۱- بررسی میزان تولید سیدروفور سویه‌های باکتری به‌روش‌های کمّی اسپکتروفتومتری، نیمه‌کمّی CAS-AD و کیفی CAS-Agar

			روش اسپکتروفتومتری	روش CAS-AD	روش CAS-Agar
سویه باکتری	محل نمونه‌برداری	میزبان	میکرومول پیووردین	معادل دفروکسامین میلی‌گرم در لیتر	قطر هاله میلی‌متر
UTPF5	کرج	ترپچه	۴۸۷/۰۵c	۰/۴۴۲ fg	۱۰/۱۵ d
UTPF10	کرج	گندم	۴۴۸/۸۲ c	۰/۳۳۸ gh	۱۰/۸۸ c
UTPF45	خمین	لوبیا	۲۸۰/۱۱ g	j۰/۰۲۶	b۱۳
UTPF54	خمین	لوبیا	۱۹۹/۳۱ hi	fg۰/۴۵۵	jk۸
UTPF59	قره تپه	پیاز	۹۵/۸۸ k	۰/۲۳۷ hi	۹/۲۶ h
UTPF61	الموت	برنج	۴۹۸/۸۲ c	۰/۶۴۷ bcd	۸/۴۸ j
UTPF68	ساری	ترپچه	۲۳۰/۰۶ h	ef۰/۴۸	bc۱۱
UTPF75	الموت	برنج	۶۹/۴۱ kl	۰/۴۴۰ fg	۱۰/۲۳ d
UTPF76	الموت	برنج	۲۳۴/۱۱ h	۱/۰۰۵ a	۲۰/۴ a
UTPF81	قسین رود	برنج	۵۹۰ b	۰/۴۴۲ fg	۱۰/۲۰ d
UTPF82	الموت	برنج	۳۵۱/۷۶ e	۰/۵۹۵ cde	۱۰/۱۸ d
UTPF83	الموت	برنج	۱۴۸/۸۲ ij	۰/۳۳۸ gh	۹/۳۸ g
UTPF84	کرج	گندم	۳۲۸/۲۳ ef	۰/۳۶۵ g	۹/۵۸ f
UTPF85	گازرخان	برنج	۲۸۱/۱۷ g	۰/۵۴۴ def	۹/۹۴ e
UTPF86	شموک	برنج	۱۶۹/۴۱ i	۰/۳۴۱ gh	۱۰/۱۵ d
UTPF87	رازمیان	برنج	۵۷۸/۲۳ b	۰/۶۹۸ bc	۹/۹۸ e
UTPF88	رازمیان	برنج	۲۴۰ h	۰/۴۹۳ ef	۶/۰۸ m
UTPF90	شموک	برنج	۱۲۵/۲۹ j	۰/۳۲۹ gh	۷/۷۳ k
UTPF92	الموت	برنج	۶۰/۵۸ l	۰/۷۴۹ b	۹/۴۸ fg
UTPF93	الموت	برنج	۱۴۰ j	۰/۳۴۰ gh	۰/۰ o
UTPF96	کرج	گندم	۳۱۳/۵۲ f	۰/۴۳۹ fg	۸/۷۲ i
7NSK2	بلژیک	جو	۶۲۵/۲۹ a	۰/۴۹۳ ef	۱۲/۹۲ b
MPFM1	بلژیک	جو	۰/۰ m	۰/۱۳۵ ij	۶/۲۸ l
Bacillus sp.	کرج	گندم	۰/۰ m	۰/۰۵۰ j	۳/۸۲ n

۳- روش اسپکتروفتومتری: در این روش به‌صورت اختصاصی، مقدار تولید سیدروفور نوع پایووردین قابل ارزیابی است. نتایج به‌دست‌آمده از میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد پایووردین خالص به میکرومول‌برلیتر تبدیل شد. از بین سویه‌های موردآزمایش سویهٔ 7NSK2 با تولید ۶۲۵/۲۹ مول‌برلیتر پایووردین بیشترین مقدار تولید را داشت و ازلحاظ آماری با سایر سویه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد. به دنبال آن UTPF81، UTPF87 و UTPF61به‌ترتیب با تولید ۵۹۰، ۵۷۸/۲۳ و ۴۹۸/۸۲ میکرومول‌درلیتر در گروه بعدی قرار گرفتند. همان‌طور که انتظار می‌رفت موتانت MPFM1 فاقد توانایی تولید

پایووردین بود. سویهٔ *باسیلوس* مورداستفاده در این آزمایش نیز در ۴۰۰ نانومتر پیک جذبی نداشت. سویهٔ UTPF93 که در روش CAS-Agar سیدروفور تولید نکرده بود، قادر به تولید سیدروفور نوع پایووردین بود و توانست به‌میزان ۱۴۰ میکرومول‌برلیتر پایووردین تولید کند.

