

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 ۹۷-۱۰۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۱۳

بررسی روش‌های مختلف ارزیابی تولید سیدروفور در سودوموناس‌های فلورسنت بومی ایران

روح‌اله 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 پایوردین 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: به منظور مقایسه روش‌های اندازه‌گیری تولید سیدروفور، میزان تولید سیدروفور ۲۱ سویه سودوموناس بومی ایران به همراه دو سویه مرجع خارجی و یک سویه باسیلوس با روش کیفی CAS-Agar، روش نیمه کمی CAS-AD و روش کمی اسپکتروفتومتری با استفاده از سیدروفور خالص اندازه‌گیری شد.

نتایج: در روش CAS-Agar به علت وجود ماده شوینده HDTMA رشد سلولی تعدادی از سویه‌ها محدود و در نتیجه تولید سیدروفور آنها پایین بود. در روش CAS-AD همه باکتری‌ها قادر به تولید سیدروفور بودند که بیشترین 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 سویه باسیلوس و موتانت پایوردین *P. aeruginosa* MPFM1 به میزان کمی تولید سیدروفور کردند که نشان‌دهنده غیرانتخابی بودن این روش‌ها به نوع سیدروفور بود. در روش کمی فقط سیدروفور نوع پایوردین قابل اندازه‌گیری بود که سویه‌های *P. aeruginosa* MPFM1 و *Bacillus* sp. قادر به تولید آن نبودند. بیشترین میزان تولید پایوردین مربوط به سویه 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 رتبه بعدی قرار گرفتند.

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

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

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

آهن چهارمین عنصر فراوان پوسته 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 به صورت غیر قابل حل در بین لایه‌های مختلف کانی‌ها وجود دارد (۱). موجودات خاک برای فائق آمدن بر این مشکل سازوکارهای مختلفی را به کار می‌بندند که مهم‌ترین آنها تولید سیدروفورها است (۲).

تقریباً همه میکروارگانیسم‌هایی که قابل کشت 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 نتیجه 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 به سرعت در خاک هیدرولیز می‌شود. انتروباکتین توسط *E. coli* و همچنین *Enterobacte spp.* تولید می‌شود. اگر باکترین و پایوچلین هم از این گروه هستند. ۲. هیدروکسیمات‌ها از جمله ائروباکتین و فروکسامین‌ها؛ این سیدروفورها اغلب توسط اعضای خانواده انتروباکتریاسه^۱ و اکتینومیست‌ها تولید می‌شوند که همه کلونیزه‌کننده‌های عمومی ریشه گیاهان هستند. سیدروفور تولید شده 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^۲ تولید می‌شوند و به عنوان 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^۳ ساختار شیمیایی و خصوصیات فیزیولوژیکی آن را مشخص کردند (۶). این سیدروفورها به طور اختصاصی توسط اعضای جنس *Sodomonas* تولید می‌شوند و نقش مهمی در توان رقابتی *Sodomonas*‌ها می‌شوند و عامل کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی ایفا می‌کنند (۶ و ۷). گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که این سیدروفورها نقش مهمی در تأمین آهن مورد نیاز گیاهان ایفا می‌کنند (۸). گفتنی است که *Sodomonas*‌های 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^۴ (۹) روش *CAS*^۵ را برای بررسی میزان تولید سیدروفور ارائه دادند. نقطه ضعف این روش وجود ماده دترجنت *HDTMA*^۶ بود که مانع رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌شد. برای رفع این نقص روش *CAS-AD*^۷ 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

درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

نگهداری به صورت یخ خشک نیز انجام شد. در این روش یک میلی‌لیتر محیط کشت شیرخشک بدون چربی (شیرخشک بدون چربی ۱۰۰ گرم، پیتون ۵ گرم، ساکاروز ۵ گرم در یک لیتر آب) درون لوله‌های آزمایشی با حجم چهار میلی‌لیتر ریخته و اتوکلاو شد. بعد از سرد شدن 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 به مدت ۱۲ ساعت در دستگاه لیوفلیز قرار داده شدند تا به طور کامل آبگیری شوند. سپس با استفاده از شعله‌ گاز اکسیژن سر لوله‌ها بسته و در دمای محیط نگهداری شدند (۱۲).