سویهٔ UTPF76 که در روش‌های قبل بیشترین تولید سیدروفور را داشت، در این روش جزء باکتری‌های برتر قرار نگرفت. همان‌طور که قبلاً گفته شد، روش اسپکتروفتومتری به‌صورت اختصاصی فقط قادر به تعیین کمیت سیدروفور نوع پایووردین است؛ چرا که سیدروفورهای مختلف طول موج‌های متفاوتی دارند؛ بنابراین می‌توان چنین فرض کرد که سویهٔ ذکرشده علاوه بر پایووردین قادر است سیدروفورهای دیگری را در حجم بالا تولید کند که عامل گسترش هالهٔ نارنجی در محیط CAS- آگار هستند.

درنتیجه از روی اختلافات موجود بین داده‌های روش‌های CAS-Agar و روش اسپکتروفتومتری می‌توان به تولید و مقدار تولید سیدروفورهای غیر از پایووردین در سویه‌های سودوموناس فلورسنس پی برد.

بحث و نتیجه‌گیری

روش قدیمی تشخیص میکروارگانیسم‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور که شاون و نیلند (۹) معرفی کرده بودند به‌علت وجود مادهٔ HDTMA مانع رشد باکتری‌های گرم‌مثبت و قارچ‌ها می‌شد (۱۷). روش تغییریافتهٔ میلارگس[۱۴] و همکاران (۱۸) که در آن نصف تشتک‌های پتری را محیط کشت و نصف دیگر را محیط CAS می‌ریختند مشکل بازداری از رشد روش قبلی را حل می‌کرد؛ اما این روش بسیار کاربر بود و کند جواب می‌داد؛ علاوه بر این، با این روش فقط یک نوع میکروارگانیسم قابل بررسی بود. از بین روش‌های دیگری که ارائه شد (۱۵، ۱۹ و ۲۰) روش CAS-AD بهتر از سایر روش‌ها توانست مشکلات موجود را حل کند. در روش CAS-AD باکتری‌ها در محیط اختصاصی خود رشد می‌کنند و فقط از عصارهٔ خارج سلولی آنها برای اندازه‌گیری سیدروفور استفاده می‌شود (۱۵). در این روش میزان تولید سیدروفور تمام میکروارگانیسم‌های قابل‌کشت قابل‌اندازه‌گیری است. همچنین به‌صورت هم‌زمان می‌توان میزان تولید سیدروفور میکروارگانیسم‌های متفاوت را با هم مقایسه کرد. داده‌های به‌دست‌آمده از این روش با استفاده از سیدروفور تجاری دسفرال قابل‌کمّی‌سازی است.

تفاوت معنی‌دار بین تولید سیدروفور سویه‌ها در دو روش CAS-Agar و CAS-AD نشان می‌دهد که اگرچه اغلب سویه‌ها قادر به رشد روی محیط CAS بودند ولی این بهینه رشدی آنها نیست؛ به عبارت دیگر، میزان رشد و تولید سیدروفور هریک از سویه‌ها مقداری تحت تأثیر مواد دترجنت محیط قرار می‌گیرد. درمجموع می‌توان گفت که روش CAS-Agar معمولی روشی مناسب برای بررسی میزان تولید سیدروفور میکروارگانیسم‌ها نیست و بهتر است از روش‌های جایگزین اصلاح‌شده استفاده شود. به هرحال، تهیهٔ محیط CAS کاری زمان‌بر و حساس است و با کوچک‌ترین خطا در تنظیم pH محیط، رنگ آن عوض شده و غیرقابل‌استفاده می‌شود (۱۵)؛ بنابراین بهتر است روش‌های جایگزین ارائه شوند. ازآنجاکه پایووردین مهم‌ترین سیدروفور سودوموناس‌های فلورسنت است که در مقایسه با سایر انواع از میزان تولید و قدرت باندشدن با آهن بالاتری برخوردار است (۲۱)،

اندازه‌گیری دقیق آن به‌صورت مجزا می‌تواند در مشخص کردن توان سویهٔ باکتری در فراهم‌کردن آهن موردنیاز گیاه و کنترل رقابتی بیمارگرها استفاده شود. خاصیت فلورسنت سیدروفور در طول موج ۴۰۰ نانومتر امکان ارزیابی کمّی آن با روش اسپکتروفتومتری را فراهم کرده است (۲۲)؛ علاوه بر این، اختلاف بین داده‌های به‌دست‌آمده از روش اسپکتروفتومتری با روش CAS-AD به‌شرط یکسان‌بودن شرایط کشت می‌تواند نشان‌دهندهٔ میزان تولید سیدروفورهای غیر از پایووردین توسط سویهٔ باکتری باشد. همان‌طور که برای سویهٔ UTPF76 شرح داده شد، درمورد سویهٔ 7NSK2 نیز مشخص است که میزان تولید سیدروفورهای به غیر از پایووردین بسیار پایین است؛ چرا که در روش اسپکتروفتومتری که فقط سیدروفور نوع پایووردین را نشان می‌دهد در رتبهٔ اول قرار گرفته؛ اما در روش CAS-AD که تولید همهٔ سیدروفورها را اندازه‌گیری می‌کند در گروه با تولید متوسط قرار می‌گیرد. میزان تولید سیدروفورهای غیر از پایووردین توسط سویهٔ MPFM1 نیز گواه این مطلب است. درمجموع می‌توان روش CAS-AD را به‌عنوان بهترین روش برای اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور کل سویه‌ها و روش اسپکتروفتومتری را به‌عنوان روش مناسب برای اندازه‌گیری تولید سیدروفور نوع پایووردین ارائه داد.