خالص‌سازی پیووردین: تهیه و خالص‌سازی

پیووردین سویه *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 پیووردین خالص رسم شود. بدین منظور ۹۰ میلی‌گرم 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^۱ مدل T70⁺). با استفاده از داده‌های به دست آمده، منحنی استاندارد در نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۷ رسم شد و معادله خط همبستگی نوشته شد. با استفاده از معادله خط و وزن ملکولی پیووردین

اسپکتروفوتومتری که مایر و عبدالله (۶) معرفی کردند، امکان تعیین دقیق مقدار سیدروفور نوع پایووردین را فراهم کرد اما سیدروفورهای دیگر تولید شده توسط سودوموناس‌ها با این روش قابل اندازه‌گیری نبودند. در ایران برای اولین بار رسولی صدقیانی و همکاران (۱۰) به منظور 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 مقایسه این روش‌ها برای ارائه بهترین روش برای هر شرایط است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری: ۲۲ سویه باکتری از سویه‌های منتخب کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست قطب کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران که دارای قدرت بالایی در بیوکنترول عوامل بیمارگر مختلف بوده و همچنین قادر به بهبود صفات رشدی گیاه بودند انتخاب شدند. سویه *P. aeruginosa* 7NSK2 جدا شده از مزارع جو بلژیکی (۱۱) به عنوان سویه مرجع استفاده شد. وجود سه نوع سیدروفور پایووردین، پایوچلین و سالیسیلیک‌اسید در این سویه به اثبات رسیده است. سویه *P. aeruginosa* MPFM1 موتانت پایووردین سویه 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 به صورت مورب کشت داده شدند و بعد از رشد کامل باکتری روی آن پارافین مایع دوبار سترون شده ریخته و در دمای منفی چهار

میلی گرم CaCl_2 ، $1/17$ میلی گرم $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، $1/4$ میلی گرم H_3BO_3 ، $0/04$ میلی گرم $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، $1/2$ میلی گرم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و $1/0$ میلی گرم Na_2MoO_4 . این محلول نیز به صورت جداگانه اتوکلاو و سرد شد.

محلول کازامینوآسید (محلول ۴): مقدار سه گرم کازامینوآسید به 30 میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. این محلول با استفاده از دستگاه میلی پور از فیلتر $0/2$ میکرون عبور داده شد تا سترون گردد.

ابتدا محلول چهار و سپس محلول سه به محلول بافر اضافه شد. در آخر محلول معرف به آرامی و با هم زدن کافی اضافه شد و در تشتک‌های پتری نه سانتیمتری توزیع شد. برای تلقیح این تشتک‌های پتری، پنج میکرولیتر سوسپانسیون، از کشت 24 ساعته باکتری‌ها به صورت قطره گذاری استفاده شد. از سویه **7NSK2** به عنوان شاهد مثبت و از سویه **MPFM1**، (موتانت پایووردین) به عنوان شاهد منفی استفاده شد. این تشتک‌های پتری در دمای 27°C نگهداری شدند.

تولید سیدروفور باعث جدا شدن آهن از CAS می‌شود که نتیجه آن تولید یک هاله نارنجی رنگ 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 به دلیل داشتن مادهٔ درجنت 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)، $79-70\%$ درصد باکتری‌های ریزوسفری که روی محیط کشت غیرانتخابی TSA^۱ رشد کرده بودند، قادر به رشد روی محیط CAS-Agar نبودند.

ضریب مولی پایووردین محاسبه شد ($\epsilon = 7300$). براساس این ضریب مولی و فرمول زیر غلظت پایووردین اندازه گیری شد (۶).

$A = \epsilon BC$ = جذب در 400 نانومتر = ضریب مولی
 B = قطر کووت = غلظت پایووردین

اندازه گیری 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 به صورت جداگانه‌ای سترون می‌شوند تهیه می‌شود.

محلول معرف Fe-CAS (محلول ۱): این محلول از اختلاط 10 میلی لیتر $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ یک میلی مولار (در اسید کلریدریک 10 میلی مولار) با 50 میلی لیتر محلول CAS ($1/21$ میلی گرم در لیتر) تهیه شد. محلول ارغوانی تیره حاصل به آرامی و همراه با تکان دادن پیوسته به 40 میلی لیتر محلول HDTMA ($1/82$ میلی گرم در لیتر) اضافه شد. محلول حاصل که دارای رنگ آبی تیره بود اتوکلاو شد و در دمای محیط تا 50 درجه سانتیگراد سرد شد. این محلول باید به صورت تازه تهیه شود.

محلول بافر (محلول ۲): محلول شماره دو با حل کردن $30/24$ گرم بافر piperazine-N,N'-PIPES ($\text{bis}(2\text{-ethanesulfonic acid}$ در 750 میلی لیتر محلول نمکی حاوی $0/3$ گرم KH_2PO_4 ، $0/5$ گرم NaCl و $1/0$ گرم NH_4Cl تهیه گردید و pH آن با 50% KOH به $6/8$ رسانده شد. قبل از اتوکلاو، به محلول فوق 15 گرم آگار اضافه شد و با افزودن آب مقطر حجم آن به 800 میلی لیتر رسید. بعد از اتوکلاو تا 50 درجه سانتیگراد سرد شد.

محلول غذایی (محلول ۳): حاوی دو گرم گلوکز، دو گرم مانیتول، 493 میلی گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 11

سانتریفیوژ کردن در ۱۰۰۰۰g به مدت 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 به دست آمده از موتانت پایووردین (MPFM1) به عنوان شاهد استفاده شد. داده‌های حاصل با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده از پایووردین خالص به مول برلیتر تبدیل شدند. بدین منظور از پایوورین خالص سازی شده سوئیۀ UTPF5 استفاده شد. تمام لوازم شیشه‌ای استفاده شده در این روش با اسید هیدروکلریدریک ۰/۱ نرمال اسیدشویی شدند تا آلودگی‌های آهن زدوده شود (۹).

محاسبات آماری: تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش حداقل تفاوت معنی دار^{۱۱} ($P > 0.05$) و با استفاده از روش مدل خطی^{۱۲} SAS، انجام گرفت. نرمال بودن پراکنش داده‌ها قبل از آنالیز آماری با نرم افزار SAS آزمایش شد (۱۷).

نتایج

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور در سوبه‌ها

۱- روش CAS-Agar: معرف CAS، هنگامی که آهن به آن متصل است به رنگ آبی دید می‌شود و در صورتی که آهن آن جدا شود نارنجی رنگ می‌شود. چون اتصال CAS-Fe قوی نیست، هر عاملی که بتواند با گرفتن آهن این پیوند را بشکند باعث بروز رنگ نارنجی می‌شود، قطر هاله تغییر رنگ داده شده 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 سوبه است. از بین سوبه‌های مورد آزمایش سوئیۀ UTPF76 با هاله‌ای به قطر ۲۰/۴ میلی‌متر بیشترین تولید سیدروفور را داشت و به دنبال آن

ترکیبات محیط CAS-Agar برای این آزمایش مشابه آزمایش قبل است. به غیر اینکه تمام مواد غذایی (محلول ۳ و ۴) حذف شدند. بعد از ریختن محیط درون تشتک پتری، با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ کن پنج میلی‌متری، چاهک‌هایی در تشتک‌های پتری CAS-Agar ایجاد شد. این تشتک‌های پتری تا زمان استفاده درون نایلون‌های پلاستیکی و در یخچال نگهداری شدند (۱۵).

باکتری‌ها به مدت ۴۰ ساعت، در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد روی محیط کشت سوکسینات (۶ گرم برلیتر K_2HPO_4 ۳ گرم برلیتر KH_2PO_4 ، ۰/۲ گرم برلیتر H_2O ، $MgSO_4$ یک گرم برلیتر NH_4SO_4 و ۴ گرم برلیتر سوکسینیک اسید که با استفاده از KOH ۵۰٪ به pH ۷ رسانده شد) رشد داده شدند و سپس سوسپانسیون باکتری در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی جدا شد. به میزان ۳۵ میکرولیتر از مایع رویی هر سوبه درون چاهک‌ها ریخته شد. بعد از جذب آن مقدار مساوی دیگر از همان مایع رویی دوباره به چاهک‌ها اضافه شد. تشتک‌های پتری به مدت ۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و قطر هاله نارنجی اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری شد. از سری رقت‌های محلول ۲/۵ میلی گرم درلیتر سیدروفور تجاری دسفرال[®] برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و در نهایت میزان تولید سیدروفور به صورت معادل دسفرال اندازه‌گیری شد.