References

(1) Lindsay WL. *Chemical equilibria in soils*. New York: Wiley; 1979.

(2) Salamian N., Ebrahimipour G., Ghasemi M., Fakhari J. Isolation and characterization of a Facultative chemolithotrophic sulfur and iron oxidizing bacterium from Ardabil acidic springs. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (1):1-10.

(3) Budzikiewicz H. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Review* 1993; 104 (3, 4): 209–228.

(4) Crowley D. Microbial Siderophores in the Plant Rhizosphere. In: Barton LL., Abadía J., Editor. *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Netherlands: Springer; 2006: 169–198.

(5) Fernandez V., Ebert G., Winkelmann G. The use of microbial siderophores for foliar iron application studies. *Plant and Soil* 2005; 272 (1, 2): 245–252.

(6) Meyer JM., Abdallah MA. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physico-chemical properties. *Journal of General Microbiology* 1978; 107 (2): 319–328.

(7) Sharifi R., Ahmadzade M., Sharifi-Tehrani A., Fallahzade V. Competition for iron uptake by fluorescent pseudomonads to control *Rhizoctonia solani* Kühn, a causing agent of bean damping-off disease. *Journal of Plant Protection* 2009; 22 (2): 183-196.

(8) Vansuyt G., Robin A., Briat JF., Curie C., Lemanceau P. Iron Acquisition from Fe-Pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 2007; 20 (4): 441–447.

(9) Schwyn B., Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 1987; 160 (1): 46–56.

(10) Rasouli-Sadaghiani MH., Khavazi K., Rahimian H., Malakouti MJ., Asadi-rahmani H. An evaluation of potential of indigenous fluorescent Pseudomonads of wheat rhizosphere for producing siderophore. *Soil and water Journal* 2006; 20: 133-143.

(11) Hofte M., Seong KY., Jurkevitch E., Verstraete W. Pyoverdin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK2: Ecological significance in soil. *Plant and Soil* 1991; 130 (1, 2): 249-257.

(12) Kim DS., Cook RJ., Weller DM. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 1997; 87(5): 551-558.

(13) Sharifi R., Ahmadzadeh M., Sharifi-Tehrani A., Talebi-Jahromi K. Pyoverdine production in *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 and its association with suppression of common bean damping off caused by *Rhizoctonia solani* (Kühn). *Journal of Plant Protection Research* 2010; 50(1): 72-78.

(14) Alexander DB., Zuberer DA. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 1991; 12(1): 39-45.

(15) Shin SH., Lim Y., Lee SE., Yang NW., Rhee JH. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *Journal of Microbiological Methods* 2001; 44(1): 89–95.

(16) Kamaly A., Ahmadzadeh M., Sadeghi A., Karimi E. Effect of exogenous ectoines on some antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 under salt conditions. *Biological Journal of Microorganism* 2016; 17:1-10.

(17) Perez-Miranda S., Cabirol N., George-Téllez R., Zamudio-Rivera LS., Fernández FJ. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods* 2007; 70(1): 127–131.

(18) Milagres AM., Machuca A., Napoleao D. Detection of siderophores production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* 1999; 37(1): 1–6.

(19) Ames-Gottfred NP., Christie BR., Jordan DC. Use of the chrome azurol S agar plate technique to differentiate strains and field isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Applied Environmental Microbiology* 1989; 55: 707–710.

(20) Machuca A., Milagres AMF. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology* 2003; 36(3): 177–181.

(21) Cornelis P., Matthijs S. *Pseudomonas* siderophores and their biological significance. In: Varma A., Chincholkar S., Editors. *Microbial Siderophores*. Berlin: Springer-Verlag; 2006: 230-254.

(22) Castaneda GC., Munoz TJJ., Videa JRP. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent Pseudomonas in the presence of copper and iron. *Microchemical Journal* 2005; 81(1): 35– 40.

---

[1]- Enterobacteriaceae
[2]- *Rhizobium*
[3]- Meyer and Abdallah
[4]- Schwyn and Neilands
[5]- Chrome Azurol S
[6]- Hexadecyltrimethylammonium bromide
[7]- CAS agar diffusion
[8]- PG-Instrument
[9]- Alexander and Zuberer
[10]- Tryptic soy agar
[11]- Least significant difference
[12]- General linear model (SAS 9.1, SAS institute, Cary, NC)
[13]- Shin
[14]- Milagres