روش اسپکتروفتومتری: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از

کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط سوکسینات به فلاسک‌های حاوی ۴۰ میلی لیتر محیط سوکسینات منتقل شد. این سوسپانسیون‌های باکتری به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد و ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با

جدول ۱- بررسی میزان تولید سیدروفور سویه‌های باکتری به روش‌های کمی اسپکتروفتومتری، نیمه کمی CAS-AD و کیفی CAS-Agar

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

۳- روش اسپکتروفتومتری: در این روش به صورت

اختصاصی، مقدار تولید سیدروفور نوع پایورددین قابل ارزیابی است. نتایج به دست آمده از میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد پایورددین خالص به میکرومول برلیتر تبدیل شد. از بین سویه‌های مورد آزمایش سویه 7NSK2 با

تولید ۶۲۵/۲۹ مول برلیتر پایورددین بیشترین مقدار تولید را داشت و از لحاظ آماری با سایر سویه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد. به دنبال آن UTPF81، UTPF87 و UTPF61 به ترتیب با تولید ۵۹۰، ۵۷۸/۲۳ و ۴۹۸/۸۲ میکرومول درلیتر در گروه بعدی قرار گرفتند. همان‌طور که انتظار می‌رفت موتانت MPFM1 فاقد توانایی تولید

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 عصاره خارج سلولی آنها برای اندازه‌گیری سیدروفور استفاده می‌شود (۱۵). در این روش میزان تولید سیدروفور تمام میکروارگانیسم‌های قابل کشت قابل اندازه‌گیری است. همچنین به صورت هم‌زمان می‌توان میزان تولید سیدروفور میکروارگانیسم‌های متفاوت را با هم مقایسه کرد. داده‌های به دست آمده از این روش با استفاده از سیدروفور تجاری دسفرال قابل کمی‌سازی است.

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

پایوردین بود. سویه باسیلوس مورد استفاده در این آزمایش نیز در ۴۰۰ نانومتر پیک جذبی نداشت. سویه UTPF93 که در روش CAS-Agar سیدروفور تولید نکرده بود، قادر به تولید سیدروفور نوع پایوردین بود و توانست به میزان ۱۴۰ میکرومول برلیتر پایوردین تولید کند.

سویه 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 به صورت اختصاصی فقط قادر به تعیین کمیت سیدروفور نوع پایوردین است؛ چرا که سیدروفورهای مختلف طول موج‌های متفاوتی دارند؛ بنابراین می‌توان چنین فرض کرد که سویه ذکر شده علاوه بر پایوردین قادر است سیدروفورهای دیگری را در حجم بالا تولید کند که عامل گسترش هاله نارنجی در محیط CAS-آگار هستند.

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

بحث و نتیجه‌گیری

روش قدیمی تشخیص میکروارگانیسم‌های تولیدکننده سیدروفور که شاون و نیلند (۹) معرفی کرده بودند به علت وجود ماده HDTMA مانع رشد باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌ها می‌شد (۱۷). روش تغییر یافته 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

References

- اندازه‌گیری دقیق آن به صورت مجزا می‌تواند در مشخص کردن توان سویه باکتری در فراهم کردن آهن مورد نیاز گیاه و کنترل رقابتی بیمارگرها استفاده شود. خاصیت فلورسنت سیدروفور در طول موج ۴۰۰ نانومتر امکان ارزیابی کمی آن با روش اسپکتروفتومتری را فراهم کرده است (۲۲)؛ علاوه بر این، اختلاف بین داده‌های به دست آمده از روش اسپکتروفتومتری با روش CAS-AD به شرط یکسان بودن شرایط کشت می‌تواند نشان‌دهنده میزان تولید سیدروفورهای غیر از پایووردین توسط سویه باکتری باشد. همان‌طور که برای سویه UTPF76 شرح داده شد، در مورد سویه 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 رتبه اول قرار گرفته؛ اما در روش CAS-AD که تولید همه سیدروفورها را اندازه‌گیری می‌کند در گروه با تولید متوسط قرار می‌گیرد. میزان تولید سیدروفورهای غیر از پایووردین توسط سویه MPFM1 نیز گواه این مطلب است. در مجموع می‌توان روش CAS-AD را به عنوان بهترین روش برای اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور کل سویه‌ها و روش اسپکتروفتومتری را به عنوان روش مناسب برای اندازه‌گیری تولید سیدروفور نوع پایووردین ارائه داد.
- (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. Pyoverdinin 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., Videia 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